

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية للعلوم البحرية وتكنولوجيا الساحل
École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
D'INGENIEUR EN SCIENCES DE LA MER

Spécialité: Aquaculture

Sujet :

**Evaluation de la qualité microbiologique
des crevettes décortiquées congelées (*Aristus antennateus*).
Partie I : Recherche des contaminants Gram négatif**

Réaliser par :

GHEZAL Nora

Session : Octobre 2014

Examiné par la commission

Dr SOFIANE O.	Maitre de conférence B (ENSSMAL)	Président
Mr BELHASNAT K.	Maitre de conférence B (ENSSMAL)	Examineur
Mme ALOUACHE.	Maitre de conférence B (ENSSMAL)	Examinatrice
Dr DJEGHRI HOCINE B.	Professeur (ENSSMAL)	Promotrice

Promotion 2014

Je dédie ce travail

- ✦ *A Dieu Tout Puissant et Miséricordieux, pour toutes ses grâces*
- ✦ *A mes parents, pour m'avoir mis sur le banc de l'école.*
- ✦ *A mes frères Jugurtha, yuva et Yani*
- ✦ *A mes sœurs wahiba et bahia et la petite célia*
- ✦ *A mes très chers cousins et cousines*
- ✦ *À tous mes ami(e)s et toutes les personnes que j'aime*

NORA

REMERCIEMENT

Je suis sur le point de mettre les derniers points pour finir ce modeste travail. Je tiens à remercier dieu qui ma donner la foi et le courage, qui m'a mis sur le bon chemin d'étudier.

Je remercie vivement tous ceux qui ont contribués de près ou de loin au bon déroulement de mon projet de fin d'étude.

*Un grand merci pour ma promotrice **Mme DJEGHRI B** de m'avoir encadré durant ce travail, qui m'a bien aider et assister par leurs conseils, et qui a été toujours à mes côtés.*

*Mes vifs remerciements vont également à **Mr BELHASNAT K** et à **Madame ALLOUACHE S** pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Je remercie également **Mr SEFIANE O** pour le grand honneur qu'il m'a fait, en présidant ce jury.*

*Mes remerciements vont également aux ingénieurs et aux techniciens de l'ENSSMAL en particulier **Mme REFES** et **Youcef**, qui n'ont pas ménagé leurs efforts pour la bonne marche de la présente étude.*

Sommaire

Introduction	11
---------------------------	-----------

Partie I : Synthèse bibliographique

1. Les crevettes rouges.....	13
1.1. Position systématique.....	13
1.2. Description biologique.....	14
1.3. Habitat.....	14
1.4. Valeur nutritionnelle des crevettes péneïdés.....	14
1.5. Caractéristiques diététiques des crevettes péneïdés.....	15
2. Congélation des crustacés.....	15
2.1. Les crevettes décortiquées congelées.....	15
2.2. Qualité de la crevette congelée.....	16
2.3. Durée de la congélation des crustacés.....	16
2.4. Influence de la congélation sur les crevettes.....	16
3. Bactériologie des produits de la pêche.....	17
3.1. Contamination primaire ou endogène.....	17
3.2. Contamination secondaire ou exogène.....	18
3.3. Conséquences de la contamination des produits de la pêche.....	19
3.3.1. L'altération.....	19
3.3.2. Les accidents alimentaires.....	19
4. Présentation des germes recherchés.....	20
4.1. La flore aérobie mésophile totale.....	20
4.2. <i>Salmonella</i>	20
4.2.1. Principaux caractères.....	20
4.2.2. Habitat.....	21
4.2.3. Mode de transmission.....	21
4.2.4. Symptomatologie.....	21
4.3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21
4.3.1. Habitat.....	21
4.3.2. Mode de transmission.....	21
4.3.3. Symptomatologie.....	21
4.4. <i>Escherichia coli</i>	22
4.4.1. Mode de transmission.....	22
4.4.2. Principaux symptomatologie.....	22
4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
4.5.1. Mode de transmission.....	23
4.5.2. Pouvoir pathogène.....	23
4.6. La flore fongique	23
4.6.1. Habitat.....	23
4.6.2. Toxicité	23
5. Action de la température sur la croissance des micro-organismes.....	24

Partie II : Matériel et méthodes

Cadre de l'étude	26
1. Echantillon.....	26
2. Analyse microbiologique	26
2.1.Préparation de la suspension mère.....	27
2.2.Préparation des dilutions décimales.....	27
2.3.Choix de diluant	27
3. Dénombrement bactérien.....	27
3.1. Sur milieu solide	28
3.2. En milieu liquide	28
4. Dénombrement de la flore mésophile totale.....	29
5. Recherche de <i>Salmonella</i>	31
6. Recherche de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	33
7. Recherche et dénombrement des coliformes et d' <i>Escherichia</i>	35
8. Recherche des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
9. Recherche et dénombrement de la flore fongique.....	39
10. Techniques d'identification bactérienne.....	40
10.1.Technique de coloration de Gram.....	40
10.2.Recherche de la catalase.....	41
10.3.Recherche de l'oxydase	41
10.4. Test d'identification par la galerie API 20 ^E	42

Partie III: Résultats et discussions

1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT).....	45
2. Recherche de <i>salmonella</i>	47
3. Recherche de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	49
4. Recherche d' <i>Escherichia coli</i>	51
5. Recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
6. Recherche de la flore fongique	53
Conclusion.....	55
Recommandations.....	57

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les cinq échantillons de crevettes décortiquées congelées	26
Tableau 02 : Technique de coloration de Gram (DELARRAS, 2007).	40
Tableau 03 : Résultat de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale.	45
Tableau 04 : Résultats de dénombrement de salmonella.	47
Tableau 05 : Résultats de la recherche de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	49
Tableau 06 : Résultats de la recherche d' <i>Escherichia coli</i>	50
Tableau 08 : Résultats de la recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Tableau09 : Résultats de recherche de la flore fongique.	52

Liste des figures

Figure 01 : <i>Aristus antinnateus</i>	13
Figure 02 : Action de la température sur la multiplication et la toxinogénèse des micro-organismes de contamination des alimentaires.	24
Figure 03 : Technique de dénombrement de la flore mésophile totale	30
Figure 04 : Technique de la recherche de <i>salmonella</i>	32
Figure 05 : Technique de la recherche des <i>Vibrio.Sp</i>	34
Figure 06 : Technique de la recherche des coliformes et d' <i>E.coli</i> par la méthode NPP : Test présumé	36
Figure 07 : Technique de la recherche des coliformes et d' <i>E.coli</i> par la méthode NPP : Test confirmatif.	37
Figure 08 : Technique de la recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	38
Figure 09 : Technique de la recherche et du dénombrement des levures et moisissures.	39

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

AFNOR : Association Française de la normalisation.

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

ANSSE : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire : aliment, environnement, travail.

Aw : activité de l'eau.

BCPL : Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol

BLBVB : Bouillon lactosé bilié au vert brillant

BSC : bouillon au sélénite et à la cystéine.

C. perfringens : *Clostridium perfringens*.

C. botulinum : *Clostridium botulinum*.

cm : centimètre.

E.coli : *Escherichia coli*.

ENSSMAL : Ecole Nationale Supérieure des sciences de la Mer et de l'Aménagement du littoral.

EPI : Eau peptonée exempte d'indole.

EPSA : Eau peptonée saline alcaline.

EPT: Eau peptonée tamponnée.

FAO: Food and Agriculture Organisation of United Nations.

FMAT: Flore mésophile aérobie totale.

g : gramme.

Gram- : Gram négatif.

Gram+: gram positif.

HTP : hypochlorite de potassium.

ISO: International Organization for Standardization.

kg: kilogramme.

min: minute.

ml: millilitre.

NPP: Nombre le plus probable.

Ox : Oxydase.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

PCA : Plate Count Agar.

pH : Le potentiel d'Hydrogène.

Sec : seconde.

SS : Gélose Salmonella-Shigella.

TCBS : Gélose au Citrate, à la Bile et au Saccharose.

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collectives.

UFC : Unité formant colonies.

V. parahaemolyticus : *Vibrio parahaemolyticus*.

Introduction

Dans de nombreuses régions du monde, les crevettes font partie du régime alimentaire des hommes et constituent une source importante de protéines animales. En Algérie ce fruit de la mer est très apprécié pour ses qualités gustatives. Mais, vu la flambée des prix, l'intérêt des petites bourses se tourne vers le marché des produits congelés, une filière très rentable de plus en plus prisée par les Algériens.

Les crevettes congelées sont préparées à partir d'espèces appartenant aux familles Penaeoidea, elles sont importées de différentes régions (d'Inde, les Etats-Unis, la Chine, le Japon, la Thaïlande, du Vietnam...). Elles doivent être traitées et conditionnées de manière à en maintenir la qualité pendant les opérations de transport et d'entreposage et à réduire au minimum la déshydratation et l'oxydation ainsi que des contaminations.

Cependant, il est bien connu que les crevettes sont particulièrement fragiles et s'altèrent très rapidement, quand les commerçants manipulent ce produit congelé, ils constituent la source la plus fréquente de contamination, car, ils ne maintiennent pas un degré approprié d'hygiène corporelle et ne prennent pas toutes les précautions nécessaires pour éviter la contamination et la prolifération d'une flore microbienne qui provoque des intoxications alimentaires et des toxi-infections nocives et parfois mortelles pour le consommateur.

C'est dans cette optique que nous avons entrepris ce travail qui a pour but l'évaluation de la qualité microbiologique des crustacés congelés (crevettes décortiqués) vendus à Alger.

Les objectifs spécifiques sont:

- ✓ apprécier le niveau d'application d'hygiène au cours du circuit de transformation.
- ✓ déterminer les flores de contamination qui sont la flore mésophile aérobie totale (FMAT) et la flore fongique
- ✓ rechercher les contaminants Gram négatif tel que : les salmonelles, les vibrio, les Pseudomonas et les *E. Coli* qui sont révélateurs de la contamination fécale.



CHAPITRE I

*Synthèse
bibliograp
hique*

1 .Les crevettes rouges :

Les Aristeidea, constituent un groupe très ancien de crustacés décapodes (cinq paires de pattes) qui habite autant la mer, l'eau douce, que l'eau saumâtre. Elles s'adaptent aussi bien à l'eau tempérée que chaude et froide, et sont réparties un peu partout à travers le monde (Ifremer, 2009).



Figure 01 : *Aristeus antinnaeus* (FAO, 2006).

1 .1. Position systématique

Règne : Animalia

Embranchement : Arthropoda

Classe : Crustacea

Sous classe : Eumalacostraca

Super ordre : Eucarida

Ordre : Décapoda

Super famille : Penaeoidea

Famille : Aristeidea

Genre : aristeus (RISSO, 1816).

1.2. Description biologique :

La crevette rouge est une crevette de grande de taille. Elle se caractérise par un rostre très court chez le mâle, la partie dorsale est armée de trois dents.

Chez la femelle : le rostre est très long avec trois dents sur la partie basale, la Carapace est sans épines hépatiques et sans carène.

La taille commune est entre 10-18 cm. La crevette à une seule mue annuelle qui se passe en mai. La maturation est atteinte en juin et la reproduction en été (RISSO, 1816).

La reproduction dépend surtout de la saison, des conditions climatiques (salinité et température) et également du cycle lunaire.

Elles se nourrissent de petits crustacés, de moules, de vers et de détritus.

1.3. Habitat :

La crevette rouge est une espèce benthique qui est fréquente dans le fond qui varie de 10 jusqu'à 1500 m.

L'espèce est présente dans toute la méditerranée et également dans l'Atlantique Est. Elle est très abondante en méditerranée de l'Ouest entre l'Espagne et l'Afrique du Nord (KENNOUCHE H, 2003).

En Algérie, elle est localisée dans la partie centrale du pays et pêchée entre 400 et 800 m. Elle accuse une nette préférence pour les eaux plus froides (KENNOUCHE, 2003).

1.4. Valeur nutritionnelle des crevettes *Aristeidea* (Tahiana, 2004). :

Pour 100 g de crevettes, équivalent à 98 kilocalories, la valeur nutritionnelle est :

- Protéines : 22 g ;
- Lipides : 1,8 g (dont 75 % d'acides gras insaturés) ;
- Glucides : traces ;
- Minéraux : Phosphore, Calcium, Magnésium, Sodium, Fer, Iode et;
- Vitamines: B1, B2, B3, B6, B12, E.

1.5. Caractéristiques diététiques des crevettes *Aristeidea*:

Elles sont digestes et légères, fournissent autant de protéines que la viande, avec une excellente qualité biologique, permet la synthèse et le renouvellement des cellules de l'organisme dans les meilleures conditions.

La teneur en lipides reste très faible. Ils sont constitués en majorité d'acides gras insaturés, bénéfiques pour la santé cardio-vasculaire.

Les crevettes constituent une mine de minéraux et d'oligo-éléments. Elles sont bien pourvues en vitamines B, ainsi qu'en vitamine E anti-oxydante (Tahiana., 2004).

2. Congélation des crustacés :

Les crevettes figurent parmi les aliments les plus périssables, elles sont instables du point de vue microbiologique. Pour ces raisons elles sont soumises aux différents procédés de conservation dont la conservation par le froid.

Ce procédé permet d'empêcher totalement ou partiellement l'apparition des phénomènes d'altération et de ralentir la multiplication microbienne et l'activité des enzymes ce qui permet aussi d'allonger la durée de vie et d'accroître la sécurité sanitaire (JOFFIN et JOFFIN, 2010).

La congélation abaisse le « cœur » de l'aliment à des températures inférieures à -18°C d'une manière lente (JOFFIN et JOFFIN, 2010). Elle désigne le changement d'état d'eau liquide en glace, elle combine les effets de la diminution de la température et celle de l'activité de l'eau (a_w), puisqu'une partie de l'eau est sous forme cristallisée (JEANTET *et al*, 2010).

La surgélation garantit que le produit est congelé le plus rapidement possible à une température égale ou inférieure à -18°C , puis maintenu à cette température pendant toute la durée de stockage (JEANTET *et al*, 2010).

2.1. Les crevettes décortiquées crues congelées : correspondent aux pièces inaptes à la congélation, entière ou aux crevettes en mauvais état, suite aux conditions de chalutage et de triage. Elles sont, après leur réception décortiquées et étêtées. La pesée précède leur lavage dans la solution d'hypochlorite de potassium et leur triage.

Les crevettes sont surgelées en bloc pendant 3 heures, rangées sur une pellicule plastique dans les plateaux de congélation.

Le démoulage qui intervient après, se fait par trempage des plateaux dans d'eau douce pour faciliter le triage et le calibrage.

Le conditionnement se fait dans des sachets plastiques de 1 kg avant que les crevettes décortiquées crues congelées soient emballées dans des cartons de 10 kg et stockés à -18°C (Tahiana., 2004).

2.2. Qualité de la crevette congelée :

Les crevettes congelées doivent être d'une qualité qui leur permette d'être vendues à l'état frais pour la consommation humaine. On s'intéresse donc à la qualité sanitaire et organoleptique.

A. Qualité sanitaire :

Elle correspond à la salubrité, l'innocuité du produit. Il s'agit d'éviter les risques de contaminations microbiologiques de la matière première et l'hygiène de transformation et chimiques par présence des substances que renferme la matière première par celles apportées par le processus de fabrication (ABOTCHI *et* SEYDI, 2010).

B. Qualité organoleptique

Elle s'agit de la qualité sensorielle (saveur, odeur, texture, couleur) et la valeur nutritionnelle que les crevettes congelées doivent garder.

2.3. Durée de congélation des crustacés :

La durée de conservation des crevettes congelées dépend de la température d'entreposage, elle est variable de quelques jours à un an quand la température oscille entre -18 et -30°C (ANONYME I, 1972).

2.4. Influence de la congélation sur les crevettes :

Même si les crevettes sont congelées et entreposées dans de bonnes conditions, elles ne peuvent pas se conserver indéfiniment, leur qualité se dégrade au fil des semaines en raison d'un certains nombres de processus limitants (apparition d'un goût de rance, altération de la couleur, perte de valeur nutritionnelle). Certaines des réactions de détérioration interviennent lors de l'entreposage par les enzymes catalysantes (JEANTET *et al*, 2007).

Au cours du stockage à froid, les crevettes subissent des fluctuations de température qui contribuent à accroître le risque de dessiccation superficielle qui entraîne une perte de masse et

favorise l'oxydation des lipides, durcissement de la chair et apparition des tâches noires ou brunes correspondant aux échaudures par le gel (JEANTET et *al*, 2010).

3. Bactériologie des produits de la pêche:

Juste après la capture, les poissons et les fruits de la mer dont les muscles sont pratiquement stériles ne renferment de bactéries que sur la peau, les branchies et dans le tube digestif. La majorité de cette flore bactérienne est de nature banale, donc inoffensive ou seulement responsable de l'altération de la qualité marchande des produits (ABABOUCHE, 1995).

C'est au cours des manutentions, de la transformation et de la commercialisation que le produit peut être contaminé par des germes dangereux (pathogènes).

Ainsi on peut distinguer deux origines possibles de contamination des produits de la pêche (BOURGEOIS et LEVEAU, 1980, ROZIER et *al*, 1985).

3.1. La contamination primaire ou endogène :

Elle a lieu du vivant de l'animal par le biais de la respiration et de l'alimentation et lors des déplacements dans les eaux contaminées, par dépôt des germes sur la peau. Il s'agit essentiellement de bactéries propres à l'environnement naturel des poissons et autres fruits de mer ((BOURGEOIS et LEVEAU, 1980).).

Ces diverses espèces bactériennes prolifèrent après la mort vers les tissus les plus fragiles (sang, foie, rein) ; mais également vers tous les éléments proches des branchies et du tube digestif, et sont par conséquent à l'origine de l'altération des produits (SMITH et *al*, 1983).

Les germes de contamination endogène peuvent être regroupés en 3 classes en fonction de leurs origines (OUATTARA, 1986) :

- **Les germes typiquement aquatiques:**

La flore microbienne prédominante des produits marins en zone tropicale est composée de bactéries à Gram positif mésophiles. Cependant, un grand nombre de bactéries à Gram négatif psychrotrophes serait présent. On y dénombre *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* et *Vibrio*.

- **Les germes d'origine tellurique**

Ce sont des bactéries vivantes dans le milieu terrestre et dont la dissémination dans le milieu aquatique est assurée par les pluies et les eaux de ruissellement.

Cette flore tellurique est essentiellement composée par des bactéries sporulées, en particulier les genres *Clostridium* et *Bacillus*.

- **Les germes d'origine humaine ou animale**

Il s'agit essentiellement des bactéries du tube digestif de l'homme et des animaux, ce qui traduit une pollution marine d'origine fécale. Les effluents domestiques non traités rejetés par les grandes agglomérations sont une source importante de contamination du milieu marin (SITTI, 2001).

3.2. La contamination secondaire ou exogène :

Elle regroupe toutes les possibilités de contamination des produits de la pêche depuis la capture jusqu'à la table du consommateur. La contamination exogène fait intervenir deux types de vecteurs (ROZIER et *al*, 1985) :

Les vecteurs animés,

Les vecteurs inanimés,

- ✓ **Les vecteurs animés:**

Il s'agit de l'homme et des animaux. L'homme constitue la source la plus fréquente de contamination des denrées alimentaires.

Ainsi, l'homme chargé de la préparation, de la manipulation, de la récolte ou de la commercialisation doit être fortement sensibilisé sur le respect des règles d'hygiène corporelle et les bonnes pratiques de transformation (SEYDI, 1982).

Il intervient comme agent animé de contamination de deux manières différentes:

- **Vecteur actif**

L'homme est un réservoir de germes divers. La flore fécale humaine est composée de germes des groupes des entérobactéries, des entérocoques et des lactobacilles et d'un petit nombre de staphylocoques, *Clostridium*, *Pseudomonas*, levures, moisissures (TOURE, 1996).

- **Vecteur passif**

Hormis les germes qu'il héberge, l'homme peut assurer le transfert de germes des matières souillées à la denrée alimentaire. C'est le cas lors de la manipulation des produits avec des mains sales, lors du contact des denrées avec des vêtements mal entretenus, des gants souillés et des bottes.

- ✓ **Les vecteurs inanimés**

Ce sont des éléments inertes pouvant être responsables du transfert de germes sur les aliments. On distingue principalement le sol, la terre, l'air, les locaux et le matériel (DJEANTET, 2007 et VIERLING, 2008).

3.3. Conséquences de la contamination des produits de la pêche :

3.3.1. L'altération :

Les poissons, crustacés et mollusques sont parmi les denrées alimentaires les plus périssables. Ils ont en effet:

- Une hydratation plus élevée que celle de la viande,
- D'avantage de composés azotés non protéiques,
- Un pH ultime élevé, de 6,1 à 6,9 selon les espèces.

L'altération qui commence dès la mort est un processus complexe mettant en jeu des phénomènes physiques, chimiques et bactériologiques. Elle se traduit par un changement d'aspect et par l'apparition d'odeurs et de goûts anormaux, conférés aux produits par certains métabolites bactériens (TOURE, 1996).

3.3.2. Les accidents alimentaires :

Les bactéries pathogènes des produits de la pêche et / ou leurs toxines provoquent généralement des toxi- infections alimentaires, des intoxications par *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *Salmonella* sont les plus souvent incriminés. Par exemple :

Les salmonelles sont responsables de Toxi-Infections alimentaires collectives (TIAC) caractérisées par une gastro-entérite fébrile survenant 12 heures après ingestion des germes.

Les *Staphylococcus aureus*: la victime présente des vomissements en jets incoercibles 1 à 6 heures après ingestion des denrées contaminées.

Malgré les mesures d'hygiène rigoureuses et les procédés de conservation bien menés, il y a toujours des bactéries qui échappent à la vigilance. Il s'avère donc nécessaire de compléter ces mesures par la recherche de certains germes dangereux dans les produits de la pêche dans un but de contrôle sanitaire. Afin de pouvoir rechercher ces germes, il faut bien les connaître (SITTI, 2001).

4. Présentation des germes recherchés :

4.1. La flore aérobie mésophile totale :

La flore aérobie totale est l'ensemble des microorganismes aptes à donner des colonies visibles aux températures moyennes (30° à 37°C)

Le dénombrement de cette flore est utile, en ce sens qu'il permet de définir des déviations par rapport aux conditions de bonnes pratiques de fabrication, notamment en ce qui concerne la rupture de la chaîne du froid et les retards accusés lors de l'élaboration (DELARRAS, 2007).

4.2. *Salmonella* :

4.2 .1 Principaux caractères :

Les salmonelles sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif, appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae. Ces bactéries possèdent un métabolisme oxydatif et fermentaire, elles sont catalase positive et oxydase négative.

C'est un germe qui est commun à toutes les espèces animales et qui se retrouve au niveau de l'environnement pollué. Sa présence dans l'aliment dénote d'un manque d'hygiène (BOURGEOIS et al, 1988).

4.2.2. Habitat :

Les salmonelles sont des bactéries parasites intestinales de l'homme et des animaux, se disséminent dans la nature par leurs excréta (matières fécales). Elles résistent bien dans le milieu extérieur (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

4.2.3. Mode de transmission :

Le mode de transmission des salmonelles se fait par la consommation d'eau et l'ingestion d'aliments contaminés (DELARRAS, 2007).

4.2.4. Symptomatologie

Les gastro - entérites à salmonelles font généralement suite à l'absorption d'un nombre élevé de bactéries vivantes de l'ordre de 10^6 .

La phase d'incubation dure de 12 à 14 heures et les principaux signes sont ceux d'une gastro-entérite fébrile avec vomissement, diarrhée parfois sanglante et douleurs abdominales.

La phase aiguë dure de 24 à 48 heures.

Les symptômes régressent spontanément et un traitement thérapeutique symptomatologique est généralement suffisant. La mort survient rarement sauf chez les sujets immunodéprimés, les enfants et les vieillards (HELMUTH et *al*, 1985).

4.3. *Vibrio parahaemolyticus* :

Ce germe fait partie de la famille des *Vibrionaceae*. C'est un germe recourbé en virgule à Gram-, non sporulé, mobile, aéro-anaérobie facultative et présente une réaction à l'oxydase positive et une catalase positive (Prescott et *al*, 2010).

4.3.1. Habitat :

V. parahaemolyticus est un vibron marin halophile, se trouve particulièrement dans les estuaires et les eaux côtières du monde entier. La bactérie a été mise en évidence dans une grande variété de poissons et de coquillages incluant les palourdes, les crevettes, les homards, les coquilles Saint-Jacques, les langoustines et les crabes ainsi que les huîtres (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

4.3.2. Mode de transmission :

La plupart des infections à *Vibrio parahaemolyticus* sont due à la consommation de mollusques crus (huîtres et palourdes) ou de crustacés mal cuits (crevette, crabes, homards), poissons séchés et d'autres produits surgelés (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

4.3.3. Symptomatologie :

La bactérie est responsable des symptômes suivants :

- ✓ Diarrhée ;

- ✓ Crampes abdominales ;
- ✓ Nausée ;
- ✓ Vomissements ;
- ✓ Céphalée ;
- ✓ Faible fièvre ;
- ✓ Frissons (RODIER 2009).

4.4. *Escherichia coli* :

Découverte en 1885 par ESCHERICH, c'est un bâtonnet à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae lactose +, aéro-anaérobie facultatif, oxydase- et catalase+ (DELARRAS, 2007).

Il se rencontre au niveau de la flore du tube digestif, plus précisément dans le colon de l'homme et des animaux, leur présence dans les aliments indique généralement un risque de contamination fécale (TAHIANA, 2004).

4.4.1. Mode de transmission :

Le mode de transmission est dû à la consommation d'aliment d'origine animale ou végétale, d'eau et des boissons contaminés par les matières fécales.

4.4.2. Principaux symptômes :

E. coli inclut de nombreux biotypes dont certains sont pathogènes provoquant des troubles digestifs spécifiques :

- ✓ Diarrhée banale ou colite hémorragique ;
- ✓ Crampes abdominales

4.5. *Pseudomonas aeruginosa* :

P. aeruginosa, est un bacille à Gram -, mobile, asporulé, présente un métabolisme oxydatif et une catalase+, dégrade la caséine, il produit des pigments dont les deux principaux sont la pyocyanine et la pyoverdine (DELARRAS, 2007).

Les pseudomonas constituent une grande partie de la flore banale. Ces bactéries sont ubiquitaires très répandues dans la nature en particulier dans le monde végétale ou elles peuvent se révéler phytopathogènes (GUIRAUD, 2003 et DELARRAS, 2007).

4.5.1. Mode de transmission :

La bactérie se transmet par l'ingestion des denrées alimentaires contaminées (DELARRAS, 2007).

4.5.2. Pouvoir pathogène :

P. aeruginosa est l'agent de gastro-entérite (vomissement, diarrhées, crampes abdominales), possède au moins six toxines (entérotoxines, exotoxines A, exoenzymes S, hémolysine, leuccocidine et glycolipoprotéine) (GUIRAUD, 2003).

4.6. La flore fongique :

La flore fongique correspond aux levures et aux moisissures. Ces derniers sont des micro-organismes filamenteux, acidophiles. Ils ont un rôle nuisible avec l'altération de certains produits destinés à l'homme ou à l'animal, en provoquant des changements d'aspects, en changeant les qualités organoleptiques (odeur et saveur), rechercher pour évaluer l'état d'avancement de l'altération du produit (JEANTET et *al*, 2007).

4.6.1. Habitat :

Cette flore fongique a pour biotope : L'air, les sols, les eaux, les matières premières alimentaires et les aliments.

4.6.2. Toxicité :

De nombreuses moisissures peuvent produire des mycotoxines (Aflatoxines) dans les aliments et être à l'origine de mycotoxicose chez l'homme comme des aflatoxines entraînant hépatite et hépatome (DELARRAS, 2007).

5. Action de la température sur la croissance des micro-organismes :

La température constitue l'une des conditions physiques essentielles permettant la multiplication des micro-organismes. La figure suivante résume le comportement des microorganismes en fonction de la température (ROSSET *et al*, 2002).

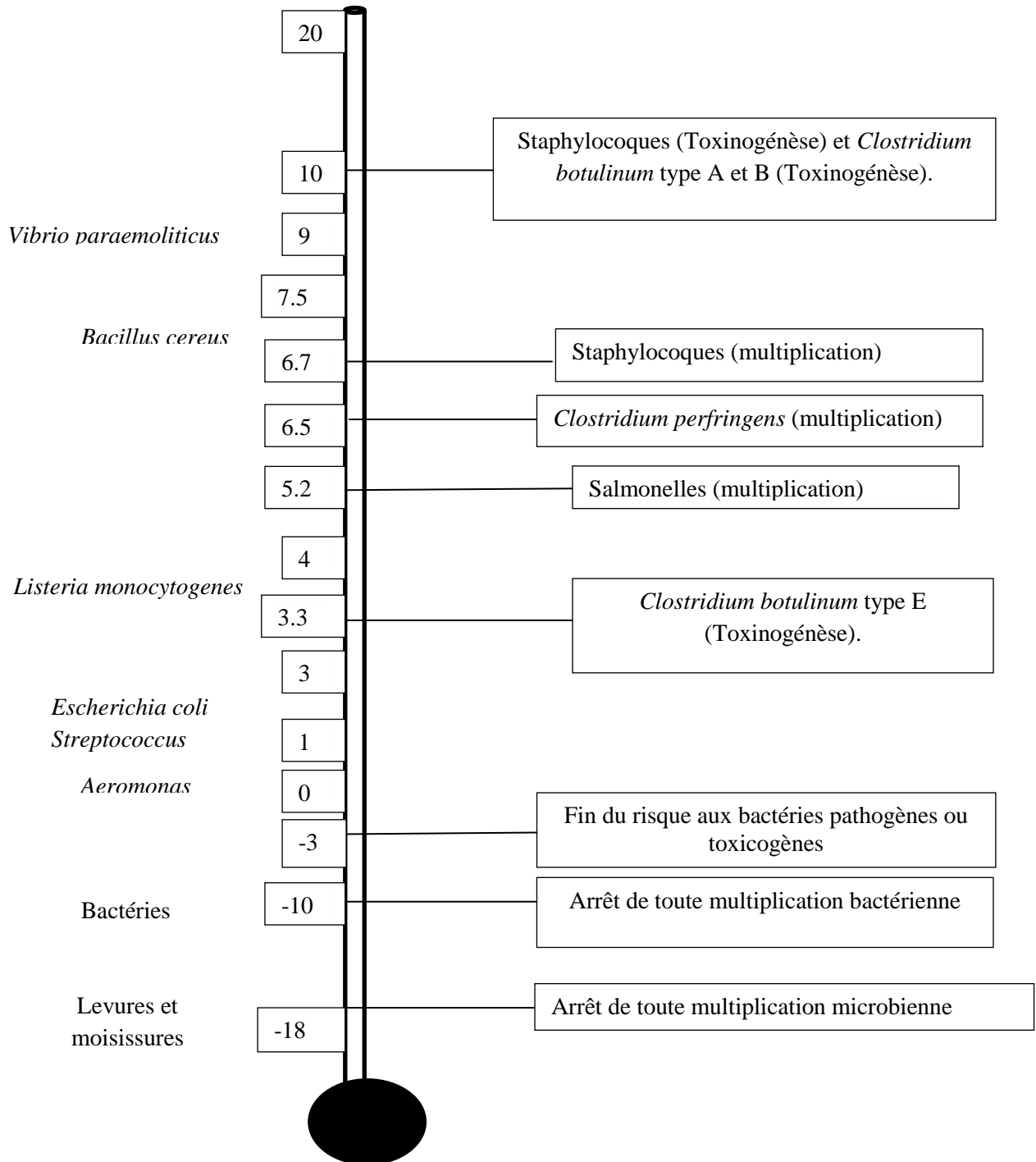


Figure 02 : Action de la température sur la multiplication et la toxinogénèse des micro-organismes de contamination des denrées alimentaires (NICCOLE *et* KNOCKAER, 1989 ; JEANTET *et al*, 2007)



CHAPITRE II

Matériel

&

Méthodes

Cadre de l'étude :

Cette étude s'est déroulée du 05 mai au 15 juillet 2014 au niveau du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire de l'ENSSMAL.

1. Echantillons :

Notre étude a porté sur cinq échantillons de crevettes décortiquées congelées. Ces dernières ont été achetées à différents points de vente chez les détaillants commercialisant les produits congelés (viandes, légumes et poissons).

Tableau 01 :Les cinq échantillons de crevettes décortiquées congelées.

Echantillons	Localisation	Poids (g)
(1)	Dely Brahim A	100
(2)	Dely Brahim B	100
(3)	Dely Brahim C	100
(4)	El-Biar	100
(5)	Cheragua	100

Les échantillons sont transportés au laboratoire dans des sachets de stockage et à température ambiante. Nous n'avons pas transporté nos échantillons dans une glacière pour nous placer dans les conditions de transport des consommateurs. La décongélation se fait lentement à 4°C au réfrigérateur.

2. Analyse microbiologique :

Les germes recherchés et dénombrés sont : la flore mésophile totale et la flore fongique ainsi que des bactéries à Gram négatif, qui ont un pouvoir pathogène comme, les salmonelles, les vibrio, les Pseudomonas et les *E. Coli* qui sont révélateurs de la contamination fécale.

3. Dénombrement bactérien :

Avant d'arriver à rechercher et dénombrer ces germes, nous devons préparer la suspension mère.

3.1. Préparation de la suspension mère :

- Faire sortir les crevettes décortiquées de leur sachet aseptiquement devant un bec Bunsen.
- Prélever et peser 25 g de la chair à l'aide d'une cuillère stérile (la pesé se fait avec une balance (OHAUS[®]) de précision 0.01g).
- Broyer la chair à l'aide d'un robot mixeur (WARING Commercial[®]) stérile en ajoutant le diluant choisi jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène ainsi on obtient la suspension mère ou la dilution 10^{-1} (BARTHE *et al*, 2007).

3.2. Préparation des dilutions :

- Prendre 3 tubes stériles numérotés de 1 à 3 contenant chacun 9 ml de diluant approprié.
- Prélever 1ml de la suspension mère à l'aide d'une micropipette et l'introduire dans 9 ml de diluant (tube N^o1) et on obtient la dilution 10^{-2} .
- On opère de la même manière jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-4} (BARTHE *et al*, 2007).

3.3. Choix de diluant :

Le choix du diluant est en fonction du produit à analyser et le type de microorganisme à rechercher (JOFFIN *et* JOFFIN, 2010) :

Le bouillon au sélénite et à la cystine (BSC) a servi de diluant pour les salmonelles, l'eau peptonée alcaline salée pour les vibrions. Alors que, l'eau peptonée tamponnée a été utilisée pour le reste des micro-organismes.

4. Dénombrement :

✓ Sur milieu solide :

Les dénombrements en milieux solides ont été réalisés selon les recommandations de JOFFIN *et* JOFFIN, 2010.

Technique de dénombrement en profondeur (dans la masse) :

- Liquéfier le milieu gélosé et le ramener en surfusion (45°C).
- Prélever 1 ml de la dilution et l'introduire dans des boites de Pétri en déposant des gouttes au fond de la boite (on commence par la plus grande dilution, afin d'utiliser qu'une seule pipette sans introduire des erreurs).
- Couler aseptiquement le milieu gélosé maintenu en surfusion et homogénéiser en imprimant à la boite des mouvements circulaires (en 8).
- Après la solidification du milieu gélosé, étuver pour une durée et une température précise.

Technique de dénombrement en surface :

- Couler le milieu adéquat dans des boites de Pétri stériles et laisser solidifier.
- Prélever 0.1 ml de la dilution la plus grande et la déposer en surface du milieu.
- Poursuivre ainsi pour toutes les dilutions, toujours stérilement.
- Etaler à l'aide d'une pipette râteau ou à l'aide d'un étaleur stérile.
- Etuver pour une température et une durée précise.

Lecture :

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1n_2)} \cdot \frac{1}{d}$$

N= nombres d'UFC par gramme ou ml de produit initial ;

$\sum C$ = somme des colonies des boites interprétables ;

V (ml) = volume de l'inoculum déposé.

n_1 = nombre de boîtes considérées à la première dilution retenue ;

n_2 = nombre de boîtes considérées à la seconde dilution retenue ;

d= facteur de la première dilution retenue.

✓ Sur milieu liquide :

La méthode du nombre le plus probable (NPP) :

- Effectuer une série de dilutions décimales à partir de la suspension mère
- ensemencer trois tubes contenant 10ml de milieu de culture par 1 ml de la suspension mère et chaque dilution.

- Après culture et incubation, procéder à la lecture des résultats en comptant les tubes positifs qui présentent une activité biologique (virage d'indicateur coloré, dégagement de gaz,...) et négatifs les autres (GUIRAUD *et* ROSEC, 2004).

5. Dénombrement de la flore mésophile totale (suivant la norme ISO 4833 ; février 2003).

+ **Mode opératoire :**

- Prélever 1 ml de chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) qu'on introduit aseptiquement dans les boîtes de Pétri.
- Ajouter 10 à 15 ml de milieu PCA (Plate Count Agar) en surfusion.
- Le mélange est homogénéisé par des mouvements horizontaux, lents, circulaires des boîtes.
- Incuber les boîtes de Pétri à 37°C. Le comptage se fait après 72 heures d'incubation.

+ **Lecture :**

On dénombre les colonies dans les boîtes qui contiennent au moins 30 et au plus 300 colonies.

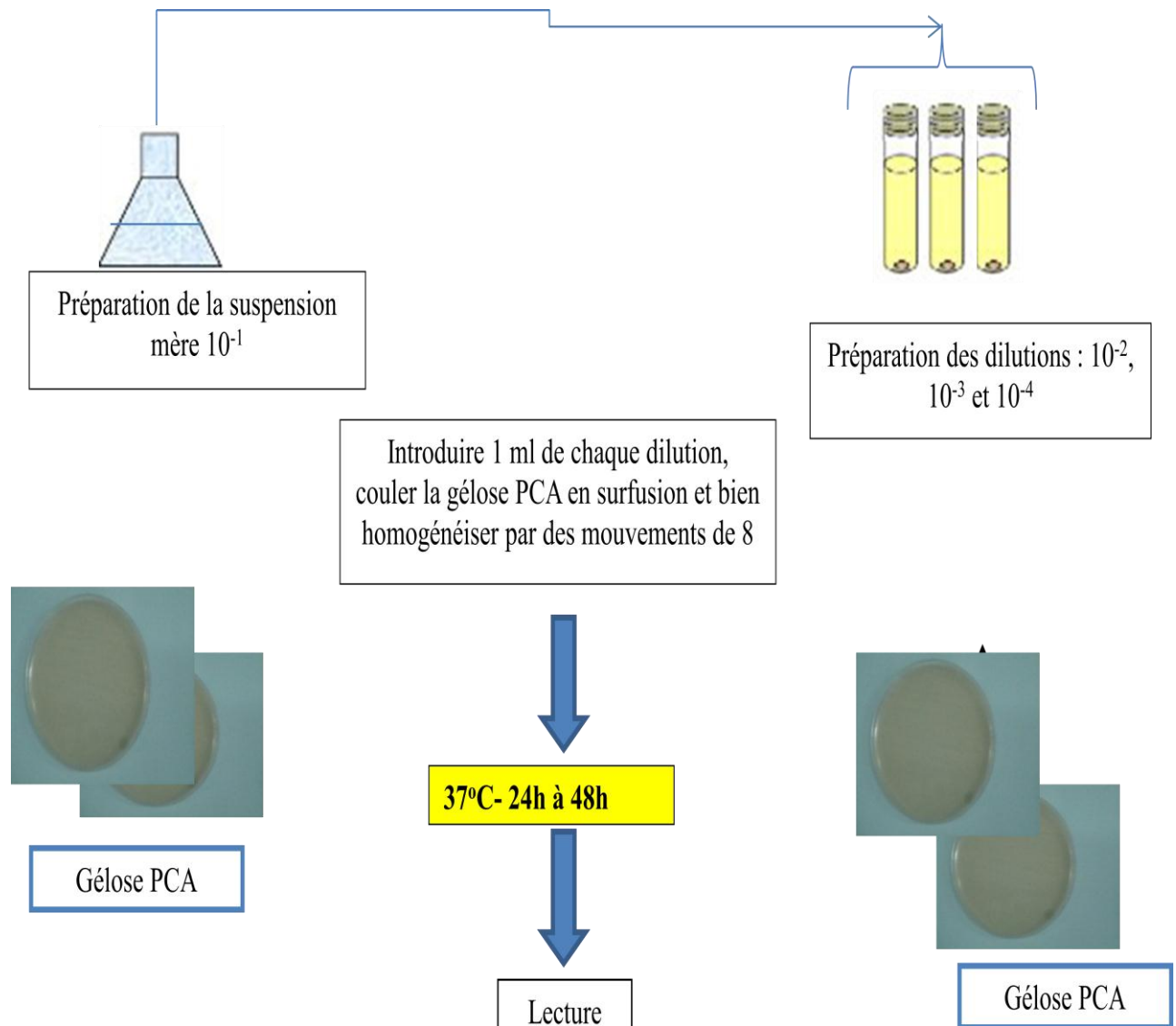


Figure 03 : Technique de dénombrement de la flore mésophile totale (norme ISO 4833 ; février 2003).

6. Recherche de *salmonella* :

La recherche de salmonella a été effectuée selon les recommandations de JOFFIN et JOFFIN, (2010). Le but de l'analyse microbiologique est de rechercher la présence d'une seule salmonella dans un échantillon de crevette congelée. Les salmonelles sont des bactéries à fort pouvoir pathogène et la présence d'une seule salmonelle dans un produit conduit à son insalubrité.

Mode opératoire:

❖ Pré enrichissement :

- Peser et broyer 25g de la chair de crevette et ajouter 225ml de bouillon au sélénite et à la cystéine.
- Broyer le contenu à l'aide d'un robot mixeur stérile pendant 2 min et le verser aseptiquement dans un flacon stérile, puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

❖ Enrichissement :

- Nous avons utilisé un milieu pour l'enrichissement sélectif: bouillon au sélénite et à la cystéine (BSC).
- Transférer 1ml de bouillon de pré enrichissement dans un tube contenant 10 ml de BSC, incubé à 37°C ±1°C pendant 24h.

❖ Ensemencement :

- La culture sur BSC est repiquée sur la gélose SS.
- L'ensemencement du milieu est effectué par stries.
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures

Lecture :

Les colonies de *Salmonella* présumées apparaissent transparentes avec ou sans centre noir sur gélose. La coloration noire est due à la formation de H₂S.

Identification ;

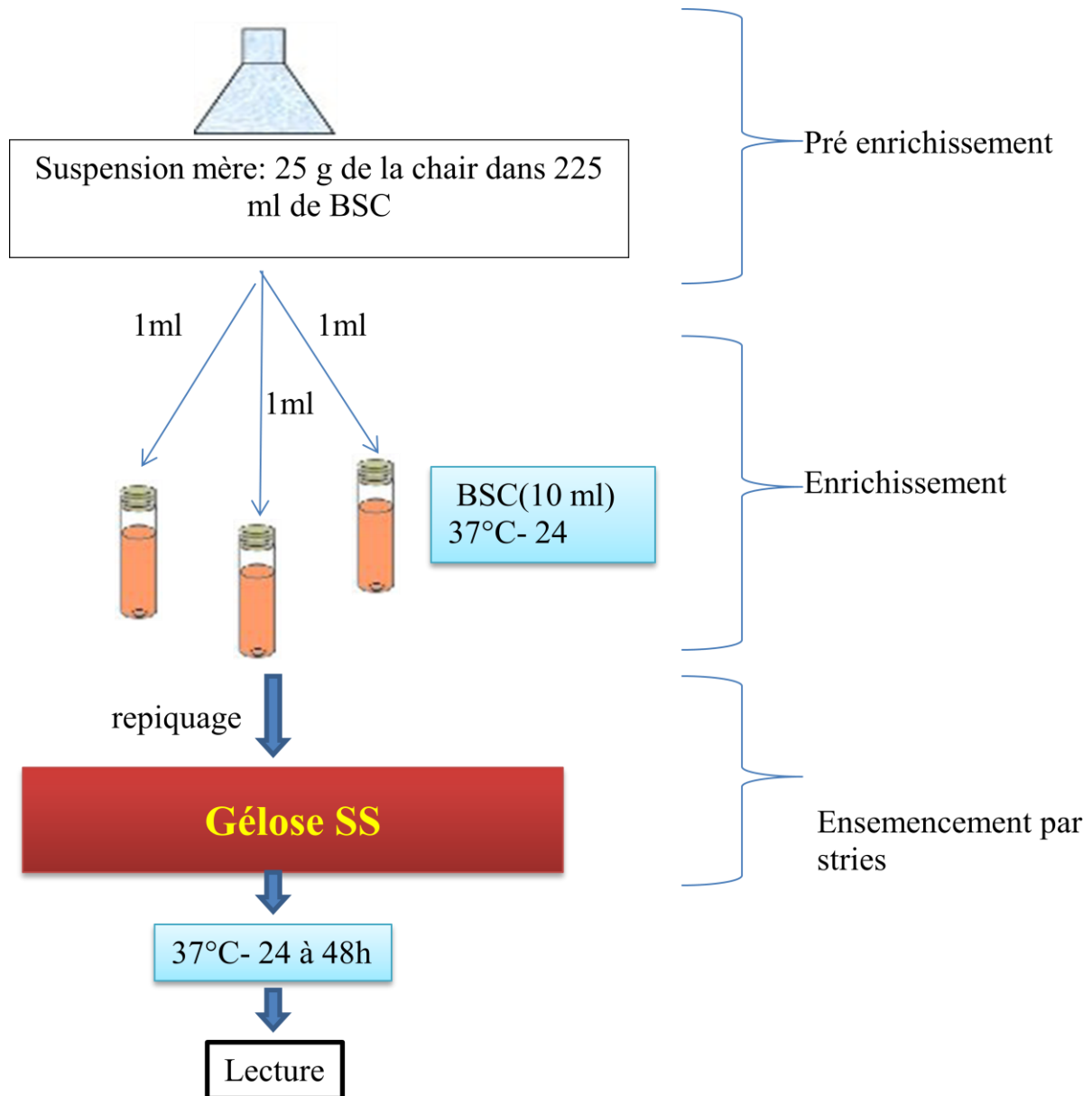
3 colonies caractéristiques et distinctes font l'objet d'une identification morphologique et biochimique qui se déroule comme suit :

- Coloration de Gram: Bacille Gram négatif.
- Test d'oxydase: Oxydase -
- Test de Catalase : Catalase

-Aspect des colonies sur la gélose (SS).

- Incolores, transparentes : Lactose-
- Incolore, à centre noire : Lactose-, H₂S+

-Galerie API 20^E.



Colonies transparentes avec ou sans centre noir

Figure 04: Technique de la recherche de Salmonella (JOFFIN et JOFFIN, 2010).

7. Recherche de *Vibrio parahaemolyticus* : (Norme XP ISO/TS 21872-1).**+ Mode opératoire :**

Préparer la suspension mère dans une eau peptonée salée alcaline (EPSA) à 30g de NaCl par litre et pH 8.8 en réalisant une dilution au 1/10. Incuber durant 6h à 37°C. Ensemencer une nouvelle EPSA (10ml) avec 1 ml de la suspension précédente et l'incuber 18h à 44°C puis isoler le germe sur le milieu au Thiosulfate, au Citrate, à la Bile et au Saccharose (TCBS).

+ Lecture :

Les colonies suspectes sont incolores à centre vert.

+ Confirmation : Elle se fait par l'observation microscopique après coloration de Gram (négatif) et les tests de la Catalase (positif) et l'Oxydase (positif).

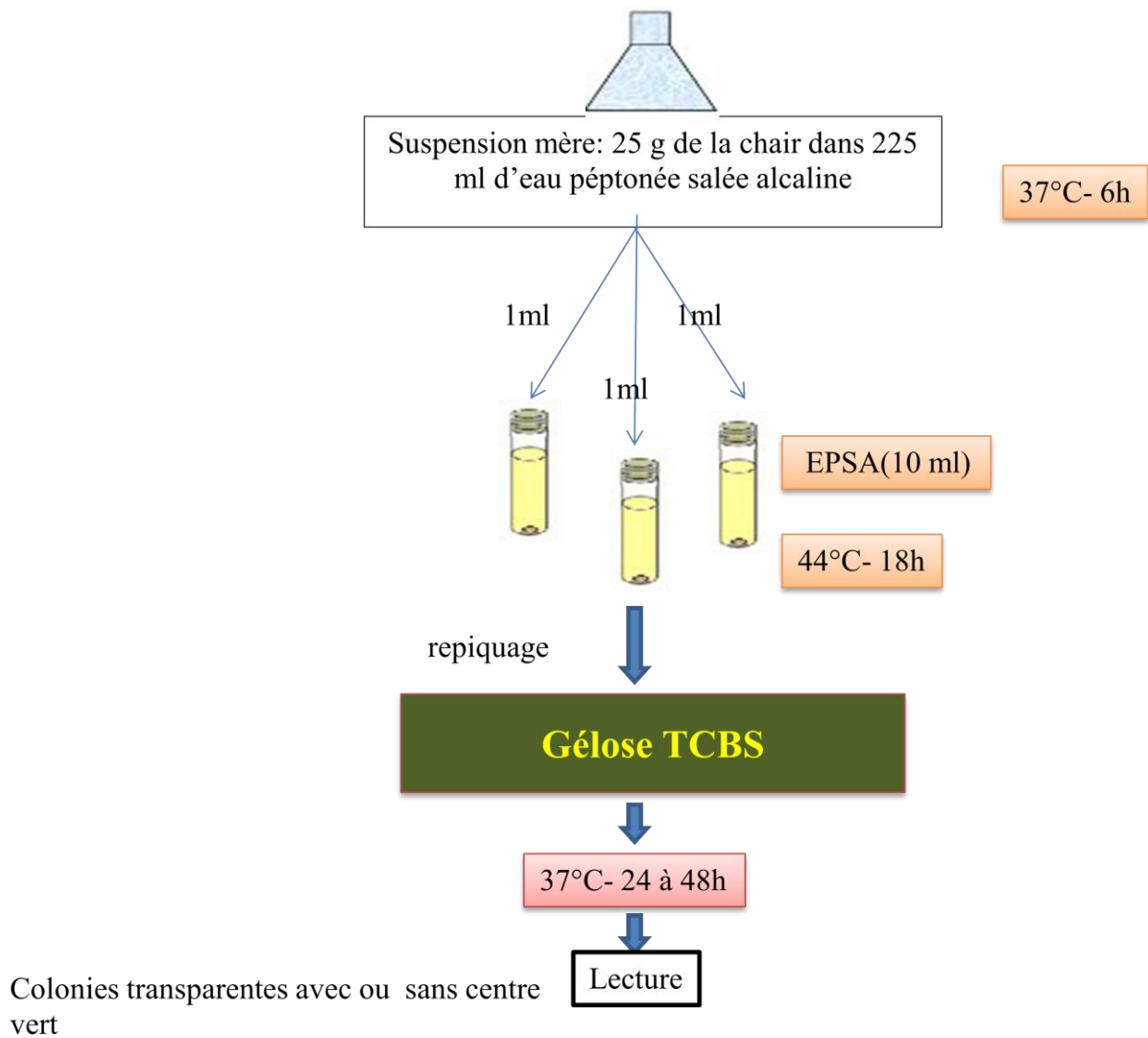


Figure 05: Technique de la recherche des *Vibrio.Sp*(Norme XP ISO/TS 21872-1).

8. Recherche des coliformes et d'*Escherichia coli* :

Les coliformes ont été recherchés par la méthode du nombre le plus probable (NPP). Cette méthode fait appel à deux tests consécutifs (JOFFIN *et* JOFFIN, 2010).

❖ Le test présomptif :

- Prendre trois tubes contenant le milieu double concentration [BCPL] et ajouter 10ml de la suspension mère.
- Ensemencer 1ml pour chacune des dilutions dans trois tubes de [BCPL] simple concentration.
- Incuber les tubes ensemencés à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Un résultat positif correspond à un trouble et à la production de gaz dans la cloche de Durhan(1/10 du volume).

❖ Le test confirmatif :

- Prendre tous les tubes du test présomptif qui sont positifs
 - Inoculer à la fois dans un tube de (BLBVB) muni d'une cloche et dans un tube d'eau peptonée exempte d'indole (EPI) 1ml de chaque tube positif.
- Incuber à (44,0 ± 0,5) °C pendant 24 et 48 heures.
- Ajouter 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs dans le tube contenant (EPI) pour la recherche d'*E.coli*.

✚ Lecture :

Une réaction positive se manifeste par un trouble et la production de gaz dans la cloche de Durhan dans le milieu (BLBVB).

Un trouble et la formation d'un anneau rouge dans le milieu (EPI) indique la présence d'*E.coli* .

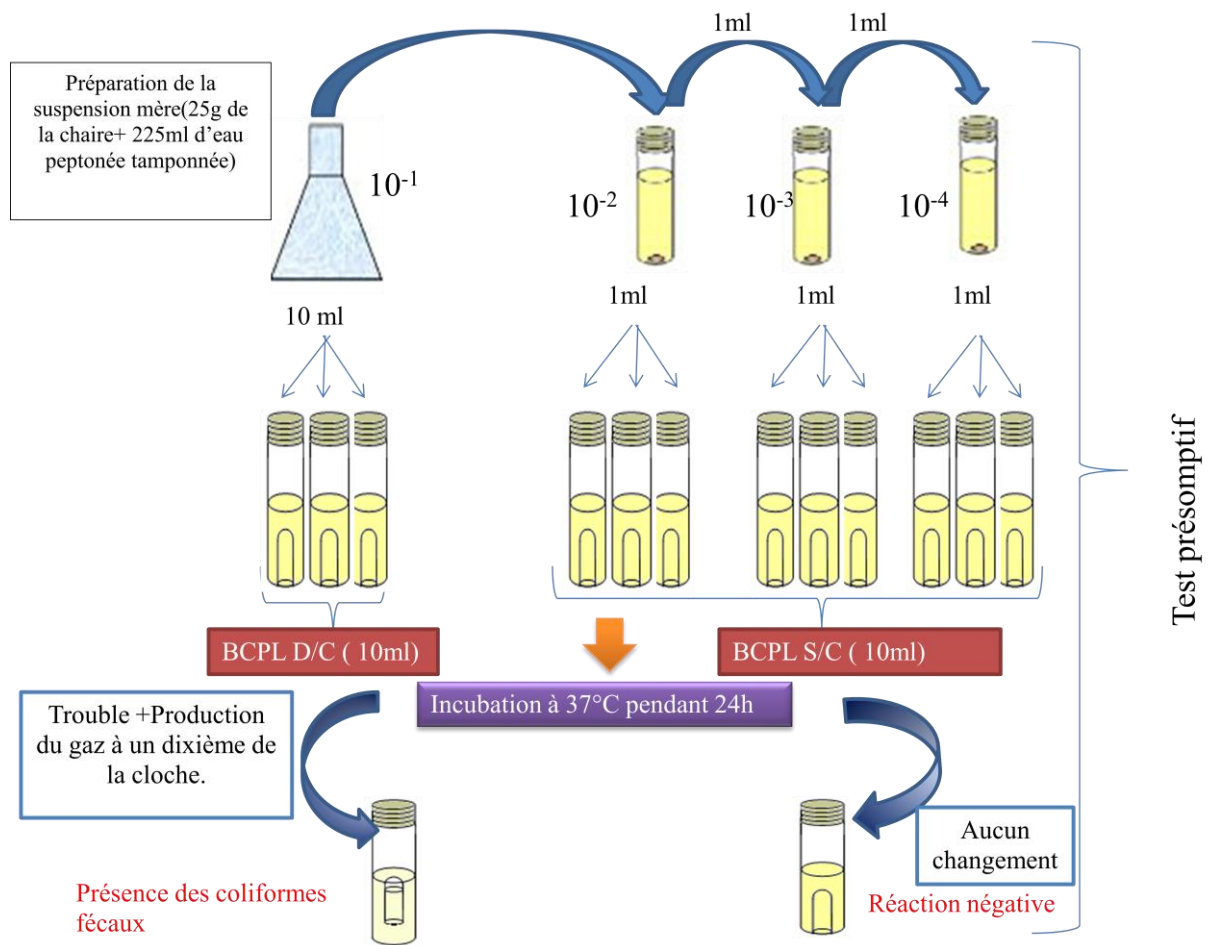


Figure 06 : Technique de la recherche des coliformes et d'*E.coli* par la méthode NPP : Test présomptif

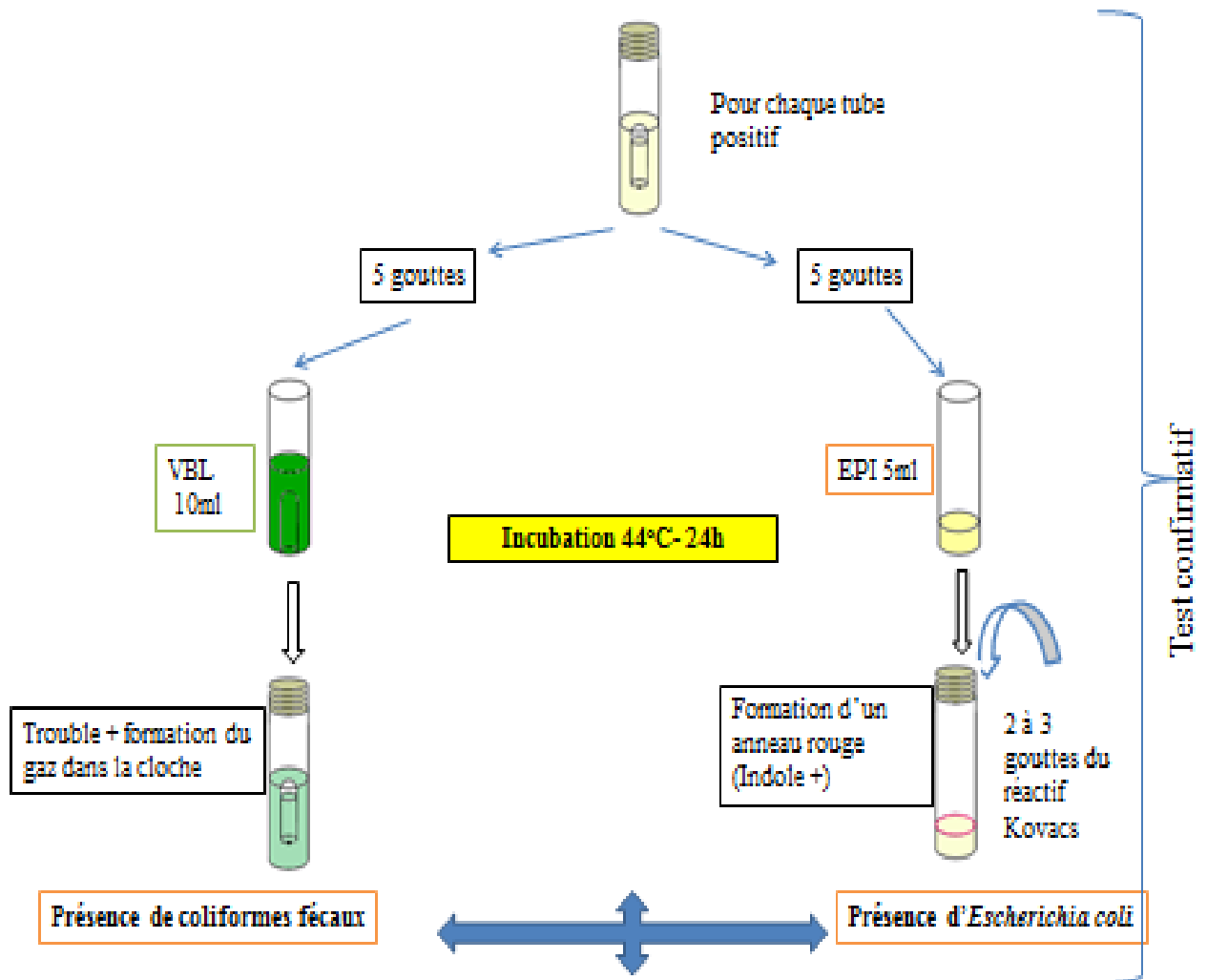


Figure 07: Technique de la recherche des coliformes et d'*E.coli* par la méthode NPP : Test confirmatif.

9. Recherche des *Pseudomonas aeruginosa* :

+ Mode opératoire :

La recherche de *P. aeruginosa* s'effectue par ensemencement en surface d'un milieu sélectif au cétrimide avec 0,1 ml de la suspension mère et des dilutions. L'inoculum est ensuite étalé à l'aide d'un râteau en verre. L'incubation se fait à 37°C pendant 48h.

+ Lecture :

Les colonies de *P. aeruginosa* présentent une pigmentation caractéristique bleue ou bleu-verte et une fluorescence sous ultra-violets à 254 nm (ANONYME II, 2010).

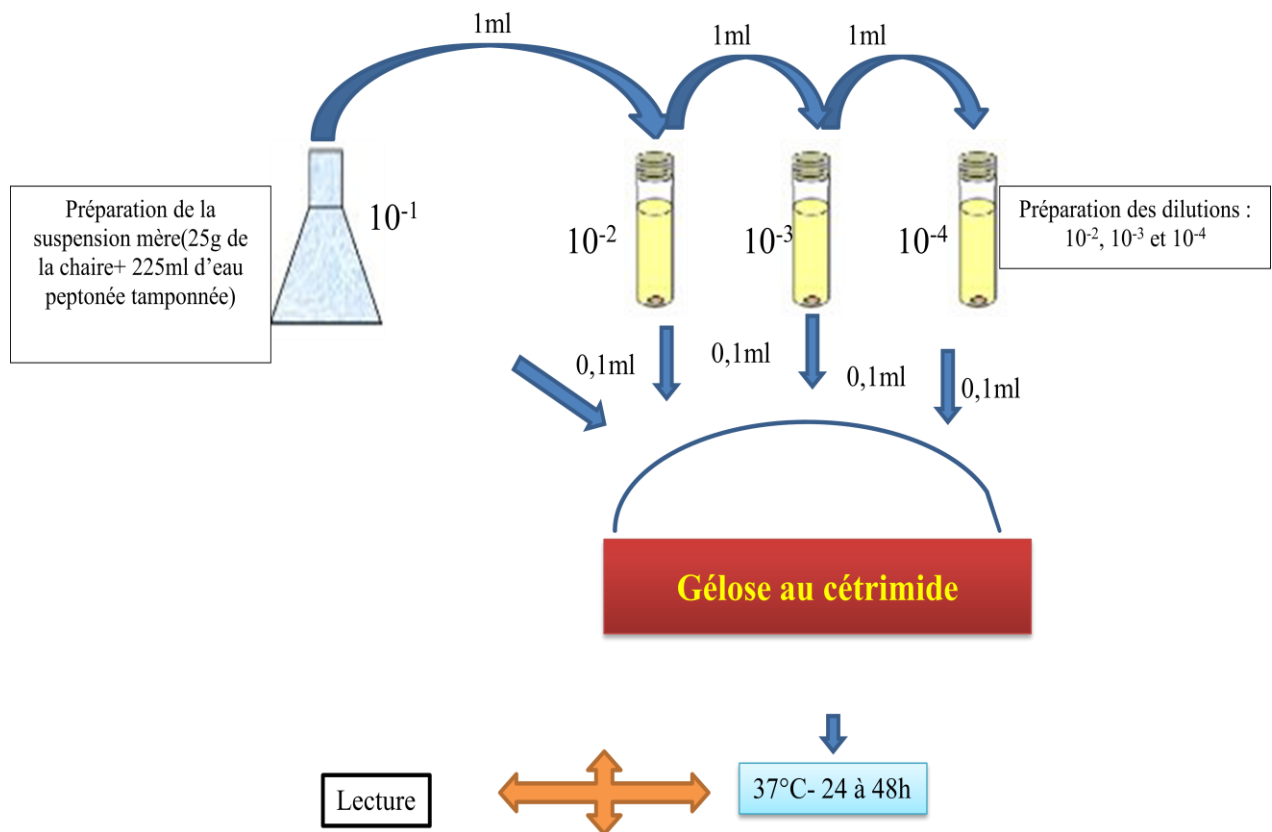


Figure 08 : Technique de la recherche de *Pseudomonas aeruginosa*.

10. Recherche et dénombrement de la flore fongique :

Le milieu Sabouraud est additionné d'amoxicilline est utilisé pour la recherche et le dénombrement des levures et moisissures.

L'amoxicilline est ajouté au milieu (0.1g/l) en vue d'inhiber la croissance bactérienne.

0,1ml des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} sont ensemencés en surface de la gélose.

La lecture des cultures se fait après 3 à 5 jours d'incubation à 37°C.

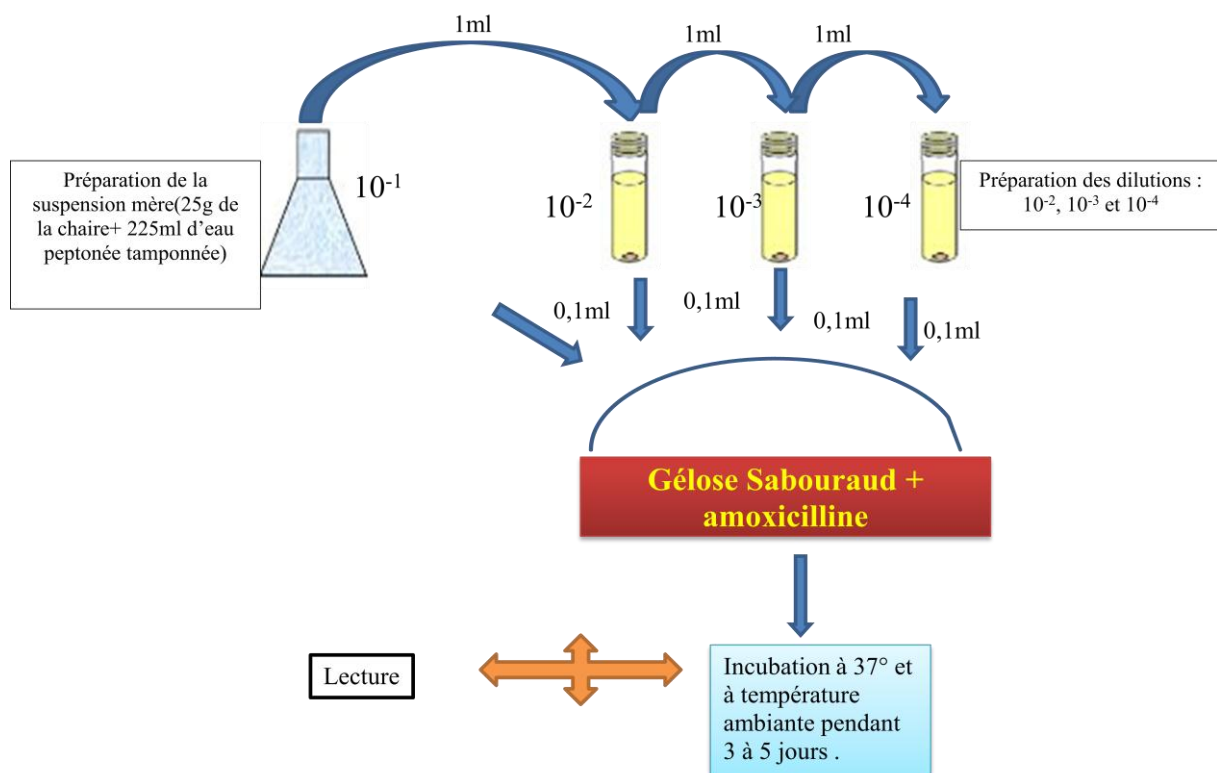


Figure 09 : Technique de la recherche et du dénombrement des levures et moisissures.

11. Techniques d'identification bactérienne :

11.1. Technique de coloration de Gram :

Elle permet de mieux observer les détails morphologiques des cellules bactériennes et d'orienter l'analyse d'un produit ou l'identification d'une bactérie (Gram+ou Gram-) (DELARRAS, 2007).

Tableau 02 :Technique de coloration de Gram (DELARRAS, 2007).

Préparation du frottis	Fixation	Coloration de Gram	Observation au microscope
<p>-Poser une goutte d'eau sur une lame propre.</p> <p>-Prélever un fragment d'une colonie bactérienne bien isolée et l'étaler sur la lame.</p> <p>-Sécher en approchant la lame de 20 à 25 cm au- dessous de la flamme.</p>	<p>-Tenir la lame avec une pince et la passer trois fois à la flamme. Cette étape consiste à tuer les bactéries, à rendre les membranes plus perméables, à fixer les structures sans les altérer et à faire adhérer le frottis à la lame</p>	<p><u>Coloration primaire :</u></p> <p>-couvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir 2min. Jeter l'excès de colorant.</p> <p><u>Mordantage :</u></p> <p>-Egoutter sans rincer et faire deux bains de lugol dont chacun dure 45 sec.</p> <p><u>Décoloration :</u></p> <p>-Egoutter et plonger la lame dans l'alcool 96°durant 30 secondes.</p> <p>-Rincer doucement et abondamment à l'eau distillée.</p> <p><u>Coloration secondaire :</u></p> <p>-Recolorer les germes - Décolorer avec la fuchsine pendant 2 min.</p> <p>-Laver à l'eau distillée et sécher la lame au-dessus de la flamme.</p>	<p>-Observer à l'objectif à immersion (G 100×10).</p> <p>-Les bactéries colorées en violet sont les bactéries Gram+.</p> <p>-Les bactéries colorées en rose sont les bactéries Gram-.</p>

11.2. Recherche de la catalase :

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage (DELARRAS,2007).

Mode opératoire :

Prendre une lame propre. Déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et prélever une parcelle de la colonie suspecte bien isolée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et émulsionner un peu cette dernière.

Résultats :

Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase : test catalase+.

Pas de réaction : catalase-

11.3. Recherche de l'oxydase :

L'oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes. La recherche de cette enzyme est utile dans le diagnostic des bactéries à Gram négatif (DELARRAS, 2007).

Mode opératoire :

Déposer sur une lame propre un disque (OX) et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée stérile ou d'eau physiologique stérile. Prélever une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque.

Résultat :

-Une coloration violette foncée apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes puis vire au noir : Oxydase+

-La coloration n'est pas modifiée dans le cas contraire.

11.4. Test d'identification par la galerie API 20^E :

La galerie API 20^E est un système standardisé pour l'identification de bactéries particulièrement des enterobacteriaceae. Elle est composée d'un nombre variable de microtubes (10 ou 20 le plus souvent), contenant des substrats déshydratés qui permettent de réaliser des tests biochimiques (DELLARAS, 2007).

✚ Mode opératoire :

❖ Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Répartir de l'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

a) Préparation de l'inoculum :

- Réaliser une suspension bactérienne dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile sans additifs, avec une seule colonie (bien isolée) prélevée sur un milieu gélosé et homogénéiser soigneusement.

b) Inoculation de la galerie :

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette en évitant la formation des bulles d'air.
- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de vaseline stérile.
- Refermer la boîte d'incubation
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.

✚ Lecture :

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (+ ou -).
- Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs :
Test TDA: 1 goutte de réactif TDA.
Test IND : 1 goutte de réactif Kovacs.
Test VP : 1 goutte des réactif VP1 et VP2 et attendre 10 min.

✚ Interprétation :

L'identification est obtenue à partir de profil numérique puis identifier à l'aide du catalogue analytique.



CHAPITRE III

Résultats
&
Discussions

L'étude a portée sur la recherche des flores (mésophile totale et fongique) et les principaux germes Gram négatif impliqués dans les intoxications alimentaires. La recherche de ces flores sont imposés par les législations nationales (JORA) et internationales(ISO).

L'objectif est de protéger le consommateur de toute contamination qui pourrait nuire à sa santé.


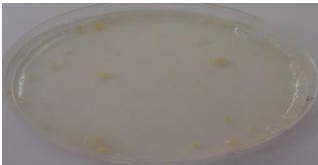

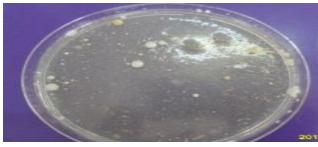

1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMT) :

Elle est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banals de contamination. Ces germes n'agissent pas sur l'aliment et n'ont de répercussion du point de vue qualitatif (altération du produit) et hygiénique (santé du consommateur) qu'au-delà d'une certaine quantité (GUIRAUD *et* ROSEC, 2004).

Les résultats de dénombrement de la FMT des échantillons sont énoncés dans le tableau 03 :

Les résultats des analyses microbiologiques montrent que le nombre UFC/g de crevette dans tous les échantillons est inférieur aux normes nationales (JORA, 1998). De ce fait, les crevettes sont considérées de qualité satisfaisante et cela dénote de la maîtrise des règles d'hygiène, des bonnes pratiques de fabrication dans les usines de transformation et le respect de la chaîne de froid au cours de l'entreposage et la commercialisation.

Tableau 03 : Résultat de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale.

Echantillons	Observation macroscopique	Nombre de germes UFC/g Résultat	normes Algériennes (JORA ,1998)	Observation
(1)	<p>Les colonies de tailles variables (de 1 à 2 millimètres), couleurs (blanches, jaunes, crèmes) et de forme (circulaire).</p> 	2. 10 ⁴	10 ⁶	Qualité satisfaisante
(2)	<p>-Colonies de tailles variables (1à 2 mm). -Couleurs jaunes, transparentes, crémeuses - Forme circulaire.</p> 	4. 10 ⁴	10 ⁶	Qualité satisfaisante
(3)	<p>Colonies de tailles différentes, couleurs jaunes, transparentes, crémeuses, forme circulaire</p> 	3. 10 ⁵	10 ⁶	Qualité satisfaisante
(4)	<p>Colonies tailles (petites, moyennes, et grandes), couleurs (jaunes, transparentes, crémeuses), forme circulaire.</p> 	4. 10 ³	10 ⁶	Qualité satisfaisante
(5)	<p>Colonies tailles (petites, moyennes, et grandes), couleurs (jaunes, transparentes, crémeuses), forme circulaire.</p> 	5. 10 ⁴	10 ⁶	Qualité satisfaisante

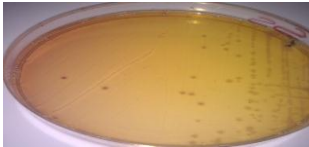

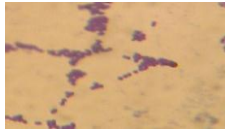
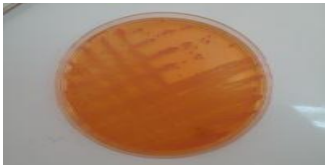
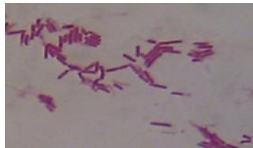
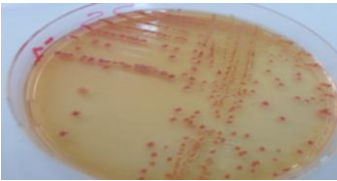


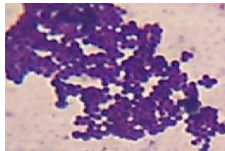
2. Recherche de *salmonella* :

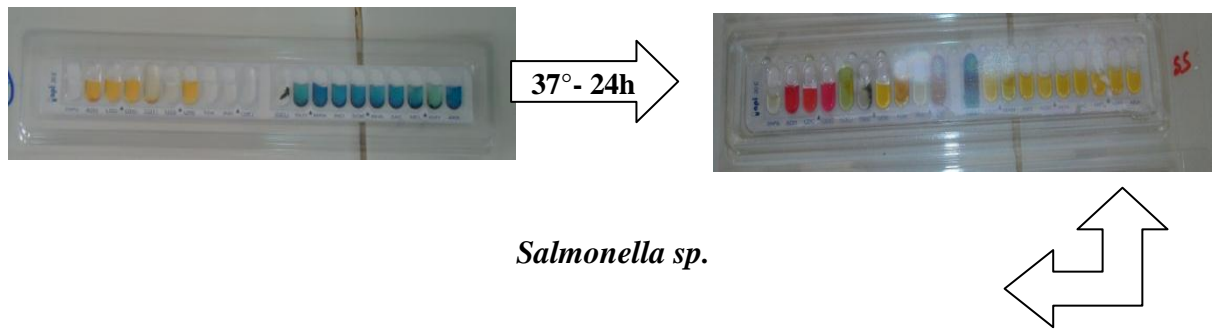
Les *salmonella* donnent des colonies transparentes avec ou sans centre noire, roses et rouges sur le milieu S-S. Ce sont des bacilles Gram -, Catalase+ et Oxydase – (DELARRAS, 2007).

Après enrichissement et isolement, les résultats obtenus dans les cinq échantillons sont présentés dans le tableau 04. Ces résultats montrent l'absence totale des colonies caractéristiques des salmonelles dans le premier échantillon. En revanche, dans les autres échantillons (2), (3), (4) et (5) on a noté la présence des colonies suspectes mais, l'absence de germe a été confirmée par coloration de Gram dans les échantillons (2) et (5). Par contre la présence de *salmonella* a été prouvée par la galerie d'identification dans les échantillons (3) et (4).

Selon les normes Algériennes (JORA, 1998) qui exigent l'absence totale de *salmonella* dans 25g de la chair, les résultats obtenus permettent de qualifier le premier, le deuxième et le troisième échantillon de qualité satisfaisante, cela est due à la salubrité de la zone d'élevage de l'espèce. Or, dans le quatrième et le cinquième échantillon, la crevette est considérée d'une mauvaise qualité, ce résultat traduit le non-respect des conditions d'hygiènes lors des opérations de transformation et de fabrication et surtout de manipulation.

Tableau 04 : Résultats de dénombrement de salmonella.

Echantillon	Observation macroscopique	Coloration de Gram Test catalase	Observation et identification
(01)	Absence des colonies caractéristiques 	/	Absence de salmonelles
(02)	Colonies transparentes avec ou sans centre noir 	Cocci Gram+  Catalase	Absence de salmonelles
(03)	Colonies roses, rouges, transparentes. 	Coccobacille Gram-  Catalase+	Identification par la galerie APE 20 ^h .
(04)	Colonies roses et rouges 	Coccobacille Gram-  Catalase+	Identification par la galerie APE 20 ^h .
(05)	Colonies transparentes sans centre noir 	Cocci Gram+  Catalase+	Absence de salmonelles




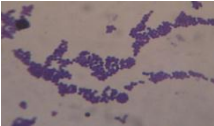
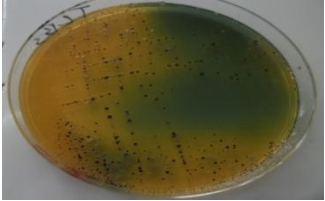
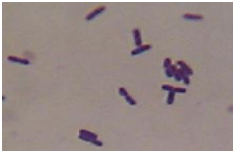

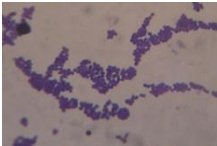


3. Recherche de *Vibrio parahaemolyticus*.

Les résultats de la recherche du germe sur le milieu TCBS dans les cinq échantillons sont indiqués dans le tableau 05.

Après plusieurs repiquages des colonies suspectées de *Vibrio parahaemolyticus*, la coloration de gram et le test de catalase ont confirmés l'absence du germe dans la chair de crevette congelée. Cette dernière est considérée de qualité satisfaisante. Ces résultats obtenus peuvent être expliqués par l'utilisation d'une matière première saine et la sensibilité du germe à la congélation.

Tableau 05 : Résultats de la recherche de *Vibrio parahaemolyticus*.

Echantillon	Observation macroscopique	Coloration de Gram Test de Catalase	Observation
(1)	Absence des colonies caractéristiques. 	/	Absence de <i>vibrio parahaemolyticus</i>
(2)	Colonies transparentes à centre vert. 	Catalase –	Absence de <i>vibrio parahaemolyticus</i>
(3)	Colonies transparentes Déviation de la couleur 	Coques Gram+  Catalase-	Absence de <i>vibrio parahaemolyticus</i>
(4)	Colonies transparentes à centre vert. 	Coques Gram+  Catalase+	Absence de <i>vibrio parahaemolyticus</i>
(5)	Colonies transparentes avec ou sans centre vert Colonies noires 	Coccobacilles Gram + Catalase+ 	Absence de <i>vibrio parahaemolyticus</i>

4. Recherche d'*Escherichia coli* :

D'après les résultats affichés au tableau 06. On note une absence d'*Escherichia coli* dans les cinq échantillons. Cela peut résulter de l'utilisation de matière première saine, du respect du code de bonne conduite (matériel bien nettoyé, non interruption de la chaîne du froid et le bon refroidissement) et la maîtrise d'hygiène lors des opérations technologiques.

En revanche, la présence de coliformes fécaux est due probablement à une contamination lors de la vente.

Tableau 06 : Résultats de la recherche d'*Escherichia coli* :

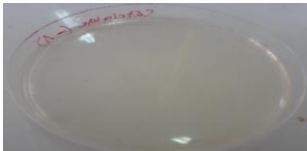
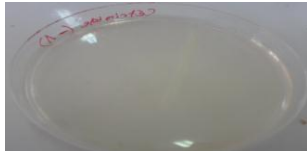
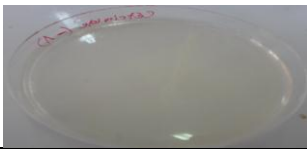
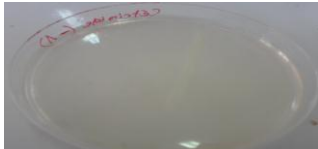
Echantillon	Observation macroscopique	normes Algériennes (JORA, 1998)	Résultats
(1)	Trouble du milieu Gaz –	10	Absence d' <i>E. coli</i>
(2)	Trouble du milieu Gaz +	10	Absence d' <i>E. coli</i> [Présence des coliformes fécaux]
(3)	Trouble du milieu Gaz +	10	Absence d' <i>E. coli</i> [Présence des coliformes fécaux]
(4)	Trouble du milieu Gaz -	10	Absence d' <i>E. coli</i>
(5)	Trouble du milieu Gaz -	10	Absence d' <i>E. coli</i>

5. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* :

La recherche du germe sur le milieu au cétrimide dans les cinq échantillons a abouti aux résultats indiqués dans le tableau 08.

L'absence totale des colonies caractéristiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans les échantillons (2), (3), (4) et (5) indique l'absence du germe. En revanche, dans le premier échantillon, on a observé des colonies jaunes fluorescentes de petite taille. Mais, l'absence des *Pseudomonas* a été prouvée par repiquage sur le milieu King A. Cela serait attribué à la bonne qualité de la matière première, le non interruption de la chaîne de froid, la durée limite de conservation était respectée.

Tableau 08 : Résultats de la recherche de *Pseudomonas aeruginosa*.





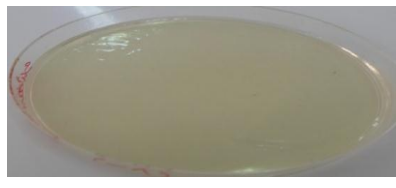
Echantillon	Observation macroscopique	Résultats
(01)	Colonies jaunes fluorescentes	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
(02)	Absence de colonies caractéristiques. 	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
(03)	Absence de colonies caractéristiques. 	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
(04)	Absence de colonies caractéristiques. 	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
(05)	Absence de colonies caractéristiques. 	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

6. Recherche de la flore fongique :

Les résultats de la culture des levures et des moisissures sont mentionnés dans le tableau 09.

Les analyses microbiologiques ont montré l'absence totale des levures et moisissures dans les cinq échantillons. Ce résultat nous permet de qualifier les crevettes d'une qualité satisfaisante. Cette dernière peut être argumentée par une limitation de la contamination par l'air et les poussières pendant la commercialisation et le respect des bonnes pratiques d'hygiène dans les circuits de transformations.

Tableau09 : Résultats de recherche de la flore fongique.

Echantillon	Observation macroscopique	Résultats
(01)		Absence des moisissures
(02)		Absence des moisissures
(03)		Absence des moisissures
(04)		Absence des moisissures
(05)		Absence des moisissures

Conclusion

Les produits de la mer sont particulièrement vulnérables, leur maintien dans un état de fraîcheur satisfaisant exige le respect de règles strictes de stockage à tous les stades de la filière car la conservation se trouve à tout moment menacée par la croissance et la prolifération de la microflore d'altération et/ou pathogène.

Nous avons entrepris cette étude qui consiste à évaluer la qualité microbiologique de Crevettes décortiquées congelées vendues sur le marché local, pour deux raisons essentielles :

- La crevette congelée peut être stockée assez longtemps et éventuellement soumise à des ruptures de la chaîne du froid (accidentelle ou intentionnelle).
- Les commerçants manipulant ce fruit de la mer ne respectent pas les règles élémentaires d'hygiène.

Ces deux facteurs concourent à favoriser l'altérabilité de ce produit déjà naturellement très sensible.

D'après les résultats obtenus, les échantillons se caractérisent par :

- La présence de *salmonella*,
- La présence de la flore mésophile totale avec un nombre inférieur à celui précisé par (JORA, 1998),
- l'absence totale de la flore fongique, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio paraheamolyticus* et d'*E. coli*.

Après avoir comparé nos résultats aux normes Algériennes (JORA, 1998) le troisième et quatrième échantillon étaient de qualité insatisfaisante contenu de la présence de *Salmonella sp.*

La présence de *Salmonella sp* dans les échantillons dénote du non-respect des règles d'hygiène au niveau du circuit de transformation.

Ces résultats sont en accord avec ceux de HOBBS(1982) qui stipule que l'Homme constitue la source la plus importante des contaminations exogènes des denrées alimentaires d'origines animales.

Recommandations :

Afin de limiter la contamination et la prolifération des germes dans les aliments congelés et protéger le consommateur des intoxications alimentaires, quelques actions doivent être menées par les vendeurs, les consommateurs et les autorités.

Vendeurs :

- L'hygiène corporelle et vestimentaire est obligatoire.
- Il est recommandé de bien se laver les mains après avoir manipulé des aliments à risques (œufs, viandes crues, le poulet).
- Il est recommandé de nettoyer soigneusement le plan de travail ayant servi aux préparations de ces aliments à risques.
- Les manipulateurs de denrées alimentaires présentant des lésions cutanées doivent être exclus de la manipulation des denrées non conditionnées et/ou emballées, tant que les lésions ne sont pas correctement couvertes
- Le respect de la chaîne du froid est capital.
- Veiller à la fermeture des emballages.
- Il est nécessaire de respecter les consignes de conservation au froid et les dates limites de consommation.
- Une désinfection régulière des chambres froides et des congélateurs qui constituent un véritable écosystème favorable au développement des psychrotrophes.

Consommateurs:

- Le lavage des mains avant et après la manipulation des crevettes est nécessaire.
- Veiller à la fermeture des emballages.
- Ne jamais recongeler les crevettes après sa décongélation.
- Lire toujours les dates limite de conservation avant d'acheter le produit.
- Il est nécessaire de bien cuire à cœur les aliments (70°C pendant 1 à 2 minutes) consommés par les jeunes enfants et les personnes âgées.
- Désinfection des réfrigérateurs et des congélateurs.

 **Autorités :**

- Organiser des journées de formation et de sensibilisation destinés à toute personne intervenant dans le circuit des produits alimentaires périssables,
- Penser à la création d'écoles professionnelles destinées aux personnels travaillant dans les métiers de la bouche.
- Créer ou redynamiser les comités citoyens pour la protection du consommateur.

*Références
bibliographiques*

Bibliographie

- **ABABOUCHE, L. (1995).** Assurance de la qualité en industrie halieutique. Rabat. 214 p.
- **ABDOULAY, N. (1998).** contribution à l'étude de l'évolution de la qualité bactériologique des produits de la pêche destinés à l'exportation en 1996 et 1997.
- **ABOTCHI, K. et al.** Evaluation de la qualité microbiologique des poissons fumés artisanalement au Togo. Master II en qualité des aliments de l'homme. Ecole Inter-Etats des sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV). Dakar. 30 p.
- **ANONYME I. (1972).** Institut international du froid.
- **ANONYME II. (2010).** Guide des bonnes pratiques d'hygiène et application de l'HACCP – Vol 6 – Poissons frais, surgelés ou congelés.
- **ANONYME III. (2011).** Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires : Ligne directrice pour l'interprétation. Luxembourg : éd fev.
- **BARTHE, et al. (2007).** *Préparation des échantillons pour l'analyse microbiologique.* Québec : 01-D-550. pp.04-18.
- **BOURGEOIS, C.M. et al. (1980).** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries alimentaires. Vol. 3. Paris : Lavoisier Tech et Doc, APRIA. 331p.
- **BOURGEOIS, C.M. et al. (1988).** Microbiologie alimentaire. Tome 1. Aspect microbiologique de la qualité et de la sécurité alimentaire. 419p.
- **BOURGEOIS, C.M. et al. (1996).** Microbiologie alimentaire. Paris : Lavoisier TEC & DOC. 672 p.
- **CODEX STAN. (1981).** Normes pour les crevettes congelées. pp. 1- 7.
- **DELARRAS, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Paris : Lavoisier Tec & Doc.476 p.
- **GUIRAUD, J-P. (2004).** Microbiologie alimentaire. Paris : DUNOD RIA, 652 p.

Bibliographie

- **GUIRAUD, J-P. et al. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Paris: AFNOR. 300 p.
- **HELMUTH, R. et al. (1985).** Epidemiology of virulence associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven. Common *Salmonella* serotype. Infection and immunity. pp. 48-182.
- **HOBBS, G. (1982).** Changes in fish after catching. éd. Fish handling and processing Torry Research Station. Edinburgh, RU, HMSO.
- **JEANTET, R. et al. (2007).** Science des aliments: Biochimie, microbiologie, procédés et produits. Paris: Lavoisier TEC & DOC. p. 211-219.
- **JOFFIN, C. et al. (2010).** Microbiologie alimentaire. 6^e éd. Centre régional de Documentation pédagogique d'Aquitaine. pp.34-292.
- Journal Officiel de la République Algérienne N°35, 27 mai 1998. Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires (les poissons et produit de la pêche).
- **KENNOUCHE, H. (1997).** Recherche des facteurs influençant le débarquement de la crevette rouge dans le port de Bou-Haroun (baie de Bou-Ismaïl). 62 p.
- **CHEURFI, S. et al. (2003).** Contribution à l'étude des statistiques et l'exploitation des crevettes pêchées au port de Bou-Haroun. 63 p.
- **OUATTARA, B. (1986).** Etude de la qualité bactériologique des filets de poissons congelés. Th. DAKKAR: Méd. Vét. 20 p.
- **PRESCOTT, LM. et al. (2010).** Microbiologie. Italie: 3^e éd. 1088 p.
- **RODIER, J. et al. (2009).** L'analyse de l'eau. Chapitre A : Analyse microbiologique des eaux. Paris : 9^e éd. Dunod. pp. 719-823.

Bibliographie

- **ROSSET, P. et al. (2002).** La chaîne du froid en agroalimentaire. Cahier de Nutrition et de Diététique. pp. 124-130.
- **ROZIER, J. et al. (1986).** Bases microbiologiques de hygiène des aliments. Paris: éd. SEPAIC. 230 p.
- **RISSO. (1816).** First record of the red shrimp *Aristeus antennatus* from the Aegean Sea Coast of Turkey.
- **SMITH, J. L. et al. (1983).** Effect of food environment Staphylococcal enterotoxin synthesis: Reviews J. Food protects. pp. 46 - 555.
- **SITTI, A. (2001).** Contribution à l'étude de l'évolution de la qualité bactériologique des produits de la pêche destinés à l'exportation de 1997 à 2000. P. 84.
- **TAHIANA, A. (2004).** Contribution à l'étude d'assurance qualité et détermination de la date limite de consommation des crevettes entières crues fraîches : cas de la société AQUAMEN.E.F MORONDAVA. 104 p.
- **TOURE, M.H. (1996).** Contribution à l'étude de l'évolution de la contamination par les coliformes fécaux des filets de poisson Sénégalais destinés à l'exportation. DAKKAR. 17p.
- **VIERLING, E. (2008).** *Aliments et boissons : Filières et produits*. Bordeaux : 3^e éd. SCEREN CRDP AQUITAINE. pp.91-109.

Documentation en ligne :

VALENCIENNES, V. (1840) [en ligne]. [Consulté en septembre 2014]. Disponible à l'adresse : www.wikipedia.fr.

Annexes

Annexes

Annexe I:

Milieux de culture et réactifs

1. Technique de préparation d'un milieu de culture

La préparation classique d'un milieu de culture passe par les étapes suivantes :

- La lecture et interprétation de la formule de préparation.
- Rassembler les différents constituants.
- La pesée.
- Dissolution avec ajustement du volume exacte.
- Ajustement du pH.
- La filtration c'est facultatif.
- La répartition.

La stérilisation des milieux de culture se fait à l'autoclave 121°C pendant 15 minutes, 120°C pendant 20 minutes (Pour les milieux stérilisables).

2. Composition des milieux de culture et réactifs :

Formules indiquées en gramme par litre d'eau distillée

Eau peptonée tamponnée (E.P.T)

Formule:

Mélange de peptones.....	10,0
Chlorure de sodium.....	5,0
Di-sodium hydrogénophosphate.....	3, 5
Dihydrogénophosphate de potassium.....	1,5

PH final= 7,2à 25oC

Autoclaver 20 minutes à120°C.

Annexes

Eau peptonée salée alcaline (EPSA)

Formule :

- Peptone.....20
- Chlorure de sodium.....5

PH= 8.2

Additionné 40% de Chlorure de sodium pour obtenir une solution hypersalée.

Autoclaver 15 minutes à 120°C.

Eau peptonée exempte d'indole (EPI)

Formule :

- Peptone exempte d'indole.....15

PH= 7.2 à 25°C

Répartir en tubes à essais (9ml) et autoclaver 15 minutes à 120°C.

Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol

- Peptone.....5
- Extrait de viande.....3
- Lactose.....10
- Pourpre de bromocrésol.....25mg

pH = 7

Répartir en tubes à essais (10 ml). Ajouter éventuellement une cloche de Durham.

Autoclaver 20 minutes à 120°C (GUIRAUD, 2003).

Bouillon lactosé bilié au vert brillant (VBL)

Formule :

- Peptone de viande10
- Lactose10
- Bile de boeuf desséchée.....20
- Vert brillant0.0133
- Eau permutée1000

PH= 7,2 à 25°C

Répartir dans des tubes à essais et autoclaver 15 minutes à 120°C (Guiraud, 2003).

Mode d'action :

Annexes

La bile et le vert brillant inhibent les bactéries autres que les entérobactéries et autres germes Gram- alors que l'hydrolysate et le glucose facilitent leur développement (DELARRAS, 2007).

Bouillon sélénite – cystine

Formule :

- tryptone.....	5,0
- Lactose	4,0
- Selinite acide de sodium.....	4,0
- Phosphate disodique.....	10
- cystine.....	100 mg

Répartir en tubes à essais (10ml). Stériliser par ébullition 10 min (ne pas autoclaver)

PH finale= 7,0 à 25°C (GUIRAUD, 2003)

Mode d'action :

- La teneur en sélénite permet d'assurer l'inhibition des microorganismes autres que les Salmonelles et notamment des coliformes et des entérocoques. Les Pseudomonas et les *Proteus* ne sont pas totalement inhibés (Delarras, 2007).
- Le phosphate disodique contribue à assurer le maintien du pH et à réduire la toxicité du sélénite afin d'augmenter la capacité de récupération du milieu (ANONYME 2, 2010).

Gélose au Cétrimide

Formule :

- Peptone.....	20
- Sulfate de potassium.....	10
- Chlorure de magnésium.....	3
- Glycérol.....	10 ml
- Phosphate dipotassique.....	0,3
- Cétrimide.....	0,2
- Acide nalidixique(facultatif selon les formules).....	15 mg
- Gélose.....	3 mg

PH= 7,2 à 25°C.

Annexes

Autoclaver 15 minutes à 120°C.

Mode d'action :

- Le cétrimide ou bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium est un antiseptique (Ammonium quaternaire) inhibiteur de beaucoup de germes autre que les *Ps.*

aeruginosa.

- La peptone de gélatine est une peptone trypsique de gélatine, à faible teneur en cystéine, tryptophane et hydrates de carbone.
- Le sulfate de potassium et le chlorure de magnésium favorisent la production des deux pigments (pyocianine et pyoverdine), (DELARRAS, 2007).

Gélose Plate Count Agar (P.C.A)

Formule:

- Tryptone.....	5,0
- Extrait de levure.....	2,5
- Glucose.....	1, 0
- Agar A (RM 10).....	12, 0

PH final= 7, 2 ± 2 à 25°C.

Autoclaver à 121°C° pendant 15 minutes.

Mode d'action :

- Les substances nutritives apportées par la Tryptone, les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure et le glucose (source énergétique) favorisent la croissance de la plupart des bactéries à dénombrer (ANONYME, 2010).

Gélose Salmonella-shigella(SS)

Formule :

- Peptone.....	5
- Extrait de viande de boeuf.....	5
- Sels biliaires.....	4. 2
- Citrate de sodium.....	10
- Thiosulfate de sodium.....	8.5
- Citrate de fer.....	2
- Lactose.....	10
- Rouge neutre.....	25 mg

Annexes

- Vert brillant.....0.3mg
- Agar.....12

PH final= 7.3±0.2 à 25°C

Mode d'action:

- Les sels biliaires, le citrate de sodium et le vert brillant (colorant) inhibent les bactéries à Gram+, le citrate et le thiosulfate de sodium diminuent le développement des coliformes et *proteus*.
- Le thiosulfate de sodium est réduit, en présence d'une réductase, en H₂S, qui réagit avec le citrate de fer pour produire du sulfure de fer ; ce dernier colore en noir le centre des colonies, qui sont dite H₂S+ (DELARRAS, 2007).

Gélose sabouraud BioMérieux® :

Formule :

- Peptone de viande (bovin ou porcin).....3
- Peptone de caséine (bovin).....3
- Peptone de soja.....3
- Extrait de levure.....2
- Extrait de malt.....1
- Glucose.....19
- Phosphate monopotassique.....0.5
- Phosphate disodique.....0.5
- Agar.....13

PH= 6.4 à 25°C

Autoclaver 20 minutes à 120°C. Additionner un antibiotique (Amoxicilline 0.5g/l)

Mode d'action :

- La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et des moisissures
- L'addition de l'antibiotique inhibe toute croissance bactérienne.

Réactif de KOVACS

Annexes

Formule :

- Paradiméthylamino-benzaldéhyde.....5,0
- Alcool amylique.....75,0
- HCL pur.....35,0
- Eau permutée.....1000 ml

Fuchsine de Ziehel

- Fuchsine basique.....1
- Alcool éthylique à 90o.....10 ml
- Phénol.....5
- Eau distillée.....100 ml

Doit être utilisée diluer au 1/15 pour la coloration de Gram.

Lugol

- Iode.....1
- Iodure de potassium.....2
- Eau distillé.....300 ml
-

Violet de gentiane

- Violet de gentiane.....1
- Ethanol à 90°.....10 ml
- Phénol.....2
- Eau distillée.....100 ml

Annexes

Annexe II :

(Journal Officiel De La République Algérienne N°35, 27 mai 1998).

Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires (les crevettes).

TABLEAU

CRITERES MICROBIOLOGIQUES DES CRUSTACES

Crevettes entiers, cuits, réfrigérés ou congelés	n	c	m
	- Germes aérobies à 30° C	5	3
- Coliformes fécaux	5	3	10
- <i>Staphylococcus aureus</i>	5	3	10 ²
- <i>Clostridium sulfito-reducteurs</i>	5	3	2
- <i>Salmonella</i>	5	0	absence
- <i>Listeria monocytogenes</i>	/	/	absence
Crevettes crus			
- Germes aérobies à 30° C	5	3	5. 10 ⁶
- Coliformes fécaux	5	3	10 ³
- <i>Staphylococcus aureus</i>	5	3	10
- <i>Streptocoques fécaux</i>	5	3	10 ³
- <i>Salmonella</i>	5	0	10 ³
- <i>Listeria</i>	4	0	absence