

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العالمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



جامعة عمار تليجي بالآغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT  
كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Microbiologie Appliquée*

*THÈME*

*Recherche et identification de quelques  
bactéries pathogènes dans les produits  
laitiers (fromage traditionnel)*

Présenté par:

BEZZA Fatima

CHOUIREB Siham

Devant le jury composé de :

Président : Mr. BENAMAR Ibrahim MAB Université de Laghouat

Examineur : Mr. MADOURI Redouane MAA Université de Laghouat

Promoteur : Mr. DJEBLI Ahmed MAB Université de Laghouat

Année Universitaire : 2020/2021



# *Remerciements*

*Tout d'abord nos remerciements ALLAH de nos avoir donné la patience, la volonté et le courage pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons tout d'abord à exprimer nos sincères remerciements à l'égard de :*

*Mr : BENAMAR Ibrahim D'avoir accepté de présider la commission de jury.*

*Promoteur Mr : DJEBLIAhmed pour laide très précieuse qu'il nous a apporté et sa Patience pour l'encadrement de ce mémoire.*

*Mr :MADOURI Redouane D'avoir accepté d'examiner ce mémoire.*

*En fin, nos remerciements vont :*

*Aux étudiants de la première promotion de microbiologie appliquée*

*Master LMD*

*A tous nos amis de département*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire notamment :*

*Tous les ingénieurs de laboratoire pour leurs patiences et aide.*

*Ça serait inconcevable de ne pas remercier nos enseignants du département de biologie pour les efforts consacrés et la formation qui nous ont donnés durant cycle d'étude.*

*Fatima et Siham*



## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail comme un geste de gratitude à :*

*Mes très chers parents,*

*Qui m'ont soutenu encouragé pour que je puisse mener à*

*Bien mes études, et qui attendu ce jour avec impatience.*

*A mes frères et sœurs :*

*Brahim Amar Mahmoud*

*Meriem Yamina Halima Karima Radia*

*Sans oublier la petite princesse Safaa*

*A toute la famille : **Bezza***

*A mon binôme : **Siham***

*A mes enseignants et mes amies de l'étude .a tout ceux qui ont contribué à la réalisation  
de ce travail.*

***Fatima***



# *Sommaire*

Liste des abréviations .....	i
Liste de tableaux.....	ii
Liste des figures. ....	iii
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Première Partie : Synthèse Bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1 : Généralités sur le fromage</b>	
1.1. Définition du fromage .....	3
I.2. La Composition du fromage .....	3
I.3. La fabrication du fromage .....	4
I.3.1. La Coagulation.....	4
I.3.2. L’Egouttage .....	4
I.3.3. L’Affinage .....	4
<b>Chapitre 2 : La Flore microbienne du fromage</b>	
2 I .4. La Flore microbienne du fromage.....	6
I .4.1. La Flore originelle.....	6
I .4.2. La Flore de contamination.....	8
<b>Deuxième Partie : Partie expérimentale</b>	
<b>Chapitre 3 : Matériel et méthodes</b>	
II.1. Objectif de l’étude .....	10
II.2. Présentation de la région d’étude .....	10
II.3.Echantillonnages et prélèvements .....	11
II.4.Conservation des échantillons.....	11
II.5. Les analyses microbiologiques.....	12
II .5.1. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales .....	12
II .5.2. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile .....	13

II.5.3. Dénombrement des entérobactéries .....	14
II .5.4. Dénombrement des coliformes totaux .....	14
II. 5.5. Dénombrement des coliformes thermo tolérants .....	15
II .5.6. Recherche et dénombrement d' <i>E .coli</i> .....	15
II .5.7.Dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
II .5.8. La recherche de <i>Salmonella</i> .....	16

## **Chapitre 4 : Résultats et discussion**

III.1. Résultats des analyses microbiologiques du fromage traditionnel.....	17
III .1.1. Résultats du dénombrement de la flore aérobie mésophile total (FTAM) .....	18
III .1.2. Résultats du dénombrement des coliformes totaux.....	19
III .1.3. Résultats du dénombrement des entérobactéries.....	20
III .1.4. Résultats du dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
III .1.5. Résultats du dénombrement d' <i>E. Coli</i> .....	21
III .1.6. Résultats du Recherche de <i>salmonella</i> .....	21
III.2. Résultats de l'Identification .....	22
<b>Conclusion</b> .....	25

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1</b> : Sites et dates des Prélèvements.....	11
<b>Tableau 2</b> : Résultats des Analyses microbiologiques (01).....	17
<b>Tableau 3</b> : Résultats des Analyses microbiologiques (02).....	17
<b>Tableau 4</b> : Résultats de l'examen microscopique.....	22

## *Liste des figures*

<b>Figure 01:</b> Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	7
<b>Figure 02:</b> La Carte géographique de la wilaya de Laghouat.....	10
<b>Figure 03 :</b> Fromage de chèvre.....	11
<b>Figure04 :</b> schéma générale de l'analyse microbiologique du fromage traditionnel.....	12
<b>Figure05 :</b> Milieu Chapman.....	16
<b>Figure 06:</b> Aspect des colonies de la flore aérobie mésophile sur milieu PCA+.....	18
<b>Figure07:</b> les colonies des coliformes totaux sur le milieu VRBL.....	19
<b>Figure 08 :</b> Les colonies de staphylocoques sur le milieu Chapman.....	20
<b>Figure 09:</b> Observation microscopique de la coloration de GRAM(x100).....	23
<b>Figure 10 :</b> Résultat du Test de la Catalase .....	23
<b>Figure11 :</b> Aspects des colonies Testées sur le milieu TSI.....	24
<b>Figure 12:</b> Test sur milieu Citrate de Simmons.....	24

## *Liste des Abréviations*

**NPP** : Nombre le plus probable

**PCA+** : Plate Count Agar

**VRBL** : Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre.

**VRBG** : Gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre.

**UFC** : Unité formant colonie

**FTAM** : Flore Totale Aérobie Mésophile

**BCPL** : Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol

**TSI** : Triple Sugar Iron

**ISO** : International Standards Organisation

**TSE** : Eau Tamponnée Salée

**GN** : gélose nutritive

**Abs** : Absence





---

## Introduction

Les aliments traditionnels font partie du patrimoine socio- culturel de chaque peuple. Chaque jour, nous vivons des recettes, jadis initiées par nos ancêtres, entourées d'un savoir-faire immémorial et transmises d'une génération à une autre (**DENIS P., 1989**). Parmi ces aliments, les fromages traditionnels qui constituent à la fois un bien culturel et une ressource économique. De nombreuses variétés de fromages sont connues dans le monde entier. Le fromage a été fabriqué par l'homme pendant des siècles à l'aide de procédures traditionnelles. La transformation du lait en produits dérivés, comme les fromages, a été depuis longtemps un moyen traditionnel de conservation (**Arvanitoyannis .,2009**).

Les fromages traditionnels sont caractérisés par un lien fort avec leur terroir d'origine et attestent de l'histoire et de la culture de la communauté qui les produit. Chaque fromage traditionnel provient de systèmes complexes qui lui donnent des caractéristiques Organoleptiques spécifiques. Ces caractéristiques sont liées à divers facteurs de biodiversité, comme l'environnement, le climat, la prairie naturelle, la race des animaux, l'utilisation de lait cru et de sa microflore naturelle, la technologie fromagère s'appuyant sur le savoir-faire unique des hommes et non pas sur une technologie automatisée, les outils historiques et enfin les conditions naturelles d'affinage (**LICITRA G., 2010**). Notre pays a une tradition bien établie sur les produits laitiers, transmise d'une génération à une autre à travers des siècles. Le lait, abondant durant certains moments de l'année est transformé en produits laitiers pour augmenter sa durabilité et sa valeur nutritive. Plusieurs produits traditionnels sont connus principalement dans les zones rurales (**CLAPCS S. et MORONE G., 2011**).

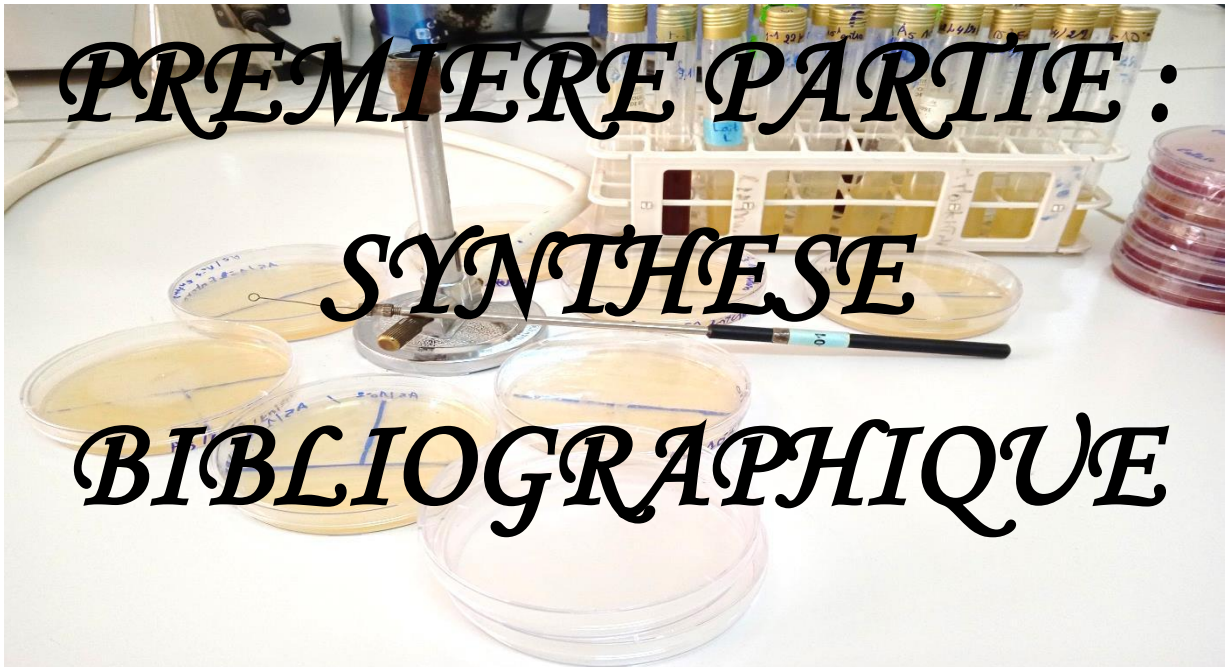
La qualité du fromage peut être affectée par des facteurs tels que la contamination par des agents pathogènes et leur multiplication, la pollution environnementale.

Les dangers microbiologiques constituent un problème majeur pour la sécurité alimentaire dans le secteur laitier, car le lait est un milieu idéal pour la croissance des bactéries et d'autres agents pathogènes. Ceux-ci peuvent être introduits dans le lait à partir du milieu environnant ou des animaux laitiers eux-mêmes. Comme des nombreux produits le fromage traditionnel, de par sa composition, avec une teneur élevée en protéines, lipides, sels minéraux calcium, phosphore et vitamines, est un aliment nutritif mais il devient



également source potentielle des microorganismes détériorants et pathogènes tels que (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.) Qui provient de la matière première et peuvent également être acquis lors de la transformation du produit, ce qui nous a poussés à réaliser ce travail, dont l'objectif principal est de faire un recherche et identification de quelques bactéries pathogènes dans quelques échantillons du fromage traditionnel (klila, fromage de vache, fromage de chèvre).

Notre travail s'articule autour de deux parties. La première partie consiste à une synthèse bibliographique dans laquelle la présence des informations sur le fromage. La deuxième partie est consacré à la méthode adoptée pour réaliser la partie expérimentale, résultats et discussions.



**PREMIERE PARTIE :**

**SYNTHESE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**



**CHAPITRE 1 :**  
**GENERALITES SUR**  
**LE FROMAGE**



## 1.1. Définition du fromage :

La dénomination « fromage » est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir de matières d'origine exclusivement laitière, utilisées seules ou en mélange, et coagulées en totalité ou en partie avant égouttage ou élimination partielle de l'eau (**extrait du décret n°88K-1206 du 30/12/1988**).

Selon le codex, le fromage est le produit affiné ou non affiné, de consistance molle ou semi-dure, dure ou extra-dure qui peut être enrobé et dans lequel le rapport protéines de lactosérum : caséines ne dépassent pas celui du lait (**GELAIS S et al., 2002**). la teneur minimale en matière sèche (MS) du produit ainsi défini doit être de 23 g pour 100g de fromage (**FREDOT E., 2006**).

## I.2. La Composition du fromage

La qualité des fromages dépendent de leur composition, y compris la texture, les propriétés sensorielles et celles de cuisson. Cette tendance convient aux effets de la composition sur l'étendue de la solubilisation du calcium, de l'hydratation des protéines, de l'activité enzymatique (la glycolyse, la protéolyse et la lipolyse) et de la microbiologie. (**GUO M et al., 1997**). Cependant, les caractéristiques du fromage obtenu (par exemple les propriétés de cuisson, la texture, le goût) affectent le niveau d'effet sur la modification d'un ou plusieurs paramètres de composition (**LAW B. et TAMIME P., 2010**). La richesse des fromages en matière grasse (quantité faible de matrice protéique) permet d'avoir des pâtes fermes et plus élastiques, tandis que les fromages en faible teneur en matière grasse sont plus fermes et moins lisses (quantité élevée de matrice protéique). Il a également été démontré que les variations dans la teneur en protéines affectent directement la fermeté des fromages. De même, le niveau d'eau qui est affectée par les conditions de fabrication des fromages et par l'évaporation de la surface au cours de la maturation affecte de son tour grandement la fermeté (**ADDEO F. et MASI P., 1992**). Il est difficile d'étudier les effets exacts des changements ciblés d'un paramètre de composition en raison de l'interaction de ces différents paramètres (par exemple humidité, graisses, protéines, pH, calcium total et rapport entre le calcium soluble et colloïdal) (**LAW B. et TAMIME P., 2010**).



### I.3. La fabrication du fromage comprend trois étapes :

#### I.3.1. La Coagulation :

La coagulation est l'étape durant laquelle le lait passe de la forme liquide à l'état solide en formant un gel. C'est à ce moment que débute la formation d'un réseau protéique tridimensionnel (GOUDEDRANCHE H et al., 2001). La coagulation se produit en résultat de la déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine du lait. Dans la pratique, cette déstabilisation est réalisée de deux manières :

- Par voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes, en particulier la présure.
- Par voie fermentaire à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains).
- Par voie mixte obtenue lorsque le lait présente au moment de la coagulation une acidité moyenne (pH 6,5 à 5,5) et qu'une dose de présure intermédiaire est utilisée (10 à 25 ml pour 100 litres de lait en général). Cet éventail de solutions est une des origines de la diversité fromagère.
- **I.3.2. L'Egouttage :**

L'égouttage se traduit macroscopiquement par une élimination du lactosérum qui s'accompagne d'une rétraction et d'un durcissement du gel. L'égouttage résulte, à la fois, d'un processus actif, appelé synérèse, et de l'aptitude du gel à évacuer le lactosérum occlus. Il ne s'agit pas d'une simple déshydratation. La plus grande partie des éléments solubles du lait (lactose, sels minéraux) et quelques fractions insolubles mineures (protéines solubles) sont expulsées du gel avec l'eau (GELAIS S et al., 2002).

#### I.3.3. L'Affinage :

L'affinage est un ensemble de réactions enzymatiques qui va progressivement transformer les constituants du fromage jeune obtenu en fin d'égouttage en une multitude de composés rendant la pâte plus ou moins onctueuse et fondante et lui conférant son arôme et son goût (GOUDEDRANCHE H et al., 2001). Il correspond principalement à des modifications de deux composants majeurs : protéines et matière grasse ; protéolyse et lipolyse sont donc les phénomènes dominants de l'affinage, elles se traduisent par de profondes modifications de la composition physico-chimique du substrat, et par voie de conséquence, de celles de

son aspect, de ses qualités organoleptiques, de sa digestibilité et de sa valeur nutritive (RAMET J., 1985).

Les transformations précitées se font par l'intermédiaire d'agents de maturation et principalement par les enzymes et les micro-organismes; leur activité est fortement dépendante à la fois de facteurs internes au fromage et des facteurs externes. Les enzymes responsables de la transformation ont trois origines: celles présentes naturellement dans le lait, les agents coagulants ajoutés et celles des différents microorganismes bactériens, levures et moisissures. En agissant sur les principaux constituants du lait, le lactose, les triglycérides et les protéines, elles modifient profondément la texture du fromage jeune et contribuent à former tout un ensemble de composés qui donnent au fromage affiné sa saveur et son arôme (GOUDEDRANCHE H et al., 2001).



# CHAPITRE 2 :

LA FLORE MICROBIENNE

DU FROMAGE

## I.4. La Flore microbienne du fromage :

### I.4.1. La Flore originelle :

Le lait contient peu de microorganismes lors d'un prélèvement d'un animal sain (<10<sup>3</sup> cellules /ml), il s'agit d'une flore saprophyte des canaux galactophores et du pis, dont des microcoques, des streptocoques lactiques et des lactobacilles. Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices (les lacténines) à action très courte (1 h), la flore banale ne présente pas de danger sanitaire mais peut se développer dans le lait et l'altérer (GUIRAUD J. et GALZY P., 1980).

➤ *Streptocoques lactiques :*

Les espèces de streptocoques sont homo- fermentaires strictes, se rencontrant chez L'Homme et les animaux, la plupart sont saprophytes toutefois certaines d'entre elles possèdent des caractères pathogènes (*Streptococcus pyogenes*), ce genre regroupe une bactérie d'intérêt industriel et nutritionnel *Streptococcus thermophilus* utilisée dans la Fabrication du fromage (LUQUET F., 1986 et JAMET E., 2009).

➤ *Lactocoques :*

Les *lactocoques* ont un métabolisme homo-fermentaire facultatif (JAMET E., 2009). Le genre *Lactococcus* comporte plusieurs espèces et sous espèces, dont les plus importantes sont les espèces suivantes: *Lactococcus lactis*ssp. *Lactis*, *Lactococcus lactis*ssp. *Cremoris*, *Lactococcus lactis*ssp. *Lactisbiovardiacetylactis*. Certains caractères biochimiques distinguent ces sous espèces et biovariants, telle que la production de diacétyl à partir du citrate, la désamination de l'arginine, la capacité à croître en présence de 4% de sel, à pH 9,2 et à une température de 40° C (BADIS A et al., 2004). Les deux sous espèces de *Lc. lactis*: *Lc. lactis*ssp. *lactis* et *Lc. lactis*ssp. *Cremoris* se distinguent essentiellement par leur capacité acidifiante et leur croissance à 40°C. La sous espèce *Lc. lactis*ssp. *Cremoris* est incapable de pousser au-dessus de 37°C. Le biovar *Lc. lactis*ssp. *Lactisbiovardiacetylactis*, utilise le citrate pour produire du diacétyl, de l'acétoïne et du CO<sub>2</sub> (BADIS A et al., 2005).

➤ **Lactobacilles :**

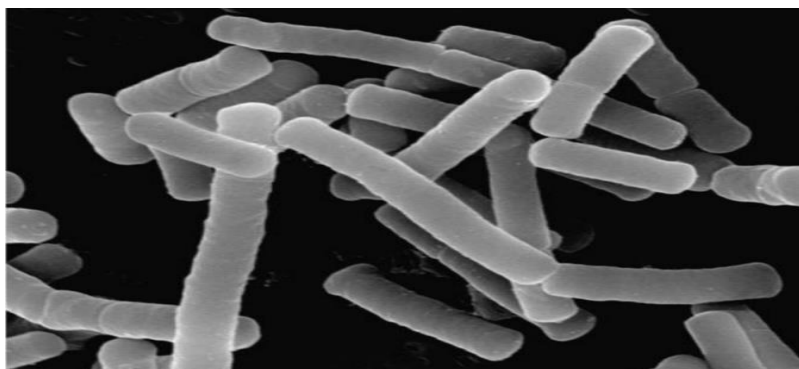
Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, a sporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (KHALID N. M. et MARTH E.H., 1990 ; LECLERC H. et al., 1994).

Les *lactobacillus* se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire : homofermentaires stricts, hétéro fermentaires facultatifs et hétéro fermentaires stricts (*Lb.brevis*, *Lb.kefir* et *Lb. Sanfransisco*) (TORMO H., 2010).

Les homofermentaires stricts : produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus* (SUTRA L et al., 1996).

Les hétérofermentaires facultatifs : sont capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitant. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakeet* *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles (LAURENT S., 1998).

Les hétérofermentaires stricts : ils fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO<sub>2</sub>. Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique. Ces bactéries produisant du CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose et du gluconate (STREIT F., 2008).



**Figure 01:** Le genre *Lactobacillus* (HAMED I A.R., 2009).

➤ *Les leuconostocs :*

Ce sont des coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétéro fermentaire marqué, avec production d'acide lactique, de CO<sub>2</sub> et l'éthanol. Elles sont classées en quatre espèces : *Ln mesenteroides*, *Ln paramesenteroides*, *Ln lactiset Ln oenos*, (GONZALEZ et al., 2007).

Elles sont responsables de contaminations et d'altérations de divers produits tels que les boissons acides et sucrés. Elles sont utiles dans certains fromages car elles facilitent leur ouverture par la production de CO<sub>2</sub> (KIHHEL M., 1996).

#### **I .4.2. La Flore de contamination :**

La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, et elle fait, alors, suite à une excrétion mammaire de l'animal malade ; elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux) ou bien liées à l'homme (BRISABOI A et al., 1997). Parmi ces germes :

➤ *Listeria :*

Les bactéries du genre *Listeria* se présentent sous la forme de petits bacilles à Gram-positif de forme régulière arrondis aux extrémités, elles sont mobiles grâce à des flagelles péritriche. Ce sont des bactéries aérobies anaérobies facultatives, catalase positive et oxydase négative, qui hydrolysent rapidement l'esculine (BOUADJAIB S., 2013).

➤ *Salmonelles :*

Ces entérobactéries à Gram négatif sont présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives, leur survie et leur multiplication sont possibles dans un milieu privé d'oxygène et peuvent provoquer les mêmes symptômes, caractéristiques d'une toxi-infection alimentaire (TCHAMBA C., 2007).

➤ *Staphylocoques* :

Ce sont des coques à Gram positif, non sporulés et immobiles, ils se trouvent assez fréquemment dans le lait. Après l'ingestion de l'aliment contaminé, ils provoquent des intoxications de gravité variable par leur production de toxines thermostables, la symptomatologie débute dans un contexte non fébrile, en associant vomissements, une diarrhée aqueuse abondante, des douleurs abdominales et des céphalées. Les toxines produites par cette bactérie ne sont pas détruites par la cuisson (**BECILA A., 2009**).

➤ *Escherichia coli* :

C'est une entérobactéries lactose +, gazogène, réalisant une fermentation d'acide99mixte, elle produit de l'indole (**GUIRAUD P.,1998**). C'est l'hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud, c'est un coliforme fécal, germe indicateur de contamination fécale dans les aliments (**DELARRAS C., 2007**). Les souches d'*Escherichia coli* sont responsables d'infections chez l'homme : les enterotoxinogènes, les enteroinvasives, les enterohémorragiques et les enteropathogènes sont différentes de celles qui constituent l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie des enfants (**DELARRAS C., 2007**).



*DEUXIEME PARTIE :*

*PARTIE*

*EXPERIMENTALE*



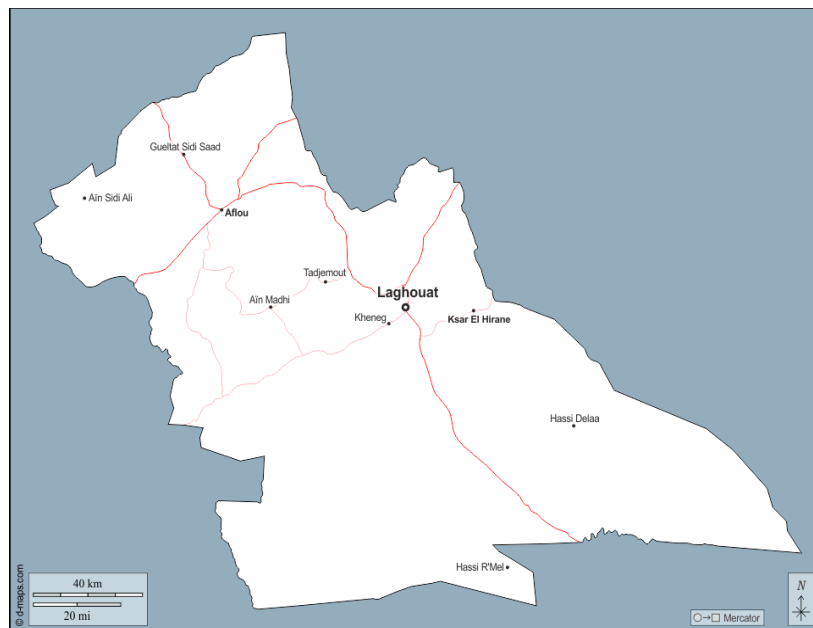
**CHAPITRE 3 :**  
**MATERIEL ET**  
**METHODES**

## II.1. Objectif de l'étude :

L'objectif de notre travail est la recherche et l'identification de quelques bactéries pathogènes dans quelques échantillons des fromages traditionnels (Klila, fromage de chèvre, fromage de vache).

## II.2. Présentation de la région d'étude :

De par sa position géographique et ses caractéristiques, la wilaya de Laghouat fait partie du groupe de neufs wilaya posturale du pays ainsi que des wilaya du sud. Elle est issue du découpage administratif de 1974 ainsi que celui de 1984. Sa superficie est de : 25 052Km pour une population estimée au 31 /12/2010 à 520188 habitants soit une densité de : 20 ,76Hab /Km sur le plan administratif, la wilaya est composé de 10 Daïras de 24 communes. La principale daïra étant Laghouat, qui ne comprend que la commune éponyme (Monographie., 2007).



**Figure 2:** Lacarte géographique de la wilaya de Laghouat.

### II.3. Echantillonnages et prélèvements :

Pour réaliser cette étude, nous avons prélevés trois échantillons composés de 5 unités pour chacun à différentes dates dans la ville de Laghouat : **E (1)** : klila , **E (2)** : fromage de chèvre, **E (3)** : fromage de vache.



**Figure03** : Fromage de chèvre.

**Tableau 01** : Sites et dates des Prélèvements.

Echantillons	Type de fromage	Localisation	Date des prélèvements	Poids /g
<b>E1</b>	<b>Klila</b>	Région de Laghouat	19/04/2021	5×100g
<b>E2</b>	<b>Fromage de Chèvre</b>	Région de Laghouat	15/05/2021	5×100g
<b>E3</b>	<b>Fromage de Vache</b>	Région de Laghouat	31/05/2021	5×100g

### II.4. Conservation des échantillons :

Les échantillons sont conservés au maximum 24h à 4C<sup>0</sup>-6C<sup>0</sup> avant d'être analysés.

## II.5. Les Analyses microbiologiques:

### II .5.1. Préparation de la Suspension mère et des dilutions décimales:

Dans des conditions stériles, nous avons pesé 10g de fromage et le mettes dans des flacons stériles contenant 90ml de diluant TSE. Après l'avoir mélangé, on obtient la suspension mère  $10^{-1}$ . Ensuite, nous avons préparé une série des dilutions décimales en prenant 1ml de la suspension mère à l'aide d'une micropipette stérile, et on le mit dans un tube à essai contenant 9ml de TSE stérile, puis mélangé à l'aide d'un vortex, nous obtenons la dilution  $10^{-2}$ , de la même façon on prépare la dilution  $10^{-3}$  (ISO 6887.,1999).

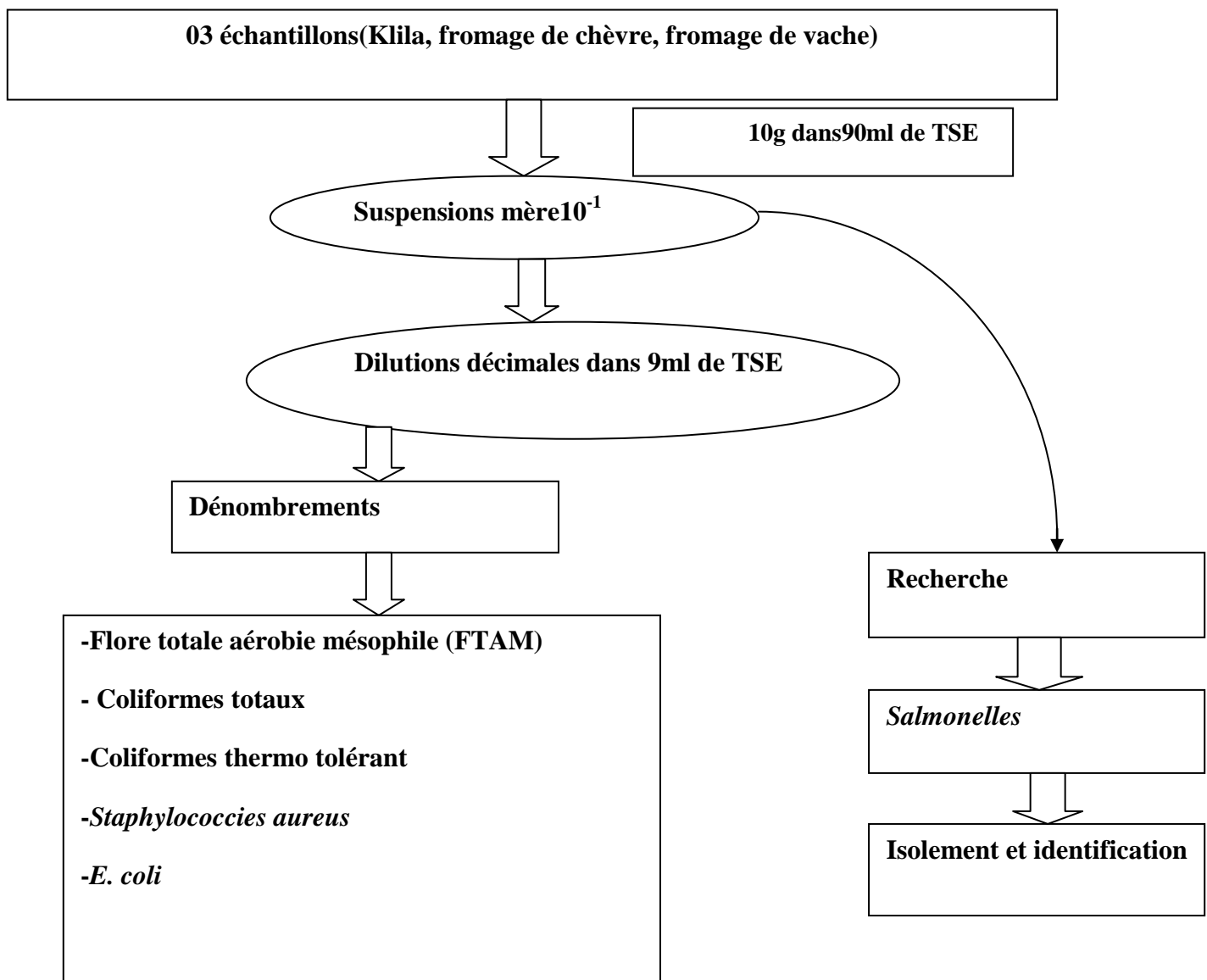


Figure04: Schéma générale de l'analyse microbiologique.

## II .5.2. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile :

Pour le dénombrement des germes aérobies. On met 1ml de la suspension mère  $10^{-1}$  et dilution  $10^{-3}$  au centre de boîte de pétri puis on a coulé environ 15 ml de la gélose PCA+ (ensemencement en masse). Après on a mélangé soigneusement l'inoculum et on a laissé les boîtes se solidifier sur la pailleuse, l'incubation se fait à 30 °C pendant 72 h. (GUIRAUD P., 1998).

Pour les dénombrements, calculs et expressions des résultats, on s'est référé à la norme **ISO 7218 version 2007** relative aux exigences générales et recommandations en microbiologie alimentaire.

- **Dénombrement des colonies :**

Après la période d'incubation mentionnée dans la norme spécifique, procéder au comptage des colonies (colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies présumées) pour chaque boîte contenant moins de 300 colonies (ou tout autre nombre indiqué dans la norme spécifique).

Dans le cas du comptage des colonies caractéristiques ou caractéristiques présumées, la description des colonies doit être celle indiquée dans la norme spécifique. Dans certains cas, les colonies peuvent être difficiles à compter (par exemple en présence de microorganismes envahissants). Considérer les colonies envahissantes comme des colonies uniques. Si moins d'un quart de la boîte est envahi, compter les colonies sur la partie non affectée de la boîte et calculer le nombre correspondant à la boîte entière. En déduire par extrapolation le nombre théorique qui devrait correspondre à la boîte entière. Si plus d'un quart de la boîte est envahi, ne pas procéder au comptage. Considérer également les colonies envahissantes sous forme de chaînes comme une seule colonie.

Expression des résultats :

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de compter les colonies sur au moins une boîte contenant au moins 10 colonies [colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies répondant aux critères d'identification].

Calculer le nombre N de micro-organismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de la Formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

Où :

$\sum C$  : est la somme des colonies comptées sur les 2 boîtes retenues de deux dilutions 2successives et dont au moins une contient au moins 10 colonies;

V : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

d : est la dilution correspondant à la première dilution retenue [d = 1 pour un produit liquide non dilué (échantillon pour essai)].

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le troisième chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédent n'est pas modifié; si le troisième chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent est augmenté d'une unité.

Exprimer, de préférence, le résultat comme un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10, ou un nombre entier avec 2 chiffres significatifs.

Rapporter le résultat comme le nombre N de micro-organismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).

### II .5.3. Dénombrement des entérobactéries :

Le dénombrement est effectué sur le milieu VRBG avec ensemencement en masse de 1ml de chaque dilution ( $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ ), l'incubation se fait à 37 °C pendant 24 h. (ISO 21528-2., 2017).

### II .5.4. Dénombrement des coliformes totaux :

Ce dénombrement s'effectue à ensemencement en masse de 1 ml de la suspension mère dans des boites de gélose VRBL (gélose lactosé biliée au cristal violet et au rouge neutre),l'incubation se fait à 37 °C pendant 24 h. (ISO 4832 ., 2006)

**II. 5.5. Dénombrement des coliformes thermo tolérants :**

La numération des coliformes thermo tolérants est effectuée par la même méthode d'ensemencement sur le milieu VRBL sauf l'incubation se fait à 44 °C pendant 24 h. (ISO4832 ., 2006)

**II .5.6. Recherche et dénombrement de *E .coli* :**

*E. coli* sont dénombrés en milieu liquide par la technique de NPP (nombre le plus probable) sur le bouillon BCPL réparti à raison de 10 ml par tubes munis d'une cloche de durham, la technique fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

**- Test de présomption :**

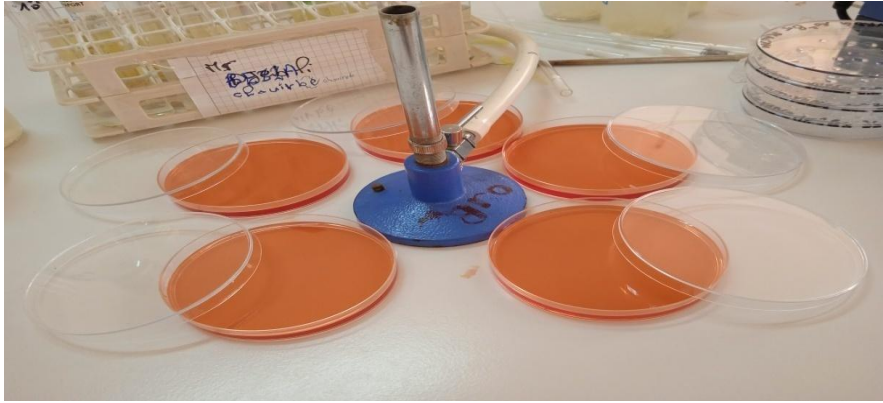
Nous avons préparé dans un portoir une série des tubes contenant le milieu BCPL double concentration à raison de trois tubes par dilution. A partir de la suspension mère  $10^{-1}$  et dilution décimales ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) nous avons porté aseptiquement 10 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée et mélanger bien le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 h.

**-Test de confirmation :**

Chaque tube de BCPL positif lors de la présomption fera l'objet d'un repiquage dans de milieu Schubert, bien mélanger le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait à 44C pendant 24 h. Après l' incubation on ajoute 2 ou 3 gouttes de réactif Kovacs.

**II .5.7.Dénombrement des *Staphylococcus aureus* :**

Un volume de 0,1 ml de la Suspension mère  $10^{-1}$  est ensemencé sur surface dans des boites de Gélose Chapman, l'incubation se fait à 37 °C pendant 24 /48 h.



**Figure 05 :** Milieu Chapman.

### II .5.8. La recherche de *Salmonella* :

La recherche de *Salmonella* a été réalisée selon la méthode de référence (ISO 6579., 2017). La recherche de ces bactéries s'effectue en 4 étapes :

**1-Un pré-enrichissement** sur l'eau peptone tamponnée par prélèvement de 25 g du fromage dans un flacon stérile contenant 225ml d'eau peptone tamponnée. Une agitation est effectuée pour avoir une suspension, ensuite incubé à 37°C pendant 24 heures.

**2-L'enrichissement** : en repiquant 1 ml du milieu de pré-enrichissement (trouble) dans 10 ml de bouillon au sélénite de cystéine (stérile). Les tubes ensemencés sont mélangés puis incubés à 37°C pendant 24h.

**3-L'isolement** : est réalisé en prélevant une goutte du milieu d'enrichissement avec l'anse de platine que l'on ensemence en stries sur milieu sélectif (gélose Hektoen). Les cultures sont incubées à 37°C pendant 24h.

#### **4- Identification :**

Avant l'identification on a d'abord fait le repiquage des colonies dans le milieu GN (pour avoir une culture jeune).



**CHAPITRE 4 :**  
**RESULTATS ET**  
**DISCUSSION**

## Résultats et discussion :

### III.1. Résultats des Analyses microbiologiques :

Nos résultats enregistrés pour le dénombrement des principaux groupes microbiens et la recherche des bactéries pathogènes, sont représentés sous forme de tableaux accompagnés par des figures :

**Tableau 02 :** Résultats des analyses microbiologiques (01).

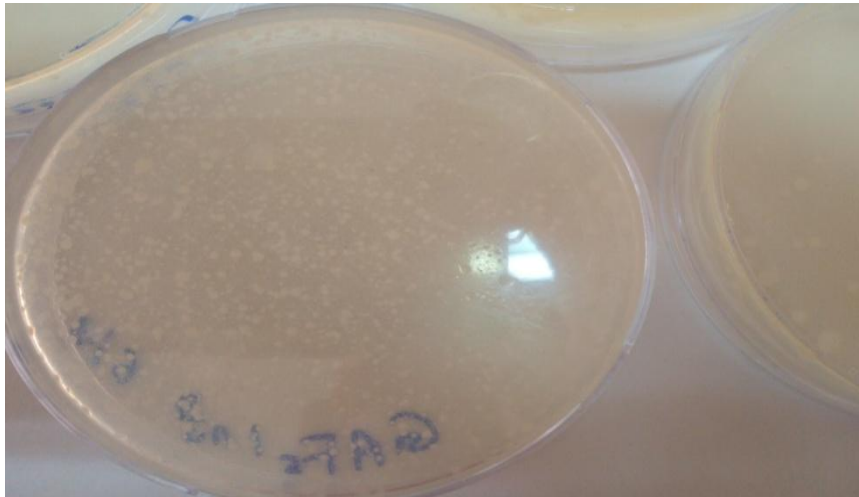
Flore dénombré (UFC/g)	Germe aérobie			Coliformes totaux			Entérobactéries		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
<b>Unité 01</b>	$1,6 \times 10^2$	$2,22 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	1×10	$3,6 \times 10^2$	$3,8 \times 10^3$	$8 \times 10^2$	$1,14 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$
<b>Unité02</b>	$2,7 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	$6 \times 10^3$	1×10	$1,4 \times 10^2$	$5 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
<b>Unité03</b>	$2,7 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	<10	$1,92 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$	$6,8 \times 10^2$	$1,35 \times 10^2$
<b>Unité04</b>	$6 \times 10$	$4,73 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$3,2 \times 10^2$	$5,7 \times 10^2$	$1,8 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$9,9 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$
<b>Unité05</b>	$4,94 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	1×10	$4,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$

**Tableau03 :** Résultats des analyses microbiologiques (02).

Germes	<i>Salmonella</i>			<i>E .coli</i>			<i>staphylococcus aureus</i>		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
<b>Unité 01</b>	Abs	Abs	Abs	<0,3	<0,3	<0,3	$4 \times 10$	$8,3 \times 10^2$	$3 \times 10$
<b>unité02</b>	Abs	Abs	Abs	<0,3	<0,3	<0,3	$5 \times 10$	$6 \times 10^2$	<10
<b>Unité03</b>	Abs	Abs	Abs	<0,3	<0,3	<0,3	$1,2 \times 10$	$5,1 \times 10^2$	<10
<b>Unité04</b>	Abs	Abs	Abs	<0,3	<0,3	<0,3	<10	$4,9 \times 10^2$	<10
<b>Unité05</b>	Abs	Abs	Abs	<0,3	<0,3	<0,3	$2 \times 10$	$4,6 \times 10^2$	<10

### III .1.1. Résultats du dénombrement de la flore aérobie mésophile total(FTAM) :

La flore aérobie mésophile totale a été dénombrée sur milieu PCA+. Après 72h d'incubation à 30°C, les colonies qui apparaissent sont caractérisées par une couleur blanche (pour la majorité), ces colonies sont de petite taille et une forme ronde (figure 12). Le dénombrement à prendre en compte toutes les colonies qui ont poussés sur le milieu PCA+.



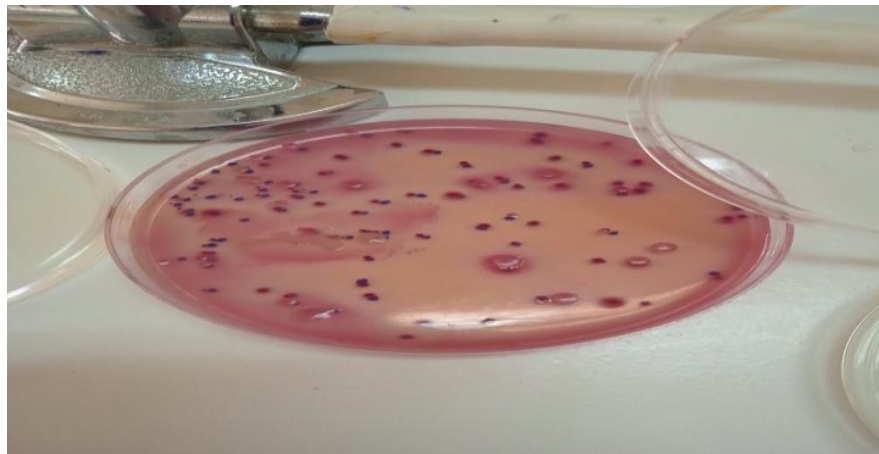
**Figure 06:** Aspect des colonies de la flore aérobie mésophile sur milieu PCA+

Les résultats du dénombrement de la flore aérobie mésophile totale sur milieu PCA montrent une charge bactérienne moyenne allant de  $4.94 \times 10^3$  UFC/g pour le Klila et  $4.73 \times 10^3$  UFC/g pour le fromage de vache et  $6 \times 10^3$  UFC/g pour le fromage de chèvre, ces résultats sont inférieures par rapport les résultats de **MEHAMDIA.E., 2015** qui trouve une charge microbienne élevée avec une moyenne de  $1.02 \times 10^9$  UFC/g, et **AYGUNA et al., 2005** dont la moyenne en FAMT dans le fromage traditionnel turc (carra) était de  $1,87 \times 10^8$  UFC/g, dans une étude sur la klila et le jben marocains traditionnels **RHIAT M et al., 2013** et **MENNANE Z., 2008** le nombre en FAMT décrit était respectivement ( $0,9 \times 10^5$  UFC/g et  $1,43 \times 10^5$  UFC/g et  $1,01 \times 10^6$  UFC/g) pour le klila et  $1.2 \times 10^6$  UFC/g pour le jben, ce qui témoigne une bonne qualité microbiologique des différents fromages analysés.

### III .1.2. Résultats du dénombrement des coliformes totaux :

L'analyse des coliformes totaux est effectués sur les 3 échantillons de fromage au lait cru permis d'obtenir les résultats suivants :

Le dénombrement de coliformes totaux sur le milieu sélectif VRBL donne des colonies qui sont présentées dans la (Figure13). Dans ce milieu le développement de la plupart des bactéries qui n'appartenant pas à la famille des entérobactéries inhibé par le cristal violet et sel biliaire. L'utilisation du lactose est mise en évidence par le virage de couleur au rouge. Les colonies considérées sont violet (ou roses-rouges) de forme ronde ou fusiforme avec un diamètre de 0,5 à 1 mm .



**Figure 07:** les colonies des coliformes totaux sur le milieu VRBL.

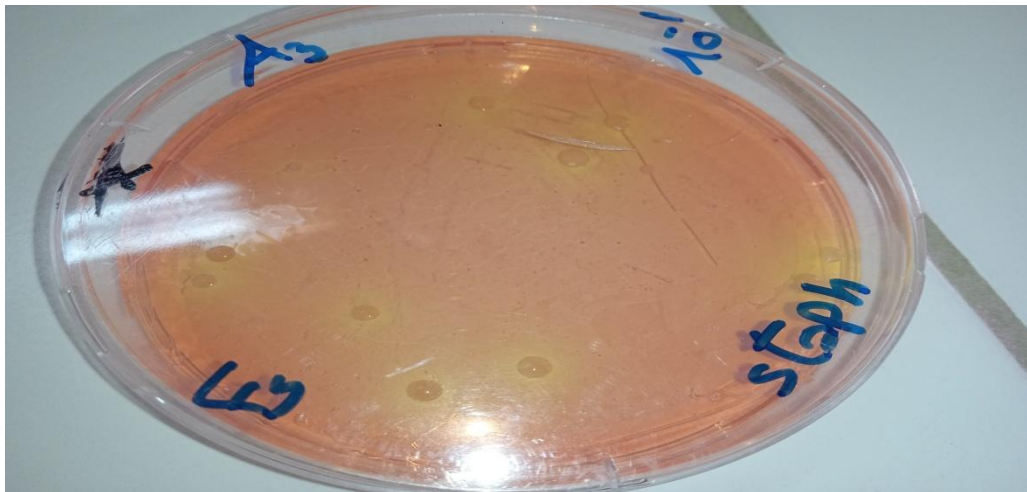
Le dénombrement des coliformes totaux a montré des charges de  $3,2 \times 10^2$  UFC/g pour l'échantillon 01 et de  $1,92 \times 10^3$  UFC/g pour l'échantillon 02 et de  $2,1 \times 10^2$  UFC/g pour l'échantillon 03, ces valeurs restent inférieures à celles trouvées par **HAMAMA A., 1989** qui a trouvé une valeur de  $2,05 \times 10^5$  UFC/g par contre **MEHAMDIA. E., 2015** indique l'absence de coliforme totaux sauf chez deux échantillons, elle était de  $1,26 \times 10^3$  UFC/g et  $2,7 \times 10^3$  UFC/g respectivement. Nos résultats sont en accord avec **RHIAT M et al., 2013** qui a rapporté de  $2,1 \times 10^2$  UFC/g, d'autre part, aucun résultat positif n'a été signalé par **MENNANE Z et al., (2007)**. Donc la présence des coliformes est un indicateur de mauvaise condition hygiénique pendant ou après la transformation des aliments (**BONNEFOY C et al., 2002**).

### III .1.3. Résultats du dénombrement des entérobactéries :

Le dénombrement des entérobactéries de trois échantillons de fromage dénombrés sur le milieu VRBG a révélé un taux plus élevé pour l'échantillon E2 ( $1,14 \times 10^3$  UFC /g) par rapport à l'échantillon E1 ( $3,8 \times 10^2$  UFC/g) et l'échantillon E3 ( $4,4 \times 10^2$  UFC/g). La valeur  $12 \times 10^2$  UFC/g obtenue par **TOUNKOB A., 2016** était proche à celle mentionnée par l'échantillon E2. Nos résultats sont inférieures aux résultats obtenus par **MENNANE Z et al ., 2007 .**

### III .1.4. Résultats du dénombrement de *Staphylococcus aureus* :

Les *staphylococcus aureus* recherchés sont dénombrées sur gélose Chapman mentionné dans la figure suivante :



**Figure 08 :** les colonies des *staphylococcus aureus* sur le milieu Chapman.

La recherche des *Staphylococcus aureus* a révélé leur présence dans les trois échantillons analysé mais l'échantillon **E2** possède le taux le plus élevée ( $3,8 \times 10^2$  UFC/g) par rapport à l'échantillon **E1** ( $5 \times 10$  UFC/g) et **E3** le plus faible ( $3 \times 10$  UFC/g) , ces résultats sont satisfaisants selon ce qui a été mentionné dans **l'arrêté interministériel de 4 octobre 2016 publié dans J.O.R.A N° 39,1438**, car leur valeur ne dépasse pas les normes  $10^3 - 10^4$  UFC/g.

--Nos résultats sont inférieurs à celui rapporté par **HAMAMA A., 1989** où le jben étudié a une valeur de  $7 \times 10^4$  UFC/g. Par contre de nombreux auteurs ont signalé

l'absence de staphylococcus aureus (MENNANE Z et al ., (2007 ),MEDFOUNI S. et BENIDIR G.,(2017) , au KHOUALDI G.,(2016).

### III .1.5. Résultats du dénombrement d'*E. Coli* :

Les résultats de la recherche et le dénombrement de *E coli* sont réalisé sur milieu BCPL, on obtien des résultats inférieurs à 0,3UFC/g selon le tableau de Mac Grady. denombreuxauteurs (KUNTZE U.et al., 1996,ANSAY S. et KASPAR C.,1997 , QUINTO E.et CEPEDA A.,1997). Ont signalé la prévalence de ce germe est faible pour ce qui concerne les fromages fabriqués au lait cru parce que ces germe sont des indicateurs de contamination fécale.

### III .1.6. Résultats du Recherche de *salmonella* :

Les résultats des analyses de la recherche de *salmonella* indiquent leur absence totale dans les trois échantillons analysés, RHAT M et al .,2011 ont signalé le même résultats pour le jben marocain alors que les travaux de HAMAMA A.,1989ontmontrés la présence de *salmonella* dans trois échantillons de jben marocain. JACQUES V.,1998 indique la présence de ce germe dans 153 échantillons des fromages artisanaux fabriqués au lait cru en région wallon. Nos résultats montre que ce fromage au lait cru a été préparé dans des conditions hygiénique satisfaisant et des meilleures conditions de stockage ce qui est conforme aux normes fixées par l'arrêté interministériel du 4 octobre 2016 publié dans J.O.R.A N<sup>0</sup> 39.

### III.2. Résultats de l'Identification :

#### Examen microscopique :

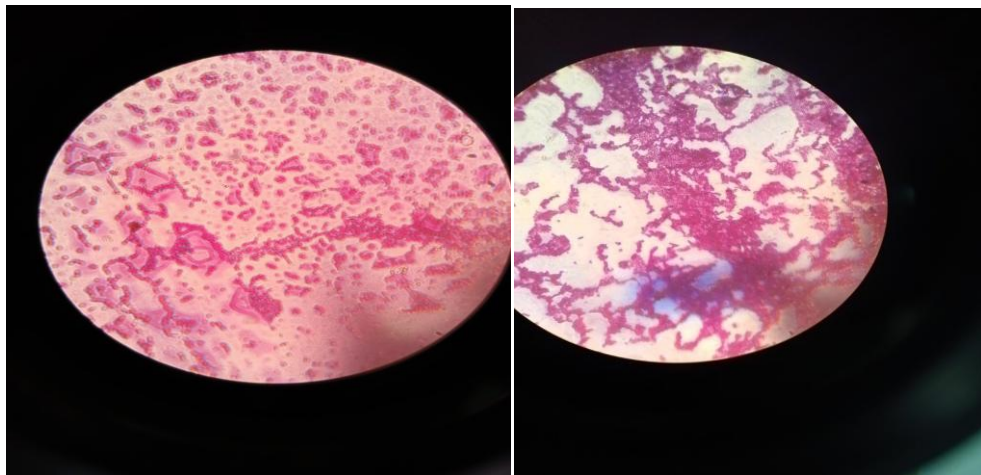
Les résultats de cet examen sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau04** : résultats de l'examen microscopique.

Germes	Gram	Formes	Regroupements	Observation de l'Examen à l'état frais
<i>E. Coli</i>	-	Bacille	En chaînette	mobile
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	cocci	En amas	immobile
<i>Salmonella</i>	-	Bacille	En chaînette	immobile

La coloration de gram, nous a permis d'observer que les bactéries étaient gram négatif et apparaissent sous différentes formes et différents modèles d'associations. Sauf les *staphylococcus aureus* sont des grams positifs.

L'observation microscopique a montré que des bactéries sont des bacilles et d'autres sont des cocci.

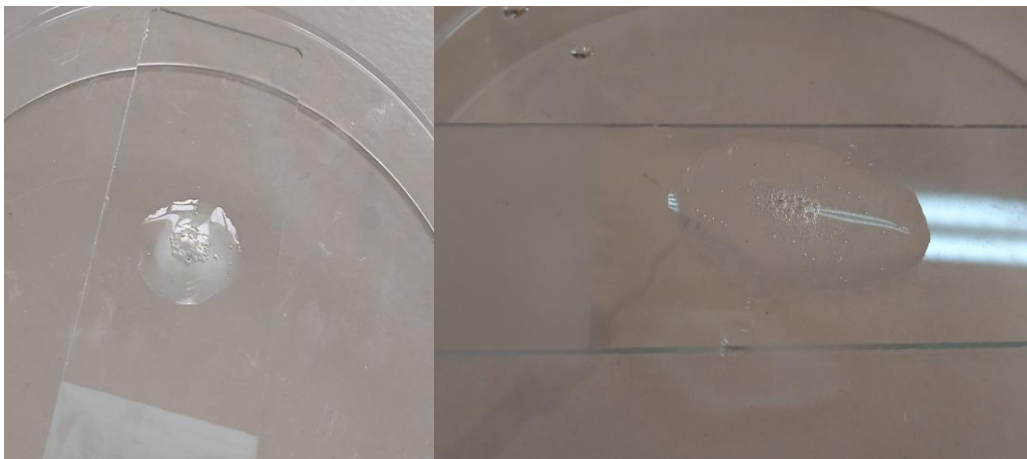


**Figure 09** : observation microscopique de la coloration de GRAM(x100 ).

### III.2. 1. Identification des quelque testes biochimiques :

#### Test de catalase pour *staphylococcus aureus* :

- toutes les colonies testées sont catalase positives dont la présence se manifeste par un dégagement de gaz.



**Figure10** : Résultat du Test de la Catalase.

**- Gélose TSI (Triple Sugar Iron) pour les entérobactéries :**

- Après incubation du milieu TSI, nous avons observé :
- Une déformation de la gélosé désigne une production de gaz.
- Un virage au jaune du culot se traduit par l'utilisation du glucose.
- Un virage au jaune du culot se traduit par L'utilisation de lactose.



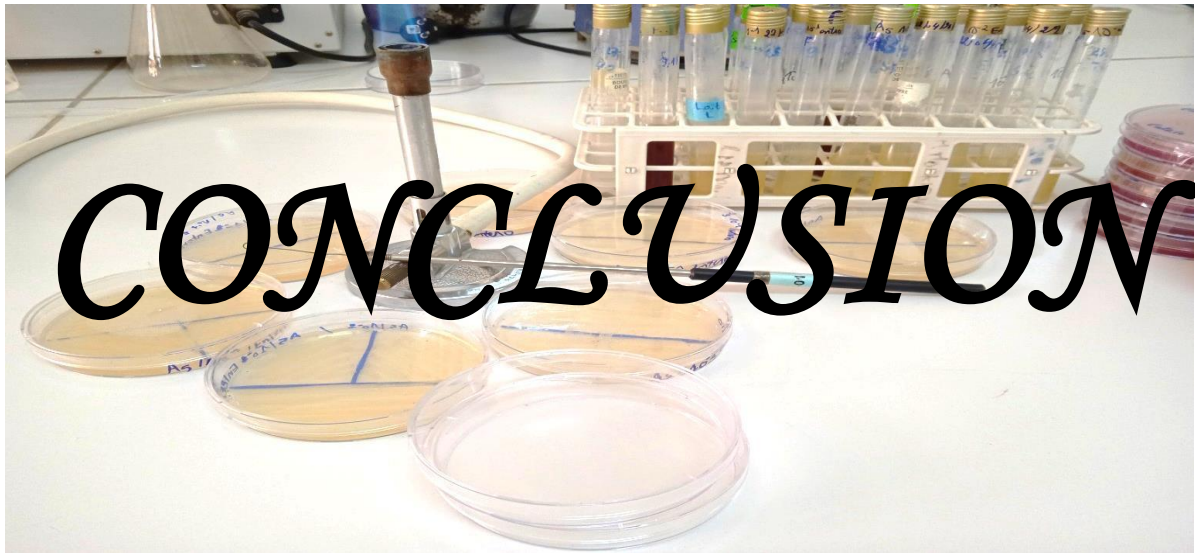
**Figure11** : Aspects des colonies Testées sur le milieu TSI.

**Test sur milieu Citrate de SIMMONS pour les entérobactéries :**

**Lecture du résultat** : Citrate (-) et pas de virage de couleur donc il n'Ya pas d'utilisation de citrate



**Figure 12:** Test sur milieu Citrate de SIMMONS.





---

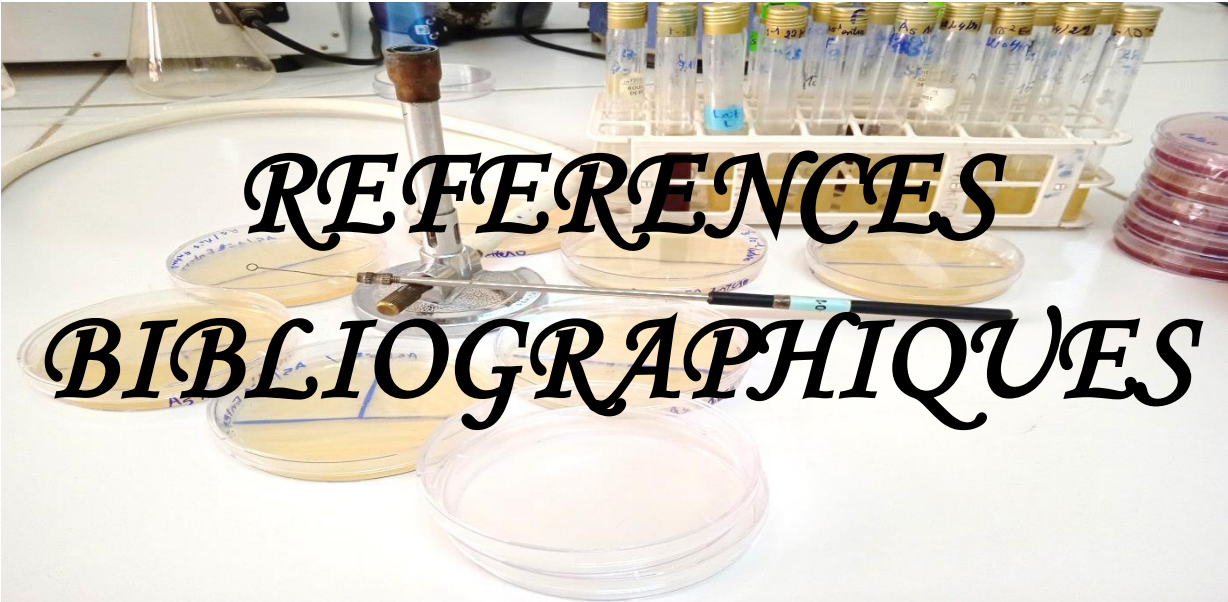
## Conclusion

Le fromage traditionnel fabriqué à partir de lait cru fait partie des produits alimentaires les plus consommés en Algérie. Dans ce travail, nous avons réalisé une recherche et identification des bactéries pathogènes dans quelque échantillon du fromage traditionnel collecté dans la région de Laghouat.

D'après les résultats d'analyses microbiologiques on a signalé que les trois échantillons contenaient des FTAM, des coliformes totaux, des entérobactéries et des *Staphylococcus aureus* mais ne dépassent pas les normes fixées par **l'arrêté interministériel de 4 octobre 2016 publié dans J.O.R.A N° 39,1438**. Nous avons remarqué l'absence totale de salmonella. Donc on peut déduire que la qualité microbiologique de fromage analysé est acceptable.

Les résultats de cette étude montrent une bonne qualité microbiologique globale des fromages traditionnels.

Il ressort de cette étude, l'importance d'adopter un processus de fabrication adéquat vigilant et simple pour la préparation du fromage traditionnel, tout en respectant les bonnes pratiques d'hygiène à fin de réduire les contaminations susceptible de cette denrée fragile et obtenir un produit salubre conforme aux normes microbiologies internationales.



## *Référence bibliographique*

**ADDEO F. MAI P.,1992.** Production of pasta cheese In: 3rd cheese symposium, National Dairy Products Research Center, Moorepark. Edition T M Cogan Teagasc, Fermoy Co. Cork. : 31-40.

**ANSAY SE. et KASPAR CW.,1997.** Survey of retailcheeses ,dairyprocessingenvironments and rawmilk for Escherichia coli O157 :H7.lett.Appl.Microbiol .25,p :131-134.

**Arvanitoyannis Ioannis S., 2009.**HACCP and ISO 22000 :Applications to foods of Animal origin.First edition United Kingdom.<http://www.bogmisailac.org/web> « documents/haccp and iso 22000application arvanitoyannis-2009.pdf.

**AYGUNA O, ASLANTAS O, ONER S.,2005.**A Survey on the microbiological quality of carra, a traditioal Turkish cheese.journal of Food Engineering .66 :401-404.

**BADIS A, LAUABDIA SELLAMI N, GUETARNI D, KIHAL M et OUZROUT R., 2005.**Caractérisationphénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru dechèvre de deux populations caprines locales “Arabia et kabyle”. *Sci et Technol.* **23**, 30-37.71p.

**BADIS A, GUETRANI D, MOUSSA-BOUDJEMAB, HENNIDE et KIHAL M. (2004).** Identificationand technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of fourAlgerian races. *Food Microbiol.* 21, 579-588.

**BECILA A., 2009-** Préventions Des Altérations et Des Contaminations Microbiennes des Aliments. Mémoire du diplôme de post graduation, Université. Mentouri, Constantine, 30-33p.

**BRISABOIS A., LAFARGE V., BROUILLARD A., BUYSER M., COLLETTE C., GARIN-BASTUJI B et THOREL M., 1997-** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers. situation en France et en Europe, Science technologique, 452-4

**CLAPS S. et MORONE G.,2011.** Produits laitiers et fromagers traditionnels de l’Algérie. In Développement de la filière laitière et fromagère en Algérie, Corfilac.P :57-77.

**Carte géographique.,2007-2021.**<https://d-maps.com>.

**Décret n°88-1206** du décembre 1988 portant application de la loi du 1 août 1905 sur les fraudes et falsifications en matière de produits ou de services et de la loi du 2 juillet 1935 tendant à l'organisation et à l'assainissement du marché du lait en ce qui concerne les fromages.

**DELARRAS C.,2007.**Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire .Edition Techniques et documentation Lavoisier, paris.P .128-129,271.

**DENIS P .,1989.**Les derniers nomades.L'Harmattan.631 p.

**FREDOT E .,2006.** Connaissance des aliments. Lavoisier. Londres- Paris-New York p:09-66.

**GELAIS ST-D,TIRRARD-DOLLER P.,BELANGER G.,DRAPEAU R., COUTURE R., (2002).** Le Fromage in science et technologie du lait transformation et du lait .par vignola carole L.presse internationale polytechnique .p :349-413 .

**GONZALEZ et al., 2007-** In BOUADJANI W.,2009-Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Université. Tlemcen, 73 p.

**GOUEDRANCHE H, CAMIER-CAUDRON B,GASSI J-Y, et SCHUCK P.,(2001).**Procédés de transformation fromagère (parité 1) .Techniques de l'ingénieur (LRTL,INRA).F6305-2-F6307.

**GUIRAD J. et GALZY P., (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition : De l'Usine Nouvelle. Paris. 237p.

**GUIRAUD JP., (1998).** Microbiologie alimentaire. Edition : Dunod. Paris. 390p.

**GUO MR, GILMORE JA, KINDSTEDT PS., 1997.** Effect of sodium chloride on the serum phase of Mozzarella cheese. Journal of Dairy Science 80(12):3092-3098

**HAMAMA A.,1989.** Qualité bactériologique des fromages frais marocains. Options Méditerranéennes -Série Séminaires, n°6 (1989a) 223-227.

**HAMEDI A.R., 2009.**étude du potentiel probiotique et technologique des lactobacilles isolés du lait cru de chamelle .Mémoire de Magister Université d'oran.p :14

**ISO 4832,2006**, Microbiologie des aliments –Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes-méthode par comptage des colonies.

**ISO 21528-2,2017**,Microbiologie de la chaîne alimentaire-Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des Enterobactériaceae.

**ISO 6575-1,2017**,Microbiologie de la chaîne alimentaire –Méthode horizontale pour la recherche , le dénombrement et le sérotypage des salmonella.

**J.O.R.A(2017)**.Journal Officiel de la République Algérienne N°39.Critères microbiologiques des laits et des produits laitiers.

**JACQUES V , CHARLES D,LAURENCE N ,FRANCOIS M,CLAUDE J,EMILE P ,MOHAMED E , JACQUES D .,1998**.Qualité microbiologique des fromages artisanaux fabriqués au lait cru en Région Wallonne,Biotechnol.Agron.Soc.Environ .2(4),248-225

**JAMET E ., 2009**. Les bactéries lactiques : une composante de l'écosystème microbien des fromages. In : Drider DJ et Prévost H. (Eds.), Bactéries lactiques. Economica, Paris, pp. 319-343.

**KHALID N.M et MARTH E.H., 1990**. Lactobacilli, their enzymes and role .In : Ripening and spoilage of cheese.Rev.Dairy Sci.73. P:158-16.

**KHOUALDI Gania.,2016**. Caractérisation du fromage traditionnel algérien Medeghissa.mémoire Magister, université Mentouriconstantine 1 .P :85.

**KIHEL M., 1996**.Etude de la production du dioxyde de carbone par leuconostocmesenteroides élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu.thèse de docteur d'état,Université.Es-senia,Oran.

**KUNTZE U., BECKER H., MARTBAUER E, BAUMANN C.,BOROW H.,1996**..Detection of verotoxigenic strains of *E.coli* in raw ilk cheese.Arch . Lebensm.Hyg .47,p.141-144.

**LAURENT S., 1998**.Manuel de bactériologie alimentaire. Polytechnica paris .p:307

**LAW BA, TAMIME AY. 2010.**, Technology of cheesemaking. Second e, editor: John Wiley & Sons. London, UK.

**LECLERC H., GAILLARD F.L. et SIMONET M., 1994.** Les grands groupes de bactéries. In: Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. DOIN. Paris. P :445.

**LICITRA G ., 2010 .** World-widetraditionalcheeses : Banned for business. *DairySci.Techol.*90, P :357-374.

**LUQUET F.M ., 1986.**laits et produits laitiers vache brebis chèvre.2<sup>ème</sup>Edition : tec et doc.Lavoisier.paris.P :460.

**MAHAMEDI A. E., 2015.** Etude des qualités: hygiénique, physicochimique et microbiologique des ferments et des beurres traditionnels destinés à la consommation dans différentes régions d'Algérie. Mémoire de Magister en Biologie. Benlahcen K. Université d'Oran. Algérie.111p.

**MEDFOUNI S. et BENIDIR K.,2018.** Caractérisation du fromage traditionnel Algérien *Bouhezza* de chèvre et détermination de sa durée limite de conservation au cours de la réfrigération. Mémoire Master, université LARBI BEN M'HIDI D'OUUM EL – BOUAGHI .P :31-34

**MEMDOUH S.,2018.**Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* aux CHU de Constantine. Mémoire de magister. Université Frères Mentouri constantine 1.P :90.

**MENNANE Z, KHEDID K ., ZINEDINE A.,LAGZOULI M L., OUHSSINE M., ELYACHIOUI M .,2007.** Microbial characteristics of Klila and Jben traditional Moroccan cheese from rawcow's milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2,23–27.

**MENNANE Z.,2008.** Lait et produits laits entre la tradition et la biotechnologie. Étude physicochimique et microbiologique. Thèse doctorat 2008 en Microbiologie. Université Ibn Tofaïl, Faculté des sciences dénitra, (2008) 175p.

**QUINTO EJ .,CEPEDA A., 1997.**Incidence of toxigenic *Escherichia coli*,in soft cheese made with raw or pasteurised milk.*lett Appl.Micrbiol* .24,P.291-295.

**RAMET J.P., 1985.** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin Méditerranéen. FAO, M-26, ISBN92-5202169-8.

**RHIAT M, LABIOUI H, DRIOUCH A, MENNANE Z, AOUANE M, CHBAB Y, DRIOUCH A, MENNANE Z et OUHSSINE M., (2011).**Etude bactériologique comparative des fromages frais marocains commercialisés (Mahlabats) et des fromages fabriqués au laboratoire. Afrique SCIENCES.07(3) ,108-112.

**RHIAT M, LABIOUI H, DRIOUCH A, MENNANE Z, OUHSSINE M., (2013).**Preparation of the starter Trial production of cheese (Jben) and klila et laboratory scale. Food science and quality Managem E.Vol.13.

**SOUIDI Z., 2012.** Caractérisation microbiologique et de la protéolyse du fromage traditionnel algérien Bouhezza" de ferme. Mémoire de Magister. Université de Constantine Algérie .P :50-51.

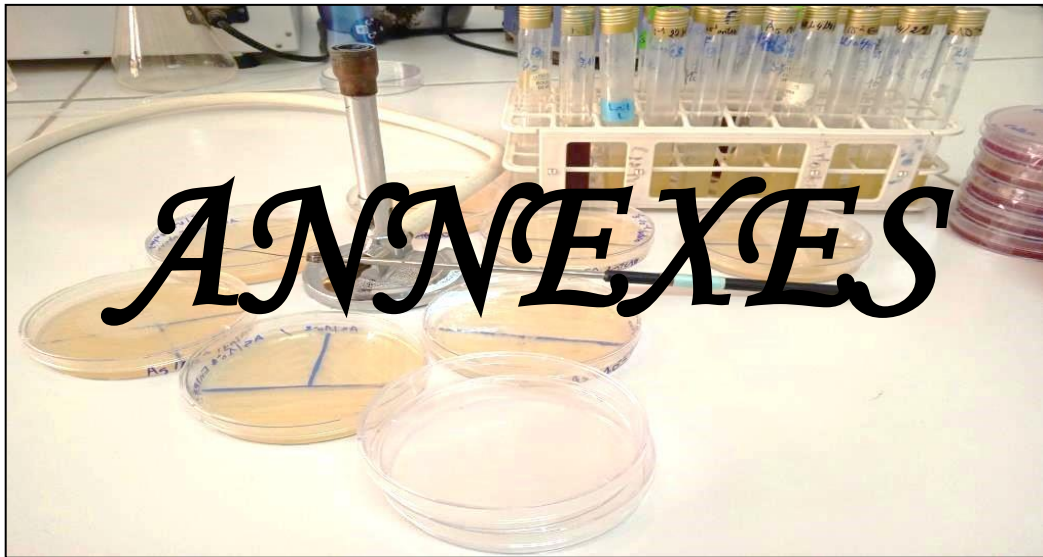
**STREIT F., 2008.**Influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *lactobacillus delbrueckii sub sp.bulgaricus*.Thèse de Doctorat, 223p.

**SUTRA L FEDRINGHI M., JOUVE J.L., 1996.**Manuelde bactériologie alimentaire, éditionpolytechnica, paris. P:235-259.

**TCHAMBA C., 2007.**Caractérisation de la flore lactique des laits fermentés artisanaux au Sénégal: cas de la zone des Niayes. Thèse de doctorat, Université. cheikh Anta Diop, Dakar, 16p.

**TORMO H., 2010.**Diversité des flores microbiennes du lait cru de chèvre et facteurs de variabilité .Thèse en vue de doctorat, Université. Toulouse, 238 p.

**TOUNKOB A., 2016.** Etude physicochimique, Microbiologique du jben traditionnel de la région d'AIN SEFRA fabrique par el haka. Mémoire Master, Université Abou BekrBelkaïd-Tlemcen.P :33-34.



**Annexes (1)**

**Composition des diluants (g/l)**

**Tryptone sel Eau (TSE) :**

Peptone.....	1g
Chlorure de sodium.....	8,5g
Eau distillée.....	1000ml

**Eau peptonée tamponnée :**

Na Cl.....	5g
Peptone.....	20g
Phosphate di sodique.....	9g
Phosphate mono potassique.....	1,5g
Eau distillée.....	1000ml

**Eau physiologique :**

Nacl.....	9g
Eau distillée.....	1000ml

**Composition des milieux des cultures (g/l)**

**Milieu VRBG :**

Extrait de levure .....	3 g
Peptone.....	7 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Sels biliaires.....	1.5 g
Glucose.....	10 g
Rouge neutre.....	0.03 g
Cristal violet.....	0.002 g
Agar.....	12 g

Eau distillé.....1000ml

**Milieu VRBL:**

Extrait de levure .....3 g

Peptone.....7 g

Chlorure de sodium.....5 g

Sels biliaires.....1.5 g

Glucose.....10 g

Rouge neutre.....0.03 g

Cristal violet.....0.002 g

Agar.....15 g

Eau distillé.....1000ml

**Gélose PCA+ :**

Peptone de caséine.....5,00g

Extrait de levure.....2,5 g

Glucose.....1,00 g

Lait écrémé.....1,00g

Agar.....12,5g

Eau distillé.....1000ml

**Milieu CHAPMAN :**

Peptone.....11g

Extrait de viande.....1g

Chlorure de sodium.....75 g

Mannitol.....1g

Rouge de phénol.....0, 0025

Agar-agar.....15g

Eau distillé .....1000ml

**Bouillon au sélénite de cystéine :**

Tryptone.....	5g
Lactose.....	4g
Sélénite de sodium.....	4g
Phosphate disodique.....	10g
Cystine.....	0,01g
Eau distillée.....	1000ml

**Milieu Schubert :**

Tryptophane .....	0,2g
Acide glutamique.....	0,2g
Sulfate magnésium.....	0,7g
Citrate de sodium.....	0,5g
Sulfate d'ammonium .....	0,4g
Chlorure de sodium.....	2g
Peptone.....	10g
Mannitol.....	75g
Phosphate di sodique.....	4g
Phosphate mono sodique.....	6g
Eau distillé.....	1000ml

**Gélose Nutritive :**

Peptone .....	5g
Extrait de viande .....	1g

Extrait de levure .....	2g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar .....	15g
Eau distillée .....	1000 ml

**Gélose TSI :**

Extrait de viande de bœuf.....	03g
Extrait de levure.....	03g
Peptone .....	20g
Chlorure de sodium.....	05g
Citrate ferrique.....	0,3g
Thiosulfate de sodium.....	0,3g
Lactose.....	10g
Glucose.....	01g
Saccharose.....	10g
Rouge de phénol.....	0.05g
Agar.....	12g
Eau distillée.....	1000ml

**Gélose au Citrate de SIMMONS :**

Ammonium dihydrogenophosphate.....	01g
Phosphate dipotassique.....	01g
Chlorure de sodium.....	05g
Citrate de sodium.....	02g
Sulfate de magnésium.....	0,2g

---

Bleu Bromothymol.....	0,08g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml

**Bouillon lactosé au pourpre de bromocresol(BCPL) :**

Peptone.....	5g
Extrait de viande.....	2g
Lactose.....	5g
Pourpre de bromocresol.....	0,0025g

Annexes (2)

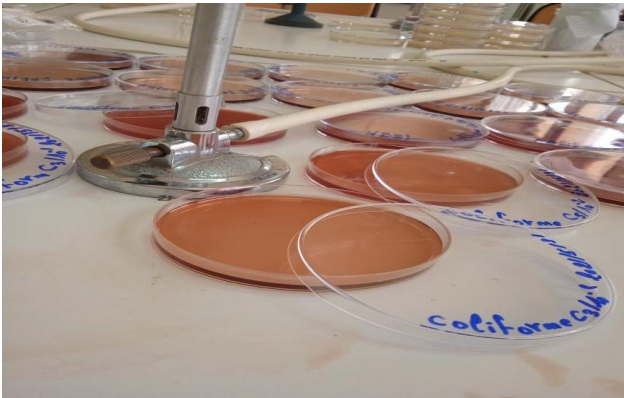


Photo 01 : Milieu VRBL.

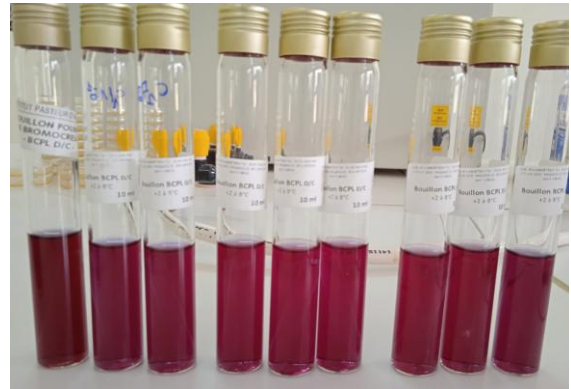


Photo 02 : Bouillon BCPL

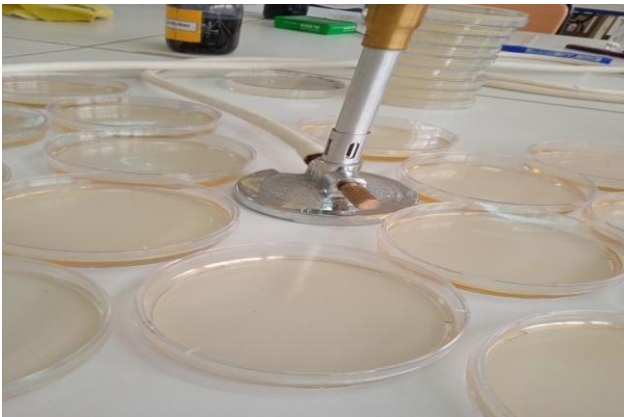


Photo 03 : Milieu GN

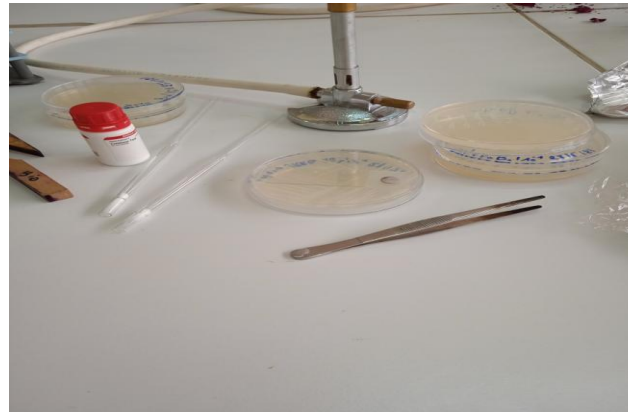


Photo 04 : Test oxydase



Photo05: Milieu Citrate de  
Simmons

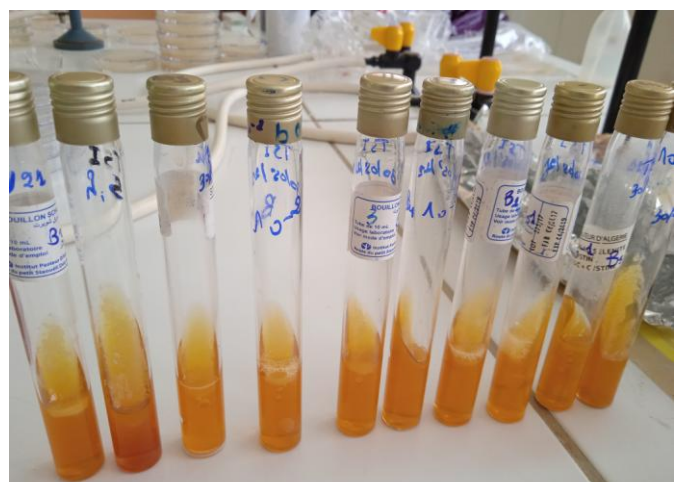


Photo 06 : Milieu TSI

---

### *Annexes(3)*

#### ❖ **Protocole de coloration de Gram :**

##### **Etape 1 : préparation du frottis**

A l'aide d'une pipette stérile on prélève une colonie bactérienne .celle-ci est déposée sur une lame propre qui contient une goutte d'eau physiologie avec étalement en fine couche, on termine par fixer la préparation à la chaleur.

##### **Etape 2 : la coloration**

- Recouvrir le frottis avec le violet de gentiane et laisser agir de 30 secondes à 1 minute.
- Rincer à l'eau pour éliminer l'excédent de colorant.
- Couler sur la lame la solution de lugol et laisser agir de 30 secondes à 1 minute.
- Rincer à l'eau pour éliminer l'excédent de lugol.
- Décolorer le frottis en versant quelques gouttes d'alcool (éthanol à 95°) sur la lame et laisser agir 10à15 sec.
- Rincer à l'eau.
  
- Recolorer par la fuchsine en versant le colorant sur la lame et laisser agir 1 min.
- Rincer à l'eau.
- Sécher la lame entre 2 feuilles de papier.
- Observer au microscope optique grossissement X100 avec une goutte d'huile à immersion.

---

### *Annexes(3)*

#### ❖ **L'examen à l'état frais :**

Déposer sur une lame propre une goutte de bleu de méthylène puis prélever une colonie isolée à l'aide d'une pipette pasteur stérile et la mettre sur la lame, ajouter la lamelle. Observer sous le microscope optique à l'objectif x100.

- **Test d'oxydase :**

Est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries gram négative qui produisent cette enzyme.

- **Technique :**

Déposer sur une lame propre un disque OX et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile. Prélever une partie de la colonie à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile et étaler sur le disque. (DELARRAS C., 2007).

- **Gélose TSI (Triple Sugar Iron) :**

- **Principe :**

La gélose TSI permet l'identification des Entérobactéries. C'est un milieu différentiel qui permet la mise en évidence de la fermentation du glucose, lactose et saccharose, ainsi que la production de gaz et du H<sub>2</sub>S.

- **Technique :**

Prendre une colonie bactérienne à l'aide d'une pipette pasteur ou d'une anse en platine.ensemencer à la surface inclinée par des stries serrées et le culot par piqûre centrale, l'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures. (MAMDOUH et al., 2018).

- **Test sur milieu Citrate de SIMMONS :**

- **Principe :**

Ce milieu permet de savoir si la bactérie utilise le citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

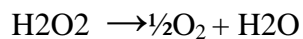
- **Technique :**

Prendre une colonie bactérienne, ensemercer la pente par une strie unique Centrale à l'aide d'une anse de platine ou pipette de pasteur, l'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures ( **MAMDOUH et al., 2018** ) .

- **Test catalase :**

- **Principe :**

La catalase est une enzyme capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène (2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produit par certaines bactéries pendant leur respiration aérobie.



- **Technique :**

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau oxygénée.
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur une colonie isolée et la mettre sur une lame.

## Résumé :

L'objectif de cette étude s'inscrit dans la recherche et d'identification de quelques bactéries pathogènes dans quelques échantillons du fromage traditionnel, où nous avons prélevé trois échantillons de fromages au lait cru (fromage de chèvres, fromage de vaches, klila) préparés dans la wilaya de Laghouat et puis nous avons effectué plusieurs analyses microbiologiques.

Grace aux analyse microbiologiques de ces échantillons, il a été constaté qu'ils contiennent une quantité acceptable de la flore totale aérobie mésophile autant que  $4,94 \times 10^3$  UFC/g pour le klila et  $4,74 \times 10^3$  UFC/g pour le fromage de vache et  $6 \times 10^3$  UFC/g pour le fromage de chèvre ainsi que la présence de coliformes totaux, Entérobactéries, la présence de bactérie E.coli avec un taux inférieure à 0,3UFC/NPP.

Nous avons également noté la présence de *Staphylococcus aureus* en quantité acceptable qui ne dépasse pas les critères fixés par l'arrêté ministériel du 4 octobre 2016 publié dans le journal n° 39, et une absence totale de bactéries pathogènes représentées par les salmonelles. L'absence de facteurs pathogènes indique le respect des règles d'hygiène lors de la fabrication, du transport et du stockage du fromage, et c'est ce que nous avons constaté à travers notre analyse des trois échantillons, ce qui signifie que ce fromage se caractérise par une bonne qualité microbiologique.

Les mots clés : fromage traditionnel, Klila, analyse microbiologique, bactéries pathogènes.

## Abstract :

The aim of this study falls within the research methodology and identification of pathogenic bacteria in some samples of traditional cheese, where we took three samples of cheese made from raw milk (goat cheese, cow cheese, klila) prepared in the state of laghouat. and we conducted several microbiological analyzes on them.

Through the microbiological analyzes of these samples, it was found that they contain an acceptable amount of total aerobic mesophilic flora as much as  $4,94 \times 10^3$  UFC/g for klila and  $4,74 \times 10^3$  UFC/g for cow cheese and  $6 \times 10^3$  UFC/g for goat cheese and also the presence of total coliforms, Enterobacteriaceae, the presence of E.coli bacteria is less than 0,3. we also noted the presence of *Staphylococcus aureus* in an acceptable quantity that did not exceed the criteria set forth in the ministerial decree issued on 04 October 2016 published in journal n°39, and a complete absence of pathogenic bacteria represented by salmonella. The absence of pathogenic factors indicates compliance with hygiene rules during the manufacture, transportation and storage of cheese, and this is what we found through our analysis of the three samples.

Meaning that this cheese is characterized by a good microbiological quality.

## ملخص :

يندرج الهدف من هذه الدراسة ضمن منهجية البحث وتعريف البكتيريا الممرضة في بعض العينات من الجبن التقليدي حيث أخذنا ثلاث عينات من الجبن المصنوع من الحليب الخام ( جبن الماعز, جبن البقر, الكليلية ) المحضر في ولاية الأغواط وبعدها أجرينا عليها عدة تحاليل ميكروبيولوجية.

تبين لنا من خلال التحاليل الميكروبيولوجية لهذه العينات أنها تحتوي على كمية مقبولة من المكروبات الهوائية المحبة للحرارة المعتدلة بقدر  $4.94 \times 10^3$  UFC/g بالنسبة للكليلة و  $4.74 \times 10^3$  UFC/g بالنسبة لجبن البقر و  $6 \times 10^3$  UFC/g بالنسبة لجبن الماعز وكذلك وجود القولونيات الكلية, البكتيريا المعوية, وجود بكتيريا الإشريكية القولونية بمقدار اقل من 0.3 NPP.

كما لاحظنا وجود المكورات العنقودية الذهبية بكمية مقبولة لم تتجاوز المعايير الموضحة في المرسوم الوزاري الصادر في 4 أكتوبر 2016 والمنشور في المجلة رقم 39. وغياب تام للبكتيريا المسببة للأمراض المتمثلة في سالمونيلا.

يدل غياب العوامل الممرضة على الإمتثال لقواعد النظافة أثناء تصنيع ونقل وتخزين الجبن وهذا ما تبين لنا من خلال تحليلنا للعينات الثلاث أي أن هذا الجبن يتميز بنوعية ميكروبيولوجية جيدة

الكلمات المفتاحية : جبن تقليدي, كليلة, تحاليل ميكروبيولوجية, بكتيريا مسببة للأمراض.