



Année Universitaire : 2014-2015

***Filière ingénieurs
Industries Agricoles et Alimentaires***



Projet de Fin d'étude

Contribution au développement d'une procédure sensible et efficace de décontamination des fruits secs d'origine marocaine (Amandes décortiquées)

Réalisé par:

AZARFANE Karima

Encadré par:

- **Mr. Mohammed BOUKSAIM (INRA)**
- **Pr. Adiba KANDRI RODI (FST Fès)**

Présenté le 29 juin 2015 devant le jury composé de:

- **Mr. Mohammed BOUKSAIM (INRA-Rabat)**
- **Pr : Adiba KANDRI RODI (FST Fès)**
- **Pr : J. ALFIGUIGUI (FST Fès)**
- **Pr : H. TOUZANI (FST Fès)**

Stage effectué à : L'INRA- Rabat



Filière Ingénieurs
Industries Agricoles et Alimentaires



Résumé

Nom et prénom : AZARFANE Karima

Année Universitaire : 2014-2015

Titre : Contribution au développement d'une procédure sensible et efficace de décontaminations des fruits secs d'origine marocaine « Amandes décortiquées ».

Le présent travail effectué à pour but de trouver une méthode de décontamination convenable et efficace des amandes commercialisées dans les marchés marocains après avoir évalué la qualité hygiénique et microbiologique qui a pour but de caractériser la flore bactérienne et fongique qui peuvent contaminer notre produit. Afin de réussir ces objectifs, 22 échantillons ont été prélevés de deux différentes régions du Maroc de point de vue conditions climatiques.

Les analyses bactériologiques ont été très satisfaisantes car tous les résultats trouvés ont été largement en deçà de la norme décrite selon le codex alimentarius, par contre sur le plan mycologique 74 isolats ont été déterminés à partir de 22 échantillons d'amandes décortiquées. L'identification des isolats a révélé qu'ils appartiennent à 5 genres différents: *Aspergillus* (54%), *Penicillium* (31%), *Mucor* (8%), Mycélium (4%) et *Rhizopus* avec (3%).

La détection de l'aflatoxine B1, par CCM a mis en évidence la contamination de 2 échantillons sur cinq.

La méthode de décontamination optimisée a conduit à des résultats bien encourageants puisque le taux d'inhibition des moisissures a pu atteindre un pourcentage de 100%.

Mots clés : Décontamination, amande, moisissures toxigènes, aflatoxine, CCM, *Aspergillus*.

Introduction

Les maladies d'origine alimentaire constituent à l'heure actuelle l'un des problèmes de santé publique les plus répandus à l'échelle internationale. Leurs répercussions sur la santé et sur l'économie mondiale sont de plus en plus largement reconnues. Ces maladies sont causées par divers agents en particulier les microorganismes pathogènes.

En plus des virus et des bactéries pathogènes, les champignons toxigènes constituent un danger réel pour la santé de l'homme et de l'animal par la sécrétion des substances hautement toxiques au cours de leur prolifération sur ou dans les aliments d'origine végétale ou animale.

Certaines techniques traditionnelles pour la transformation et la conservation des aliments - encore utilisées à travers le monde, notamment au Maroc- constituent un environnement optimal pour le développement des microorganismes pathogènes qui peuvent engendrer des risques sanitaires graves.

Vu ces problèmes ainsi que les pertes économiques causées par la contamination des cultures, un grand intérêt est actuellement attribué à travers le monde aux différents substances qui peuvent être sécrétées par plusieurs microorganismes, pour que chaque pays ou chaque région se doive adopter une législation spécifique pour chaque aliment susceptible d'héberger des moisissures toxigènes dans le but de cerner les problèmes engendrés à long terme par ces substances.

Notre présente étude s'inscrit dans cette optique. Elle illustre la démarche suivie pour la contribution au développement d'une procédure de décontamination efficace et sensible des amandes décortiquées consommées au Maroc.

Nous avons choisi de travailler sur les amandes, étant donné que les fruits secs en général sont parmi les éléments liés aux habitudes de consommation de la population marocaine, qu'ils soient directement utilisés ou sous forme d'ingrédients dans des préparations traditionnelles pendant les festivités. Cependant, peu d'informations microbiologiques sur la qualité de ces produits sont disponibles.

Le document suivant comporte trois parties :

- La première donne une présentation du secteur amandier, les risques liés à la consommation de cette denrée ainsi que certaines méthodes de décontamination.

- La deuxième partie du rapport est consacrée à la description de la méthodologie suivie pour effectuer les différentes analyses au sein de l'INRA.
- La dernière partie représente la discussion et l'interprétation des différents résultats obtenus.

***Partie 1 : Présentation de l'organisme
d'accueil et étude bibliographique***

I. Présentation de l'INRA :

L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), est un établissement public dont les origines remontent à 1914 avec la création des premiers services de la recherche agricole officiel. Il a connu dernièrement une réorganisation structurelle visant la modernisation de son processus de gestion.

L'INRA opère à travers dix centres régionaux de la recherche agronomique et 23 domaines expérimentaux répartis sur le territoire national et couvrant les divers agro systèmes du pays.

L'INRA vise à :

- Analyser la demande sociale et les systèmes de production ;
- Améliorer la productivité, la compétitivité et la durabilité de la production agricole;
- Caractériser, préserver et valoriser les ressources naturelles ;
- Améliorer la qualité, valoriser et diversifier les productions végétales et animales.

Le centre régional de la recherche agronomique rabat (CRRA) mène ses activités de recherche dans les domaines prioritaires tels que :

- Environnementale et la conservation des ressources naturelles ;
- Protection des plantes ;
- Production animale et les fourrages ;
- Biotechnologie ;
- Technologie Agro -Alimentaire et qualité ;
- Amélioration des plantes, conservation et valorisation des ressources phylogénétiques.

L'unité d'accueil au sein du centre de Rabat notamment celle de la technologie alimentaire a pour mission principale de mener des activités de recherche pour la valorisation des produits agricoles d'intérêt et la maîtrise de la qualité et de la sécurité sanitaire des produits alimentaires.

- Organigramme de l'INRA

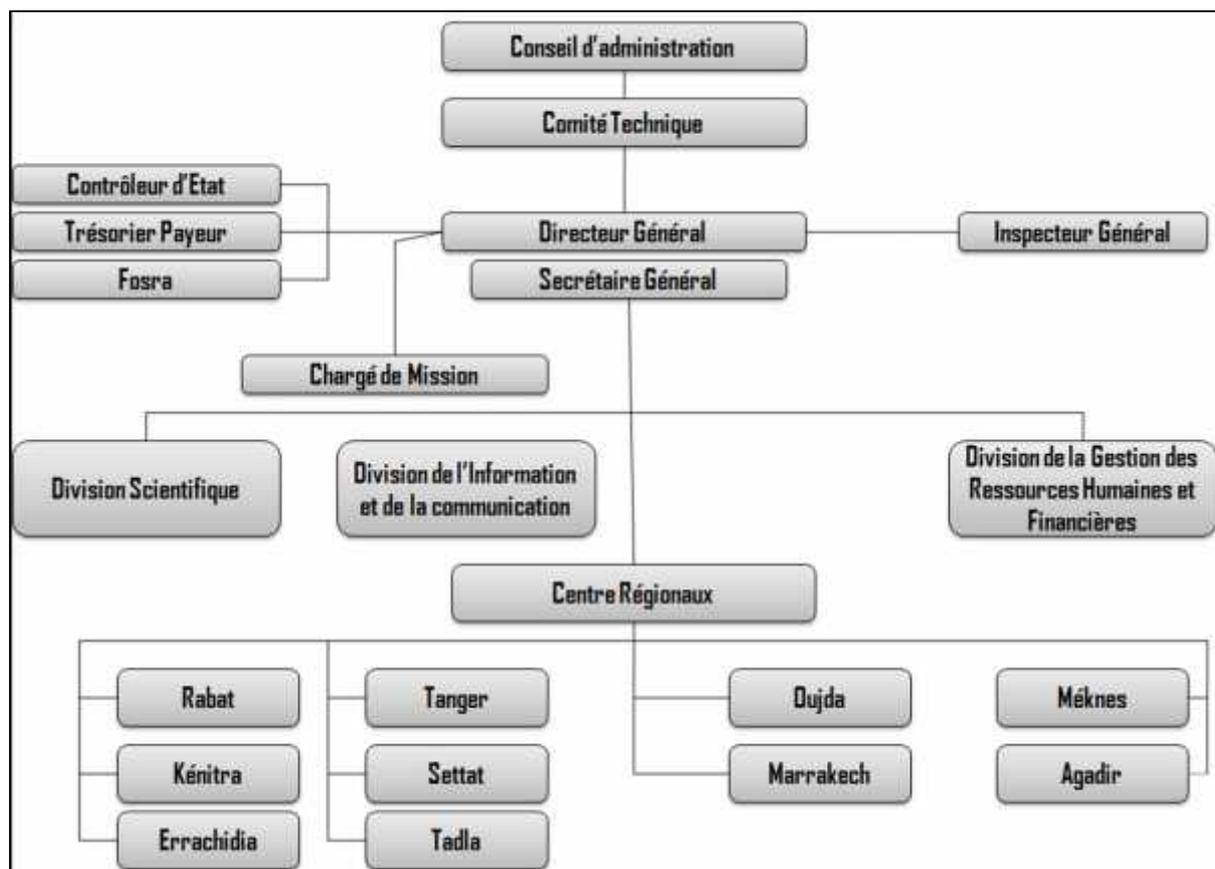


Figure 1: Présentation de l'organigramme de l'INRA

II. Généralité sur le secteur des fruits à coque :

Le secteur des fruits à coque comprend essentiellement les amandes, les noisettes et les noix communes. Toutefois il s'étend aussi aux pistaches, pignons et quelques autres fruits à coque, mais ces dernières catégories ne revêtent d'importance sur le plan de la production.

Selon la Commission Européenne (2013), la production des amandes, des noisettes et des noix communes s'élève dans la Communauté à plus de 660.000 tonnes pour une production mondiale de 2.000.000 tonnes dont 60 % pour les amandes, 23 % pour les noisettes et 17 % pour les noix.

1. Le secteur Amandier :

1.1 Importance :

L'amandier est l'arbre fruitier le plus durable, cependant sa production s'épuise rapidement. Il s'agit du premier arbre fruitier à fleurir à la fin de l'hiver. L'amandier s'adapte bien aux conditions méditerranéennes sèches et présente une bonne opportunité de valorisation des

terrains marginaux. En plus de son intérêt économique incontestable, l'amandier est d'un intérêt reconnu dans la mise en valeur des écosystèmes fragiles en matière de fixation des sols et d'embellissement du paysage (MAPM, 2013).

1.2. Situation du secteur des amandes au niveau mondial :

a. Production mondiale des amandes :

La production mondiale des amandes a atteint environ 1,24 million de tonnes (Planetoscope, 2015). En ce qui concerne le classement des pays producteurs on trouve l'USA en premier rang avec un pourcentage qui dépasse les 80% suivie par l'Australie, l'Espagne et le Maroc qui vient en neuvième rang (figure2) (ALMOND ALMANAC, 2013).

Forecasted World Almond Production 2013/14 (in millions of lbs.)				
Country	Beginning Stock	Crop	Total Supply	Ending Stock
USA	317.2	1,850.0	2,167.2	261.7
Australia	2.2	152.1	154.3	0.0
Spain	4.4	70.5	75.0	2.2
Turkey	0.0	33.1	33.1	0.0
Iran	0.0	33.1	33.1	0.0
Tunisia	3.5	20.7	24.2	1.1
Greece	2.2	11.0	13.2	0.0
Chile	0.0	22.0	22.0	0.0
Morocco	1.1	13.2	14.3	0.0
Italy	1.1	11.0	12.1	0.0
Others	0.0	66.1	66.1	0.0
World Total	331.7	2,290.9	2,622.6	265.0

Sources: Almond Board of California and NC, The Gracker 2013.

Figure 2:Présentation de la production mondiale des amandes en 2013

b. Consommation mondiale des amandes :

La consommation des amandes n'est pas très répandue à l'échelle internationale. Néanmoins, il existe deux grands bassins de consommation en Europe et aux USA. Sur ces deux marchés, une partie importante des amandes est transformée et utilisée par l'agro-industrie notamment dans les secteurs de la confiserie, de la boulangerie et la restauration (MAPA, 2013).

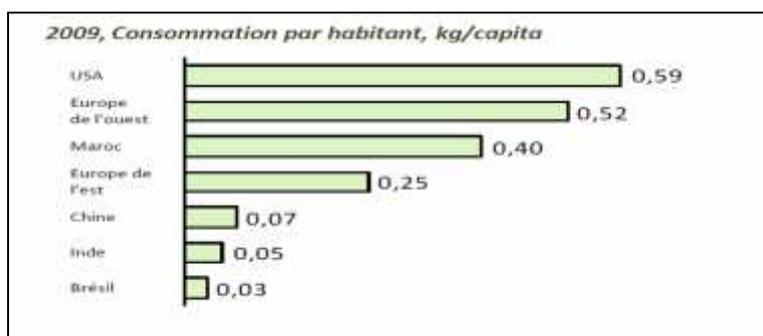


Figure 3: Distribution de la consommation mondiale des amandes par habitant en 2013

1.3 Présentation du secteur amandier au Maroc:

L'amandier, après l'olivier, est l'espèce fruitière qui occupe le plus de superficie au Maroc. La superficie d'amande avoisine 151kha en 2012 contre 134kha en 2008, ce qui représente un accroissement de 13% sur la période.

En termes de production, la filière amande a connu une nette croissance passant de 72kT en 2008 à 99kT en 2012 (MAPM, 2013).

a. Production nationale :

Au niveau régional, plus de 50% de la superficie de l'amandier est concentrée sur les régions de Taza, Al Houceima, Taounate et de Souss Massa Draa mais ces deux régions ne représentent qu'un tiers de la production.

Avec 6% de la superficie productive d'amandier, Fès et Meknès totalisent près de 30% de la production nationale en 2012 (MAPM, 2013).

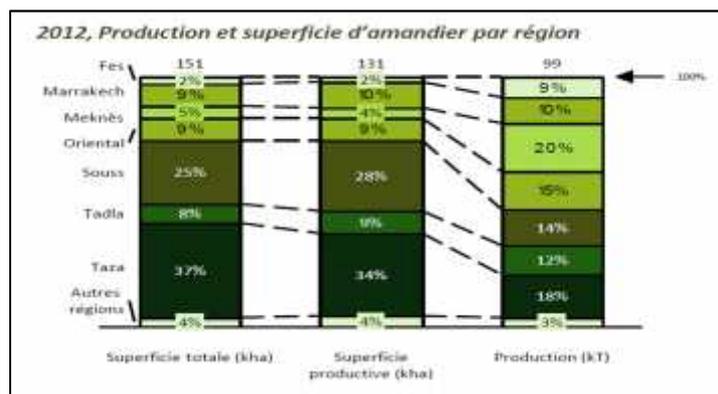


Figure 4: Production et superficie d'amandier à l'échelle nationale

b. Commercialisation sur le marché local :

La filière est caractérisée par une offre très dispersée, eu égard au fait que 80% des exploitations couvrent des superficies de moins d'un hectare. Cette situation influe fortement sur les modes de commercialisation et les volumes mis sur le marché (MAPM, 2013).

Les collecteurs opèrent dans les souks hebdomadaires des régions de production de l'amande.

Collecteurs - - - ➔ Grossistes - - - ➔ Semi grossistes - - - ➔ Détaillants

1.4 Composition et bienfaits:

Par sa richesse en éléments nutritifs, l'amande est un aliment énergétique important de notre alimentation. Très riche en huile, protéines, glucides et vitamines, environ 50 % de lipides, en majorité des acides gras, soit en moyenne : 60-75 % d'acide oléique, 18 % d'acide linoléique et 7 % d'acide palmitique répondant aux recommandations nutritionnelles actuelles. La présence d'alpha-tocophérol (25-26 mg/100 g d'amande sèche) est un excellent apport d'antioxydant alimentaire. Par ailleurs, la teneur en sodium de l'amande étant très faible (1-2 mg/100 g), le rapport potassium/sodium est compris entre 360 et 900 ce qui est exceptionnel pour un aliment naturel. Ceci peut être utile dans le traitement des régimes hyposodés. La consommation d'amande n'entraîne pas de prise de poids et est bénéfique chez les hypercholestérolémiantes (Tessier, 2014).

III. La qualité microbiologique et risques sanitaires liés à la consommation des fruits à coque :

Avec l'évolution de la société, le consommateur est devenu plus soucieux de sa sécurité alimentaire, et il demande à être protégé de mieux en mieux contre les risques de contamination. Tandis que les professionnels de l'agro-industrie prennent des mesures de plus en plus strictes pour garantir l'innocuité des aliments, les pouvoirs publics mettent également en place des normes de plus en plus sévères pour prévenir au mieux les risques sanitaires (Zinedine, 2008).

La qualité microbienne des aliments est fortement influencée par des facteurs chimiques, physiques, biologiques et environnementaux. Elle est liée aussi aux conditions de culture, de récolte, de manutention, de transport, d'entreposage des récoltes ainsi aux conditions de commercialisation. En effet, certains paramètres physiques peuvent affecter la croissance et l'activité métabolique des micro-organismes, entre autres, la température, le pH et l'humidité. Les facteurs chimiques comprennent la disponibilité des nutriments et des oligo-éléments nécessaires à la croissance microbienne, tandis que les facteurs biologiques incluent la présence d'une flore concurrente (Gorny, 2006).

1. L'influence de la contamination sur la qualité des aliments :

Les micro-organismes présents dans les denrées alimentaires peuvent provoquer des modifications organoleptiques et altérer les qualités marchandes des produits, ou constituer un danger pour la santé publique en raison de leur pouvoir pathogène pour l'homme. L'examen microbiologique est un outil incontournable d'évaluation du niveau de contamination des denrées alimentaires et de la nature de leur microflore. Il est très largement utilisé dans le cadre du contrôle officiel ainsi que des autocontrôles mis en œuvre par les industriels pour garantir la salubrité des denrées qu'ils commercialisent. La mise en place progressive des principes de l'assurance-sécurité dans l'ensemble de l'industrie agro-alimentaire et l'évolution récente du cadre réglementaire conduisent cependant à s'interroger sur l'intérêt réel des examens microbiologiques de denrées. Il s'avère nécessaire de prendre en compte les principes techniques de tels examens et les limites de leur emploi, pour optimiser leur utilisation dans ce contexte et parvenir à garantir la protection de la santé du consommateur (Bornet, 2000).

Les fruits à coque (tels que les pignons bruts, les amandes, les noix de coco séchées) peuvent être vecteurs d'agents pathogènes d'origine alimentaire, ils ont notamment provoqué des épidémies de maladies d'origine alimentaire. Ces contaminations sont soit d'origine bactérienne ou encore d'origine fongique, par la sécrétion des mycotoxines (Linda, 2012).

2. Les différents microorganismes responsables de la contamination des fruits à coque :

Les micro-organismes ont une propriété importante et remarquable : ils sont capables de se reproduire. Ainsi, lorsque les conditions sont favorables à cette reproduction, ce qui est souvent le cas pour les micro-organismes des produits naturels et alimentaires, la biocontamination s'autoamplifie. Le risque d'altération et d'intoxication éventuelle associé à ce phénomène nécessite sa maîtrise (Leveau *et al.*, 2001).

a. Bactéries :

Omniprésentes dans l'environnement et dans l'organisme humain, les bactéries occupent une place prépondérante dans les préoccupations de l'hygiéniste.

Le sol constitue un très important réservoir naturel de bactéries. On peut y distinguer des espèces naturellement présentes et d'autres provenant de contaminations, notamment par les déjections des animaux (Leveau *et al.*, 2001).

Bien que les fruits à coque soient trop secs pour permettre une croissance bactérienne, il est cependant de plus en plus reconnu que de nombreux agents pathogènes d'origine alimentaire, y compris *Salmonella* et *EHEC*, peuvent causer une maladie lorsqu'ils sont présents même à de très faibles niveaux, à savoir que la croissance microbienne n'est pas nécessaire pour qu'une maladie se produise. En outre, une fois les agents pathogènes ingérés, la forte teneur en matières grasses présente dans les fruits à coque peut protéger ces mêmes agents pathogènes des acides gastriques permettant le passage des micro-organismes viables à l'intestin (Linda, 2012).

Le fait de reconnaître les fruits à coque comme une source potentielle d'agents pathogènes d'origine alimentaire et de maladies humaines est relativement récente (Linda, 2012).

b. Moisissures :

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme.

Le développement normal d'une moisissure comprend une phase végétative de croissance et de nutrition, et presque simultanément, une phase reproductive au cours de laquelle se forment des spores qui assurent la dissémination. La germination des spores est à l'origine de la forme végétative (Roquebert, 1997). Les moisissures absorbent les éléments nutritifs via les hyphes et les intègrent dans les réactions de synthèses et de dégradation du métabolisme permettant leur croissance dit : primaire (Demain, 1981).

Les conditions de développement des moisissures ont fait l'objet de plusieurs études (Pitt et Christian, 1968; Christensen *et al.*, 1973 ; Rheeder *et al.*, 1992 ; Pitt et Miscamble, 1995).

L'ensemble de ces travaux antérieurs attestent que les moisissures sont des organismes très peu exigeant du point de vue éléments nutritifs (Roquebert, 1997). Cependant, les facteurs physiques de l'environnement constituent un élément déterminant pour la germination des spores et la croissance des moisissures. En tête de liste de ces facteurs se trouve l'humidité (Roquebert, 1997).

La contamination fongique des fruits secs, destinés à l'alimentation humaine, est le principal dommage qui va entraîner de nombreux problèmes. Ainsi, la présence indésirable des moisissures modifie l'aspect des produits alimentaires, dû notamment à la production de pigments, comme par exemple un pigment foncé, la mélanine (Bulter et Day, 1998).

L'apparition de mycoses et d'allergies chez l'homme peut résulter de l'ingestion des denrées contaminées par des moisissures (Krogh, 1987).

Selon Zinedine (2008), les moisissures responsables de l'altération des graines sont réparties en deux groupes écologiques :

- Les moisissures du champ : *Alternaria* et *Fusarium*
- Les moisissures de stockage : *Aspergillus* et *Penicillium*

c. Mycotoxine :

Parmi la multitude de contaminants connus à nos jours, les mycotoxines sont des substances naturelles produites par un métabolisme secondaire des moisissures et exercent un pouvoir toxique réel pour le consommateur (homme et animal) une fois introduites même en faibles concentrations (Steyn, 1998).

Actuellement, il existe plus de 300 métabolites secondaires fongiques recensés mais seule une trentaine posséderait des caractéristiques toxiques préoccupantes (Pfohl-Leszkowicz, 1999). La même toxine peut être élaborée par diverses espèces fongiques mais pas obligatoirement par toutes les souches appartenant à une même espèce (Zinedine, 2008).

Les champignons majeurs connus comme précurseurs de l'OTA et de l'AFB1 qui sont impliqués dans la chaîne alimentaire humaine et animale, appartiennent principalement aux genres : *Aspergillus* et *Penicillium* (Delage *et al.*, 2003 ; Lopez De Cerain *et al.*, 2002 ; Filali *et al.*, 2001 ; Otteneder et Majerus, 2000).

3. La normalisation :

Vu les problèmes sanitaires et les pertes économiques causés par la contamination des cultures, un grand intérêt est actuellement attribué à travers le monde afin de minimiser les risques sanitaires liés à la consommation des fruits à coque dans le but de cerner les problèmes engendrés à long terme par ces microorganismes.

Le codex alimentarius a mis en place des normes sévères pour prévenir au mieux ces risques sanitaires. Le tableau suivant présente l'ensemble des normes microbiologiques qui doivent être respecté durant toute la période d'entreposage des amandes.

Tableau 1: Normes microbiologiques des amandes décortiquées.

<i>Critères microbiologiques</i>		<i>Fonction</i>	<i>Seuil</i>
Bactéries	Flore aérobie mésophile	Indicateur de contamination générale	< 10 000 UFC/g
	Entérobactéries (coliformes)	Indicateur de contamination d'origine fécale	< 100 UFC/g
	Salmonelles	Indicateur d'une contamination croisée	Absence dans 25g
Levures et moisissures	Levures	Indicateur du niveau d'altération du produit (conditions de conservation et qualité gustative)	Absence des souches toxigènes
	Moisissures	Les moisissures sont la source de développement d'aflatoxine	
Mycotoxines	aflatoxines B1 (la plus toxique)	Indicateur de mauvaises conditions de stockage	< 2µg/kg
	aflatoxine B1, B2, G1, G2	Indicateur de mauvaises conditions de stockage	< 4µg/kg

IV. Méthodes de décontamination :

Comme la présence des moisissures dans les récoltes est un phénomène naturel, il serait impossible d'éliminer toute trace de mycotoxines des produits alimentaires.

Cependant, il est possible de minimiser la contamination en prenant des précautions au niveau de l'entreposage et la manutention des récoltes après la moisson et en inspectant rigoureusement les produits avant la mise sur le marché. La réduction des taux des mycotoxines relève à la fois du rôle des agriculteurs, des commerçants et des industriels (Zinedine, 2008).

D'un point de vue pratique, la meilleure approche pour éliminer les mycotoxines des aliments est d'empêcher la croissance de moisissures à tous les niveaux de la production, la récolte, le transport et le stockage (Drush et Ragab, 2003).

1. La lutte chimique :

Certains produits chimiques fongicides, bactéricides et insecticides sont autorisés par la loi dans le but d'éliminer les agents pathogènes. Le fludioxonil et le thiram sont utilisés par exemple pour traiter les semences contre les maladies dues à *Fusarium spp*, à *Rhizoctonia spp*, à *Aspergillus spp*, et à *Penicillium spp* (AAC, 2012).

Mais ces méthodes ne sont pas toujours satisfaisantes, car elles conduisent à des altérations de qualité du produit ainsi qu'au fameux problème des résidus chimiques toxiques qui provoque plusieurs maladies graves (Patharajan *et al.*, 2011).

2. La lutte biologique :

Une étude de synthèse fait le point sur ces méthodes biologiques de décontamination. Des microorganismes (bactéries, levures, champignons) ou leurs enzymes peuvent détoxifier les mycotoxines, soit par biodégradation, soit par des mécanismes d'adsorption. Cependant, la non-pathogénicité des microorganismes utilisés et la non-toxicité des produits de réaction formés sont essentielles. C'est pourquoi l'utilisation de microorganismes - déjà largement employés dans l'industrie alimentaire comme les bactéries lactiques ou la levure *Saccharomyces cerevisiae* - présente de grands avantages, ou encore l'utilisation de certains produits naturels et biologiques qui possèdent l'activité antifongique telles que les huiles essentielles (Abrunhosa *et al.*, 2010).

- Décontamination par les huiles essentielles

Les huiles essentielles ainsi que des composés dérivés possèdent d'importantes activités dont l'activité antimicrobienne est la plus étudiée (Hammer *et al.*, 2003; Yehouenou *et al.*, 2010). L'utilisation des huiles essentielles, en tant qu'agents antimicrobiens présente deux avantages principaux: le premier est leur origine naturelle, qui signifie plus de sécurité pour la population et l'environnement, et la seconde est qu'elles ont été considérées à faible risque de développement de la résistance par des microorganismes pathogènes (Tatsadjieu *et al.*, 2010).

- Bio-décontamination par les bactéries lactiques

La bio-décontamination consiste à ajouter à un aliment une culture simple ou mixte de microorganismes, en vue d'augmenter sa durée de consommation et de lutter contre les pathogènes (Stiles, 1996, Rosss *et al.*, 2002). Ces microorganismes sont dits GRAS (Generally Recognized as safe) aux États-Unis et QPS (Qualified presumption of safety ou présomption de sécurité qualifiée) en Europe (Pawlowska *et al.*, 2012). Pour être applicable

dans les produits alimentaires, ils doivent être incapables de provoquer chez le consommateur des affections (Ström *et al.*, 2005).

Les bactéries lactiques par leurs utilisations en alimentaire humaine, sont considérées comme non pathogènes et GRAS (Bouksaim *et al.*, 2000, Jamaly *et al.*, 2011), ne présentent pas de problème de sécurité sanitaire, elles possèdent une activité antifongique très importante en occupant la niche écologique et en entrant en compétition avec les moisissures toxigènes. Elles peuvent également produire des métabolites qui inhibent les pathogènes ou dégrader les toxines produites par ceux-ci.

3. La lutte physique (irradiation) :

L'irradiation des fruits secs, peut réduire de façon significative la contamination fongique (Aziz et Moussa, 2002).

Les échantillons suspects, comme le maïs et les fruits secs, sont inspectés sous une lampe UV à grandes ondes. La fluorescence caractéristique sous la lumière ultraviolette (à 365 nm) est associée à la présence d'acide kojique formé par les champignons produisant de l'aflatoxine comme l'*A. flavus* ou l'*A. parasiticus*. Le test BGYF (fluorescence jaune verdâtre brillante) indique la croissance des champignons qui peut avoir résulté en la production d'aflatoxines (Aksoy *et al.*, 2001).

4. Le séchage et le stockage sous une atmosphère contrôlée :

Les amandes décortiquées doivent être conditionnées de façon à assurer une protection convenable du produit (NORME CEE-ONU DDP-06).

C'est pour cette raison que les contrôles environnementaux tels que la basse température et une faible activité d'eau sont des mesures essentielles pour maintenir la bonne qualité des amandes. Le contrôle de l'humidité est obtenu généralement par un séchage rapide est un stockage correct. La désinfection de la surface, l'utilisation des bonnes semences, ainsi que l'application d'un traitement de fumigation sont des moyens efficaces contre la contamination.

Partie 2 : Matériel et Méthodes

I. Echantillonnage :

Vingt-deux échantillons d'amandes, commercialisées au Maroc, ont été prélevées sur les points de vente des deux villes Temara et Fès. L'échantillonnage a été effectué chez différents fournisseurs de telle sorte que les échantillons prélevés soient de différentes origines et ceci dans le but d'avoir une hétérogénéité des prélèvements. Tous ces échantillons ont été transportés au laboratoire de l'INRA pour l'analyse microbiologique.

Le tableau suivant résume la répartition géographique des différents échantillons collectés.

Tableau 2: Nombre des échantillons des amandes prélevées des deux régions du Maroc

La ville	Quartier	Nombre d'échantillon
Fès	Bensouda	2
	Oued fes	3
	Ben debab	2
	Enarjiss	2
	Centre ville	2
Temara	Temara centre	2
	Gich l'oudaya	4
	E-Nahda	2
	EL Massira1	1
	EL Massira2	2
Total		22

L'ensemble des échantillons prélevés sont présentés dans le tableau3, afin de faciliter l'ensemble des analyses nous avons données un code pour chaque échantillon.

Tableau 3: Répartition des échantillons des amandes collectés.

<i>Code échantillon</i>	<i>Provenance</i>		<i>date</i>	<i>Etat du produit</i>
	Ville	Région		
F1	FES	Bensouda	16/02/2015	Beldi
F2	FES	Bensouda	02/03/2015	Beldi
F3	FES	Oued fes	16/02/2015	Beldi
F4	FES	Oued fes	02/03/2015	Beldi
F5	FES	Oued fes	02/03/2015	Beldi
F6	FES	Bendabab	16/02/2015	Beldi
F7	FES	Bendabab	02/03/2015	Roumi

F8	FES	Enarjiss	16/02/2015	Beldi
F9	FES	Enarjiss	02/03/2015	Beldi
F10	FES	Centre ville	16/02/2015	Beldi
F11	FES	Centre ville	02/03/2015	Roumi
T1	Temara	Temara centre	23/03/2015	Beldi
T2	Temara	Temara centre	06/04/2015	Beldi
T3	Temara	Gich l'oudaya	23/03/2015	Beldi
T4	Temara	Gich l'oudaya	06/04/2015	Beldi
T5	Temara	Gich l'oudaya	23/03/2015	Beldi
T6	Temara	Gich l'oudaya	27/04/2015	Beldi
T7	Temara	E-nahda	23/03/2015	Beldi
T8	Temara	E-nahda	06/04/2015	Beldi
T9	Temara	El massira1	23/03/2015	Beldi
T10	Temara	El massira2	06/04/2015	Beldi
T11	Temara	El massira2	23/03/2015	Beldi

Cette étude vise à apporter une comparaison entre le degré de contamination des amandes commercialisées dans les régions humides avec celles commercialisées dans les régions sèches.

Pour notre travail, nous avons acheté des échantillons de 200g, chaque prélèvement à analyser est placé dans un sachet stérile, qui offre une protection adéquate contre la contamination, étiqueté et codé (Conformément aux règlements N.40/2006 et N. 178/ 2010 de la commission Européenne).

II. Les analyses bactériologiques :

Dans cette étude nous avons utilisé la technique de dénombrement sur gélose avec des milieux de cultures spécifiques et sélectifs afin de détecter la présence ou non de certains microorganismes pathogènes dans le but de vérifier l'innocuité et la salubrité de notre échantillon à analyser.

Durant toute la période des analyses nous avons stocké les échantillons à température ambiante et à l'abri de la lumière, dans une durée qui ne dépasse pas les 36heures pour éviter toute modification de la microflore initiale (Bornert, 2000).

1. Préparation des échantillons :

Nos échantillons sont broyés via un broyeur mécanique afin de faciliter leur mise en suspension dans une solution revivifiante d'eau peptonée tamponnée en introduisant 25g d'échantillon dans 225ml d'EPT, puis l'ensemble est bien homogénéisé. Ensuite, la suspension est laissée 5 à 10 minutes à la température du laboratoire (20°C) avant d'effectuer les dilutions et d'ensemencer les milieux.

2. Préparation de la série de dilution :

Les dilutions des échantillons sont effectuées à l'aide d'une solution de revivification: eau peptonée tamponnée [Merck].Elles sont effectuées selon des séries logarithmiques dont les termes sont en progression géométrique à savoir : 0,1 (10^{-1}), 0,01 (10^{-2}), 0,001 (10^{-3}), 0,0001 (10^{-4}), dans des conditions aseptiques. Nous préparons autant de tubes qu'il y a de dilutions à réaliser en prenant des tubes stériles dans lesquels nous pipetons aseptiquement 9 ml de liquide diluant.

Le liquide diluant utilisé est l'EPT qui est un milieu d'enrichissement pour la majorité des bactéries. Ensuite, 1ml de la suspension de l'échantillon (suspension de départ ou suspension mère 10^{-1}) est prélevé à l'aide d'une micropipette de 1 ml et nous le portons dans le premier tube de dilution (10^{-2}). Avec un nouveau cône de 1 ml, le contenu de ce tube 10^{-2} est homogénéisé à l'aide d'un vortex et le tube 10^{-3} ensemencé et ainsi de suite en changeant à chaque fois le cône pour ne pas perturber les dilutions (figure 5).

Nous préparons aussi un tube dit témoin pour confirmer que notre diluant est stérile.

Le but de cette préparation est de calculer la concentration bactérienne dans notre produit à analyser.

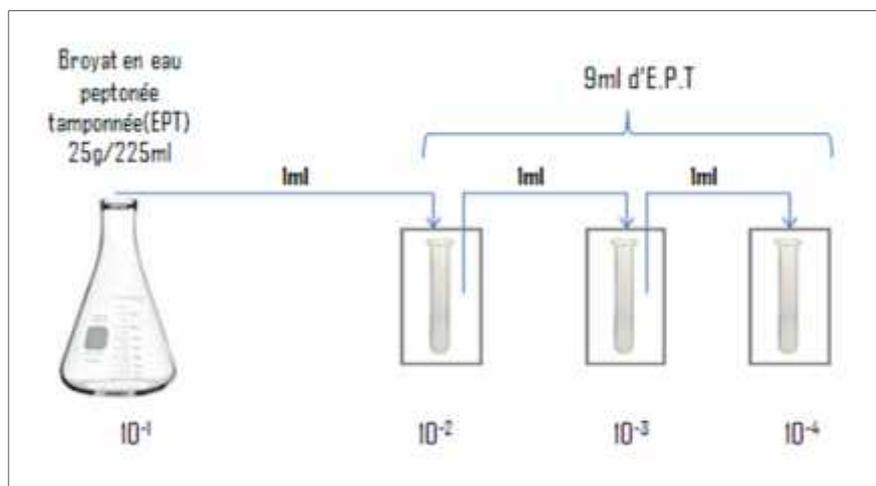


Figure 5: Méthode de la préparation de la série de dilution

3. Principe de la méthode d'ensemencement:

La méthode d'ensemencement sur la gélose consiste à dénombrer ou détecter les microorganismes viables présents dans une portion d'échantillon, c'est-à-dire, ceux qui ont la capacité de se développer sur les milieux de culture utilisés et ce, aux conditions de croissance fournies (Température, oxygène, durée d'incubation, etc.)

4. Composition et préparation des milieux de culture :(Voir annexe 1)

5. Les méthodes de recherche des différents microorganismes :

5.1 La recherche de la Flore Mésophile Aérobie Totale(FMAT) :

La FMAT est un indicateur d'hygiène important (sanitaire). En effet, elle permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant colonie) présent dans un aliment. Ce dénombrement se fait à 37°C ce qui permet de dénombrer la majorité des microorganismes qui peuvent se développer sur la matrice alimentaire.

Le dénombrement s'effectue sur un milieu ordinaire PCA par la méthode d'incorporation à la gélose appelée aussi dénombrement en masse, qui consiste sur le prélèvement d'un ml de chaque dilution déjà préparée dans des conditions d'asepsie, et les mettre dans des boites de pétri stériles, à laquelle est ajoutée le milieu de culture PCA, maintenu liquéfié à environ 45°C. Les boîtes de Pétri sont ensuite agitées doucement afin de répartir uniformément les bactéries dans tout le volume du milieu disponible, et qui sont ensuite laissées enlever à refroidir sur une surface au niveau et incubées à une température de 37°C pendant 24h.

Le dénombrement se fait par un simple comptage des colonies.

5.2 La recherche des coliformes :

Les coliformes sont dénombrés car ils sont un bon marqueur de la qualité hygiénique. Le dénombrement et l'isolement des coliformes s'effectuent sur un milieu glucosé inhibant la croissance des bactéries Gram (+) et de la plupart des autres bactéries Gram (-). Le milieu le plus courant pour l'analyse alimentaire est la gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre(VRBL). La bile et les colorants sont des agents sélectifs et le glucose permet la croissance de toutes les entérobactéries. Différents types d'ensemencement existent. Ici nous utiliserons l'inoculation dans la masse, c'est-à-dire l'incorporation à la gélose.

Après 24 heures à 48 heures d'incubation à 37°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux (thermotolérants), les colonies se développeront en profondeur.

Le comptage des colonies rouges, d'au moins 0,5 mm de diamètre, donne le nombre d'entérobactéries par UFC.

5.3 La recherche des germes pathogènes (Salmonelles) :

La recherche de ces germes est souvent compliquée par leur faible concentration dans l'échantillon à analyser. Une des solutions est d'utiliser des milieux de pré-enrichissement et d'enrichissement liquides qui permettent la multiplication des germes avant leur isolement et leur identification. Cette technique ne permet pas une numération mais une simple mise en évidence.

La méthode de la recherche de *Salmonella* consiste à suivre les quatre étapes suivantes (selon la norme ISO 6579) :

- Pré-enrichissement ;
- Enrichissement ;
- Isolement ;
- Et Identification.

La première étape consiste à la mise en suspension de 25g d'échantillon bien broyé dans 225ml d'EPT pendant 24h à une température d'incubation de 37°C. Ceci permet aux salmonelles (éventuellement présentes) de se multiplier en abondance ; elles deviennent ainsi facilement détectables par la suite.

Une fois l'étape de pré-enrichissement est terminée, 0,1 ml d'échantillon est mélangé à 10 ml de bouillon sélénite cystéine selon Leifson (milieu d'enrichissement pour *Salmonella* et *Shigella*) [BD] pendant une durée de 24h à une température de 37°C. Le sélénite de sodium inhibe la croissance des bactéries coliformes et des entérocoques ainsi que celle de nombreuses bactéries gram positif.

Après enrichissement, les milieux servent à ensemer des milieux solides d'isolement comme la gélose SS (*Salmonella-Shigella*) que nous utilisons ici par la technique des stries d'épuisement à partir d'un même bouillon d'enrichissement.

La gélose SS contient 4 inhibiteurs qui empêchent la croissance des germes Gram positif et rendent difficile la croissance des germes Gram négatif autres que *Salmonella* et *Shigella*. Ce milieu contient également du lactose, dont la fermentation est mise en évidence par le rouge

neutre et du citrate ferrique qui permet de mettre en évidence la production d' H_2S . L'incubation dure 24 heures à 37°C.

Ensuite des tests de caractères sont effectués :

- Milieu TSI [BD] : milieu pour la différenciation des entérobactéries par la fermentation de trois sucres et la production d' H_2S .
- Milieu Citrate de Simmons [BD] : Milieu gélosé pour l'identification des entérobactéries par l'utilisation du citrate comme seule source de carbone.
- Milieu Lysine [BD] : Milieu de diagnostic des Salmonelles, la gélose lysine fer est un milieu différentiel qui détecte les salmonelles par leur activité lysine décarboxylase et la production d' H_2S .

Suivant la couleur prise par ces milieux et le dégagement éventuel de gaz, une présomption d'identification peut être réalisée.

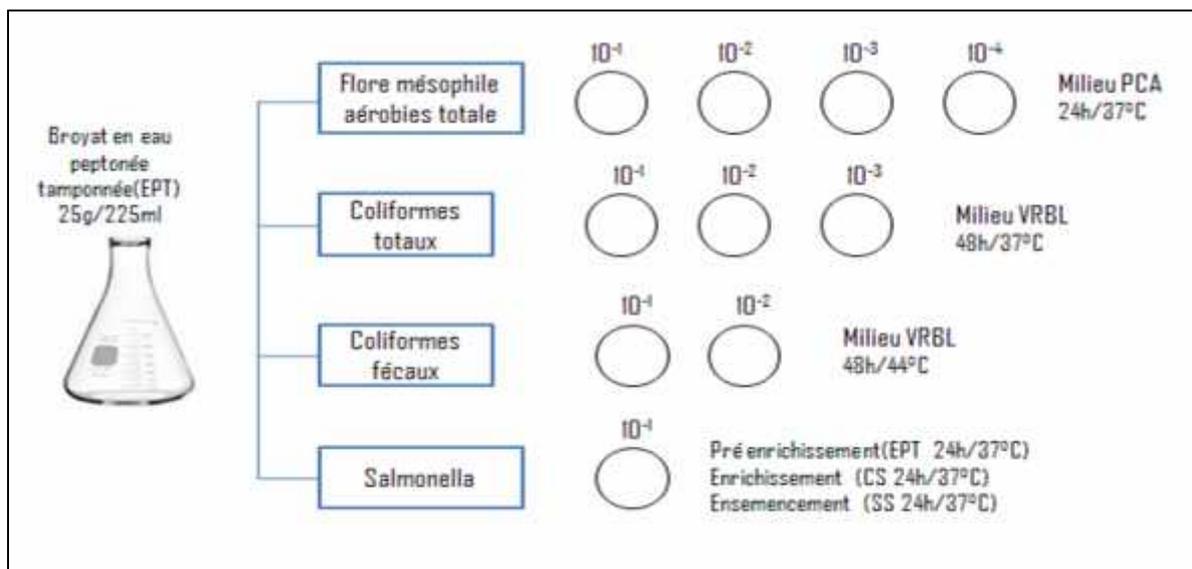


Figure 6:Présentation du plan des analyses bactériologiques

III. Les analyses mycologiques :

Le but de cette étude est d'identifier l'ensemble des moisissures qui peuvent contaminer nos échantillons et de discuter la nature de ces moisissures.

1. Préparation des échantillons :

Les échantillons pesés, marqués ont été stockés dans des sacs en plastique dans un local sec à température ambiante et à l'abri de la lumière (Weidenborner *et al.*, 2000). Dans le but de faciliter leurs mises en suspension, et pour une bonne homogénéisation les échantillons sont broyés à l'aide d'un mortier.

2. Technique de suspension-dilution :

La mise en suspension des échantillons d'analyse est effectuée dans de l'eau peptonée tamponnée à 1,5% (Weidenborner *et al.*, 2000), la procédure de la technique de suspension-dilution débute par l'assurance des conditions aseptiques. Vingt-cinq grammes (25g) d'échantillon sont mis en suspension dans 225ml d'EPT et agités vigoureusement pendant quelques minutes. Après décantation et sous des conditions stériles, une série de dilutions successives a été réalisée allant de 10^{-1} à 10^{-4} (Moreau, 1991).

3. Milieux de culture et ensemencement :

Le choix s'est porté sur les milieux Sabouraud et Czapeck en raison du fait qu'ils soient peu spécifiques et permettent le développement d'un grand nombre d'espèces (Moreau, 1991). Les milieux furent préalablement stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 min et coulés dans des boîtes de pétri stériles.

Après les dilutions en cascade, 0,1ml des deux dernières dilutions (10^{-3} et 10^{-4}) de chaque échantillon sont prélevés aseptiquement et déposés à la surface des milieux gélosés Sabouraud et Czapek (Moreau, 1991; CFSAN, 2001). L'inoculum est étalé à l'aide de bâtons d'étalements stériles et les boîtes sont incubées à 30°C pendant 5j à l'obscurité. Si aucune pousse fongique n'apparaît au bout de ce délai, les boîtes sont incubées pendant 48 heures additionnelles à la même température.

4. Composition et préparation des milieux (Voir annexe1) :

5. Purification des isolats de moisissures :

Dans le but d'étudier les caractères macroscopiques et microscopiques des moisissures isolées, nous avons réalisé un repiquage sur milieux Sabouraud. Les spores et /ou les thalles des différentes colonies visiblement pures sont prélevés et déposés sur milieux de culture vierges (Moreau, 1991), l'opération est pratiquée sous conditions aseptiques et après 5 à 7 j d'incubation pour permettre une bonne sporulation et s'assurer de la différenciation des thalles.

6. Caractérisation des isolats de moisissures :

La procédure débute par l'observation macroscopique des caractères culturels après l'apparition des colonies. Pour pouvoir observer les caractères microscopiques des isolats, un bout de thalle est prélevé à l'aide d'une anse platine et déposé sur une lame sur laquelle, est déposée au préalable une goutte de potasse (KOH) qui clarifie les structures microscopiques. La préparation est couverte d'une lamelle et observée sous microscope au grossissement 40.

L'identification des isolats de moisissures a été effectuée à l'aide de deux clés d'identification (Branet, 2000).

IV. Les analyses mycotoxicologiques :

Pour cette étude nous avons proposé de travailler avec la chromatographie sur couche mince (CCM) afin de détecter la présence ou non des mycotoxines, les échantillons préparés pour l'analyse sont constitués en se basant sur les résultats de l'analyse mycologique. Notre intérêt dans cette troisième partie a été porté sur la mycotoxine associée aux genres isolés et plus précisément sur l'aflatoxine B₁ la plus répandue dans les fruits secs.

Ainsi, cinq échantillons de 50g ont été tirés pour cette analyse, de telle sorte que chaque échantillon ait un duplicata. Et ce, comme suit :

Tableau 4: Répartition des échantillons destinés à l'analyse mycotoxicologique.

L'origine d'échantillon	Nombre d'échantillon à analyser
Temara	3
Fès	2
Total	5

1. La chromatographie sur couche mince (CCM) :

▪ Principe :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est un procédé de séparation dans lequel la phase stationnaire est un matériau adéquat, étalé en une couche mince uniforme, fixée sur un support de verre, de métal ou de plastique.

La séparation s'effectue par migration de solutés dans un solvant sur la couche mince, la révélation est réalisée par une lampe UV.

▪ Procédure :

1.1 Préparation des échantillons :

Nos échantillons sont broyés dans un broyeur mécanique à l'aide d'un tamis de 1mm (conformément à la recommandation ISO R565).

1.2 Extraction :

Nous introduisons 50g d'échantillon dans une fiole de 500ml avec 25g de Kieselguhr, puis nous rajoutons 25ml d'eau distillée et 250ml de chloroforme, l'ensemble est agité

vigoureusement à l'aide d'un agitateur pendant 30min, puis la solution est filtrée dans un papier filtre : Wattman. Les 10 premiers ml doivent être éliminés et 50ml de la solution sont recueillis.

1.3 Purification de l'extrait :

Elle a été faite sur une colonne de gel de silice (Merck, Allemagne). La colonne est constituée d'un tube de verre de 2 cm de diamètre et de 40 cm de longueur équipée d'un robinet et comportant à sa partie supérieure une ampoule de 150 ml de volume.

La laine de verre est placée à la base, la colonne a été remplie de chloroforme sur une hauteur de 20 cm. Ensuite, 5 g de sulfate de sodium anhydre ont été introduits dans la colonne de façon à obtenir une base pleine. D'autre part, 15 g de gel de silice 60(Machery-Nagel, Allemagne) ont été mis dans du chloroforme, et la suspension translucide obtenue est versée dans la colonne en évitant d'emprisonner des bulles d'air. Après 1 h de repos, 15 g du sulfate de sodium anhydre ont été ajoutés avec précaution. Le chloroforme est alors drainé jusqu'à affleurement avec le sommet du sulfate de sodium.

Les 50 ml de l'extrait chloroformique correspondant à 10g de produit de départ sont concentrés jusqu'à un volume d'environ 2-3 ml et sont déposés au sommet de la colonne, le récipient est rincé 3 fois par quelque ml de chloroforme qui sont également introduits dans la colonne. La colonne est d'abord lavée par 150 ml d'hexane ou d'éther de pétrole dépourvus de carbures benzéniques, puis par 150 ml d'éther diéthylique. Les aflatoxines sont éluées par 150 ml de chloroforme-méthanol (97-3 : V/V). Le produit d'élution est évaporé à sec au rotavapeur. Enfin, la détermination est réalisée par CCM.

1.4 Détection des aflatoxines par la CCM :

La couche mince a été préparée à l'avance par le traçage d'une ligne de départ appelée « ligne de dépôt » sur laquelle nous avons déposé nos échantillons avec des concentrations ascendantes 10 μ l, 20 μ l, 30 μ l et 40 μ l.

Le chromatogramme a été développé à l'obscurité dans le solvant de développement constitué par un mélange de chloroforme -méthanol (1/9 V/V). Le solvant est laissé s'évaporer dans l'obscurité, puis la plaque est irradiée avec de la lumière UV en la plaçant à 10 cm de la lampe. La tâche d'aflatoxine B1 donne une fluorescence bleue.

1.5 Confirmation de l'identité de l'aflatoxine B1 :

La confirmation d'identité de l'aflatoxine B1 dans l'extrait a été réalisée grâce au traitement du chromatogramme avec l'acide sulfurique par pulvérisation. La fluorescence des tâches d'aflatoxine B1 doit virer du bleu au jaune sous irradiation UV.

V. La méthode de décontamination :

Afin d'obtenir un produit purement bio nous avons décidé de travailler avec des méthodes de lutte biologique, utilisant des microorganismes antagonistes contre les pathogènes pour protéger la noblesse de notre aliment contre toute détérioration de la qualité nutritionnelle ainsi que sa qualité organoleptique.

Par son pouvoir probiotique, de nombreuses études rapportent les effets bénéfiques des lactobacilles contre les microorganismes pathogènes tels que virus, bactéries, champignons. Ils agissent également simplement en occupant la niche écologique et en entrant en compétition avec les pathogènes. Ils peuvent également produire des métabolites qui inhibent les pathogènes ou dégrader les toxines produites par ceux-ci (Turpin, 2013).

Pour réaliser le test antifongique nous nous sommes basés sur la procédure suivante :

1. Recherche des bactéries lactiques dans les amandes :

Cette étape permet de connaître la possibilité de la croissance des bactéries lactiques sur notre matrice alimentaire.

Après avoir préparé nos échantillons, ainsi que la série des dilutions nous avons procédé à un ensemencement sur la gélose MRS, qui est un milieu sélectif pour le développement des bactéries lactiques et plus précisément les lactobacilles selon la méthode de dénombrement par incorporation à la gélose.

2. Isolement des bactéries à partir du lait :

Les souches de *lactobacillus* que nous avons utilisées dans cette étude font partie de la collection des micro-organismes du Laboratoire de Microbiologie Alimentaire de l'INRA, et qui sont conservées dans le congélateur à -18°C, pour cette raison nous avons procédé aux deux étapes suivantes :

- Etape d'activation : Pour activer l'activité des bactéries nous avons réalisé une étape de revivification dans l'EPT qui consiste sur le prélèvement de 1ml de l'inoculum

conservé au congélateur et le remettre dans 9 ml d'EPT stérile, l'incubation se fait à une température de 37°C pendant 24h à 48h.

- Le repiquage des souches : nous prélevons 1ml de la solution d'activation et nous la mettons dans un nouveau tube stérile qui contient 9ml du milieu MRS liquide, l'incubation se fait de 24h à 48h à une température de 37°C pour obtenir une concentration à voisinage de 10^8 UFC/ml.

3. Diffusion à la gélose (principe d'antibiogramme) :

3.1 Germe testé :

Nous avons testé l'activité antifongique des lactobacilles sur les moisissures type *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus parasiticus* qui sont isolées à partir de notre échantillon.

3.2 Milieu de culture :

Nous avons utilisé la gélose sabouraud (Bio-RAD/Réf : 64449 ; Lot : 8B2212) à pH acide (5,7). Un milieu approprié et couramment utilisé pour la culture des champignons. (Yapi Guillaume *et al.*, 2011)

3.3 Matériel antifongique :

La solution antifongique est préparée à partir des bactéries lactiques (*Lactobacillus*), dans le milieu MRS liquide à une concentration de 10^8 UFC/g.

3.4 Protocole de la méthode de diffusion :

Cette méthode consiste à ensemercer les boîtes de pétri contenant le milieu de culture solidifié avec des souches de champignons déjà purifiées, puis à déposer des disques qui ont été imprégnés dans la solution antifongique sur la gélose à l'aide d'une pince stérile dans des conditions d'asepsie, dès l'application des disques, la solution antifongique ou l'inoculum diffuse de manière uniforme si bien que leur concentration est inversement proportionnelle à la distance du disque.

L'incubation se fait pendant 5 à 7j à une température de 30°C. Une boîte témoin estensemencée uniquement par les souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* et incubée dans les mêmes conditions.

Nous ne pouvons déclarer le résultat final qu'après 21 jours d'incubation (Fouzia, 2011).

Partie3 : Résultats et discussion

Dans cette partie, nous allons présenter les différents résultats obtenus concernant les analyses bactériologiques, l'identification des souches isolées à partir des amandes, ainsi que la détection de l'aflatoxine B1 et finalement la méthode de lutte contre les moisissures toxigènes.

I. Analyse bactériologique :

Après incubation nous avons dénombré les boîtes de pétri dont la croissance est comprise entre 30 à 300 colonies selon Larcher (2012), le résultat final est obtenu en appliquant la formule suivante :

$$\text{UFC} = \frac{N}{(V \cdot F)}$$

Avec :

UFC : unité formant une colonie

N : Nombre de colonie compté

V : Volume de dilution

F : Facteur de dilution

Le tableau ci-dessous présente l'ensemble des résultats obtenus des différentes analyses bactériologiques effectuées sur les amandes.

Tableau 5: Concentrations bactériennes de différentes analyses bactériologiques réalisées sur les amandes.

Code d'échantillon	<i>F.M.A.T</i> 10 ³ UFC/g	<i>C.T</i> 10 ² UFC/g	<i>C.F</i> UFC/g	<i>Salmonelle</i>
F1	3,62	0,11	Pas de croissance	Absence dans 25g
F2	2,50	0,13		
F3	0,81	0,00		
F4	0,50	0,00		
F5	2,10	0,00		
F6	3,12	0,00		
F7	2,00	0,16		
F8	1,15	0,00		
F9	2,30	0,10		
F10	1,50	0,00		
F11	3,14	0,00		
T1	2,23	0,00		
T2	1,45	0,14		
T3	3,52	0,00		
T4	4,20	0,00		

T5	2,18	0,00	Pas de croissance	Absence dans 25g
T6	3,00	0,00		
T7	4,12	0,20		
T8	2,18	0,30		
T9	3,12	0,00		
T10	2,25	0,00		
T11	4,67	0,00		
Norme	10	1	Absence dans 25g	

Comme nous l'avons abordé au paravent, les amandes commercialisées dans les marchés sans emballage adéquat peuvent être facilement contaminées par les bactéries qui se trouvent dans l'environnement de stockage par une simple contamination croisée. Ce qui nous amène à penser que les conditions de vente peuvent influencer la qualité microbiologique des amandes.

Selon le codex Alimentarius la charge bactérienne des amandes décortiquées doit être en dessous du niveau critique (pour la FMAT 10^4, C.T+C.F <math><10^2</math>, *Sallmonella* doit être absente dans 25g). Des niveaux plus élevés peuvent déclencher des toxi-infections alimentaires responsables de plusieurs épidémies par l'ingestion des entérotoxines sécrétées par ces microorganismes.

A l'image des résultats obtenus dans le tableau, la charge bactérienne est largement inférieure à la norme ce qui nous a permis de déclarer que notre produit respecte les conditions d'hygiène.

II. Analyse mycologique :

1. Isolement, purification et identification des isolats :

1.1 Isolement et purification:

L'analyse mycologique a concerné 74 isolats obtenus de 22 échantillons d'amande.

L'isolement de ces moisissures a été réalisé sur un milieu standard Sabouraud, qui permet l'isolement d'un grand nombre de germes fongiques.

Pour éviter une contamination bactérienne et travailler dans des conditions d'isolement propice, nous avons ajouté le chloramphénicol (0,25g/l) au milieu standard.

1.2 Identification des souches isolées :

L'ensemble des souches isolées des échantillons sont présentés dans le tableau Annexe 2. Afin de faciliter l'identification nous avons donné un numéro pour chaque souche isolée. 20 échantillons sur 22 sont contaminés. Les deux échantillons sains proviennent de Fès.

1.3 Identification du genre des souches isolées à partir des amandes :

L'identification des moisissures a été basée essentiellement sur les caractères morphologiques (macroscopiques et microscopiques) de la souche étudiée. Ces caractères sont notés avec précision et comparés avec les clés d'identification. Cette tâche est très difficile à réaliser et demande une grande expérience à mettre en œuvre. Les résultats de l'identification macroscopique sont présentés dans le tableau Annexe 3.

En se basant sur la croissance et la coloration du mycélium, la texture du thalle, la coloration et l'aspect du revers, la présence ou non d'exsudat et de pigment soluble, nous avons pu identifier 5 genres de l'ensemble des souches isolées.

Le tableau suivant donne la proportion de chaque genre par rapport à la flore totale.

Tableau 6: Nombre d'isolats isolés à 30°C par genre à partir des échantillons des amandes.

<i>Genres</i>	<i>Nombre d'isolats</i>	<i>Pourcentage par rapport à la flore mésophile totale (%)</i>
<i>Aspergillus</i>	40	54,054
<i>Penicillium</i>	23	31,081
<i>Mucor</i>	6	8,108
<i>Mycélium</i>	3	4,054
<i>Rhizopus</i>	2	2,703
<i>Total</i>	74	100

Un total de 74 souches a été obtenu appartenant à 5 genres, nous avons pu identifier l'ensemble de ces souches.

A la lumière de ces résultats, l'*Aspergillus* est le genre le plus dominant, son incidence est de 54% par rapport à la flore totale, suivi par le *Penicillium* qui présente un pourcentage de 31% et le *Mucor* avec un pourcentage de 8%.

Concernant les autres genres, *Mycélium* et *Rhizopus* leur présence était très rare et représente, respectivement 4% et 3% de l'ensemble des isolats.

Quelques souches isolées composées d'un ensemble de filaments plus ou moins ramifiés et qui ne présentent aucune forme sous le microcoque, nous les avons classées sous le nom de Mycélium.

1.4 Identification d'espèces des souches isolées à partir des amandes :

L'identification de toutes les espèces de moisissures que nous avons isolées nous a pris beaucoup de temps, malgré cela nous nous ne sommes pas contentés uniquement à identifier les espèces du genre *Aspergillus* mais toutes les espèces des autres genres (Annexe4).

Nous avons utilisé pour l'identification des espèces deux clés de détermination issues de l'ouvrage « Moisissures utiles et nuisibles ; importance industrielle » (BOTTON *et al.*, 1985), qui permet d'identifier les espèces les plus fréquentes en se basant sur celle de Raper et Fennel (1965), et SAMSON (1979), et La clé de Barnett *et al.*,(2000).

Les résultats d'identification des souches isolées des amandes (Annexe 4) sont illustrés dans le graphe suivant :

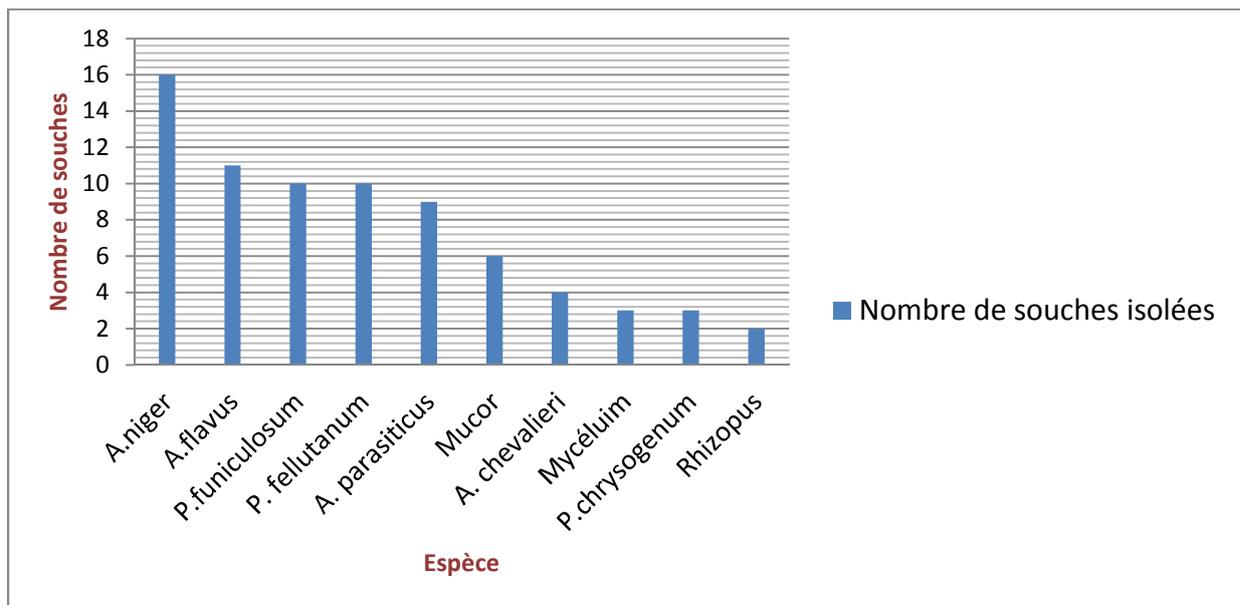


Figure 7: Nombre des espèces isolées des échantillons des amandes incubés à 30°C

A partir des résultats de la figure 7, nous avons pu tirer un certain nombre de remarques que nous allons discuter ci-après :

- Conformément aux résultats obtenus à travers les travaux réalisés sur l'étude de la mycoflore des amandes, l'*A. niger* et le groupe flavi (*A.flavus*, *A.parasiticus*), sont les contaminants les plus répandus.
- Selon la littérature les trois espèces *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, peuvent être productrices de substances toxiques, entre autre l'aflatoxine B1 et l'ochratoxine.

2. Identification des souches appartenant au genre *Aspergillus* :

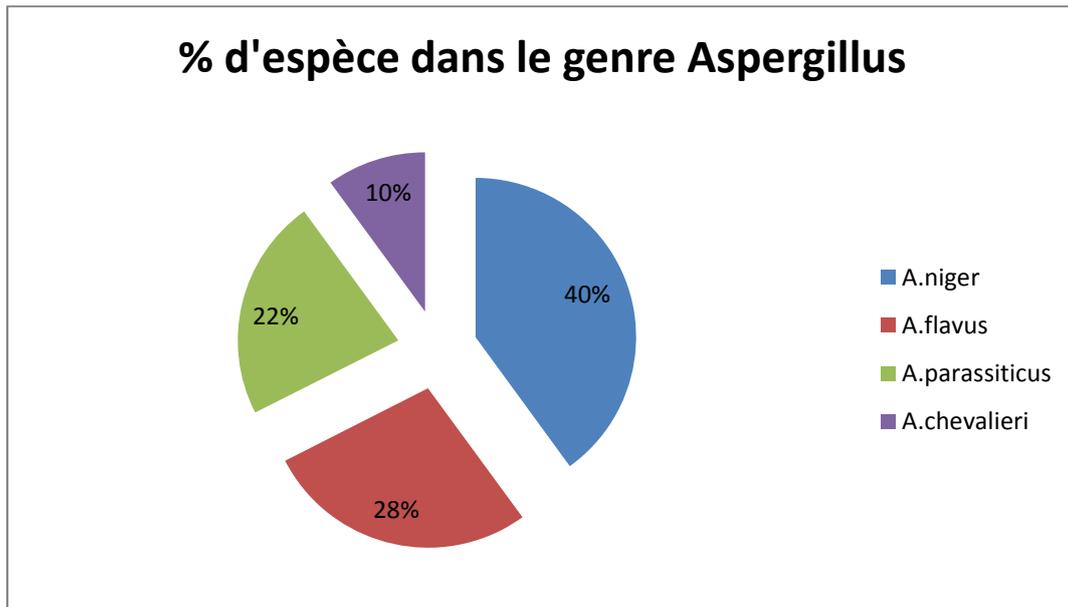


Figure 8: Répartition des espèces d'*Aspergillus* isolées à partir des amandes.

La première constatation qui s'impose est qu'il y a une grande diversité au sein du genre *Aspergillus*, nous avons pu également identifier à partir des échantillons des amandes 4 espèces : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus chevalieri*.

Les résultats obtenus ont montré que l'*Aspergillus niger* est l'espèce la plus dominante, avec une incidence de 40%, suivi par l'*Aspergillus flavus* et l'*Aspergillus parasiticus*, qui représentent 28% et 22%, respectivement.

Les espèces que nous avons isolées et identifiées sont reconnues par leur toxinogénèse. C'est la raison pour laquelle nous avons pensé à détecter la présence ou non des mycotoxines dans certains échantillons.

3. Identification des espèces appartenant au genre *Penicillium* :

L'étude menée a révélé l'existence du genre *Penicillium* dans les échantillons d'amande, avec un pourcentage de 31%. Les principales espèces identifiées sont *P.fellutanum* et *P.funiculosum*, qui représentent, une incidence de 43,5% pour chacune au sein de ce genre (tableau 7).

Tableau 7: Répartition des espèces de *penicillium* isolées à partir des amandes.

<i>l'espèce</i>	<i>nombre de souches isolées</i>	<i>pourcentage par rapport au total</i>
<i>P.chrysogenum</i>	3	13
<i>P.fellutanum</i>	10	43,5
<i>P.funiculosum</i>	10	43,5
<i>Total</i>	23	100

4. Discussion :

Nos observations relatives à la distribution de la flore mycologique qui contamine les amandes commercialisées à Temara et Fès sont en accord avec celles rapportées par les travaux d'Adjou et Soumanou (2013), Ruey-shyang et al (2001) et Nesci (2011) qui ont démontré que les moisissures appartiennent au genre *Aspergillus*, notamment l'*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* qui existent d'une manière très fréquente au niveau des fruits secs.

Nous signalons ainsi que nous avons pu conclure que les amandes s'altèrent au cours de la période de stockage conformément aux travaux de Zinedine (2008) qui a démontré que les moisissures appartiennent au genre *Aspergillus* et *Penicillium* sont des moisissures qui altèrent les cultures au moment du stockage.

Il est important de remarquer que nous avons pu isoler 49 souches à partir des échantillons de Temara contre 25 souches à partir des échantillons à provenance de Fès, cette différence peut être expliquée par la différence des conditions climatiques des deux villes. Cela nous amène à conclure que la charge des moisissures est en relation directe avec le taux d'humidité relative, entre autres.

III. Analyse mycotoxique :

Suite à l'analyse bibliographique et aux résultats de notre étude mycologique, l'abondance et la fréquence des espèces du genre *Aspergillus* dans les différents échantillons à analyser, a été remarquée, ce qui nous a incité à opter pour la recherche des aflatoxines et plus précisément l'aflatoxine B₁. Pour ce faire, la détection de l'aflatoxine B₁ a été réalisée par la méthode de la chromatographie sur couche mince (CCM).

- Analyse de quelques extraits d'amande :

Les résultats obtenus après l'analyse des échantillons des amandes par CCM sont représentés dans le tableau suivant :

Nous avons traité seulement cinq échantillons à cause du manque de temps et de réactifs, chaque extrait d'un échantillon a été noté avec le code de l'échantillon à partir duquel il a été extrait.

Tableau 8: Résultats de la détection d'aflatoxine B1 dans les échantillons.

N° d'échantillon	Code d'échantillon	Provenance		Aflatoxine B1
		Ville	Région	
1	T5	Temara	Gich l'oudaya	+
2	T7	Temara	E-nahda	-
3	T8	Temara	E-nahda	+
4	F2	Fes	Bensouda	-
5	F6	Fes	Bendebab	-

+ : Présence

- : Absence

Pour cette partie de la recherche, la sélection des échantillons analysés était basée sur les résultats de l'analyse mycologique, en tenant compte que la présence des moisissures n'implique pas automatiquement la production des mycotoxines. Toutefois, la formation de mycotoxine est conditionnée au préalable par la croissance des champignons bien précis. C'est la raison pour laquelle nous avons analysé les échantillons qui présentent une forte contamination par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (les deux espèces aflatoxinogènes).

A noter que la production d'aflatoxine peut avoir comme origine les conditions de vente du produit sans emballage. Les dites conditions l'exposent aux variations de l'humidité et de la température qui favorisent les conditions optimales provoquant ainsi la sécrétion de ces substances.

Nous avons déduit alors que l'origine de la contamination des échantillons analysés peut être due au non-respect des bonnes pratiques de production, des conditions de stockage inadéquates, chez les vendeurs et les agriculteurs eux-mêmes. La sensibilisation des acteurs de la chaîne des amandes, tout un chacun, sur les dangers que peuvent causer les aflatoxines pour l'homme aussi bien que pour l'animal s'avère nécessaire voire obligatoire.

Nous devons souligner l'effet cumulatif de ces aflatoxines au niveau du foie qui peut aboutir à long terme soit à des complications au niveau de cet organe surtout chez les gens de faible immunité, soit même, dans les cas extrêmes d'intoxication chronique.

C'est pour cette raison que nous avons pensé au développement d'une méthode de décontamination sensible et efficace contre les moisissures toxigènes, pour éviter toute origine de contamination par les mycotoxines.

IV. Méthode de décontamination :

Dans le souci de la protection du consommateur, nous avons essayé de s'orienter vers la bio-décontamination par les bactéries lactiques, nous avons travaillé avec les espèces du genre *Lactobacillus* afin de tester leur effet antifongique sur les espèces d'*A.niger*, *A. flavus* et *A.parasiticus*. Les résultats du test antifongique *in vitro* sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 9: Effet antifongique des *Lactobacillus* « *in vitro* » sur certaines souches d'*Aspergillus*.

<i>Solution antifongique</i>	<i>Moisissures</i>	<i>Effet antifongique</i>
Inoculum des <i>Lactobacillus</i> 10 ⁸ UFC/ml	<i>Aspergillus flavus</i>	++++
	<i>Aspergillus niger</i>	++++
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	++++

++++ : Inhibition très fort.

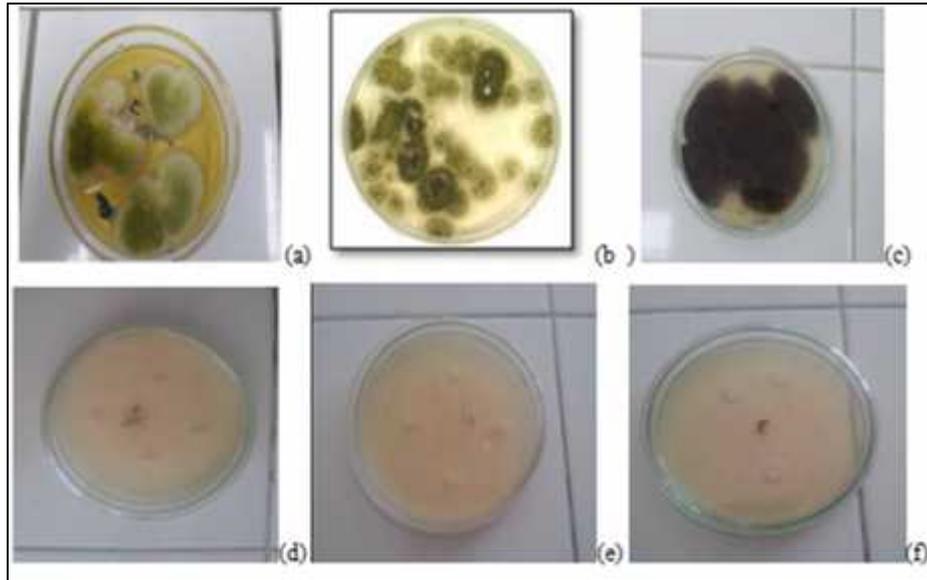


Figure 9: Résultats du test antifongique après 7 jours d'incubation à 30 °C.

(a), (b) et (c) représentent respectivement les souches d'*A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. niger* comme témoin et (d),(e) et (f) représentent l'effet des *lactobacillus* sur la croissance de ces moisissures.

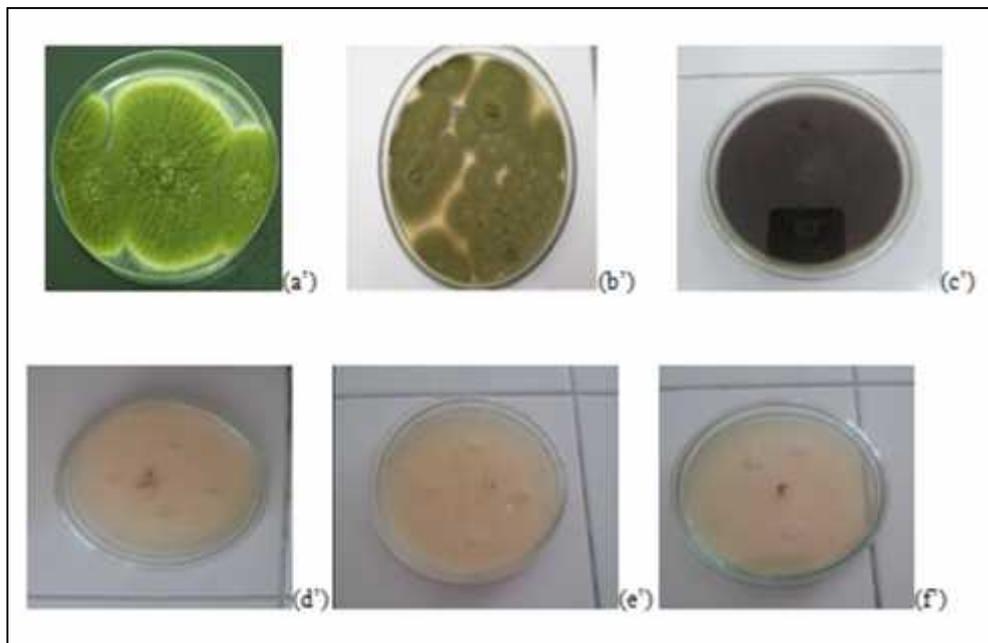


Figure 10: Résultats du test antifongique après 21 jours d'incubations à 30°C.

(a'), (b') et (c') représentent respectivement les souches d'*A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. niger* comme témoin et (d'), (e') et (f') représentent l'effet des *lactobacillus* sur la croissance de ces moisissures.

A l'image des résultats obtenus dans le tableau 7 et les figures (8 et 9) nous avons pu conclure que les *Lactobacillus* possèdent une activité antifongique très forte (100%) contre le genre *Aspergillus*, conformément aux travaux de Laref Nora (2014), cela peut être expliqué par le fait que la croissance des *Lactobacillus* est accompagnée par la sécrétion des acides organiques qui à leur tour participent à l'acidification du milieu et donc à l'inhibition de développement des moisissures toxigènes occupant la niche écologique et en entrant en compétition avec ces derniers, selon Turpin (2013).

Les résultats de la recherche relative aux bactéries lactiques sur les amandes ont permis de détecter la possibilité de la croissance des *Lactobacillus* sur notre matrice alimentaire, la figure suivante présente les données quant à l'analyse sur le milieu MRS à partir d'un échantillon sain (Fès):



Figure 11: Détection des bactéries lactiques sur milieu MRS.

Puisque nous avons trouvé que les bactéries lactiques peuvent se développer sur notre matrice alimentaire (amande), nous pouvons proposer d'optimiser l'inoculum de ces bactéries lactiques dans un procédé biotechnologique de myco-décontamination, et ceux par pulvérisation sur la culture des amandes au moment de stockage, dans des magasins bien aérés et ventilés, pour éviter le développement des moisissures de genre *Aspergillus* qui sont considérées comme contaminants des cultures lors du stockage et ce pour écarter toute production de mycotoxine.

Conclusion et perspective

Le but de ce travail était d'essayer de trouver un moyen efficace et sensible pour éliminer ou réduire les microorganismes qui peuvent contaminer les amandes et dont certains peuvent altérer la qualité marchande de ces fruits, et dont d'autres peuvent être dangereux pour le consommateur. Cependant, il est prouvé par plusieurs études que ce produit rassemble les conditions le rendant préféré par les moisissures toxigènes et par conséquent possibilité de présence des mycotoxines, pouvant engendrer des effets négatifs sur la santé.

Les résultats de notre étude ont montré que les amandes prélevées aussi bien de Fès que de Temara sont contaminées par des moisissures. En effet, la présence d'*A. flavus*, *A. Parasiticus* et *Penicillium* qui sont réputées mycotoxinogènes a été remarquée et que la production d'aflatoxine a été confirmée.

La procédure optimiser de myco- décontamination biologique, par la bactérie lactique *Lactobacillus* a montré un effet inhibiteur significatif sur la croissance des moisissures toxigènes. Cela peut être dû à leur sécrétion des acides organiques qui sont connus présenter un effet barrière contre le développement mycologique.

Au vu de ces résultats et afin d'améliorer sensiblement la qualité des fruits secs commercialisés, il est fortement recommandé de respecter les règles d'hygiène, de contrôler la durée et les conditions du stockage et d'exploiter les bactéries lactiques comme outil biotechnologique de myco-décontamination lors de stockage au lieu d'utiliser des produits chimiques qui sont souvent toxiques.

Cette étude n'est qu'un essai préliminaire nous renseignant sur les contaminants mycologiques alimentaires et leur décontamination convenable. Toutefois, reste à faire des études de recherche plus approfondies dans l'optique de cerner, au mieux, le problème sanitaire et économique qui peut avoir lieu à cause de ces contaminants et/ou de leurs substances toxiques.

Bibliographie

Documents:

Abruhosa, L., Paterson, R.R.M., and Venancio.A , 2010. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed décontamination. *Toxins*, vol.2, n°5, p.1078-1099.

Adjou et Soumanou, 2013. Efficacité des extraits de plantes contre les moisissures toxigènes. *J. Appl. Biosci.*

Agriculture et Agroalimentaire, 2012 Canada. Programme de réduction des liés aux pesticides, Centre de lutte antiparasitaire, Profil de la culture des fruits secs, 2012 Canada, 55 pages.

Aksoy, U., Can, H.Z., Hepaksoy, S., ahin.N, 2001. *ncir Yeti tiricili i, TUB TAK Türkiye Tarımsal Ara turma Projesi Yayınları* (Fig Growing, Turquie Agriculture Research Project Publications). (in Turkish).

Alain Tessier, 2014. *L'amandier : Douleur des contusions, des brûlures, laxatif, vieillissement de la peau... Riche en potassium-* Articles scientifique Phyto-Aroma(thérapie), 17 Janvier 2014.

Aziz, N.H. and Moussa, L.A.A, 2002. *Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits.* *Food Control*, 13, P 281–8.

Barnett H.L et Barry B. Hunter, 2000. *Illustrated Genra of Imperfect fungi* , Fourth edition P 90-119.

Bouksaim M, Audet.P, Simard. S.E, Lacroix.C, 2000. *Effects of mixed starter composition on nisin Z production by Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis UL 719 during production and ripening of Gooda cheese.* *Int J Food Microbiol* Vol 59 (141-156)

Bornet.G, 2000. *La place des analyses microbiologiques de denrées alimentaires dans le cadre d'une démarche d'assurance sécurité.* Synthèse scientifique.Revue Méd. Vét., 2000, 151, 8-9, 805-812.

Butler, M. J. & Day, A. W, 1998. *Fungal melanins: a review.* *Canadien Journal Microbiology*, 44: 1115-1136.

CFSAN, 2012. Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Demain A.L., 1981. *Industrial microbiology.* **Science, 214, 987-995.**

Drusch, S. and Ragab, W, 2003. *Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruit.* *J. Food Prot.*, 66, P 1514–27.

Fouzia Djenadi, 2011. *Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne du genévrier (Juniperus phoenicea) : essai des huiles essentielles et composés phénoliques.* Thèse doctorat, Faculté Ibn tofail Kénitra.P 98-129.

Gorny, J.R, 2006. *Microbial contamination of fruits and vegetables.* In: *Microbiology of Fruits and Vegetables*, G.M. Sapers, J.R. Gorny, A.E. Yousef (eds). CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA, pp. 3–32.

Hammer Ka, Carson Cf, Ridley Cv, 2003. *Antifungal activity of components of Meulaleuca, alternifolia (tea tree) oils.* Journal of Applied Microbiology, 95, P 853-860.

Jamaly.N, Benjouad .A, Bouksaim. M, 2011. *Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from known popular traditional moroccan dairy products.* British Microbiology Research Journal, Vol 1, p :79-94.

Jean-Yves Leveau, Jean-Paul Larpent, Marielle Bouix, 2001. *la Sécurité microbiologique des procédés alimentaires.* Article Scientifique.

Krogh, P, 1987. *Ochratoxin A in food. Mycotoxin in Food.* Academic Press, San Diego, 97-121.

Leontopoulos D., Siafaka A. et Markaki P., 2002. *Black olives as substrate for Aspergillus parasiticus growth and aflatoxin B1 production.* Food Microbiol.20,119-126.

Linda J. Harris , 2012. *Prévention et maîtrise de Salmonella et Escherichia. coli entérohémorragique dans les fruits à coque,* Séries d'enseignements tirés Vol. 2, revue scientifique.

Laref .N, 2014. *L'étude de l'activité antifongique des lactobacilles et leur effet sur la croissance d'Aspergillus sp.* Thèse doctorat. Université d'oran. Faculté de Science. Algérie.

Lund F., Nielsen A.B. et Skouboe P., 2002. *Distribution of Penicilium commune isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolites profiles, morphotypes, RAPD and AFLP fingerprinting.* Food Microbiol.20,725-734.

MAPA : Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, Veille économique-Secteur amandier Octobre 2013, Note stratégique n°96.

Moreau C., 1991. *les moisissures. Technique d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaire.* Contrôles microbiologique. Chap6, 222-241.

Nesci A, Montemarani A, Etcheverry M, 2011. *Assessment of mycoflora and infestation of insects, vector of Aspergillus section Flavi, in stored peanut from Argentina.* Mycotoxin Research, 27, P 5–12.

Patharajan, S., Reddy, K.R.N., Karthikeyan,V., et al, 2011. *Potential of yeast antagonists on in vitro biodegradation of ochratoxin A.* Food control, vol.22, n°2, p.290-296.

Pfohl-Leskowicz, A, 1999. *Les mycotoxines dans l'alimentation : Evaluation et gestion du risque.* Lavoisier, Paris, France.

Pitt, J.I. and Miscamble, B.F, 1995. *Water relations of Aspergillus flavus and closely related species.* J. Food Prot. 58: 86–90.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., Miscamble, B.F., Dharmaputra, O. S., Kuswanto, K.R., Rahayu, E.S., et Sardjono, 1998. *The mycoflora of food commodities from Indonesia.* J. Food Mycol. 1, P 41–60.

Pitt, J.I.; Hocking A.D, 2009. (Edt) *Fungi and food spoilage.* Blackie, London.

Roquebert M.F, 1997. *Les moisissures : nature, biologie et contamination.* Ed. Université de Lyon. France.

Roquebert M.F, 1998. *Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation, Identification*", in "Moisissures des aliments peu hydratés", Ed. Tec & Doc, 39-95.

Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. et Filtenborg O., 2000. *Introduction of food and airborne fungi*. 6 th edition. Centraal bureau voor schimmelcultures. Utrecht.

Stiles M.E., 1996, *Biopreservation by lactic acid bacteria*, *Antonie van Leeuwenhek*, 70, 331-345

Steyn PS, 1998. *The biosynthesis of mycotoxins*. *Rev Méd Vét*, 149, 6: 469-478.

Strom K, Sjogren J, Broberg A, Schnurer J., 2002, *Lactobacillus plantarum MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L- Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyllactic acid*, *Applied Environmental Microbiology*, 68, 4322-4327.

Tatsadjieu N, Jazet M, Ngassoum MB, Etoa X, Mbofung MF, 2010. *Investigations on the essential oil of Lippia rugosa from Cameroon for its potential use as antifungal agent against Aspergillus flavus Link ex. Fries*. *Food Control*, 5, P 161–166.

Turpin, W., Humblot, C., Thomas, M., 2013. *Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms*. *International journal of food microbiology*. Vol. 143, n°3, p.87-102.

Weidenbörner M., Wiczorek C., Appel S. et Kunz B., 2000. *Whole wheat and white wheat flour- the mycobiota and potentiels mycotoxins*. *Food Microbiol.* 17, 103-107.

Yapi Guillaume Yaye, Adou Koffi Mathieu Kra, Jacques Auguste Alfred Bognan Achahet Allico Joseph Djaman, 2011. *évaluation de l'activité antifongique et essai de purification des principes actifs des extrait de Terminalia mantaly (H.Perrier), une combrétacée sur la croissance in vitro de Candida albicans*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, V 80, p. 953 – 964.

Yèhouénou B, Noudogbessi J-P, Sessou P, Avlessi F, Sohounhloué Dominique, 2010. *Étude chimique et activités antimicrobiennes d'extraits volatils des feuilles et fruits de Xylopiya aethiopica (Dunal) A. Rich. Contre les pathogènes des denrées alimentaires*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 029, P 19 - 27.

Zinedine Abdalah, 2008. *Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxine par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels*-thèse de doctorat. Université Sidi mohammed Ben Abdellah, Faculté Dhar El Mahraz. p 16-35.

Sites :

www.agriculture.gov.ma (Site officiel du ministère d'agriculture et de pêche maritime)

www.almonds.com

www.codexalimentarius.org

www.FAO.org (Food and Agriculture Organisation)

www.planetoscope.com

Annexes

Annexe1:

- Composition et préparation des milieux de culture :
 - Milieu EPT : Eau peptonée tamponnée
 - Peptone : 10,0 g
 - Chlorure de sodium : 5,0 g
 - Phosphate disodique dodécahydraté : 9,0 g
 - Phosphate monopotassique : 1,5 g
 - Eau distillée : 1000 ml
 - Milieu PCA : Plate Count Agar
 - Tryptone : 5,0 g
 - Extrait de levure : 2,5 g
 - Glucose : 1,0 g
 - Agar agar bactériologique : 12,0 g
 - Eau distillée : 1000ml
 - Milieu VRBL : lactosé bilié au cristal violet et au rouge neutre
 - Peptone pepsique de viande : 7,0 g
 - Extrait de levure : 3,0 g
 - Lactose : 10,0 g
 - Sels biliaires : 1,5 g
 - Chlorure de sodium : 5,0 g
 - Rouge neutre : 30,0 mg
 - Cristal violet : 2,0 mg
 - Agar agar bactériologique : 12,0 g
 - Eau distillée : 1000ml
 - Milieu SC broth : Sélénite cystine
 - Tryptone : 5,0 g
 - Lactose : 4,0 g
 - Phosphate disodique : 10,0 g
 - Hydrogénosélénite de sodium : 4,0 g
 - L-cystine : 10,0 mg
 - Eau distillée : 1000ml
 - Milieu SS : Salmonelle Shigella
 - Peptone pancréatique de viande : 5,0 g
 - Extrait de viande : 5,0 g
 - Lactose : 10,0 g
 - Sels biliaires : 8,5 g
 - Citrate de sodium : 10,0 g
 - Thiosulfate de sodium : 8,5 g
 - Citrate ferrique ammoniacal : 1,0 g
 - Rouge neutre : 25,0 mg
 - Vert brillant : 0,33 mg
 - Agar agar bactériologique : 15,0 g

- Eau distillée : 1000ml
 - Milieu MRS agar : Man, Rogosa and Sharpe
- Polypeptone : 10,00 g
- Extrait de viande : 10,00 g
- Extrait de levure : 5,00 g
- Glucose : 20,00 g
- Tween 80 : 1,08 g
- Phosphate dipotassique : 2,00 g
- Acétate de sodium : 5,00 g
- Citrate d'ammonium : 2,00 g
- Sulfate de magnésium : 0,20 g
- Sulfate de manganèse : 0,05 g
- Agar agar bactériologique : 15,00 g
- Eau distillée : 1000ml
 - Milieu sabouraud au chloramphénicol (milieu standard)
- Peptone pepsique de viande : 10,0 g
- Glucose : 20,0 g
- Chloramphénicol : 0,25 g
- Agar agar bactériologique : 15,0 g
- Eau distillée : 1000ml
 - Milieu Czapek :
- Saccharose : 30,0g
- Nitrate de sodium : 2,0g
- Dihydrogène phosphate de potassium:1,0g
- Sulfate de magnésium : 0.5g
- Chlorure de potassium : 0.5g
- Sulfate ferreux : 0.01g
- Agar : 15g
- Eau distillée : 1000mL

Annexe2: Liste des souches isolées à partir des amandes à une température de 30°C et leurs échantillons d'origine.

<i>N° de souche</i>	<i>L'origine</i>	<i>N° de souche</i>	<i>L'origine</i>
A1	F1	A38	T5
A2	F1	A39	T5
A3	F1	A40	T5
A4	F1	A41	T5
A5	F2	A42	T5
A6	F2	A43	T5
A7	F2	A44	T5
A8	F2	A45	T6
A9	F3	A46	T6
A10	F3	A47	T6

A11	F4	A48	T6
A12	F4	A49	T6
A13	F4	A50	T6
A14	F5	A51	T7
A15	F5	A52	T7
A16	F6	A53	T7
A17	F6	A54	T7
A18	F6	A55	T7
A19	F6	A56	T7
A20	F7	A57	T7
A21	F7	A58	T7
A22	F7	A59	T8
A23	F8	A60	T8
A24	F8	A61	T8
A25	F9	A62	T8
A26	T1	A63	T8
A27	T1	A64	T8
A28	T1	A65	T9
A29	T2	A66	T9
A30	T2	A67	T9
A31	T3	A68	T9
A32	T3	A69	T10
A33	T3	A70	T10
A34	T3	A71	T10
A35	T4	A72	T11
A36	T4	A73	T11
A37	T4	A74	T11

Annexe 3 : Description et identification des souches isolées des amandes des deux villes du Maroc.

N° de la souche	Description	Le Genre
A1	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A2	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A3	Colonies de teint brun gris, bordure blanche, texture veloutée. Revers jaune pâle.	<i>Penicillium</i>
A4	Colonies à croissance lente, de couleur verdâtre au départ devenant marron-jaune avec des contours irréguliers. Revers jaune-orange.	<i>Aspergillus</i>
A5	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A6	Colonies de teint brun gris, bordure blanche, texture veloutée. Revers jaune pâle.	<i>Penicillium</i>
A7	Thalle à croissance moyenne, de couleur vert foncé, aspect poudreux, revers jaune à vert, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A8	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>

A9	Thalle à croissance moyenne, de couleur vert foncé, aspect poudreux, revers jaune à vert, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A10	Thalle gris plus ou moins foncé, texture cotonneuse. Revers pâle.	<i>Mucor</i>
A11	Thalle blanc à rose, aspect laineux, revers incolore.	<i>Mycélium</i>
A12	Colonies de teint brun gris, bordure blanche, texture veloutée. Revers jaune pâle.	<i>Penicillium</i>
A13	Colonies gris, texture veloutée, présence d'exsudat au centre de la colonie. Revers jaune	<i>Penicillium</i>
A14	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A15	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A16	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A17	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A18	Thalle à croissance moyenne, de couleur vert foncé, aspect poudreux, revers jaune à vert, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A19	Colonies de teint gris, texture veloutée, présence d'exsudat au centre de la colonie. Revers jaune	<i>Penicillium</i>
A20	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A21	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A22	Thalle gris plus ou moins foncé, texture cotonneuse. Revers pâle.	<i>Mucor</i>
A23	Colonies à croissance lente, de couleur verdâtre au départ devenant marron-jaune avec des contours irréguliers. Revers jaune-orange.	<i>Aspergillus</i>
A24	Colonies de teint brun gris, bordure blanche, texture veloutée. Revers jaune pâle.	<i>Penicillium</i>
A25	Thalle gris plus ou moins foncé, texture cotonneuse. Revers pâle.	<i>Mucor</i>
A26	Thalle gris plus ou moins foncé, texture cotonneuse. Revers pâle.	<i>Mucor</i>
A27	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A28	Thalle à croissance moyenne, de couleur vert foncé, aspect poudreux, revers jaune à vert, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A29	Thalle blanchâtre à brun grisâtre, texture laineuse envahissante. Revers blanc.	<i>Rhizopus</i>
A30	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A31	Colonies à croissance limitées, de couleur bleu gris.	<i>Penicillium</i>

	Revers orange	
A32	Colonies de teint gris, texture veloutée, présence d'exsudat au centre de la colonie. Revers jaune	<i>Penicillium</i>
A33	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A34	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A35	Colonies de teint brun gris, bordure blanche, texture veloutée. Revers jaune pâle.	<i>Penicillium</i>
A36	Colonies de teint gris, texture veloutée, présence d'exsudat au centre de la colonie. Revers jaune	<i>Penicillium</i>
A37	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A38	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A39	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A40	Thalle à croissance moyenne, de couleur vert foncé, aspect poudreux, revers jaune à vert, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A41	Colonies à croissance lente, de couleur verdâtre au départ devenant marron-jaune avec des contours irréguliers. Revers jaune-orange.	<i>Aspergillus</i>
A42	Colonies de teint brun gris, bordure blanche, texture veloutée. Revers jaune pâle.	<i>Penicillium</i>
A43	Colonies à croissance limitées, de couleur bleu gris. Revers orange	<i>Penicillium</i>
A44	Colonies gris, texture veloutée, présence d'exsudat au centre de la colonie. Revers jaune	<i>Penicillium</i>
A45	Colonies brun gris, bordure blanche, texture veloutée. Revers jaune pâle.	<i>Penicillium</i>
A46	Thalle gris plus ou moins foncé, texture cotonneuse. Revers pâle.	<i>Mucor</i>
A47	Colonies de teint gris, texture veloutée, présence d'exsudat au centre de la colonie. Revers jaune	<i>Penicillium</i>
A48	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A49	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A50	Thalle blanc à rose, aspect laineux, revers incolore	<i>Mycélium</i>
A51	Thalle blanc à rose, aspect laineux, revers incolore	<i>Mycélium</i>
A52	Thalle gris plus ou moins foncé, texture cotonneuse. Revers pâle.	<i>Mucor</i>
A53	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A54	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>

A55	Thalle à croissance moyenne, de couleur vert foncé, aspect poudreux, revers jaune à vert, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A56	Thalle blanchâtre à brun grisâtre, texture laineuse envahissante. Revers blanc.	<i>Rhizopus</i>
A57	Colonies de teint brun gris, bordure blanche, texture veloutée. Revers jaune pâle.	<i>Penicillium</i>
A58	Colonies de teint gris, texture veloutée, présence d'exsudat au centre de la colonie. Revers jaune	<i>Penicillium</i>
A59	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A60	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A61	Thalle à croissance moyenne, de couleur vert foncé, aspect poudreux, revers jaune à vert, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A62	Colonies de teint brun gris, bordure blanche, texture veloutée. Revers jaune pâle.	<i>Penicillium</i>
A63	Colonies de teint gris, texture veloutée, présence d'exsudat au centre de la colonie. Revers jaune	<i>Penicillium</i>
A64	Colonies à croissance limitées, de couleur bleu gris. Revers orange	<i>Penicillium</i>
A65	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A66	Thalle à croissance moyenne, de couleur vert foncé, aspect poudreux, revers jaune à vert, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A67	Colonies à croissance lente, de couleur verdâtre au départ devenant marron-jaune avec des contours irréguliers. Revers jaune-orange.	<i>Aspergillus</i>
A68	Colonies de teint gris, texture veloutée, présence d'exsudat au centre de la colonie. Revers jaune.	<i>Penicillium</i>
A69	Colonies noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A70	Colonies granuleuses plus denses vers le centre et lâche en périphérie, vert jaune à vert olive. Revers beige clair, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A71	Colonies de teint brun gris, bordure blanche, texture veloutée. Revers jaune pâle.	<i>Penicillium</i>
A72	Colonies de teint noir foncé à croissance rapide, bordures mycéliennes blanches, texture poudreuse. Revers incolore.	<i>Aspergillus</i>
A73	Thalle à croissance moyenne, de couleur vert foncé, aspect poudreux, revers jaune à vert, absence d'exsudat et de pigment soluble.	<i>Aspergillus</i>
A74	Colonies de teint gris, texture veloutée, présence d'exsudat au centre de la colonie. Revers jaune	<i>Penicillium</i>

Annexe 4: Espèces identifiées des échantillons d'amande incubés à 30°C

N° de la souche	L'espèce	N° de la souche	L'espèce
A1	<i>Aspergillus niger</i>	A38	<i>Aspergillus niger</i>
A2	<i>Aspergillus flavus</i>	A39	<i>Aspergillus flavus</i>
A3	<i>Penicillium funiculosum</i>	A40	<i>Aspergillus parasiticus</i>
A4	<i>Aspergillus chevalieri</i>	A41	<i>Penicillium funiculosum</i>
A5	<i>Aspergillus niger</i>	A42	<i>Penicillium fellutanum</i>
A6	<i>Penicillium funiculosum</i>	A43	<i>Penicillium chrysogenum</i>
A7	<i>Aspergillus parasiticus</i>	A44	<i>Penicillium fellutanum</i>
A8	<i>Aspergillus flavus</i>	A45	<i>Penicillium funiculosum</i>
A9	<i>Aspergillus parasiticus</i>	A46	<i>Mucor fuscus</i>
A10	<i>Mucor fuscus</i>	A47	<i>Penicillium fellutanum</i>
A11	<i>Mycélium</i>	A48	<i>Aspergillus flavus</i>
A12	<i>Penicillium funiculosum</i>	A49	<i>Aspergillus niger</i>
A13	<i>Penicillium fellutanum</i>	A50	<i>Mycélium</i>
A14	<i>Aspergillus niger</i>	A51	<i>Mycélium</i>
A15	<i>Aspergillus flavus</i>	A52	<i>Mucor fuscus</i>
A16	<i>Aspergillus niger</i>	A53	<i>Aspergillus niger</i>
A17	<i>Aspergillus flavus</i>	A54	<i>Aspergillus flavus</i>
A18	<i>Aspergillus parasiticus</i>	A55	<i>Aspergillus parasiticus</i>
A19	<i>Penicillium fellutanum</i>	A56	<i>Rhizopusstolonifer</i>
A20	<i>Aspergillus niger</i>	A57	<i>Penicillium funiculosum</i>
A21	<i>Aspergillus flavus</i>	A58	<i>Penicillium fellutanum</i>
A22	<i>Mucor fuscus</i>	A59	<i>Aspergillus niger</i>
A23	<i>Aspergillus chevalieri</i>	A60	<i>Aspergillus flavus</i>
A24	<i>Penicillium funiculosum</i>	A61	<i>Aspergillus parasiticus</i>
A25	<i>Mucor fuscus</i>	A62	<i>Penicillium funiculosum</i>
A26	<i>Mucor fuscus</i>	A63	<i>Penicillium fellutanum</i>
A27	<i>Aspergillus niger</i>	A64	<i>Penicillium chrysogenum</i>
A28	<i>Aspergillus parasiticus</i>	A65	<i>Aspergillus niger</i>
A29	<i>Rhizopusstolonifer</i>	A66	<i>Aspergillus parasiticus</i>
A30	<i>Aspergillus niger</i>	A67	<i>Aspergillus chevalieri</i>
A31	<i>Penicillium chrysogenum</i>	A68	<i>Penicillium fellutanum</i>
A32	<i>Penicillium fellutanum</i>	A69	<i>Aspergillus niger</i>
A33	<i>Aspergillus niger</i>	A70	<i>Aspergillus flavus</i>
A34	<i>Aspergillus flavus</i>	A71	<i>Penicillium funiculosum</i>
A35	<i>Penicillium funiculosum</i>	A72	<i>Aspergillus niger</i>
A36	<i>Penicillium fellutanum</i>	A73	<i>Aspergillus flavus</i>
A37	<i>Aspergillus niger</i>	A74	<i>Penicillium fellutanum</i>

Dédicaces

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus durs

Et ceux à qui je dois tant

A mes parents pour leur amour et leur support affectif

A mes sœurs et mes frères

Je présente mon travail

Karima AZARFANE.

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance sont adressés à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, notamment :

La direction de la l'INRA dans la personne de son Directeur pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon stage dans un prestigieux institut de recherche.

Je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements au **Dr. Mohamed BOUKSAIM** qui a rendu ce stage une expérience motivante et enrichissante. Je ne saurais jamais oublier sa disponibilité. Sa compétence et ses recommandations continues pour moi, me furent très inestimables.

Je tiens aussi à exprimer mes profondes gratitude à Mme **Adiba KANDRI RODI** pour son encadrement et son assistance.

Mes remerciements vont aussi à **Mme H. TOUZANI** et **Mme J. ALFIGIGUI** les membres de jury, d'avoir accepté de juger ce travail.

Ainsi que tout le personnel de l'Institut de Recherche Agronomique de Rabat (**INRA-Rabat**).

Je remercie également tous ceux qui ont contribué à ma formation pendant mon cursus universitaire au sein de la faculté des Sciences et Technique de Fès.

Merci enfin pour tous ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre lors de mon travail, je les remercie du fond du cœur.

Listes des figures

Figure 1: Présentation de l'organigramme de l'INRA	5
Figure 2: Présentation de la production mondiale des amandes en 2013.....	6
Figure 3: Distribution de la consommation mondiale des amandes par habitant en 2013.....	6
Figure 4: Production et superficie d'amandier à l'échelle nationale	7
Figure 5: Méthode de la préparation de la série de dilution.....	18
Figure 6: Présentation du plan des analyses bactériologiques	21
Figure 7: Nombre des espèces isolées des échantillons des amandes incubés à 30°C.....	31
Figure 8: Répartition des espèces d' <i>Aspergillus</i> isolées à partir des amandes.	32
Figure 9: Résultats du test antifongique après 7 jours d'incubation à 30 °C.....	36
Figure 10: Résultats du test antifongique après 21 jours d'incubations à 30°C.	36
Figure 11: Détection des bactéries lactiques sur milieu MRS.	37

Liste des tableaux

Tableau 1: Normes microbiologiques des amandes décortiquées.....	12
Tableau 2: Nombre des échantillons des amandes prélevées des deux régions du Maroc	16
Tableau 3: Répartition des échantillons des amandes collectés.....	16
Tableau 4: Répartition des échantillons destinés à l'analyse mycotoxique.	23
Tableau 5: Concentrations bactériennes de différentes analyses bactériologiques réalisées sur les amandes.	28
Tableau 6: Nombre d'isolats isolés à 30°C par genre à partir des échantillons des amandes.	30
Tableau 7: Répartition des espèces de <i>penicillium</i> isolées à partir des amandes.....	33
Tableau 8: Résultats de la détection d'aflatoxine B1 dans les échantillons.	34
Tableau 9: Effet antifongique des <i>lactobacillus</i> « <i>in vitro</i> » sur certaines souches <i>d'Aspergillus</i>	35

Table des matières

Introduction	1
Partie1 : Présentation de l'organisme d'accueil et étude bibliographique	3
I. Présentation de l'INRA	4
II. Généralité sur le secteur des fruits à coque :	5
1. Le secteur amandier	5
1.1 Importance :	5
1.2 Situation du secteur des amandes au niveau mondial	6
1.3 Présentation du secteur amandier au maroc	7
1.4 Composition et bienfaits	8
III. La qualité microbiologique et risques sanitaires liés à la consommation des fruits à coque	8
1. L'influence de la contamination sur la qualité des aliments	9
2. Les différents microorganismes responsables de la contamination des fruits à coque	9
3. La normalisation	11
IV. Méthodes de décontamination	12
1. La lutte chimique	13
2. La lutte biologique	13
3. La lutte physique (irradiation)	14
4. Le séchage et le stockage sous une atmosphère contrôlée	14
Partie 2 : Matériel et méthodes	15
I. Echantillonnage	16
II. Les analyses bactériologiques	17
1. Préparation des échantillons	18
2. Préparation de la série de dilution	18
3. Principe de la méthode d'ensemencement	19
4. Composition et préparation des milieux de culture	19
5. Les méthodes de recherche des différents microorganismes	19
5.1 La recherche de la flore mésophile aérobie totale(FMAT)	19
5.2 La recherche des coliformes	19
5.3 La recherche des germes pathogènes (salmonelles)	20
III. Les analyses mycologiques	21
1. Préparation des échantillons	21
2. Technique de suspension-dilution	22
3. Milieux de culture et ensemencement	22
4. Composition et préparation des milieux	22
5. Purification des isolats de moisissures	22
6. Caractérisation des isolats de moisissures	22

IV. Les analyses mycotoxicologiques	23
1. La chromatographie sur couche mince (CCM)	23
1.1 préparation des échantillons	23
1.2 Extraction	23
1.3 Purification de l'extrait.....	24
1.4 Détection des aflatoxines par la CCM.....	24
1.5 Confirmation de l'identité de l'aflatoxine B1	25
V. La méthode de décontamination	25
1. Recherche des bactéries lactiques dans les amandes.....	25
2. Isolement des bactéries à partir du lait	25
3. Diffusion à la gélose (principe d'antibiogramme)	26
3.1 Germe testé.....	26
3.2 Milieu de culture	26
3.3 Matériel antifongique	26
3.4 Protocole de la méthode de diffusion.....	26
Partie3 : Résultats et discussion	27
I. Analyse bactériologique.....	28
II. Analyse mycologique	29
1. Isolement, purification et identification des isolats.....	29
1.1 Isolement et purification.....	29
1.2 Identification des souches isolées	30
1.3 Identification du genre des souches isolées à partir des amandes	30
1.4 Identification d'espèces des souches isolées à partir des amandes	31
2. Identification des souches appartenant au genre aspergillus :.....	32
3. Identification des espèces appartenant au genre penicillium :	32
4. Discussion	33
III. Analyse mycotoxicologique	33
IV. Méthode de décontamination	35
Conclusion et perspective	38
Bibliographie.....	39
Annexes	42

Liste des abréviations

A : *Aspergillus*

AFB1 : Aflatoxine B1

BD : Biokar diagnostic

BGYF : fluorescence jaune verdâtre brillante

CCM : Chromatographie sur couche mince

C.F : coliforme fécaux

CRRA : Le centre régional de la recherche agronomique rabat

C.T : coliformes totaux

EHEC : Escherichia coli entérohémorragiques

EPT : Eau peptonée tamponnée

FMAT : Flore mésophile aérobie total

Fosra : Fond des œuvres Sociales de la Recherche Agronomique.

GRA: Generally Recongnized as safe

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

INRA : L'Institut National de la Recherche Agronomique

ISO : Organisation International de Normalisation

MAPM : Ministère d'Agriculture et de Pêche Maritimes

MRS: Man, Rogosa et Sharpe

OTA: Ochratoxine A

P : *Penicillium*

PCA: Plate Count Agar

QPS: Qualified presumption of safety

SS: Salmonelle Shigell

TSI: Triple Sugar Iron

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra violet

VRBL : gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre