

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 وتجهيز الشواطئ
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 DE
MASTER EN SCIENCES DE LA MER

Spécialité: Aquaculture

Sujet :

**Evaluation de la qualité microbiologique
des crevettes décortiquées congelées (*Aristus antennatus*).
Partie II : Recherche des contaminants Gram positif**

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 ses conseils, et qui a été toujours à mes côtés.

Mes vifs remerciements vont également à Mr BELHASNAT K et à Madame ALLOUCHE 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

Partie I : Synthèse bibliographique

1.	Les crevettes décortiquées congelées	11
2.	Position systématique	11
3.	Congélation des crevettes	12
3.1.	Les étapes de la congélation	13
3.2.	Qualité microbiologique des crevettes	13
4.	Microbiologie des crustacés	14
5.	Présentation des germes recherchés	14
5.1.	<i>Listeria monocytogenes</i>	14
5.1.1.	Habitat	14
5.1.2.	Mode de transmission	14
5.1.3.	Les principaux symptômes	15
5.2.	<i>Clostridium Sulfito_reducteurs</i>	15
5.2.1.	Réservoir	15
5.2.2.	Voies de transmissions	15
5.2.3.	Durée d'incubation	15
5.2.4.	Les caractères de l'intoxication	16
5.2.5.	Les principaux symptômes	16
5.3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
5.3.1.	Réservoir	16
5.3.2.	Mode de transmission	16
5.3.3.	Durée d'incubation	17
5.3.4.	Symptômes	17
5.4.	Les entérocoques	18
5.4.1.	Habitats	18
5.4.2.	Mode de transmission	18
5.4.3.	Dose infectante	18

Partie II : Matériel et méthodes

1.	Cadre de l'étude	20
2.	Méthodes d'analyse microbiologique	20
2.1.	Préparation de la suspension mère	20
2.2.	Préparation des dilutions décimales	20
3.	Recherche des germes	21
3.1.	Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
3.2.	Recherche de <i>C. perfringens</i> et des anaérobies sulfite-réducteurs	23
3.3.	Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus</i>	25

3.4.recherche des entérocoques	27
4. Techniques d'identification bactérienne :	30
4.1.Technique de coloration de Gram	30
4.2. Recherche de la catalase	31
4.3.Recherche de l'oxydase	31
4.4.Recherche de la coagulase	32

Partie III: Résultats et discussions

1. Recherche de <i>Listeria</i>	34
2. Recherche des <i>C. perfringens</i> et des anaérobies sulfito-réducteurs	36
3. Recherche et dénombrement de <i>staphylococcus aureus</i>	38
4. Recherche des entérocoques	40

Conclusion

Recommandations

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

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

Aw : activité de l'eau.

C. perfringens : *Clostridium perfringens*.

C. botulinum : *Clostridium botulinum*.

cm : centimètre.

D/S : double concentration

ENSSMAL : Ecole National Supérieur des sciences de la Mer et de l'Aménagement du littoral.

EPT: Eau peptonée tamponnée..

FAO: Food and Agriculture Organisation of United Nations.

g : gramme.

HTP : hypochlorite de potassium.

Gram+: gram positif.

ISO: International Organization for Standarization.

kg: kilogramme.

ml: millilitre.

min : minute

NPP: Nombre le plus probable.

Ox : Oxydase.

pH : Le potentiel d'Hydrogène.

sec : seconde.

S/C : simple concentration.

UFC : Unité formant colonies.

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Résultats de la recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	34
Tableau 02 : Résultats de la recherche de <i>C. perfringens</i> et des anaérobies sulfito-réducteurs	36
Tableau 03 : Résultats de la recherche de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Tableau 04 : Résultats de la recherche des entérocoques	40

Liste des figures :

Figure 01: la crevette décortiquée	11
Figure 02: Diagramme de fabrication de crevettes décortiquées congelées	13
Figure 03 : Technique de la recherche de <i>Listéria monocytogenes</i>	21
Figure 04 : Technique de la recherche des <i>C. perfringens</i> et des germes anaérobies sulfito-réducteurs	23
Figure 05 : Technique de la recherche des <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Figure 06: Technique de la recherche des entérocoques par la méthode NPP : Test présomptif	27
Figure 06: Technique de la recherche des entérocoques par la méthode NPP : Test confirmatif	28

Introduction

La crevette est une denrée alimentaire riche en vitamines et minéraux, possède une excellente valeur nutritive, elle a pris une grande importance dans l'alimentation des divers populations de la planète.

En Algérie ce fruit de la mer est très apprécié pour ses qualités gustatives. Cependant, les prix affichés dans les commerces atteignent des seuils vertigineux. Face à cette situation, les algériens se rabattent sur l'achat de crevette congelée car, elle est disponible tout au long de l'année et son prix est à la portée d'une part importante de la population.

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.

Ce travail constitue le prolongement de l'étude d'évaluation de la qualité microbiologique des crustacés congelés (crevettes décortiquées) du PFE, il porte sur la recherche et parfois le dénombrement des bactéries Gram positif susceptibles d'être nocives et d'altérer la qualité de la crevette congelée.

Les objectifs spécifiques sont:

- ✓ apprécier le niveau d'application d'hygiène au cours du circuit de transformation.
- ✓ rechercher les contaminants Gram positif tel que : *Listeria monocytogène*, les germes sulfite-réducteurs, *Staphylococcus aureus* et d'entérocoques.



CHAPITRE I

*Synthèse
bibliograp
hique*

1. Les crevettes décortiquées congelées :

La crevette est un petit crustacé qui vit dans les eaux chaudes ainsi que froides, très abondante en Méditerranée, possède une excellente valeur nutritive. Elle est riche en vitamines et minéraux, dont la niacine, la vitamine B12, le phosphore et le sélénium, en plus d'être une excellente source de protéines de grande qualité (FAO, 2006).



Figure 01 : La crevette décortiquée

(www.bibilomer.fr).

2. **Systematique** : La crevette rouge appartiendrait à :

Règne : Animalia

Embranchement : Arthropoda

Classe : Crustacea

Sous classe : Eumalacostraca

Super ordre : Eucarida

Ordre : Décapoda

Super famille : Penaeoidea

Famille : Aristeidea

Genre : aristeus (RISSO, 1816).

3. Congélation des crevettes :

Les crustacés sont des denrées périssables, afin de retarder l'apparition des phénomènes d'altération et ralentir la multiplication des micro-organismes, ils sont soumis à un certain procédé de conservation dont la conservation par le froid (congélation et surgélation) (JOFFIN et JOFFIN, 2010).

Les crevettes congelées doivent être préparées à partir de crevettes saines d'une qualité qui leur permette d'être vendues à l'état frais pour la consommation humaine (CODEX.STAN, 1981).

3.1. Les étapes de la congélation :

Les étapes conduisant aux crevettes congelées sont décrites dans le diagramme ci-dessous (figure 02).

3.2. Qualité microbiologique des crevettes :

Les crevettes congelées sont instables du point de vue microbiologique, et la conservation au froid pourrait constituer une arme précieuse dans la bataille pour préserver la qualité de cette denrée, mais, elle ne permet pas une inhibition complète ou la destruction des micro-organismes d'altérations ou pathogènes. Pour assurer la qualité des produits finis, il est nécessaire d'éviter les risques de contaminations microbiologiques de la matière première et l'hygiène de transformation (ANONYME II, 2011).

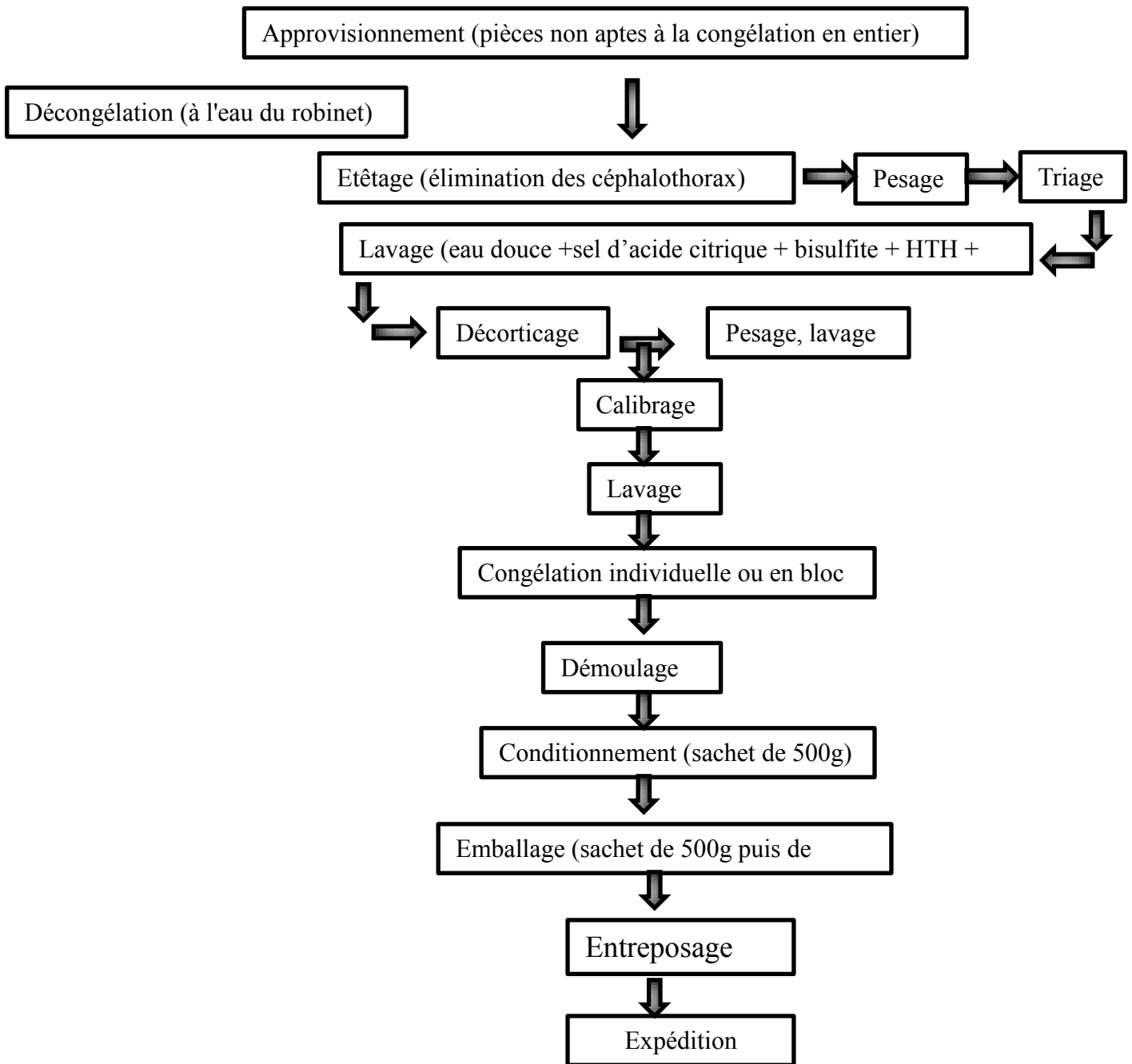


Figure 02 : Diagramme de fabrication de crevettes décortiquées congelées

(ABDOULAYE, 1997). Modifié.

4. Microbiologie des crustacés :

La chair des poissons et des fruits de la mer sains, vivants ou fraîchement pêchés est stérile, car le système immunitaire empêche les bactéries de se multiplier et de proliférer. A la mort ce dernier s'effondre et les bactéries peuvent proliférer librement dans le mucus qui recouvre la peau, les branchies et le tube digestif (ANONYME I, 1972).

Les sources de contamination sont diverses et peuvent être réparties en deux groupes :

- Contamination primaire ou endogène.
- Contamination secondaire ou exogène.

5. Présentation des germes recherchés :

5.1. *Listeria monocytogenes* :

Listeria monocytogene est un bacille de Gram positif pouvant se regrouper en palissades, aspourulé, parfois coccobacillaire, mobile, possède une catalase mais dépourvu d'oxydase (BOURJEOIS et *al*, 1988). C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, se développe mieux en présence d'une tension réduite en oxygène, tolère un pH allant de 5 à 9,6, capable de se multiplier à des basses températures. Elle est responsable de la listériose humaine (DELARRAS, 2007).

5.1.1. Habitats :

Les *listeria* sont des bactéries ubiquistes très largement repandues dans l'environnement (les eaux, les sols et les végétaux), sont rencontrées dans le tube digestif de nombreux animaux et dans les matières fécales de l'homme. On les trouve dans les ensilages et elles sont susceptibles de contaminer les aliments (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

5.1.2. Mode de transmission :

La plupart des cas de contamination résultent de l'ingestion d'aliments fortement contaminés qui contiennent plus de $10^3 - 10^6$ germe /g (GUIRAUD, 2003).

5.1.3. Les principaux symptômes :

Le pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* est lié à la présence d'hémolysines (Listériolysines O et B). Ce bacille est de type infectieux et se manifeste sous forme d'une infection septicémique avec atteintes neurologiques (fièvre, céphalées, vomissements, pharyngite et méningite). Les cas mortels ne sont pas rares (GUIRAUG et ROSEC, 2004).


5.2. *Clostridium Sulfito_reducteurs* :


Les *Clostridium* sont des bacilles Gram+, souvent de grande taille. Il s'agit de bactéries telluriques, généralement mobiles, capable de sporuler. Ils sont catalase- et anaérobies strictes, mésophiles et supportent des variations assez importantes de pH et de température (GUIRAUD, 2003).


5.2.1. Réservoir :

Les *Clostridium Sulfito-reducteurs* sont des hôtes normaux de l'intestin, mais aussi très répandues dans la nature, saprophytes des sols ou ils conservent toute leur vitalité grâce à leurs spores résistantes. Ils se trouvent aussi dans les eaux, les sédiments aquatiques et les matières organiques en voie de putréfaction (GUIRAUD et ROSEC, 2004, DELARRAS, 2007).

5.2.2. Voies de transmissions:

 *C. botulinum* : L'homme peut se contaminer en consommant des conserves ou des semi conserves des aliments mal préparé et des poissons contaminés (GUIRAUD et ROSEC, 2004, DELARRAS, 2007).

 *C. sulfitoréducteurs* sont souvent considérés comme témoins de pollution fécale (RODIER, 1996).

 *C. Perfringens* : La bactérie est transmise par l'ingestion d'aliment contaminé (DELARRAS, 2007).

5.2.3. Durée d'incubation : L'incubation est de durée variable, elle est de deux heures à quelques jours (GUIRAUD, 2004).

5.2.4. Les caractères de l'intoxication :

Les toxi-infections à *Clostridium Perfringens* représentent une grande proportion des troubles d'origine alimentaire. Une charge microbienne au moins égale à 10^8 germes /g est nécessaire pour déclencher la toxi-infection qui est provoquée par l'ingestion de la toxine contenue dans les aliments, ce qui conduit à la germination des spores et le développement bactérien si la température reste élevée (GUIRAUD, 2003).

5.2.5. Les principaux symptômes :

Les symptômes de la maladie sont des douleurs abdominales, une diarrhée, parfois des vomissements et de la fièvre. Par ailleurs, *C. Perfringens* serait responsable d'un nombre non négligeable d'appendicites, ainsi que de l'entérite nécrosante (GUIRAUD, 2003).

5.3. *Staphylococcus aureus* :

Le groupe *Staphylocoque* est constitué de coques Gram+ groupés en amas (parfois en tétrades), d'un diamètre d'environ un micron, immobiles, non sporulés et non capsulés, aéro-anaérobies facultatifs, possèdent une catalase, une oxydase et une couagulase. Ils produisent des entérotoxines protéiques qui provoquent des toxi-infections alimentaires ((BOURGEOIS, 1996, PRESCOTT et al, 2004).

5.3.1. Réservoir :

Le principal réservoir du germe est constitué par la peau et les muqueuses (en particulier les narines) de l'homme sain ou malade. On trouve 30 à 50% de porteurs sains indemne de toute infection (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

5.3.2. Mode de transmission :

La voie essentielle de transmission est manuelle. La pérennité de cette dernière est due à une recontaminatoïn rapide des mains à partir de réservoir nasal. Le portage intestinal est assez fréquent (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

5.3.3. Durée d'incubation : La période d'incubation est de courte durée : 1 à 8 heures, rarement 18 heures (PRESCOTT et al, 2004).

5.3.4. Symptômes : Les symptômes de l'intoxication sont variés :

- nausées suivies des vomissements ;
- douleurs abdominales ;

- chute de tension artérielle ;

- hyper mobilité intestinale.

La maladie est rarement mortelle et les troubles sont de courte durée (1 à 2 jours) (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

5.4. Les Entérocoques :

Il s'agit de coques Gram+, asporulés, immobiles généralement groupés en paires et surtout en chaînes de longueurs variables et dépourvus de la catalase. Ce sont des germes anaérobies facultatifs, ils se développent bien à 37°C, mais tolèrent des températures (10°C – 45°C), un pH de 9.6 et poussent en présence de 6.5 % NaCl (GUIRAUD, 2003). Ils présentent une hémolyse α , β et γ et qui appartiennent au groupe sérologique D.

5.4.1. Habitats :

Les entérocoques sont des germes ubiquistes, saprophytes du sol, des eaux douces et marines, qui vivent en commensaux dans l'intestin de l'homme et des animaux (DELARRAS, 2007).

5.4.2. Mode de transmission :

La transmission est due à la consommation des aliments contaminés (viandes, eau, pâtisseries) (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

5.4.3. Dose infectante : La dose infectante est forte ($10^8 - 10^{10}$ cellules).

Les toxi-infections à entérocoques sont très rares, elles provoquent des douleurs abdominales et une diarrhée (GUIRAUD et ROSEC, 2004).



CHAPITRE II

Matériel

&

Méthodes

1. Cadre de l'étude :

La recherche des germes (contaminants Gram positif) a été effectuée au laboratoire de microbiologie de l'ENSSMAL. Elle s'est déroulée du 05 mai au 15 juillet, et a porté sur cinq échantillons de crevettes décortiquées congelées achetées dans des différents points de vente chez les détaillants (commercialisant les produits congelés viandes, légumes et poissons).

La décongélation se fait lentement à 4°C au réfrigérateur.

2. Méthodes d'analyse microbiologiques :

L'analyse microbiologique est basée sur la recherche et parfois le dénombrement des contaminants Gram positif dans la chair des crevettes décortiquées congelées

2.1. préparation de la suspension mère :

- Faire sortir les crevettes décortiquées dans 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).

2.3. 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°1) 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. Recherche des germes:

3.1. Recherche de *Listeria monocytogenes* (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

Mode opératoire :

-Préparer la suspension mère dans l'eau peptonée tamponnée en réalisant une dilution au 1/10, la laisser reposer à $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant $1\text{h} \pm 5\text{min}$ pour la revivification des bactéries stressées.

- Réaliser les dilutions nécessaires et étaler 0.1 ml de la suspension mère et les dilutions sur la gélose Columbia additionnée de 5% de sang humain frais.

-Incuber à 37°C pendant 24-48h.

Lecture :

Les *Listeria* donnent des Colonies bleu- gris, β -hémolytiques sur gélose Columbia au sang. La β -hémolyse se traduit par une zone claire facilement visible entourant les colonies (KISMOUNE, 2009).

Confirmation :

Confirmer l'identité de 5 colonies suspectes par :

- Isolement des colonies sur gélose Columbia au sang.
- Coloration de Gram (Gram +).
- Test de la catalase (catalase+).
- Test de l'oxydase (oxydase-).

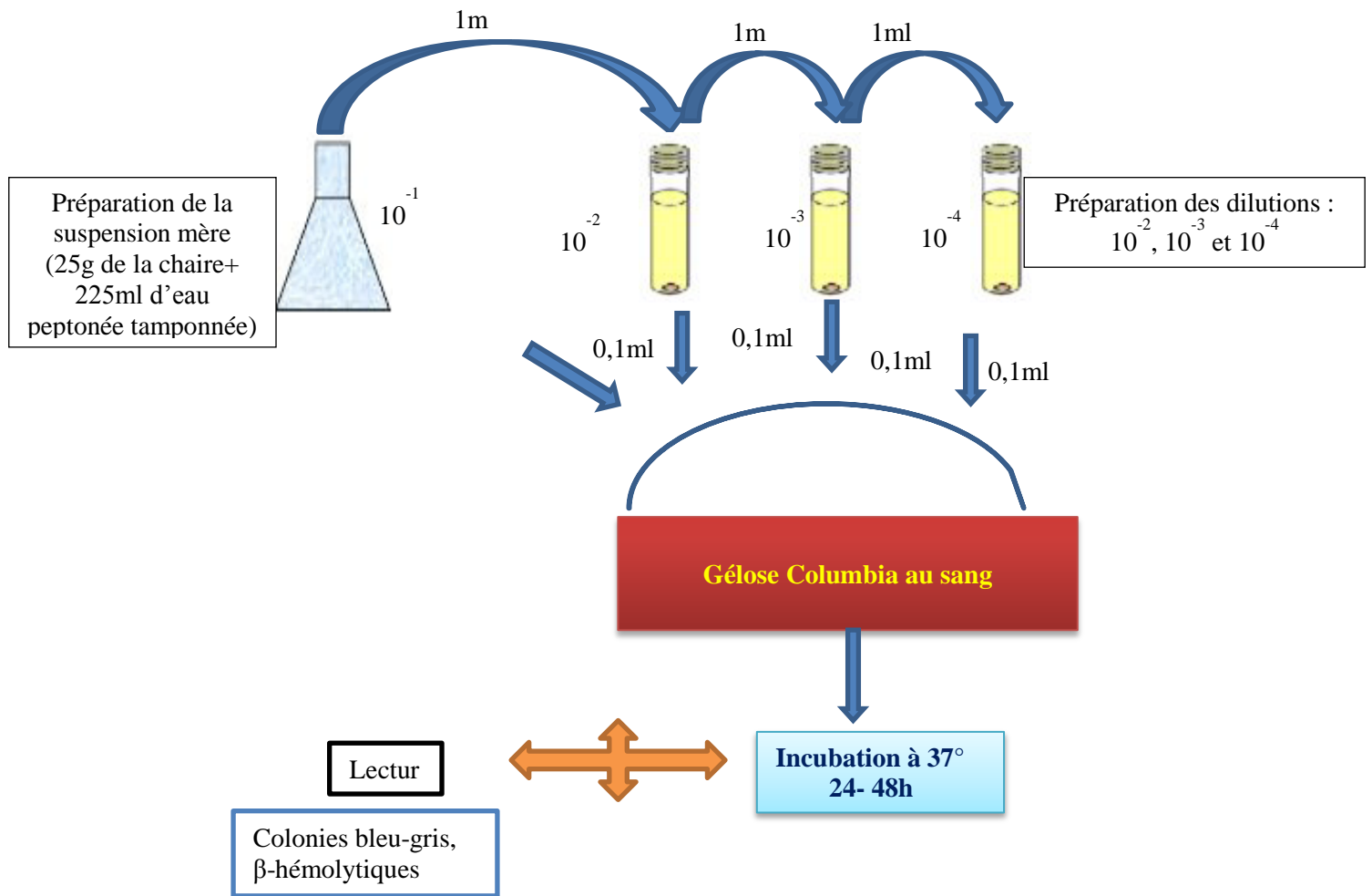


Figure 03 : Technique de la recherche de *Listeria monocytogenes* (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

3.2. Recherche de *C. perfringens* et des anaérobies sulfito-réducteurs (JOFFIN et JOFFIN, 2010).

Mode opératoire :

- Prélever 1ml de la suspension mère et les dilutions décimales et les déposer au fond des tubes à essai,
- Placer ces derniers dans un bain-Marie à 80°C pendant 10 minutes pour éliminer toutes les formes végétatives,
- Refroidir immédiatement les tubes sous l'eau de robinet (faisant un choc thermique),
- Ajouter 15 ml de la gélose viande-foie en surfusion additionnée des additifs sulfites de sodium et alun de fer (20 gouttes pour chacun des additifs),
- Mélanger doucement sans provoquer des bulles d'air,
- Ajouter une couche de paraffine stérile pour créer l'anaérobiose
- Laisser solidifier puis incuber à 37°C pour les sulfito-réducteurs et à 44°C pour *C. perfringens* pendant 72h.

Lecture :

Apparition des colonies noires.

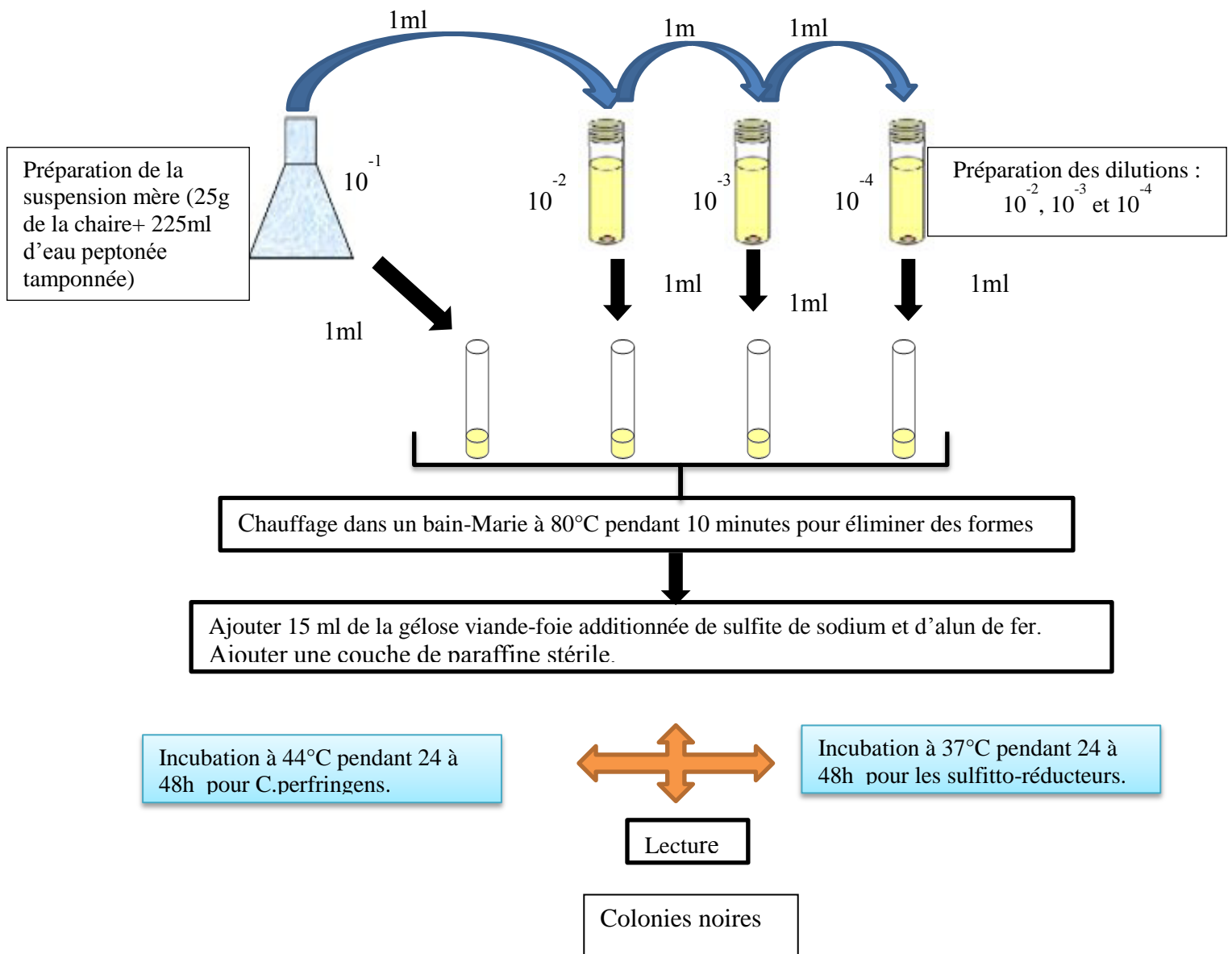


Figure 04 : Technique de la recherche des *C. perfringens* et des germes anaérobies sulfito-réducteurs (JOFFIN et JOFFIN, 2010).

3.3. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

✚ Mode opératoire :

- La recherche de *Staphylococcus aureus* se fait sur la gélose de Baird-Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium.
- Le milieu est ensemencé en surface avec 0,1 ml de la suspension mère et les 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 *Staphylococcus aureus* apparaissent sur le milieu Baird-Parker, noires (réduction du tellurite en tellure), bombées, rondes et entourées d'un halo d'éclaircissement dû à la protéolyse des protéines du jaune d'œuf et, éventuellement, un liseré blanc opaque (précipitation des acides gras produits par la lécithinase qui hydrolyse la lécithine du jaune d'œuf).

✚ Confirmation :

Les colonies noires suspectées, entourées d'un halo clair doivent subir des tests de confirmation qui consistent en :

- ✓ Une coloration de Gram (Gram+).
- ✓ Un test de la catalase (catalase +).
- ✓ Un test d'oxydase (oxydase+).
- ✓ Un test de la coagulase (coagulase+).

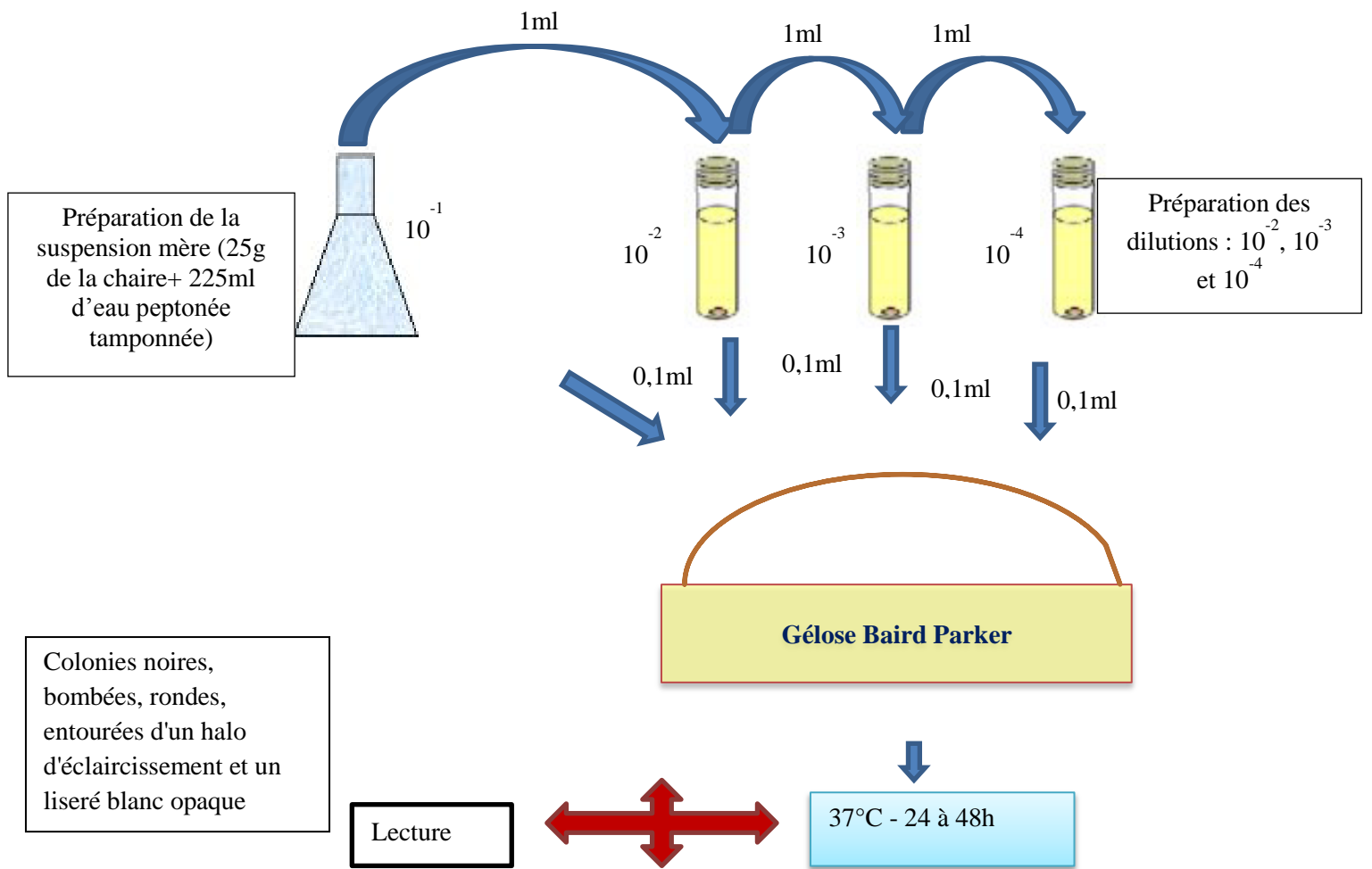


Figure 05 : Technique de la recherche des *Staphylococcus aureus* (JOFFIN et JOFFIN, 2010).

3.4. Recherche des entérocoques (GUIRAUD et ROSEC, 2004.).

La technique de la recherche des entérocoques est basée sur la succession d'un milieu sélectif présomptif et d'un milieu sélectif confirmatif.

❖ Le milieu présomptif est le milieu de Roth

Prendre trois tubes contenant le milieu Roth double concentration et ajouter 10 ml de la suspension mère.

- Ensemencer 1ml pour chacune des dilutions dans trois tubes de Roth simple concentration.

-Incuber les tubes ensemencés à 37°C pendant 24 heures.

Un développement positif se manifeste par un trouble.

❖ Le test confirmatif

Les tubes incriminés sont repiqués sur le milieu liquide de Litsky à l'azide et à l'éthyl violet.

Après 24 à 48 h d'incubation à 37°C, la présence d'entérocoques se manifeste par apparition d'un trouble et éventuellement d'une pastille violette au fond de tube.

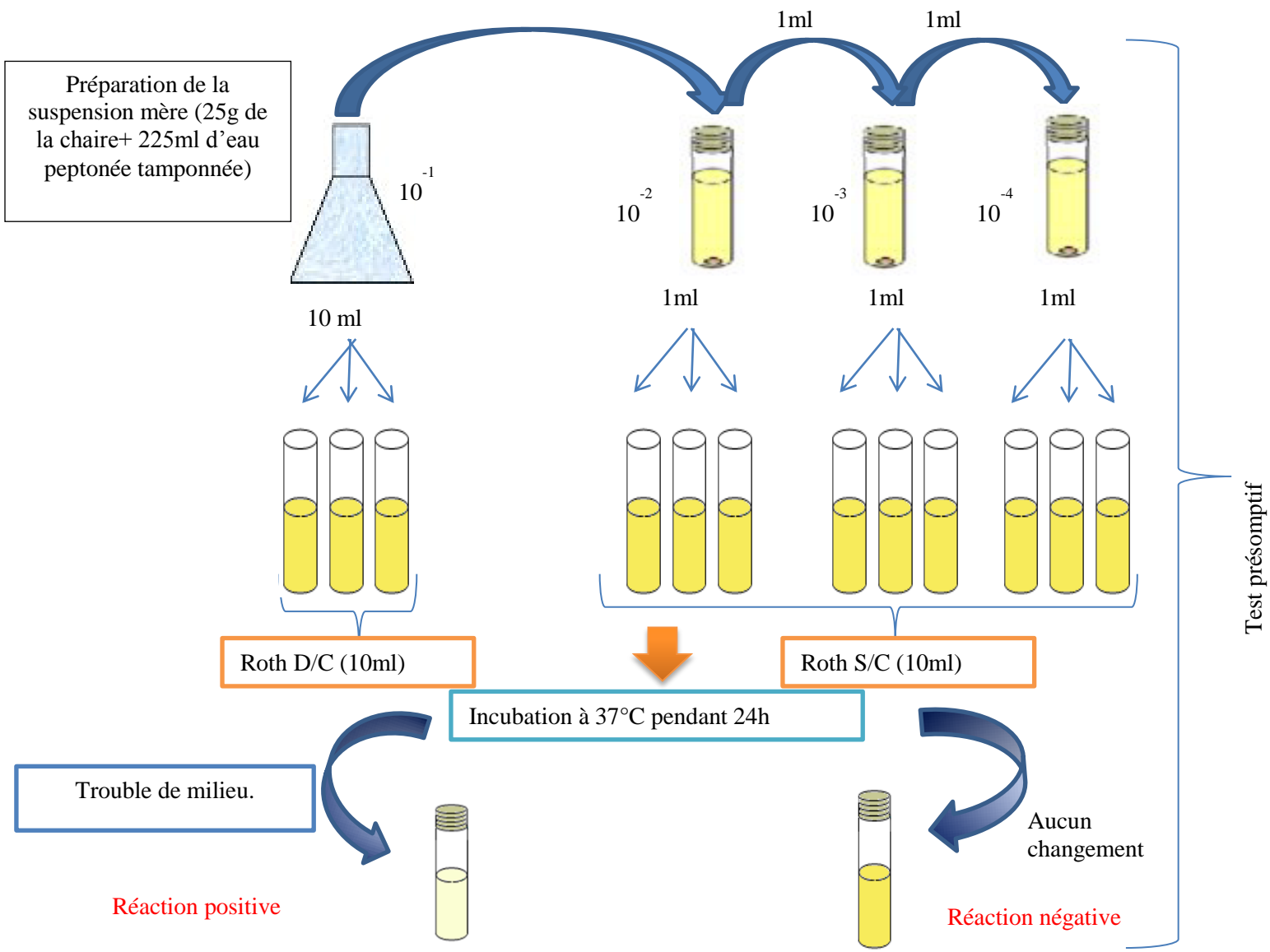


Figure 06: Technique de la recherche des entérocoques par la méthode NPP : Test présomptif (DELARRAS, 2007).

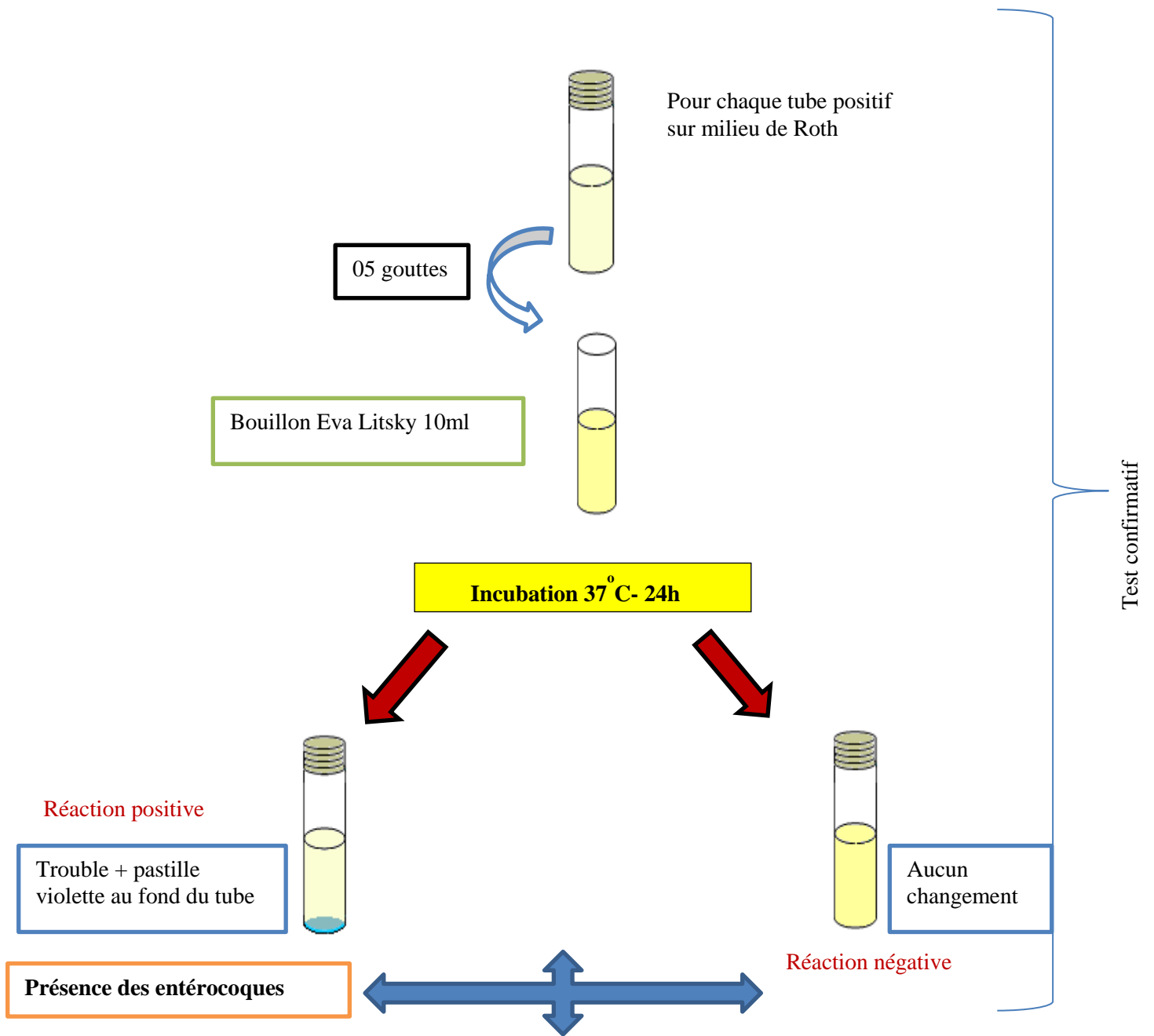


Figure 07: Technique de la recherche des entérocoques par la méthode NPP : Test confirmatif (DELARRAS, 2007).

4. Techniques d'identification bactérienne :

4.1. 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).

❖ Préparation du frottis :

- Poser une goutte d'eau sur une lame propre.
- Prélever un fragment d'une colonie bactérienne bien isolée et l'étaler sur la lame.
- Sécher en approchant la lame de 20 à 25 cm au- dessous de la flamme.

❖ Fixation :

- 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.

❖ Coloration de Gram :

Coloration primaire :

- couvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir 2min. Jeter l'excès de colorant.

Mordancage :

- Egoutter sans rincer et faire deux bains de lugol dont chacun dure 45sec.

Décoloration :

- Egoutter et plonger la lame dans l'alcool 96°durant 30 secondes.
- Rincer doucement et abondamment à l'eau distillée.

Coloration secondaire :

- Recolorer les germes et décolorer avec la fuchsine pendant 2 min.
- Laver à l'eau distillée et sécher la lame au-dessus de la flamme.

❖ Observation au microscope : Observer à l'objectif à immersion (G 100×10).

- Les bactéries colorées en violet sont les bactéries Gram+.
- Les bactéries colorées en rose sont les bactéries Gram-.

4.2. 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 porte objet 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-

4.3. 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.

4.4. Recherche de la coagulase:

Ce test sert à déterminer si la bactérie est capable de coaguler le plasma du lapin par l'action de l'enzyme coagulase. Il est destiné à la recherche du pouvoir pathogène de *staphylococcus aureus*.

Mode opératoire :

Mettre dans un tube à hémolyse stérile 0,5 ml de plasma du lapin et une colonie suspecte
Incuber à 37°C pendant 24h.

Résultats:

Coagulation du plasma avec prise en masse totale, après une demi-heure ou avant la 24^{ème} heure indique que le germe produit une coagulase (DELARRS, 2007).



CHAPITRE III

Résultats
&
Discussions


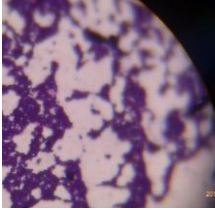




L'étude a porté sur la recherche des principaux germes Gram positif impliqués dans les intoxications alimentaires. Les résultats obtenus ont été comparé aux normes Algériennes en vigueur (JORA, 1998).

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

1. Recherche de *Listeria monocytogenes* :

Le dénombrement de *Listeria monocytogenes* a été effectué sur la gélose colombia additionnée du sang humain, les résultats d'analyses microbiologiques figurées dans le tableau 01, montrent la présence des colonies bleu-gris hémolytiques dans le premier échantillon, mais l'absence du germe était confirmée après une coloration de Gram. En revanche, dans le deuxième, troisième, quatrième et le cinquième échantillon on a noté l'absence des colonies caractéristiques de *Listéria monocytogenes*, ce qui confirme l'absence du germe. En comparant nos résultats aux normes décrites dans le (journal officiel de la république algérienne, 1998), qui exigent l'absence de *Listéria monocytogenes* dans 25g de la chair, les crevettes sont de qualité satisfaisante. Les résultats obtenus peuvent s'expliquer par le respect de la chaîne du froid durant l'entreposage et la commercialisation, les bonnes pratiques d'hygiène et la désinfection des installations et des équipements au cours de transformation et la salubrité de la zone d'élevage.

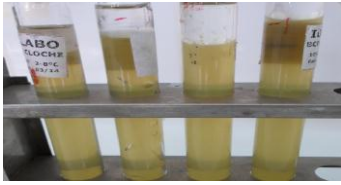
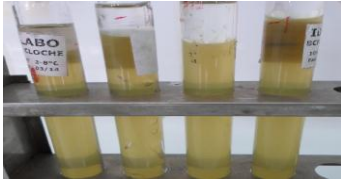
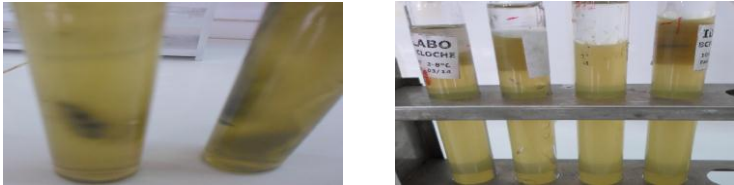
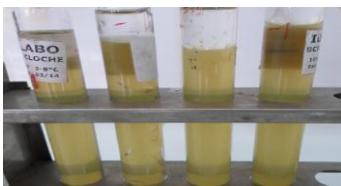
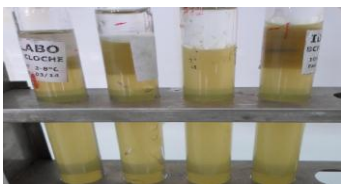
Tableau 01 : Résultats de la recherche de *Listeria monocytogenes* :

Echantillon	Observation macroscopique	Coloration de Gram	Observation
(1)	Colonies bleu-gris et β -hémolyse sur la gélose Colombia au sang 	Coques Gram+ 	Absence de <i>Listeria monocytogenes</i>
(2)	Absence de colonies caractéristiques. 	/	Absence de <i>Listeria monocytogenes</i>
(3)	Absence de colonies caractéristiques. 	/	Absence de <i>Listeria monocytogenes</i>
(4)	Absence de colonies caractéristiques. 	/	Absence de <i>Listeria monocytogenes</i>
(5)	Absence de colonies caractéristiques 	/	Absence de <i>Listeria monocytogenes</i>

2. Recherche des *C. perfringens* et des anaérobies sulfito-réducteurs.

Les bactéries du genre *Clostridium* sont caractérisées par une thermo résistance. Elles sont considérées comme des germes de contamination pour l'appréciation de l'application de l'hygiène. Les résultats du tableau 02 n'ont pas révélés la présence du germe dans l'échantillon (1), (2), (4) et (5). Ceci pourrait s'expliquer par la maîtrise de la contamination tellurique lors des traitements de transformation par le respect des bonnes pratiques d'hygiènes. Tandis que la présence de colonies noires caractéristiques dans le troisième échantillon indique la présence des *Clostridium sulfito-reducteurs*. Cela serait dû probablement à une contamination par des aliments souillés au cours du circuit de la transformation.

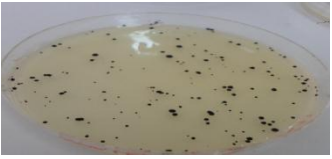
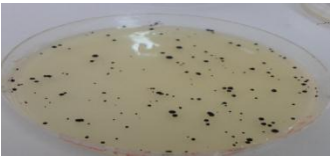



Tableau 02 : Résultats de la recherche de *C. perfringens* et des anaérobies sulfito-réducteurs.

Echantillon	Observation macroscopique	Observation
(1)	Absence de colonies caractéristiques 	-Absence des anaérobies sulfito-réducteurs. -Absence de <i>C. perfringens</i> .
(2)	Absence de colonies caractéristiques 	-Absence des anaérobies sulfito-réducteurs. -Absence de <i>C. perfringens</i> .
(3)	Colonies noires de grande taille pour les sulfito-réducteurs 	-Présence des anaérobies sulfito-réducteurs. -Absence de <i>C. perfringens</i> .
(4)	Absence de colonies caractéristiques 	-Absence des anaérobies sulfito-réducteurs. - Absence de <i>C. perfringens</i> .
(5)	Absence de colonies caractéristiques 	-Absence des anaérobies sulfito-réducteurs. - Absence de <i>C. perfringens</i> .

3. Recherche et dénombrement de *staphylococcus aureus* :

Les ensemencements réalisés sur la gélose de Baird-Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium des cinq échantillons, ont donnés les résultats regroupés dans le tableau 03. Il ressort que tous les échantillons ont des colonies noires, bombées, rondes et entourées d'un halo d'éclaircissement dû à la protéolyse des protéines du jaune d'œuf. La coloration de Gram, le test de l'oxydase, de la catalase et de la coagulase ont fait l'objet d'une confirmation de la présence du germe dans les crevettes congelées. Signalons que dans le premier, le deuxième, le quatrième et le cinquième échantillon, le nombre de germes était supérieur à celui précisé dans le JORA (1998), ce résultat nous permet de qualifier les crevettes d'une mauvaise qualité microbiologique, cela peut être justifiée par une contamination par le personnel au cours de la chaîne de fabrication et au moment de la dernière distribution du fait que les emballages qui normalement constituent une barrière protectrice contre les contaminations, étaient ouverts . Alors que le troisième échantillon était satisfaisant, cela dû à une limitation de la contamination par les manipulateurs


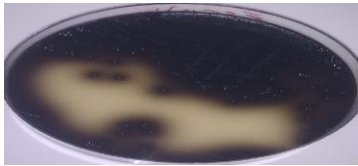

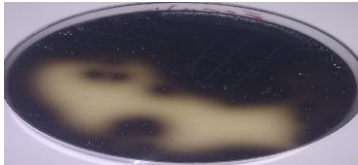

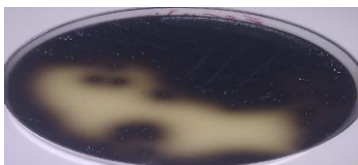

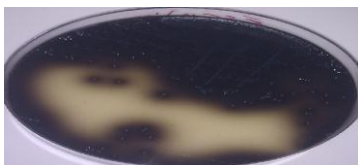


Tableau 03 : Résultats de la recherche de *Staphylococcus aureus* :

Echantillon	Observation macroscopique	Confirmation	Nombre de UFC /g	Norme Algérienne (JORA, 1998)	Observation
(01)	Colonies noires, brillantes entourées d'un halo clair 	Coques Gram+ Catalase+ Oxydase+ Coagulase+	$2.16.10^2$	10^2	Présence de <i>Staphylococcus aureus</i>
(02)	Colonies noires, brillantes entourées d'un halo clair 	Coques Gram+ Catalase+ Oxydase+ Coagulase+	$2.1.10^3$	10^2	Présence de <i>Staphylococcus aureus</i>
(03)	Colonies noires, brillantes entourées d'un halo clair 	Coques Gram+ Catalase+ Oxydase+ Coagulase+	28.6	10^2	Présence de <i>Staphylococcus aureus</i>
(04)	Colonies noires, brillantes entourées d'un halo clair 	Coques Gram+ Catalase+ Oxydase+ Coagulase+	$1.8.10^2$	10^2	Présence de <i>Staphylococcus aureus</i>
(05)	Colonies noires, brillantes entourées d'un halo clair 	Coques Gram+ Catalase+ Oxydase+ Coagulase+	$1.3.10^2$	10^2	Présence de <i>Staphylococcus aureus</i>

4. Recherche des entérocoques :

Selon DELARRAS (2007), les entérocoques sont recherchés en tant qu'indicateurs de contaminations fécales transmis essentiellement par les eaux et les aliments. Le tableau 04 représente les résultats de la recherche du germe. Il montre que les cinq échantillons sont contaminés par cette bactérie. Ces résultats permettent de qualifier les crevettes d'une mauvaise qualité microbiologique, cela est dû à la contamination de la matière première par des germes existants dans le milieu naturel ou d'élevage et aussi par l'eau utilisée pour le lavage lors des traitements au cours des procédés de fabrication.

Tableau 04 : Résultats de la recherche des entérocoques.

Echantill	Observation macroscopique	Confirmation sur gélose bile à esculine	Observation
(01)	Trouble de milieu et formation d'une pastille violette dans le milieu Eva Litsky. 	Colonies translucides entourées d'un halo noir. 	Présence des entérocoques
(02)	Trouble de milieu et formation d'une pastille violette dans le milieu Eva Litsky. 	Colonies translucides entourées d'un halo noir. 	Présence des entérocoques
(03)	Trouble de milieu et formation d'une pastille violette dans le milieu Eva Litsky. 	Colonies translucides entourées d'un halo noir. 	Présence des entérocoques
(04)	Trouble de milieu et formation d'une pastille violette dans le milieu Eva Litsky. 	Colonies translucides entourées d'un halo noir. 	Présence des entérocoques
(05)	Trouble de milieu et formation d'une pastille violette dans le milieu Eva Litsky 	Colonies translucides entourées d'un halo noir. 	Présence des entérocoques

Conclusion

La chair du poisson et fruits de la mer est une denrée très périssable (riche en eau et en éléments nutritifs) favorable à la prolifération de la microflore d'altération et/ou pathogène.

Nous avons entrepris cette étude qui consiste à évaluer la qualité microbiologique des 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 le poisson 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 dans les cinq échantillons, on a noté :

- la présence de *Staphylococcus aureus*, les anaérobies sulfite-réducteurs et les entérocoques,
- l'absence totale de *Listeria monocytogenes*.

Après avoir comparé nos résultats aux normes Algériennes (JORA, 1998) les cinq échantillons étaient de qualité insatisfaisante contenu de la présence de *Staphylococcus aureus*, les anaérobies sulfite-réducteurs et les entérocoques. Cela dénote du non-respect des règles d'hygiène au niveau du circuit de la transformation et de la commercialisation (vendeur aux mains sales et négligent, sachets ouverts.....).

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

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*

BIBLIOGRPHIE

- **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.

BIBLIOGRPHIE

- **GUIRAUD, J-P. et al. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Paris: AFNOR. 300 p.
- **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).
- **SMITH, J. L. et al. (1983).** Effect of food environment Staphylococcal enterotoxin synthesis: Reviews J. Food protects. pp. 46 - 555.
- **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.
- **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

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.

Bouillon de Litsky (bouillon à l'azide et à l'éthyl-violet)

Formule :

- Peptone.....	20
- Glucose.....	5
- Chlorure de sodium.....	5
- Phosphates dipotassique.....	2,7
- Phosphate monopotassique.....	2,7
- Azide de sodium.....	0,3
- Ethyl- violet.....	0.5

PH = 7

Répartir en tubes à essais (10 ml). Autoclaver 20 minutes à 115°C (GUIRAUD, 2003).

Bouillon de Roth

Formule :

- Peptone.....	20
- Glucose.....	5
- Chlorure de sodium.....	5
- Phosphates bipotassique.....	2,7
- Phosphate monopotassique.....	2,7
- Azide de sodium.....	0,2

PH = 7

Répartir en tubes à essais (10 ml). Autoclaver 20 minutes à 115°C (GUIRAUD, 2003).

Gélose Bile- esculine

Formule :

- Peptone tryptique.....	17
- Peptone pepsique de viande.....	3
- Extrait de levure.....	5

- Bile de bœuf.....	10
- Chlorure de sodium.....	5
- Esculine	1
- Citrate de fer ammoniacal.....	0,5
- Azide de sodium.....	0.15
- Gélose.....	13

pH = 7

Autoclaver à 120°C pendant 15 minutes.

Gélose Columbia

Formule :

- Peptone (mélange).....	23
- Amidon.....	1
- Chlorure de sodium.....	5
- Gélose.....	10

PH= 3.7 à 25°C

Autoclaver 15 min à 120°C. Ajouter aseptiquement 5% de sang défibriné stérile (Guiraud, 2003).

Mode d'action :

- Les peptones qui entrent dans la composition du milieu favorisent l'excellente croissance des colonies.
- L'extrait de levure est une source du complexe vitaminique B.
- L'amidon est un détoxifiant, également source d'énergie.
- Le sang humain défibriné, qui est rajouté au milieu, favorise la détection des réactions hémolytiques (α ou β -hémolytique), (ANONYME 2, 2010).

Gélose Baird-Parker

Formule:

- Mélange de peptones..... 15,0
- Extrait de viande..... 5,0
- Extrait de levure..... 2,0
- Pyruvate de sodium..... 7,5
- Glycine..... 7,5
- Chlorure de lithium..... 3,0
- Gélose A (RM 10)..... 17,0

PH= 6,8à 25°C.

Autoclaver à 121C° pendant 15 minutes.

Préparation : ajouter aseptiquement le supplément Baird-Parker: Émulsion de jaune d'œuf au tellurite de potassium à 1% (50 ml) (GUIRAUD, 2003).

Mode d'action :

- Le tellurite de potassium, réduit en tellure métallique noir par les staphylocoques, produit des colonies noires.
- Le jaune d'œuf contient des lipoprotéines qui peuvent être hydrolysées par des lipoprotéinase en produisant un halo d'éclaircissement au jaune d'œuf autour des colonies ; après 48h d'incubation, une opacification peut apparaître dans le halo, traduisant l'action d'une lécithinase (DELARRAS, 2007).

Gélose Viande-foie :

Formule :

- Base viande-foie.....30

- Glucose.....	2
- Amidon.....	2
- Sulfite de sodium.....	2.5
- Sels de fer.....	0.5
- Agar.....	11

PH= 7.7 ± 0.1 à 25°C

Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Mode d'action :

- L'amidon favorise la germination des spores, alors que le glucose sert de source de carbone et d'énergie.
- Les sulfites de sodium, source de soufre pour les bactéries sulfito-réductrices est réduit en sulfure de fer noir en présence des sels de fer.

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

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	10^6
- 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	$5 \cdot 10^6$
- 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