



République Algérienne Démocratique et Population

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université de Laghouat Amar Télidji

جامعة عمار تلجي الاغواط

Faculté des sciences et de la nature et de la vie

Département de sciences biologique

Filière biologie

**Mémoire De Fin De Cycle En Vue De l'Obtention Du Diplôme De
Master**

Spécialité microbiologie appliquée

Thème

**Contribution à l'étude de la qualité
microbiologique de certains fromages au lait
cru**

Présenté par :

Melle Sadeki Fatima Zohra

Melle Salmi Mouna

Soutenu publiquement

Devant le jury:

Le: 07/07/2022

M^r MESSAOUDI Omar

M.C.A

Président

M^r BENAMAR Ibrahim

M.A.B

Examineur

M^rDJEBLI Ahmed

M.A.B

Rapporteur



Remerciements


Avant tout nous remercions Allah le tout puissant qui nous a donné la force, le courage, la volonté et la patience pour faire et réaliser ce modeste travail.

Gloire à Allah

Qu'il nous soit permis de remercier tous ceux qui d'une manière ou d'autre, de près de loin, y ont contribué

Nous exprimons nos remerciements à notre encadreur Mr DJEBLIA d'avoir accepté de nous encadrer, et de nous avoir dirigé.

Nous exprimons nos respectueux remerciements aux membres de jury aussi bien pour l'honneur qu'ils ont fait et en acceptant d'évaluer ce travail.






Dédicace

Au nom de l'amour et le respect, je dédié
cette simple contribution à ma très chère mer,
aucune dédicace ne saurait être assez
éloquente pour exprimer ce que vous méritez
pour tous les sacrifices. Votre prière et votre
bénédiction m'ont été d'un grand secours
pour mener à bien mes études

Spéciale dédicace pour mes belle Sarrout
Nisraïne assma dalila





Dédicace

En premier, je dédie ce travail à mon très cher parent. Ceux qui ont toujours été là pour moi quelque soit les circonstance. A ceux qui ont fait de moi ce dont je suis, à ceux qui n'ont jamais faili à leur devoir , et à qui j'espère rendre un jour le millième de ci qu'ils ont fait pour moi et mes sœurs, à la meilleure mère et le meilleur père sur terre, merci maman, merci papa et qu'Allah vous garde pour nous.

Mes sœur : Samira, Noura ikhlas, Aicha.


- Mes frères : Nourdinne, Chmisou.
 - Mes amies :Salsabil, Aychouche, Nesrine.
 - Mes tantes : Fatiha, Wasila.
 - Mes collègues : Asma et Dalila, toutes les filles de ma promotion. A tous ceux que je n'ai pas cités
- 

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	2

Chapitre I synthèse bibliographique

1- Lait.....	4
1-1 Définition.....	4
1-2 Différents composants de lait	4
1-3 Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques.....	4
1-3-1 Caractéristiques organoleptiques.....	4
1-3-2 Caractéristiques physico-chimiques	5
1-4 Caractéristiques microbiologique du lait cru	6
1-4-1 Flore originale	6
1-4-2 Flore de contamination.....	6
1-4-3 Flore d'altération	7
1-4-4 Flore pathogène	7
1-5 Fromage	7
1-5-1 Définition.....	7
1-6 Fabrication de fromages.....	7
1-6-1 Coagulation	7
1-6-2 Egouttage.....	8
1-6-3 Salage	8
1-6-4 Affinage.....	8
1-7 Classification des fromages	9
1-7-1 Fromage à pâtes pressées	9
1-7-2 Fromage à pâtes fraîches	9

1-7-3 Fromage à pâtes fondues	10
1-7-4 Fromage à pâtes persillées.....	10
1-7-5 Fromage à pâtes molles	10
1-8 Les micro-organismes utiles	10
1-8-1 Les bactéries lactiques.....	10
1-8-2 Autres bactéries	10
1-8-3 Levures	10
1-8-4 Moisissure	10
1-9 Micro-organismes responsable d'altération.....	10
1-9-1 Les coliformes	11
1-9-2 Les bactéries butyriques	11
1-9-3 Levures et moisissures	11
1-10 Microorganismes potentiellement pathogènes	11

Chapitre II Matériel et méthodes

2- Cadre de l'étude.....	13
2-1 Situation géographique de Laghouat	13
2-2 Echantillonnage	13
2-3 Matériel et méthodes d'analyses microbiologiques.....	14
2-3-1 Les milieux de culture	14
2-3-2 Les milieux en gélose	14
2-3-3 Les bouillons et Les diluants	14
2-4 Préparation de la suspension mère.....	14
2-5 Préparation des dilutions décimales.....	15
2-6 Recherche et dénombrement des germes.....	15
2-6-1 Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT)	15
2-6-2 Dénombrement des coliformes totaux et fécaux	16
2-6-3 Recherche et dénombrement des entérobactéries.....	17
2-6-4 Recherche et dénombrement des Staphylococcus aureus	17

2-6-5 Recherche des Salmonelles	18
2-6-6 Dénombrement de la flore lactique	19
2-7 Isolement et purification des souches isolées	19
2-8 Conservation des souches	20
2-8-1 Conservation de courte durée	20
2-8-2 Conservation de longue durée	20
2-9 L'identification des isolats.....	20
2-9-1Caractérisation macroscopique.....	20
2-9-2 Caractérisation microscopique	21
2-10 Identification biochimique.....	21
2-10-1Test catalase	21
2-10-2 L'identification par la galerie API 50CHL.....	22

Chapitre III Résultat et discussion

3-Résultat des analyses microbiologiques	25
3-1 Flore mésophile aérobie totale.....	26
3-2 Les coliformes thermo tolérants	27
3-3 Les entérobactéries	28
3-4 Staphylococcus aureus.....	29
3-5 Salmonelle	30
3-6 Dénombrement de la flore lactique.....	31
3-7 Identification des bactéries lactique.....	33
3-7-1 Examen macroscopique.....	33
3-7-2 Examen microscopique	33
3-8 Profil biochimique	34
3-8-1Test catalase	34
3-8-2 API50CHL.....	34
Conclusion	39

Références bibliographique

Annexe

Liste des abréviations

- **C°** : Degrés Celsius
- **EPT**: Eau peptonée tamponnés.
- **TSE** : tryptone sel eau.
- **FTAM** : Flore Totale aérobie mésophile.
- **ISO**: International Organization for Standardization.
- **PCA** : Plate Count Agar.
- **VRBG**: violet Red Bile Glucose Agar.
- **VRBL**: violet Red Bile Lactose Agar.
- **MRS**: Man Rogosa Sharp.
- **M17**: Terzaghi et Sandine, 1975.
- **UFC**: unités formant colonies.

Liste des tableaux

Tableau 01: La composition moyenne du lait des principales femelles laitières (pour 100 g).	4
Tableau 02: Echantillonnage des fromages au lait cru.	13
Tableau 03 : Les résultats des dénombrements en UFC/g.	25
Tableau 04: Les résultats des dénombrements de La flore Lactique en UFC/g.	31
Tableau 05: Les souches obtenus selon l'identification sur la galerie API 50 CHL.	35

Liste des figures

Figure 01 : Schéma général de la fabrication du fromage (Jeantet et al, 2008).	9
Figure 02 : Situation géographique de wilaya de Laghouat. (Publié par Elhachmi.A)	13
Figure 03 : Les échantillons de fromage. (Cité de la Maison Bourourou Lait, 10/05/2021)	14
Figure 04 : préparation de la suspension mère. (Prise par l'auteur)	15
Figure05 : Préparation des dilutions à partir de la suspension mère. (Prise par l'auteur)	15
Figure 06 : dénombrement de la flore mésophile aérobie totale. (Prise par l'auteur)	16
Figure 07 : dénombrement des coliformes. (Prise par l'auteur)	17
Figure 08 : dénombrement des <i>enterobacteries</i> . (Prise par l'auteur)	17
Figure 09 : la culture sur le milieu Chapman. (Prise par l'auteur)	18
Figure 10 : dénombrement des <i>staphylococcus aureus</i> . (Prise par l'auteur)	18
Figure 11 : L'enrichissement de Salmonelle. (Prise par l'auteur)	19
Figure 12 : purification de la flore lactique. (Prise par l'auteur)	20
Figure 13 : l'observation microscopique. (Prise par l'auteur)	21
Figure 14 : galerie API 50 CHL. (Prise par l'auteur)	23
Figure 15 : Variation du nombre de La FTAM. (Prise par l'auteur)	26
Figure 16 : Dénombrement de la FTAM du fromage cru sur le milieu PCA.	27
Figure 17 : Variation du nombre des coliformes Thermotolérants dans les 25 unités de fromage au lait cru. (Prise par l'auteur)	27
Figure 18 : Dénombrement des coliformes sur le milieu VRBL. (Prise par l'auteur)	28
Figure 19 : Variation du nombre des entérobactéries. (Prise par l'auteur)	29
Figure 20 : dénombrement des entérobactéries sur le milieu VRBG. (Prise par l'auteur)	29
Figure 21 : Variation du nombre de Staphylococcus aureus. (Prise par l'auteur)	30
Figure 22 : dénombrement des staphylocoques sur le milieu Chapman. (Prise par l'auteur)	30
Figure 23 : recherche de salmonelle. (Prise par l'auteur)	31
Figure 24 : Variation du nombre de La flore Lactique. (Prise par l'auteur)	33
Figure 25 : Aspect des souches sur gélose MRS et M17. (Prise par l'auteur)	33
Figure26 : Observation au microscope optique de bactérie lactique à l'état frais à	34

l'objectif x100. (Prise par l'auteur)

Figure 27 : Aspect microscopique des coques des bactéries lactique.

34

Introduction

Introduction

Introduction :

Les produits laitiers ont un rôle important dans l'alimentation humaine, l'Algérie est le plus grand consommateur de produits laitiers au niveau maghrébin (Benderouich, 2009).

Le lait est riche en nutriments de base : des protéines de bonne qualité, des glucides, des lipides, des éléments minéraux et des vitamines avec une valeur énergétique de l'ordre de 700kcal/l. (Ellachi et Kelouche, 2017).

Le lait contient des microorganismes, certains d'entre eux des germes responsable de la fermentation (les bactéries lactique) des germes pathogène (salmonelle, sthaphylococcus.) et la flore contaminante (les coliformes, les entérobactéries).

Le groupe le plus important et diversifié de produits laitiers c'est le fromage. Il utilise environ 35% de la production totale mondiale de lait et est disponible dans au moins 1000 variétés (Chamba, 2008).

La production de lait se heurte souvent au problème de gestion de la qualité qui pénalise tant le producteur que les transformateurs. Les conditions d'hygiène au niveau des fermes, le maintien de la chaîne de froid le long du circuit de la production jusqu'à l'arrivée du lait à la laiterie, comportent au tant de source de contamination à maîtriser afin de préserver la qualité hygiénique du lait (Vierling ., 2008).

Également, il arrive que cet aliment soit contaminé en cours de production, ou de manipulation (Panisset et *al*, 2003).

Sa production doit être sévèrement contrôlée en raison des risques éventuels qu'il peut présenter pour la santé humaine (Labioui et *al*, 2009).

La caractérisation des variétés locales de fromage paraît indispensable afin de décrire le produit, de l'analyser et de s'assurer s'il est sain et conforme aux normes hygiéniques, Dans ce contexte Ce travail a pour objectif principal d'apporter une contribution à la caractérisation d'un fromage au lait cru de vache et de chèvre, du point de vue microbiologique.

Notre travail est divisé en deux parties, la première partie, ce n'est qu'une étude bibliographique (Généralités sur le fromage au lait cru, la qualité et les caractéristiques microbiologiques du fromage au lait cru).

La deuxième partie, aborde une étude expérimentale où on a entamé les points suivants :

- Matériel et méthodes utilisés dans ce travail.
- Résultats des analyses microbiologiques.
- Discussion de ces résultats.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

Synthèse bibliographique :

1- Le lait

1-1 Définition :

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus au moins jaunâtre selon la teneur en matière grasse et en bêta carotène, d'odeur peu marquée et au goût douceâtre, il est secrété par les glandes mammaires des femelles mammifères après la naissance du jeune. (Alias, 1975).

1-2 Différents composants de lait :

Le lait contient des nutriments essentiels pour l'être humain : eau, lipides, protéines (principalement de la caséine), acides aminés, vitamines et minéraux. Il contient également des constituants bioactifs comme des enzymes. La composition du lait varie en fonction de l'espèce, de la race, de l'alimentation des animaux et du stade de lactation. Donnons la composition moyenne du lait des principales femelles laitières (pour 100 g).

Tableau 01 : la composition moyenne du lait des principales femelles laitières (pour 100), D'après le vade-mecum du vkhinaire15&Edition ' par M.FONTAINE. Paris-vigot.

Espèce	Eau	Protéines	Graisse	Lactose	Cendre
Vache	87.2	3.5	3.7	4.9	0.72
Chèvre	86.5	3.6	4	5.1	0.82
Berbère	82.7	5.5	6.4	4.7	0.92
Chamelle	87.7	3.5	3.4	4.8	0.71

1-3 Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques :

1-3-1 Caractéristiques organoleptiques :

On dit qu'un lait est de bonne qualité organoleptique quand les caractéristiques (couleur, odeur, saveur, viscosité) sont stables car ces derniers se détériorent au fil du temps, et cela est causé par certains facteurs tel que : la durée de stockage, la température et leur action combinée affectent considérablement les attributs sensoriels totaux.

1-3-2 Caractéristiques physico-chimiques :

pH :

Le pH d'un lait frais se situe entre 6,6 et 6,8 contrairement à l'acidité titrable le pH ne mesure pas la concentration des composés acides mais plutôt la concentration des ions H⁺ en solution. Les valeurs de pH représentent l'état de fraîcheur du lait, plus particulièrement en ce qui concerne sa stabilité, du fait que c'est le pH qui influence la solubilité des protéines, c'est à-dire l'atteinte du point isoélectrique. Un lait ayant une acidité développée importante aura un pH plus bas que 6,6 car l'acide lactique est un acide suffisamment fort pour se dissocier et abaisse le pH d'une valeur mesurable. Deux laits peuvent donc avoir des pH identiques, c'est à-dire être dans le même état de fraîcheur, mais avoir des acidités titrables différentes. Par contre, deux laits peuvent avoir des acidités titrables identiques soit la même concentration de composés acides mais avoir des pH différents (Vignola, 2002).

Acidité du lait :

L'acidité titrable indique le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. Un lait frais a une acidité de titration de 15 à 18°Doronic (°D). Conservé à la température ambiante, il s'acidifie spontanément et progressivement. C'est la raison pour laquelle on distingue l'acidité naturelle, celle qui caractérise le lait frais, d'une acidité développée issue de la transformation du lactose en acide lactique par divers microorganismes (Makhoukh et Nabi, 2017).

Densité

La densité d'un liquide est une grandeur sans dimension définie par le rapport entre la masse d'un volume de ce liquide et la masse du même volume d'eau. Chaque constituant du lait agit sur sa densité. En effet, étant donné que la MG est le seul constituant ayant une densité inférieure à 1, plus un lait a une teneur élevée en MG plus sa densité est faible et plus sa teneur en extrait sec dégraissé (ESD) est élevée plus sa densité est élevée. Le lait de chèvre a une densité de 1,029- 1,039(Kouri, 2019).

Masse volumique

Selon (Vignola, 2002). La masse volumique, le plus souvent exprimée en grammes par millilitre ou en kilogrammes par litre, est une propriété physique le volume d'une solution varie selon la température. Pour diminuer l'effet de la température, on utilise souvent la densité relative. Cette propriété se définit comme suit :

$$DT1/T2 = \frac{m.v \text{ d'une substance à une température}}{m.v \text{ de l'eau à température } T}$$

DT1/T2 = densité relative m.v = masse volumique T= température

Point de congélation

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau pure puisque la présence de solides solubilisés abaisse le point de congélation. Cette propriété physique est mesurée pour déterminer s'il y a addition d'eau au lait. Sa valeur moyenne se situe entre - 0.54 et - 0.55°C, celle-

ci est également la température de congélation du sérum sanguin. On constate de légères fluctuations dues aux saisons, à la race, et la région de production. On a par exemple signalé des variations normales de - 0.530 à - 0.575°C. Le mouillage élève le point de congélation vers 0°C, puisque le nombre de molécules, autres que celles d'eau, et d'ions par litre diminue. D'une manière générale tous les traitements du lait ou les modifications de sa composition qui font varier leurs quantités entraînent un changement du point de congélation (Ghaoues, 2011)

1-4 Caractéristiques microbiologique du lait cru :

Le lait contient un nombre variable de cellules ; celles-ci correspondent à la fois à des constituants normaux comme les globules blancs, mais également à des éléments d'origine exogène que sont la plupart des microorganismes contaminants (Gripon et al, 1975). Les microorganismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais, on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire des virus. De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue, pour elles, un excellent substrat nutritif. Au cours de leur multiplication dans le lait, elles libèrent des gaz (oxygène, hydrogène, gaz carbonique, etc.), des substances aromatiques, de l'acide lactique (responsable de l'acidification en technologie fromagère), diverses substances protéiques, voire des toxines pouvant être responsables de pathologie chez l'homme (Institut de l'élevage, 2009). L'importance et la nature des bactéries contaminants le lait, dépendent, de l'état sanitaire de l'animal, de la nature des fourrages, mais aussi des conditions hygiéniques observées lors de la traite, de la collecte, de la manutention et de la température de conservation du lait (Robinson, 2002). Un lait est considéré comme peu contaminé s'il renferme quelques centaines à quelques milliers de germes par millilitre, un lait fortement pollué peut en contenir plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions par ml (Ramet, 1985).

1-4-1 Flore originale :

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10³ germes/ml), les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (Vignola, 2002). Il s'agit de microcoques, mais aussi streptocoques lactiques et lactobacilles. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation (Guiraud, 1998) et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (Sutherland et Varnam, 2001).

1-4-2 Flore de contamination :

C'est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse (Vignola, 2002). Le niveau de contamination est étroitement dépendant des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées ces manipulations, à savoir l'état de propreté de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (seaux à traire, machines à traire) et, enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves) (FAO, 1995).

1-4-3 Flore d'altération :

Il s'agit essentiellement de : *Acinetobacter*, *Pseudomonas* et *Flavobacterium* qui se développent à une température entre 3 à 7°C (Leveau et Bouix, 1993). et *Listeria monocytogenes* capable de se multiplier aussi à des températures basses (Rosset, 2001).

1-4-4 Flore pathogène :

Des microorganismes peuvent se trouver dans le lait, lorsqu'il est issu d'un animal malade. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infections du pis : comme *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylocoques*, etc... Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale comme : *Brucella*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter sp*, *Mycobacterium bovis* et *M.tuberculosis*, *Bacillus anthraci*, *Coxiella burnetii*, ou de germes de contamination du lait (Prescott et al., 2003).

1-5 Fromages :**1-5-1 Définition :**

Le fromage est un aliment de base, riche en matières grasses, protéines, calcium, et phosphore, à longue conservation (comparée à celle du lait).

Le fromage est un aliment résultant de la fermentation du caillé sous l'action de la présure sur le lait. Le but de l'industrie fromagère est de transformer le lait en un produit d'utilisation prolongée et de goût différent grâce à diverses actions microbiennes et enzymatiques (Leroy et De Vuyst, 2004; Hui, 1992).

1-6 Fabrication de fromage :

La fabrication du fromage comprend les étapes suivant :

1-6-1 Coagulation :

Le lait va passer de l'état liquide à l'état solide par ces points :

La coagulation est l'une des étapes essentielles de la fabrication des fromages. Laisser le lait coaguler grâce à l'action de la présure (enzyme issue de l'estomac de la vache) et de ferments lactiques. La quantité de ferments lactiques peut changer selon le type de fromage souhaité

Au cours de cette coagulation, la caséine* se soude en sorte de gel (caillé-présure) ou en forme de flocon (caillé lactique).

Coagulation par acidification :

L'acidification du lait peut être obtenue, par les produits de fermentation des bactéries acidifiants ou par des composés chimiques d'action acidifiante direct (généralement par acide lactique ou acide chlorhydrique) (Fox *et al.*, 2000). La diminution concomitante du pH a pour effet de faire régresser l'ionisation des fonctions acides des caséines, induisant le déplacement progressif du calcium et du phosphore inorganique de la micelle vers la phase aqueuse. A pH 6,5- 5,2, il y a solubilisation du phosphate de calcium et à pH 5,2- 4,6 le complexe se dissocie, ce qui

induit la désorganisation Synthèse bibliographique 7 Décalcification de la structure de la caséine et une réorganisation des sous unités micellaires (Brule *et al.*, 1997).

Coagulation enzymatique :

Un grand nombre d'enzymes protéolytique d'origines animales, végétale (extrait de cardon, du figuier et d'artichaut) et microbienne (champignon ex : *Rhizomucormiehi*), ont la propriété de coaguler le lait, mais la plus utilisée est la présure constituer d'un mélange d'enzymes qui sont la chymosine et la pepsine (Smaili et Rahouni, 2015).

1-6-2 Egouttage :

Il assure une déshydratation partielle du gel, obtenu par séparation d'une partie du lactosérum. Il peut être spontané ou amélioré, selon le type de fromage fabriqué, ce processus est lié à des Facteurs directs qui correspondent à des traitements de types mécaniques et thermiques, et des facteurs indirects comme l'acidification ou coagulation enzymatique (Ramet, 1987).

1-6-3 Salage :

Les fromages frais ainsi obtenus sont démoulés puis salés, on vérifiée éventuellement que le fromage soit suffisamment égoutté. Ensuite, on sale : soit au sel fin, à la volée, soit par immersion du fromage dans un bain de saumure saturée en sel. Le salage a trois actions directes sur le fromage :

- Il exerce une action antiseptique.
- Il détermine, selon sa répartition dans la pâte et en surface, l'aspect et le goût du fromage.
- Une action de conservation.

1-6-4 Affinage :

L'affinage est l'étape finale. Sa durée varie de quelques jours à quelques mois selon les variétés de fromages (Une maturation biologique).

Dans ce que l'on appelle des caves d'affinage, le fromage mûrit, c'est - à -dire fermente, sous le contrôle de fromagers experts, qui régulent la température et l'humidité des caves. Phase complexe de la fabrication du fromage, elle demande savoir -faire et patience.

Elle exige de l'affineur le bon geste au bon moment, une attention aiguisée, de la patience dans l'atmosphère contrôlée des caves ou des hâloirs. C'est la phase ultime de la fabrication des fromages, c'est aussi la plus complexe. Ces trois étapes sont généralement précédées d'une phase préalable de préparation du lait (FAO, 1995).

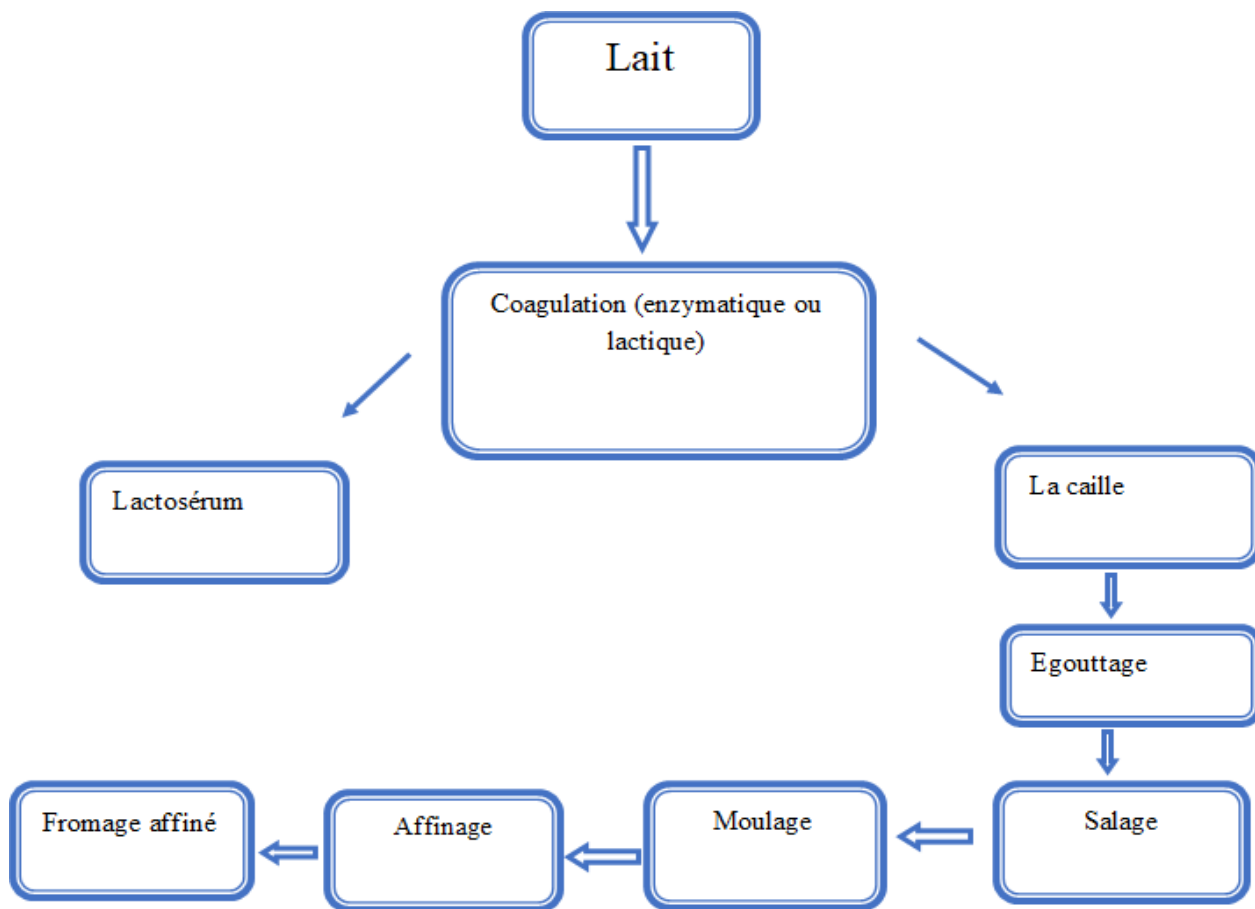


Figure 01 : Schéma général de la fabrication du fromage (Jeantet *et al*, 2008).

1-7 Classification des fromages :

Les fromages sont habituellement distingués selon leur mode de fabrication

1-7-1 Fromage à pâtes pressées:

Le caillé est tranché, brassé, moulé et pressé. Affinage au sel en caves humides. Tomme de Savoie, Cantal, Saint-nectaire, Morbier, Mimolette

1-7-2 Fromage à pâtes fraîches :

Ce sont des fromages très humides (car ils sont peut égouttés), ils sont consommés sans être affinés, additionnés habituellement de sel, d'arômes, ou de sucre, herbe

1-7-3 Fromage à pâtes fondus :

Constitués d'un ou plusieurs fromages fondus auxquels on ajoute du lait, de la crème, des épices ou des aromates. Ils sont ensuite moulés. La Crème de Gruyère, les fromages à tartiner

1-7-4 Fromage à pâtes persillées :

Ce sont des fromages dont la pâte est sillonnée de l'intérieur, elle est verdâtre ou bleuâtre, constituées par les filaments mycéliens de la moisissure *Penicillium glaucum*, le plus connue est le Roquefort

1-7-5 Fromage à pâtes molles :

Fromage à pâte molle C'est le produit d'un caillé mixte. Il présente une pâte molle presque fondante, consécutive à la protéolyse pendant l'affinage. Cette pâte est revêtue de moisissures blanches de *Penicillium candidum*. Exemple : Le camembert

1-8 Les micro-organismes utiles :**1-8-1 Les bactéries lactiques :**

Ce sont des Gram+ (coques ou bacilles), elles forment la flore dominante et tirent leur origine principale de la culture ajoutée en début de fabrication, les bactéries lactiques assure deux fonctions essentielles : - abaisser le pH par la production d'acide lactique et contribuer aux caractéristiques organoleptiques du fromage au cours de la maturation. Les bactéries propioniques Synthèse bibliographique 9 Ce sont des bactéries Gram+, fermentant le lactate pour donner l'acide acétique et propionique, ainsi que le CO₂. Ils participent à la formation du goût et de l'ouverture des fromages à pâte pressée cuite.

1-8-2 Autres bactéries :

Il s'agit de microcoques, les staphylocoques non pathogènes (*S. equorum*, *S. xylosus*, *S. lentus*), les bactéries corynéformes (*Brevibacterium*, *Arthrobacter*, etc.) : Ce sont des Gram+, constituent la flore de surface des fromages affinés. Ils jouent un rôle essentiel dans la formation du goût des fromages, notamment des fromages à croûte lavée.

1-8-3 Levures :

Les levures interviennent dans la désacidification en début d'affinage, permettant ainsi l'implantation ultérieure d'une flore acido-sensible.

1-8-4 Moisissure :

Penicillium camemberti, *Penicillium roqueforti* Ils sont présents à la surface des fromages à pâte molle à croûte fleurie, les moisissures jouent un rôle déterminant dans la formation des caractéristiques sensorielles des fromages

1-9 Micro-organismes responsable d'altération :

Du fait même de leur composition et des conditions de production, les produits laitiers peuvent être contaminés par des microorganismes qui, en se multipliant dans le milieu, provoquant la dégradation de leur constituant, ces dégradations peuvent être dues à des bactéries, levure et moisissures et se traduisant par des défauts de goût, d'odeur, d'aspect et de texture (J. Hermier *et al*, 1992).

1-9-1 Les coliformes :

Elles peuvent être responsables de gonflements précoces dans les fromages, qui est due principalement à la formation d'hydrogène très peu soluble dans le fromage. Lors de leur développement dans le fromage, les bactéries psychotropes (genre *Pseudomonas* principalement) peuvent produire des lipases et protéase extracellulaires. Ces enzymes provoquent des défauts de goût dans les fromages (J. Hermier *et al*, 1992).

1-9-2 Les bactéries butyriques :

Clostridium tyrobutyricum, Elles peuvent se développer dans les fromages à pâte pressé cuite et non cuite) et donner des défauts de goût et d'ouvertures par fermentation butyrique (J. Hermier *et al*, 1992).

1-9-3 Levures et moisissures :

Elle se manifeste dans le fromage (peu dans le lait). Ainsi, *Mucor* est responsable de l'accident dit « poil de chat » principalement en fromage à pâte molle, Il est noté que le regroupement des microorganismes en flore utile et flore d'altération est à nuancer en fonction des technologies considérées. Par exemple, le *Mucor* est utile en Tomme de Savoie, mais nuisible en camembert (Bouvier Eric et Fabienne ,2005.).

1-10 Microorganismes potentiellement pathogènes :

La contamination du lait et des produits laitiers peut être aussi l'œuvre de germes dangereux pour la santé de consommateurs comme *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *E. coli* et *Listeria monocytogenes* (J. Hermier *et al*, 1992).

Chapitre II

Matériel et méthodes

Matériel et Méthodes :

2-Cadre de l'étude :

Ce travail a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie du département de biologie-faculté des sciences- université Amar Téliidji-Laghouat.

2-1 Situation géographique de Laghouat :

Le fromage sur lequel nous avons travaillé est fabriqué localement dans la région de laghouat.

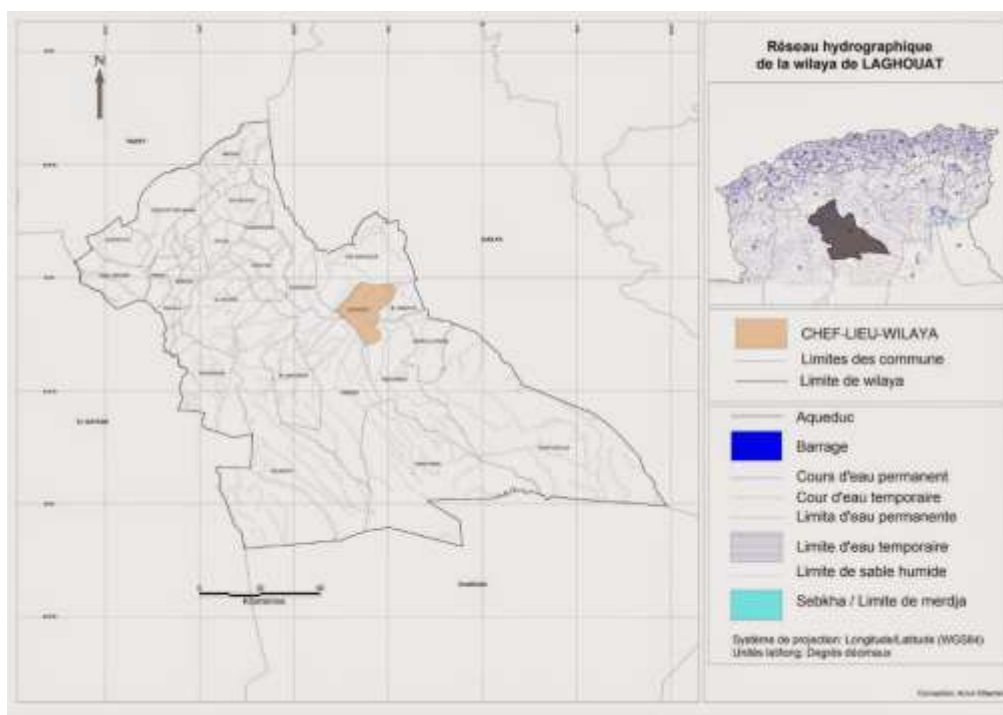


Figure 02 : Situation géographique de wilaya de Laghouat. (Publié par Elhachmi.A)

2-2 Echantillonnage :

Cinq échantillons de fromage au lait cru composé de 5 unités pour chacun, d'une quantité de 100g, sur une période de Trois mois.

Tableau 02: échantillonnage des fromages au lait cru.

Échantillons	Date du prélèvement	Type de lait utilisé dans la fabrication du fromage	Type de fromage utilisé
Echantillon1	22 /02 /2022	Lait de chèvre	Gruelle
Echantillon 2	24/02/2022	Lait de vache	Djben
Echantillon 3	1 /03/2022	Lait de chèvre	Gouda
Echantillon4	7/03/2022	Lait de vache	Gouda
Echantillon5	7/03/2022	Lait de vache	Gouda avec les épices



Figure 03: Les échantillons de fromage. (Cité de la Maison Bourourou Lait, 10/05/2021)

2-3 Matériel et méthodes d'analyses microbiologiques :

2-3-1 Les milieux de culture :

Les milieux de culture utilisés lors de la présente étude sont :

2-3-2 Les milieux en gélose : PCA au lait écrémé, VRBG, VRBL, Chapman, Hektoen, GN, MRS et M17.

2-3-3 Les bouillons et Les diluants : bouillon Rapaport et bouillon MRS, Eau peptonée tamponnée, TSE.

2-4 Préparation de la suspension mère :

La méthode ISO 6887-1:2017 définit des règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions réalisées en aérobiose, en vue des examens microbiologiques des produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale. (ISO)

Prendre 10g de fromage dans des conditions aseptique devant le bec bunsen et la mettre dans 90ml de diluant TSE et homogénéiser la solution. Cette première dilution est considérée comme suspension mère.



Figure 04: préparation de la suspension mère. (Prise par l'auteur)

2-5 Préparation des dilutions décimales :

Pour obtenir la dilution 10^{-2} , prélever 1 ml de la suspension mère et l'introduire dans un tube contenant 9ml de TSE en respectant l'asepsie puis suivie d'une agitation. Pour la 10^{-3} , on introduit aseptiquement 1ml de la solution 10^{-2} dans un tube contenant 9ml de TSE avec une homogénéisation, et ainsi de suite pour les autres dilutions jusqu'à l'obtention du nombre de dilutions voulues.

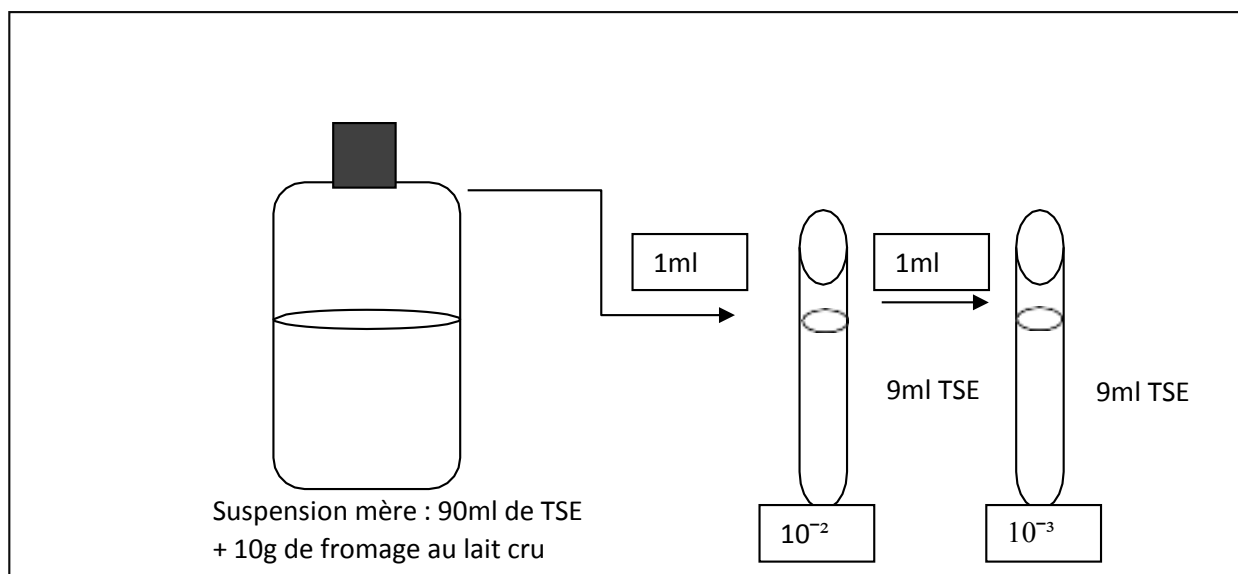


Figure05 : Préparation des dilutions à partir de la suspension mère. (Prise par l'auteur)

2-6 Recherche et dénombrement des germes :

2-6-1 Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT) :

Cette flore appelée aussi flore aérobie mésophile totale (FAMT). C'est un bon indicateur de la qualité microbiologique générale d'un aliment.

La méthode d'ISO 4833 spécifie une méthode de dénombrement des micro-organismes.

À partir de la suspension mère à analyser ou ses dilutions, porter aseptiquement 1 ml dans un boites de Pétri vides, Compléter ensuite avec gélose PCA au lait écrémé fondue puis refroidie, Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 », Laisser solidifier les boites sur paillasse, L'incubation se fait à 30°C pendant 72 heures. (ISO)

Lecture :

Après la période d'incubation, les colonies ayant poussé en masse dans les boites de pétrie sont comptées à l'aide du compteur de colonies.



Figure 06: dénombrement de la flore mésophile aérobie totale. (Prise par l'auteur)

2-6-2 Dénombrement des coliformes thermotolérants :

Les coliformes sont des indicateurs de contamination d'origine fécale et d'une mauvaise qualité hygiénique du produit.

Selon la Norme NF V08-060, Nous avons dénombré les coliformes thermotolérants sur milieu Gélose V.R.B.L par un ensemencement en masse de 1ml de chaque dilution, puis incubées à 44°C pendant 24heure.

Lecture :

Dénombrer les colonies de couleur rouge et d'un diamètre supérieur à 0.5mm.

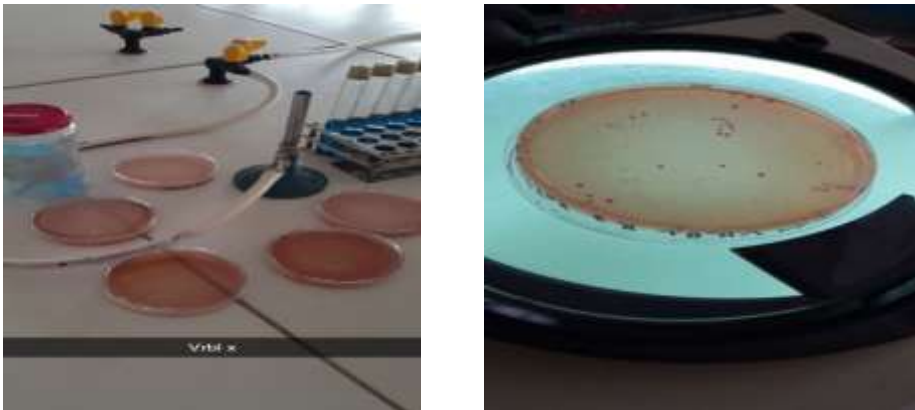


Figure 07: dénombrement des coliformes. (Prise par l'auteur)

2-6-3 Recherche et dénombrement des entérobactéries :

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactérie ayant une forte similitude.

L'ISO 21528-2 spécifie une méthode pour le dénombrement des *Enterobacteriaceae*

Après la préparation de milieu VRBG solide que on le stérilisé avant, le dénombrement s'effectue sur 1ml de chacune dilutions dans les boîtes de pétrie, ensuite on ajoute le milieu VRBG maintenu à l'état liquide avec la technique de l'ensemencement en masse. Après la solidification l'incubation est effectué à 30°C pendant 24 h. (ISO)

Lecture :

Après la période d'incubation, on fait un dénombrement de toutes les colonies violettes.

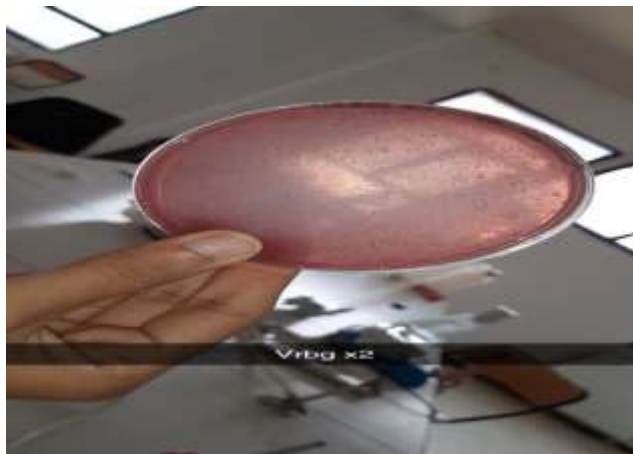


Figure 08: dénombrement des *enterobacteries*. (Prise par l'auteur)

2-6-4 Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus est un coccus anaérobie facultatif à Gram positif, qui apparaît sous forme de grappes ressemblant à du raisin lorsqu'il est observé au microscope et qui présente de grandes colonies rondes, jaune doré, souvent avec hémolyse, lorsqu'il est cultivé sur des plaques de

gélose au sang. L'aspect doré est la racine étymologique du nom de la bactérie "doré" en latin. *Staphylococcus aureus* est catalase-positif (ce qui signifie qu'elle peut produire l'enzyme, la catalase (Yves et Michel, 2009).

Sur milieu Chapman gélosé à l'aide d'un râteau stérile on fait l'étalement de 0.1 ml de chaque dilution, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.



Figure 09: la culture sur le milieu Chapman. (Prise par l'auteur)

Lecture :

Après la croissance des colonies jaunes (dorées) on fait le dénombrement.

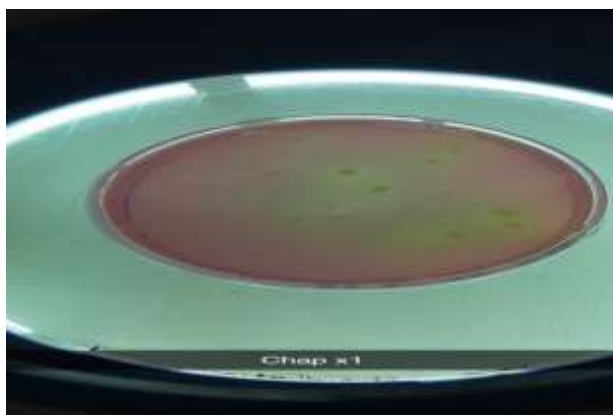


Figure 10: dénombrement des *staphylococcus aureus*. (Prise par l'auteur)

2-6-5 Recherche des Salmonelles :

Salmonella est une bactérie mésophile qui possède les caractéristiques communes aux *enterobacteriaceae* (Korsak et al., 2004)

Selon la Norme **ISO6579**, nous suivons les quatre étapes ci-dessous :

- Le pré-enrichissement
- L'enrichissement

- L'isolement
- L'identification

Le pré-enrichissement :

Introduire 25g de fromage dans 225ml d'eau peptonée tamponnée préalablement stérilisée.

La préparation est homogénéisée puis incubée à 37°C pendant 18 h.

L'enrichissement :

Dans un tube à essai stérile on met 10 ml de bouillon Rappaport et puis on ajoute 0.1 ml de la suspension de pré-enrichissement, porté le tube dans l'incubateur de 37°C laisse le 18 h.

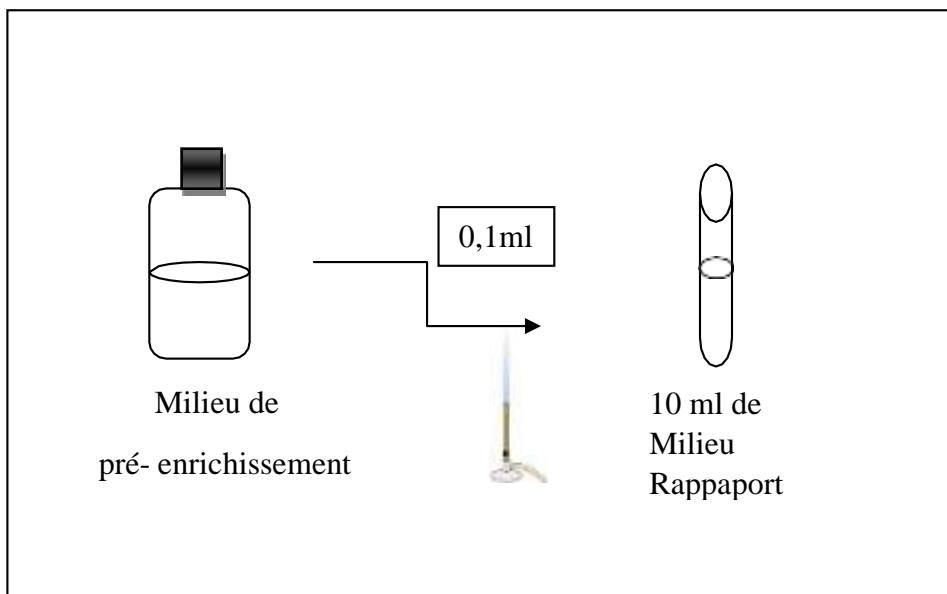


Figure 11 : L'enrichissement de Salmonelle. (Prise par l'auteur)

L'isolement en surface :

C'est après que l'isolement se fait sur la gélose Hektoen déjà coulée dans les boîtes de pétri et bien sèche. Les boîtes sontensemencées par stries à partir des tubes du bouillon Rappaport. Elles sont incubées pour 24 heures à 37°C. Les colonies caractéristique sont prélevées etensemencées sur le GN.

2-6-6 Dénombrement de la flore lactique :

Les bactéries lactiques sont des bactéries exigeantes. Pour compter, isoler, et purifier ces dernières, on a utilisé les milieux ; MRS liquide, MRS solide, et milieu M17.

On cultive les bactéries dans des boîtes de pétrie par étalement de 0.1 ml de chaque dilution à l'aide d'un râteau. Pour le milieu M17et MRS, incubé à 30°C pendant 24à48h.

2-7 Isolement et Purification des souches isolées :

Pour purifier des souches, on les a repiqués sur gélose MRS et M17 par la technique des quadrants, l'incubation est faite à 30°C pendant 48 à72 h.

Après la croissance des colonies sur milieu MRS, on fait le choix sur les souches ayant différentes caractéristiques phénotypiques, et on les a repiqués sur bouillon MRS. Tous les tubes présentant un trouble sur le bouillon de MRS sont repiqués à l'aide d'une pipette Pasteur dans les boîtes de milieu de MRS. L'incubation se fait à 30°C pendant 24h à 72 heures.

On purifie à partir des colonies blanches sur le milieu M17 et on ensemence sur milieu M17 en surface. L'incubation s'effectue à 30°C pendant 24h à 48h.

Et nous répétons le processus de purification jusqu'à ce que nous obtenions des souches pures.



Figure 12: Purification de la flore lactique. (Prise par l'auteur)

Lecture :

A l'aide d'un compteur, on compte toutes les colonies apparentes dans les boîtes de pétries.

2-8 Conservation des souches :

2-8-1 Conservation de courte durée :

On fait la culture des souches pures sur gélose MRS et M17 inclinées dans des tubes pendant 48h à 30°C, après incubation, la conservation se fait à 4°C pour une durée de quelques semaines, le renouvellement du repiquage est périodique.

2-9 L'identification des isolats :

2-9-1 Caractérisation macroscopique :

L'observation à l'œil nu permet de décrire l'aspect ou bien les caractères morphologiques des colonies (la forme, taille, pigmentation, contour, viscosité....)

2-9-2 Caractérisation microscopique :

Une caractéristique taxonomique importante des bactéries est leur réponse à la coloration de Gram. La propriété de la coloration de Gram apparaît comme étant fondamentale, depuis que la réaction de Gram coïncide avec de nombreuses autres propriétés morphologiques dans les différentes formes phylogénétiques (Benayeche et Guenifi, 2021).

Le violet de gentiane colore les composés cytoplasmiques, tandis que le lugol fixe la coloration interne. Les bactéries qui se décolorent à l'alcool (ou au mélange alcool-acétone) sont dites Gram « négatives » (Gram-). Mince et lipophile, leur paroi de peptidoglycane laisse passer l'alcool qui solubilise le colorant. Les bactéries Gram - positives (Gram+) ont une paroi plus épaisse, imperméable à l'alcool elles restent colorées en violet. La dernière étape permet de donner une légère couleur rose aux bactéries Gram- afin de visualiser au microscope (Benayeche et Guenifi, 2021).

Cette coloration permet de caractériser la paroi des bactéries et, de manière corrélative, de les classer en fonction de leurs propriétés.

Les principales étapes du protocole sont :

- La réalisation d'un frottis sur lame de verre, fixé à l'alcool pendant 5 min, puis rinçage à l'eau déminéralisée
- La coloration du frottis : par le violet de gentiane pendant 30s puis rinçage à l'eau déminéralisée.
- Mordançage fixation au lugol (solution lodo-iodurée) pendant 20s.
- Décoloration rapide à l'alcool (ou alcool + acétone) pendant (5 à 10 s)
- Recoloration à la safranine ou à la fuchsine pendant 30 s à 1 min, puis rinçage à l'eau déminéralisée et séchage de la lame sur plaque chauffante.

Les bactéries Gram positives et catalase négatives sont présumées des bactéries lactiques.

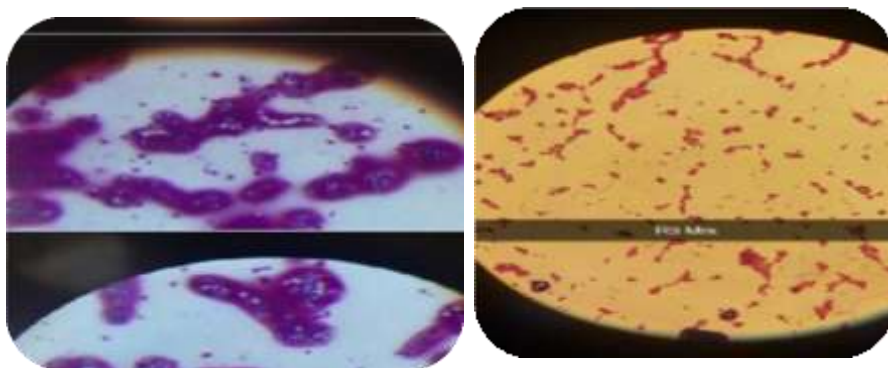


Figure 13: l'observation microscopique. (Prise par l'auteur)

2-10 Identification biochimique :

2-10-1 Test catalase :

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène. L'activité catalytique consiste à prélever une colonie sur gélose MRS ou M17 et dissociée dans une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) à 10 Volumes; l'apparition de bulles révélant le dégagement d'oxygène (Denis et al)

2-10-2 L'identification par la galerie API 50CHL :

Les galeries API 50 CHL (Biomérieux, REF 50 300, France) permettent une identification des bactéries lactiques au niveau de l'espèce et même parfois de la sous-espèce sur la base de la fermentation de 49 sucres différents.

La galerie API 50 CHL est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Préparation des galeries :

Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.

- Préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle)
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte
- Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Sortir les bandes de leur emballage, séparer en deux les bandes 0-19 et 20-39 et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation.
- Compléter la galerie avec la bande 40- 49

Préparation de l'inoculum :

- Cultiver les bactéries sur un milieu adapté à sa croissance,
- Préparer l'inoculum dans le milieu de l'API 50 CHL.

Inoculation des galeries :

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :

- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.
- Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.
- Lorsque les tubes doivent être inoculés, les cupules sont remplies avec de l'huile de paraffine stérile.
- Incuber les galeries à la température optimum de croissance de bactéries étudiées.

Durant la période d'incubation, la fermentation des sucres est indiquée par une couleur jaune exceptée pour l'esculine (brun foncé). Les résultats sont lus à 24 h et vérifiés après 48 h d'incubation.

L'interprétation des résultats peut se faire par le Web (UPBM le Lab) pour identifier les bactéries lactiques.



Figure 14: galerie API 50 CHL. (Prise par l'auteur)

Chapitre III

Résultats et discussion

3-Résultat des analyses microbiologiques :

Les résultats d'analyse microbiologique du fromage au lait cru de chèvre et lait cru de vache du 5 échantillons sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 03: les résultats des dénombrements en UFC/g.

TYPE DE FLORE	LES UNITÉS	FTAM	COLIFORMES THERMO TOLÉRANTS	ENTÉROBACTÉRIES	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	SALMONELLA
ECHS						
ECH 1	A1	3×10^3	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
	A2	3×10^3	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
	A3	3×10^3	4×10^2	1.3×10^3	< 10	Présence présumée
	A4	$5,5 \times 10^2$	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
	A5	3×10^3	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
ECH 2	B1	3×10^3	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
	B2	3×10^3	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
	B3	3×10^3	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
	B4	3×10^3	< 10	< 10	$1,2 \times 10^2$	Présence présumée
	B5	3×10^3	< 10	< 10	3×10	Présence présumée
ECH 3	C1	$8,5 \times 10^2$	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
	C2	3×10^3	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
	C3	3×10^3	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
	C4	$2,2 \times 10^2$	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
	C5	3×10^3	< 10	< 10	< 10	Présence présumée
ECH 4	D1	$2,2 \times 10^2$	< 10	< 10	$2,2 \times 10^2$	Présence présumée
	D2	$5,5 \times 10^2$	< 10	< 10	$5,5 \times 10^2$	Présence présumée
	D3	$5,6 \times 10^2$	< 10	< 10	$5,6 \times 10^2$	Présence présumée
	D4		< 10	< 10		Présence présumée
	D5	5×10^2	< 10	< 10	5×10	Présence présumée
ECH	E1	3×10^3	< 10	< 10	1×10	Présence présumée
	E2	3×10^3	< 10	< 10	< 10	Présence présumée

E3	1,28×10 ³	< 10	< 10	2x10	Présence presume
E4	3× 10 ³	< 10	< 10	11x10	Présence presume
E5	3× 10 ³	< 10	< 10	2x10	Présence presume

3-1 Flore mésophile aérobie totale :

La qualité microbiologique générale d’un produit naturel peut être reflétée par le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale, (Guiraud, 1998).

La flore aérobie mésophile totale de la quasi-totalité des échantillons analysés présentent une charge en microorganismes de la flore totale qui a révélé des valeurs supérieures à 10³ UFC/g.

Les valeurs du dénombrement de la flore mésophile aérobie totale s’accordent par rapport aux résultats reportés par (Leksir et Chemmam 2015), où un fromage traditionnel “klila” de l’Est de l’Algérie qui n’ont pas dépassé 9,80 x 10³ UFC/g.

Les valeurs observées sont s’accordent par rapport aux résultats reportés par (Hamama et Bayi, 1991), où les fromages traditionnels marocains possèdent des nombres dépassant 10⁸ UFC/g

La charge microbienne élevée des échantillons reflètent le non-respect des bonnes pratiques d’hygiène et de fabrication (BPH), cette flore n'est pas pathogène car elle est constituée de la flore naturelle des matières premières (Jeantet *et al.*, 2006).

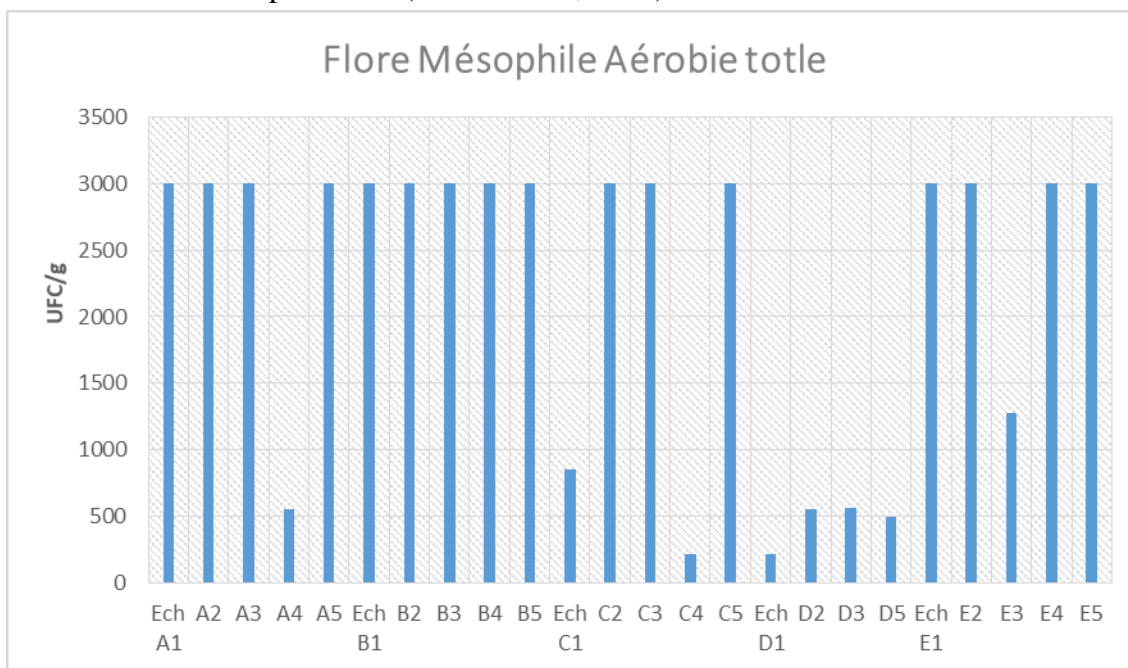


Figure 15 : Variation du nombre de La FTAM. (Prise par l’auteur)



Figure16: Dénombrement de la FTAM sur le milieu PCA au lait crémée. (Prise par l’auteur)

3-2 Les coliformes Thermotolérants :

L’estimation des coliformes thermotolérants permet d’apprécier le risque de présence de germes pathogènes.

On a enregistré une faible charge <math><10\text{ UFC/g}</math> dans la totalité des échantillons, cependant, l’unité A3 a donné une valeur de et al., 2007), où la klila et le jben ayant des charges de

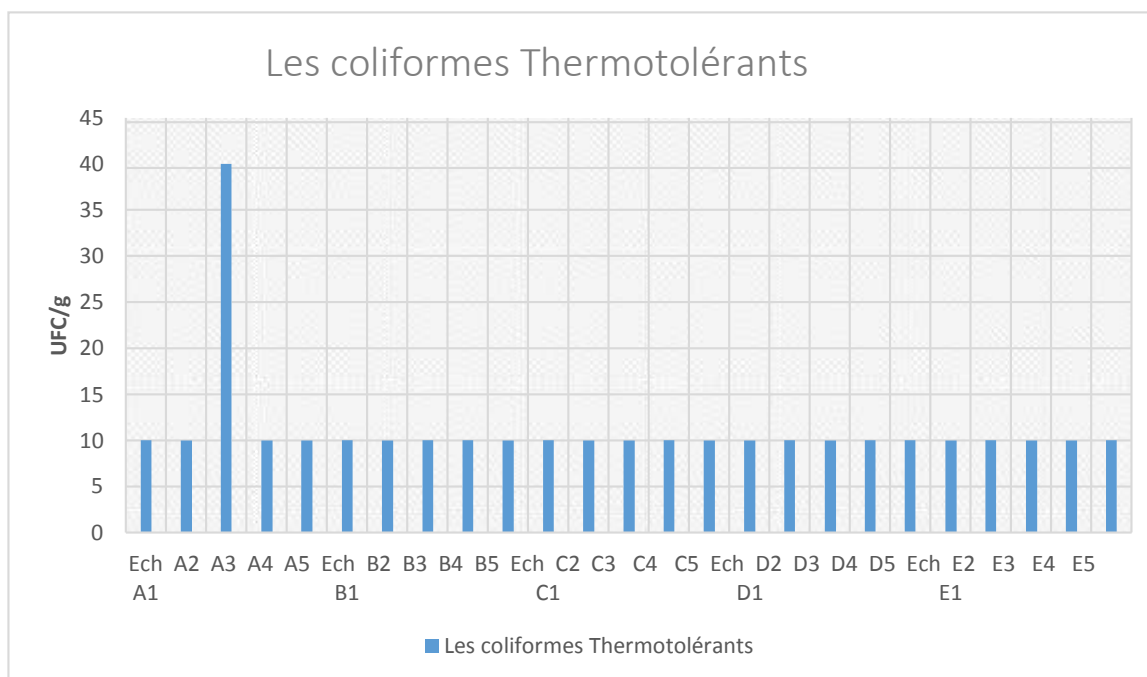


Figure 17: Variation du nombre des coliformes Thermotolérants dans les 25 unités de fromage au lait cru. (Prise par l’auteur)

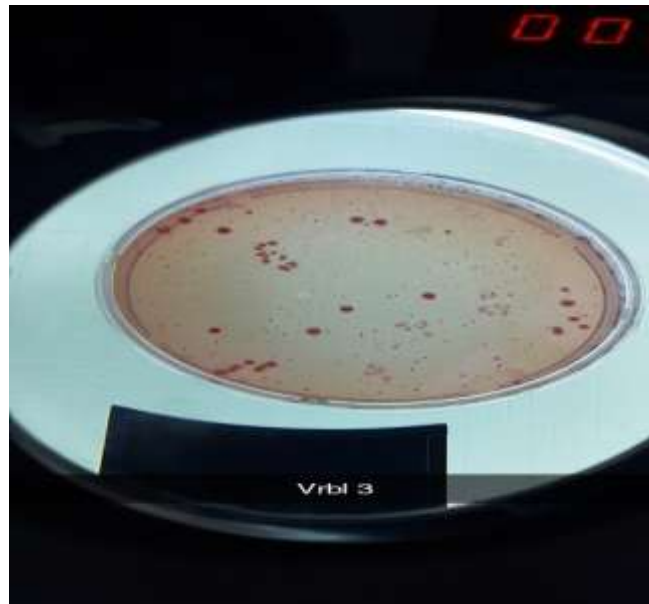


Figure 18 : Dénombrement des coliformes sur le milieu VRBL. (Prise par l'auteur)

3-3 Les entérobactéries :

Le dénombrement des entérobactéries permet la mise en évidence d'une contamination d'origine fécale (Devauchelle, 1981). Ainsi elles sont même un facteur de mauvaise conservation ou d'accidents de fabrication (Guiraud et Galzy, 1980).

Les résultats de dénombrement montrent qu'il y'a une faible charge <10 UFC/g, le plus haut moyen est dans l'unité A3 1.3×10^2 UFC/g.

Ces résultats sont en contradiction avec les valeurs rapportées par (Menassel, 2019) Les Entérobactéries sont présentes dans les échantillons du j'ben, avec taux très important varie $5,1 \times 10^5$ UFC /g.

Cependant la famille des Entérobactéries renferme des microorganismes les plus pathogènes, ils sont souvent rencontrés dans les aliments (chaves-Lopez *et al.*, 2006 ; Fulya, 2011).

Les Entérobactéries peuvent être à l'origine des IMI (infections intramammaires) mais avec des taux faibles (Bergonier *et al.*, 2003). Ces résultats peuvent être reliés à une série de facteurs, y compris le manque d'hygiène dans les fermes (Muehlherr *et al.*, 2003).

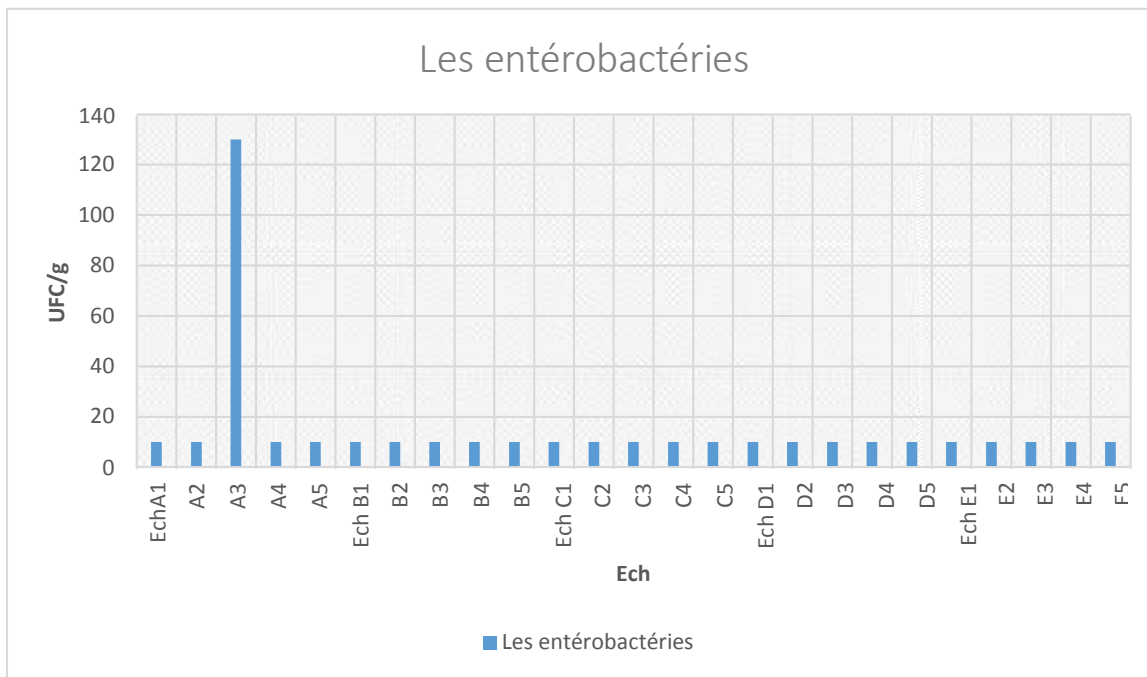


Figure 19 : Variation du nombre des entérobactéries. (Prise par l'auteur)



Figure 20 : dénombrement des entérobactéries sur le milieu VRBG. (Prise par l'auteur)

3-4 *Staphylococcus aureus* :

La contamination par *Staphylococcus aureus* peut être d'origine humaine lors de la préparation de l'aliment. Dans ce cas, les souches de *Staphylococcus aureus* peuvent provenir d'un portage sain sur la peau et les muqueuses, ou d'infection staphylococcique. (Multon; 1991).

Nous avons remarqué l'absence des staphylocoques dorés dans (Ech1, Ech3). Mais dans les autres échantillons le dénombrement a révélé la présence des colonies de couleur jaunes de 1 à 2 mm de diamètre, pour l'échantillon 4, l'unité D3 la valeur maximale $5,6 \times 10^2$ UFC/g. Selon

(JORA.2017). La norme concernant le *S.aureus* est l'absence du germe. Alors nos résultats (Echantillons 1 et 3) conforment aux normes.

Les résultats des échantillons 2, 4 et 5 ne s'accordent pas avec ceux de (GHENEM.M *et al.*, 2017) qui ont constaté une absence totale des *S.aureus*.

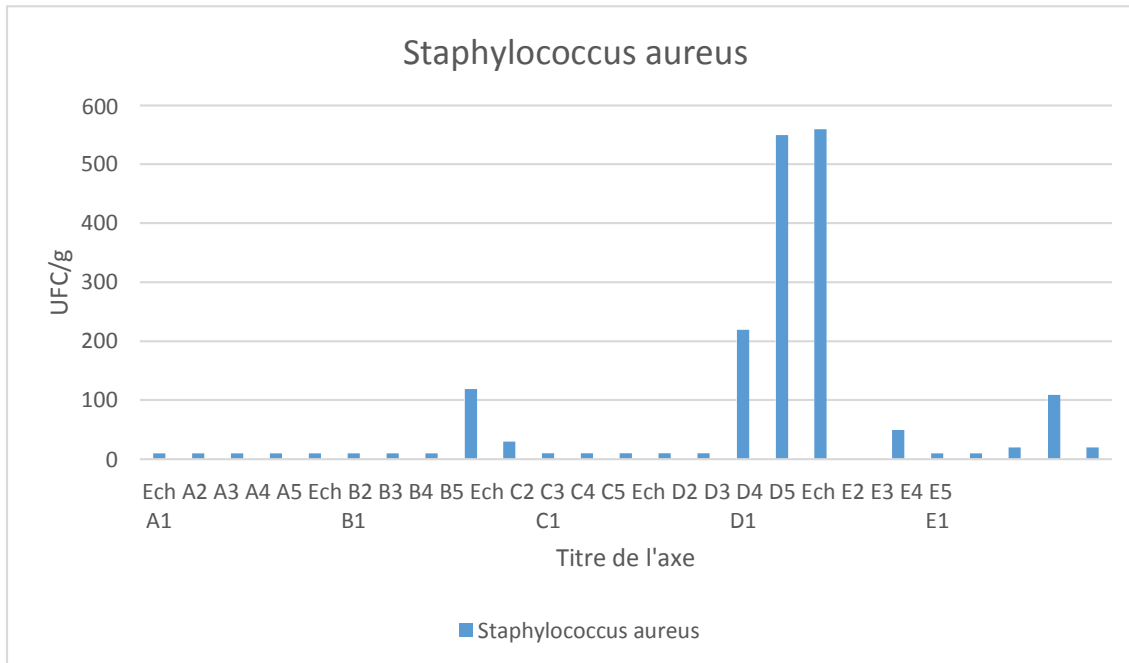


Figure 21 : Variation du nombre de Staphylococcus aureus. (Prise par l'auteur)

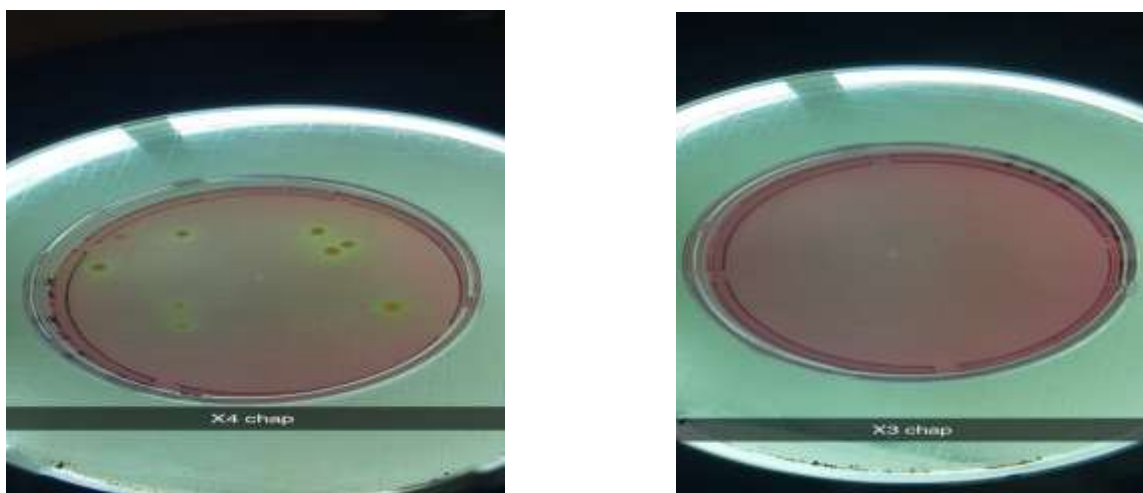


Figure 22: dénombrement des staphylocoques sur le milieu Chapman. (Prise par l'auteur)

3-5 Salmonelle :

Les Salmonelles sont considérées comme des pathogènes majeurs et font partie des critères microbiologiques de surveillance des produits laitiers au lait cru en raison de la gravité des symptômes dont elles peuvent être responsables (Guy, 2006).

Il faut avoir une absence totale de Salmonelles dans le fromage, car la présence de ces derniers constitue une menace qui peut provoquer différentes maladies et nuire à la santé du consommateur (Dehove, 1989).

Les flacons d'eau peptonée tamponnée ont présenté un trouble, donc l'isolement dans le milieu Hectoen a été effectué.

Selon (JORA ,2017), la norme concernant les salmonelles est l'absence totale de ce germe dans 25 g de produit. Alors les résultats sont non conformes.

Ces résultats ne s'accordent pas avec ceux de (GHENEM.M *et al.*,2017) qui a trouvé une absence totale des salmonelles.

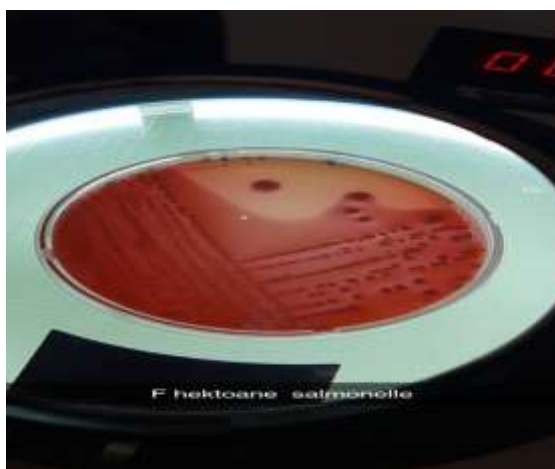


Figure 23: recherche de salmonelle. (Prise par l'auteur)

3-6 Dénombrement de La flore Lactique :

Tableau 04: les résultats des dénombrements de La flore Lactique en UFC/g.

Echantillonnages	Les unites	MRS	M17
Ech 1	A1	3×10^5	3×10^5
	A2	$3,2 \times 10^4$	3×10^5
	A3	$2,49 \times 10^5$	3×10^5
	A4	3×10^5	3×10^5
	A5	$1,5 \times 10^5$	3×10^5
Ech 2	B1	$3,4 \times 10^4$	3×10^5

	B2	3×10^5	3×10^5
	B3	3×10^5	3×10^5
	B4	3×10^5	3×10^5
	B5	3×10^5	3×10^5
<i>Ech 3</i>	C1	3×10^5	$3,4 \times 10^4$
	C2	3×10^5	3×10^5
	C3	3×10^5	3×10^5
	C4	3×10^5	3×10^5
	C5	3×10^5	3×10^5
	D1	3×10^5	3×10^5
<i>Ech 4</i>	D2	3×10^5	3×10^5
	D3	3×10^5	3×10^5
	D4	3×10^5	3×10^5
	D5	3×10^5	3×10^5
	E1	3×10^5	3×10^5
<i>Ech 5</i>	E2	3×10^5	3×10^5
	E3	3×10^5	3×10^5
	E4	3×10^5	3×10^5
	E5	3×10^5	3×10^5

Le tableau révèle que les bactéries lactique sont répandues dans tous les fromages analysés avec des niveaux élevés. Les valeurs moyenne supérieurs à 10^5 UFC/g.

Ces résultats sont inférieurs à ceux enregistrés par (Hamama, 1997).

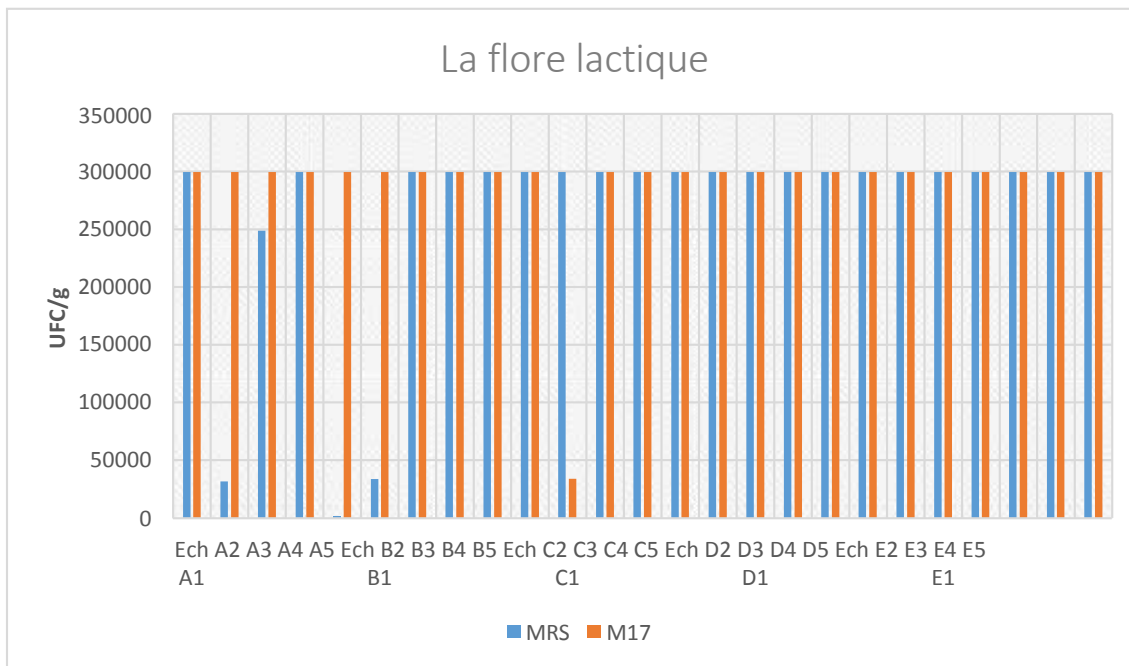


Figure 24 : Variation du nombre de La flore Lactique. (Prise par l’auteur)

3-7 Identification des bactéries lactique :

3-7-1 Examen macroscopique :

On a observé à l’œil nu sur le milieu solide MRS ou M17 des colonies circulaires de couleur blanche, d’aspect crémeux, bombée de 1 à 3 mm de diamètre.

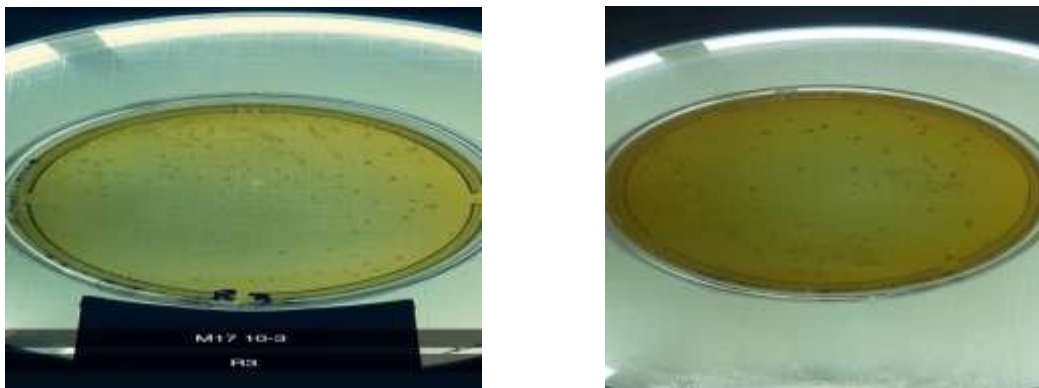


Figure25: Aspect des souches sur gélose MRS et M17. (Prise par l’auteur)

3-7-2 Examen microscopique :

Les résultats microscopiques indiquent que toutes les souches sont des Gram positif, et se présentent sous forme de cocci en chainettes et de bacille.



Figure26: Observation au microscope optique de bactérie lactique à l'état frais à l'objectif x100. (Prise par l'auteur)



Figure27: Aspect microscopique des coques des bactéries lactique. (Prise par l'auteur)

3-8 Profil biochimique :






3-8-1 Test catalase :

Les conséquences de ce test indique que toutes les souches sont des catalase négative.

3-8-2 API50CHL :

Le milieu API 50 CHL est destiné à l'identification du genre *Lactobacillus* et germes apparentés. Il est prêt à l'emploi et permet l'étude de la fermentation des 49 sucre fermentescibles.

Tableau 05: Les souches obtenus selon l'identification sur la galerie API 50 CHL.

Unités d'échantillonnages	Résultats de la galerie API 50 CHL	Souche obtenu	Pourcentage
D2 I		<i>Lactobacillus brevis 3</i>	100%
D2 II		<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1</i>	90,1 %
A2		<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1</i>	100%
E1		<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	99,9%
B3		<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	52,1%

Ces résultats s'accordent pas avec les souches rapportés par (Belarbi, 2011), qui a trouvé les résultats du profil fermentaire des souches comme suit: *Leuconostoc mesenteroides* subs *mesenteroides* Ln5 et *Lactobacillus plantarum* Lb1 sur la galerie API 50 CHL.

Conclusion

Conclusion

La transformation du lait cru en fromage dépend de plusieurs facteurs : ferments lactiques, paramètres technologiques (conditions de la coagulation, la nature et l'intensité du travail mécanique, la vitesse d'égouttage, les conditions d'affinage...) et spécialement le lait utilisé (composition chimique et microbiologique).

Le but de ce travail a visé la caractérisation microbiologique de certains fromages au lait cru commercialisés dans la ville de Laghouat.

Les résultats des analyses microbiologique montrent que la concentration moyenne de la flore mésophile aérobie totale est très variable avec une augmentation de la charge microbienne en(FMAT) avec une valeur maximale 3×10^3 UFC/g.

La présence des germes pathogènes (*Staphylococcus aureus* et salmonelles) dans certains échantillons du fromages au lait cru prouve une contamination qui peut être due soit à la flore de l'animale, ou bien de la flore de manipulateur.

La flore mésophile totale a atteint une valeur maximale 3×10^3 UFC/g, et pour les entérobactéries $1,3 \times 10^2$ UFC/g de valeur maximale, avec une valeur maximale de 4×10^2 UFC/g pour les coliformes thermotolérants ainsi que une valeur maximale $5,6 \times 10^2$ UFC/g pour les *staphylococcus aureus*, ce qui est inquiétant est la présence présumée des sallmonelles.

Enfin, ces résultats peuvent être très intéressants du point de vue microbiologique.

Perspectives :

Les résultats de la présente étude, ne sont que primordiaux et loin d'être concluants. L'étude mérite d'être compléter par :

Un effectif et un plan d'échantillonnage plus élargi, établait sur plusieurs types des fromage et étalé sur le quatre saisons de l'année. Donc, il est souhaitable, en perspective, de réaliser les parties pratiques suivantes :

- analyses physicochimiques et microbiologiques.
- suivi de la dynamique des équilibres des flores microbiennes au cours de la production.

Références bibliographique

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Alias C. (1975). Science du lait principe des techniques laitières. 3^{ème} édition. Paris, pp : 1-60.

Anonyme, 2014. A propos du lait cru, 68p.

Benayeche M. ,Guenifi C. 2021. Etude comparative des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du lait de vache et de lait de chèvre. Mémoire de Fin de Cycle. Université 8 Mai 1945 Guelma.

Benderouich, B. (2009). La kémariya: un produit du terroir à valoriser, mémoire d'ingénieure, université Kasdi Merbah, Ouargla, Algérie,

Benhedane N, 2011. Qualité microbiologique du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est algérien. Mémoire de fin d'études en science alimentaire. Université Mentouri, Constantine, 83p.

Brulle G., Lenoir J. et Remeuf F., 1997. La micelle de caséine et la coagulation du lait In Le Fromage. Ed., A. Eck, 3^{ème} Ed., Technique et documentation Lavoisier. Paris, 471p.

Chamba J-F. (2008). « Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères ». In Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Corrieu G et Luquet F-M, p.849. Paris : édition TEC et DOC, Lavoisier

Daoudi A, 2006. Qualité d'un fromage locale à base de lait de chèvre. Mémoire de Magistère en Biologie. Université Hassiba Ben-bouali, chef, 148p.

Deforges J., Derens E., Rosset R. et Serrand M., 1999. Maîtrise de la chaîne du froid des produits laitiers réfrigérés. Edition Cemagref Tec et Doc, Paris.

DENIS.F ; PLOY.M.C ; MARTIN.C ; CATTOIR.V.
Bactériologie Médicale Techniques usuelles. 3^{ème} éd. Elsevier Masson.

Ellachi, M. Kelouche H, (2017). Etude comparative des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des différents laits (chamelle, chèvre, brebis, vache), mémoire de master, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie,

FAO. (2017). Le lait et produits laitiers. La composition du lait.

FAO, 2017. La production laitière et les produits laitiers. http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/la-lait-et-les-produits-laitiers/la-composition-du-lait/fr/#.WUD7fus1_IU. 15 mars 2017

FAO. (2007). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine [http://www.fao.org/docrep.T4280F.htm](http://www.fao.org/docrep/T4280F.htm).

FAO, 1995 : Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO Alimentation et nutrition n°28.

Références bibliographiques

- Fox P.P., COGAN T.M. and Mcsweeney P.L., 2000** .Fundamentals ofcheese science .Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc.
- Ghooues, S, (2011)**. Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien,diplôme de Magister, Université Mentouri Canstantine, page : 13.
- Gordon, B., Loisel, W. (1991)**. Dosage des protéines. Dans: Multon J.L., Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agronomiques. Vol 4, 2éme édition, Tee& Doc, Lavoisier, Paris.
- Gripon JC., Desmazeaud MJ., Le Bars D., et Bergère JL., 1975**. Étude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. Influence de la présure commerciale. Le Lait 55.pp: 502-516.
- Guiraud J. et Galzy P. (1980)**. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires.Edition l'usine.
- GUIRAUD J., 1998-** Microbiologie des principaux produits laitiers. Ed. Dunod, Paris, 65p.
- Guy F. I. 2006.**, Elaboration d'un guide méthodologique d'intervention lors de contamination par les salmonelles de produits laitiers au lait cru en zone de productions fromagères AOC du Massif Central. Thèse de doctorat d'état, Université Paul-Sabatier de Toulouse, 175p.
- Hamama, A. and Bayi, M. (1991)** 'Composition and microbiological profile of two Moroccan traditional dairy products: raib and jben', International Journal of Dairy Technology, 44(4),pp. 118–120. doi: 10.1111/j.1471-0307.1991.tb01921.x.
- Institut de l'élevage. 2009.**, Traite des vaches laitière. Matériel. Installation. Entretien. 1ere Edition France Agricole. Produire mieux. Pp : 55-506.
- ISO, 3433 (2002)**. 'Fromages -Détermination de la teneur en matière Grasse- Méthode acidobutyrométrique, International Organization of Standardization.'
- Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P. and Brulé, G. (2008)** Science des aliments :Tech
- J. Hermier, J. Lenoir & F. Weber 1992**. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Edition CEPIL, Paris.nologie des produits alimentaires. Paris
- J.O.R.A : n°39 du 02 juillet (2017)**. Arrêté 04 octobre 2016 fixant les critères microbiologies des denrées alimentaire .

Références bibliographiques

Panisset J.C, Dewailly E et Doucet-Leduc H, (2003). Contamination alimentaire. In : Environnement et santé publique- Fondement et pratique, pp. 369-395.

Vierling É. (2008). Aliments et boissons : Filières et produits 3^{eme} édition .France : Doin, CRDP d'Aquitaine.140p.

kouri, F, (2019). Performance laitières et caractérisation physico-chimique et biochimique du lait de chèvre Bédouine, thèse de doctorat LMD, Université Houari Boumedienne, page :23.

Labioui H., Elmoualdi L., Benzakour A., El yachioui M., Berny E., et Ouhssine M, (2009). Etude physico-chimique et microbiologique du lait cru. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, Vol. 1

Leksir C., et Chemmam M., (2015). Contribution à la caractérisation du klila, un fromage traditionnel de l'Est de l'Algérie, Article in Livestock Research,pp 4-5

Leveau, J. Y. and Bouix, M., (1993). Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel, Sciences et techniques agro-alimentaires.

Leroy, F. and De Vuyst, L., (2004). 'Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry', Trends in Food Science, 15, pp. 67–78.
doi:10.1016/j.tifs.2003.09.004.

Muehlher J. E, Zweifel C, Corti S, Blinco J. E et Stephan R., 2003, Microbiological quality of raw goat's and ewe bulk-tank milk in switzerland, J.Dairy.Sci, 86 :38 49-3856.

Makhoukh, S, Nabi, I, (2017). Effet de la qualité physico-chimique et microbiologique du lait de vache et de chèvre sur le fromage à pâte molle type camembert, mémoire de master, université Mouloud Mammeri de Tizi ouzou, pp 2

Références bibliographiques

MENNANE M., KHEDID K., ZINEDINE A., LAGZOULI M., OUHSSINE M., ELYACHIOUI M., 2007- Microbial Characteristics of Klila and Jben Traditionnal Moroccan Cheese from Raw Cow's Milk. World Journal of Dairy and Food Sciences, 23-27p.

Ramet J.P., 1985., La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Collection FAO Alimentation et nutrition n°48.

Ramet J.P., 1987.La pressure et les enzymes coagulantes. In « lefromage » .Eck A. Ed. Technique et documentation, 58 : 695-842.

Robinson R.K., 2002. Dairy microbiology handbook. The microbiology of milk and milk, products. Third edition. Edition John Wiley and sons, INC. New York. 780p

Smaili S et Rahouni R., 2015Contribution a l'étude de la qualitémicrobiologique et physico- chimique dufromage traditionnel en Algérie« Bouhezza ».Mémoire de Fin de Cycle.Université A. MIRA – Bejaia pp 5, 6, 7.

Vignola, C, (2002). Sciences et Technologie du lait Transformation. Edition PressesInternationales Polytechniques, pages : 28- 29- 30- 89- 90.

Vignola C., (2002). Science et technologie du lait. Canada : Montréal, Ecole polytechniquede Montréal, 603p.

Annexe

Composition des bouillons et des géloses :

Eau peptonée tamponnée

Peptone.....	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogène-orthophosphate disodique Dodécahydraté (Na ₂ HPO ₄ ,12H ₂ O).....	9,0 g
Dihydrogène-orthophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Eau.	1000ml

pH=7,0 ± 0,1.

Eau physiologique

Chlorure de sodium	9g
Eau distillé.....	1000ml

pH=7,0 ± 0,1.

Gélose Hektoen

Protéose-peptone	12 g
Extrait de levure	5,0 g
Chlorure de sodium	5 g
Thiosulfate de sodium	5 g
Sels biliaires	9g
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5g
Salicine.....	2g
Lactose	12g
Saccharose.....	12g
Fuschine acide	0,1g
Bleu de bromothymol	65mg
Gélose	13mg

pH=7 ,6± 0,2.

MRS bouillon

Peptone de caséine.....	10 g/l
Extrait de viande	8,0
Extrait de levure	4,0
D (+) Glucose	20
Di-potassium hydrogénophosphate	2,0
Tween 80	1,0
Di-Ammonium hydrogénocitrate	2,0
Sodium acétate.....	5,0
Magnésium sulfate.....	0,2
Manganèse sulfate... ..	0,04

MRS Agar

Il est utilisé pour le dénombrement de la flore lactique.

Peptone decaséine.....	10
Extrait de viande.....	8,0
Extrait de levure	4,0
D (+) Glucose	20
Di-potassium hydrogénophosphate	2,0
Tween 80	1,0
Di-Ammonium hydrogénocitrate	2,0
Sodium acétate.....	5,0
Magnésium sulfate.....	0,2
Manganèse sulfate... ..	0,04
Agar	14

Milieu M17 :

Composition :

Tryptone	2,50 g
Peptone pepsique de viande	2,50 g

Peptone papaïnique de soja	5,00 g
Extrait autolytique de levure	2,50 g
Extrait de viande	5,00 g
Lactose.....	5,00 g
Glycérophosphate de sodium.....	19,00 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Acide ascorbique.....	0,50 g
Agar agar bactériologique	15,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,1 ± 0,2.

Peptone 3 (hydrolysate papaenique de soja)	5,00 g
Extrait de levure déshydratée	2,50 g
Extrait de viande.....	5,00 g

Milieu de CHAPMAN :

Le milieu de CHAPMAN est un milieu sélectif pour la culture des staphylocoques, mais exceptionnellement d'autres germes peuvent y végéter. Formule en gramme par litre d'eau distillée

:

Peptone Bactériologique	10
Extrait de viande de bœuf	1
Chlorure de sodium.....	75
Mannitol.....	10
Rouge de phénol.....	0,025
Agar.....	15

pH 'final 7,5

Milieu VRBG :

Protéoseptone.....	12g
Extrait de levure.....	3g
Saccharose.....	12g
Lactose.....	12g
Salicine	2g
Citrate de de Fe +3 et d'ammonium	1.5g

Sels biliaires.....	9g
Fuchsine acide	1g
Bleu de bromothymol	0.065mg
Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	5g
Agar	14g

Ph final= 7.6. stérilisation :120°C /20mn

BOUILLON DE RAPPAPORT:

Tryptone.....	2,50 g
Peptone pepsique de viande.....	2,50 g
Peptone papainique de soja	5,00 g
Extrait autolytique de levure	2,50 g
Extrait de viande	5,00 g
Lactose	5,00 g
Glycérophosphate de sodium	19,00 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Acide ascorbique.....	0,50 g
Agar agar bactériologique	15,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,1 ± 0,2.

Milieu VRBL

Peptone pepsique de viande.....	7,0 g
Extrait autolytique de levure	3,0 g
Lactose.....	10,0 g
Sels biliaires	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g

Rouge neutre.....30,0 mg
Cristal violet..... 2,0 mg
Agar agar bactériologique..... 12,0 g
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,4 ± 0,2.

Milieu PCA :

Tryptone5,0 g
Extrait autolytique de levure2,5 g
Glucose1,0 g
Agar agar bactériologique..... 12,0 g
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,0 ± 0,2.

Appareillage :



Figure a : Bec bunzen.



Figure b : verrerie.



Figure c : incubateur



Figure d : Balance.



Figure e : bainmarie.



Figure f : compteur de colonies manuel.



FigureJ :microscope optique.

Colorants et réactifs :
Catalase :

- Eauoxygénée V

Fushine :

- Fushine basique 1g
- Alcool éthylique a90° 10g
- Phénol5g
- Eau distillée.....100g

Lugol :

- Iode 1g
- Iodure de potassium..... 2g
- Eau distillée.....300g

Violet de gentiane :

- Violet de gentiane..... 1g
- Ethanol a 90° 10ml
- Phénol2g
- Eau distillée..... 100ml

الملخص :

ملخص: في إطار تثمين منتجات الألبان التقليدية ، يهدف العمل الحالي مبدأ المساهمة في دراسة الجودة الميكروبيولوجية لجبن الحليب الخام (الماعز و بقرة) في الجزائر في منطقة الأغواط. تضمنت الفحوصات الميكروبيولوجية التي تم إجراؤها عددًا من النباتات الهوائية المتوسطة مجموع يسمى "FTAM" والنباتات اللبنية. المعوية ، القولونيات المقاومة للحرارة ، المكورات العنقودية الذهبية والكشف عن السالمونيلا. هذه الفحوصات متبوعة باختبارات التعرف على بعض العزلات. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مجموع النباتات والنباتات اللبنية سجلت على التوالي ما يصل إلى 3.10^5 و 3.10^3 CFU / ز. أعطت أعداد المعوية قيمًا بين أقل من 10 و $1.3.10^2$ CFU / g. الحد الأقصى لقيمة الأمر $5.6.10^2$ تم اكتشافه في المكورات العنقودية المذهبية ، وكذلك وجود السالمونيلا المفترض.

Summary:

As part of the valorization of traditional dairy products, the main objective of this work is to contribute to the study of the microbiological quality of raw milk cheese (goat and cow) in Algeria in the region of Laghouat.

The microbiological examinations carried out involved counts of the total aerobic mesophilic flora called "FTAM" and of the lactic flora. Enterobacteriaceae, thermotolerant coliforms, staphylococcus aureus and the search for salmonella. These examinations are followed by identification tests on a few isolates.

The results obtained show that the total flora and the lactic flora respectively recorded up to 3.10^3 and 3.10^5 UFC/g. Enterobacteriaceae counts gave values between less than 10 and $1,3.10^2$ UFC/g. A maximum value of the order of $5,6.10^2$ is detected in Staphylococcus aureus, thus a presumed presence of salmonella..

Résumé:

Dans le cadre de la valorisation des produits laitiers traditionnels, le présent travail a pour objectif principal de contribuer à l'étude de la qualité microbiologique du fromage au lait cru (de chèvre et de vache) en Algérie dans la région de Laghouat.

Les examens microbiologiques réalisés ont impliqué des dénombrements de la flore mésophile aérobie totale dite « FTAM » et de la flore lactique. Les entérobactéries, les coliformes thermotolérants, les staphylococcus aureus et la recherche des salmonelles. Ces examens sont suivis par des tests d'identification de quelques isolats.

Les résultats obtenus montrent que la Flore totale et la flore lactique ont enregistré respectivement jusqu'à 3.10^3 et 3.10^5 UFC/g. Les dénombrements des entérobactéries ont donné des valeurs comprises entre moins de 10 et $1,3.10^2$ UFC/g. Une valeur maximale de l'ordre de $5,6.10^2$ est détectée chez les *Staphylococcus aureus*, ainsi une présence présumée des salmonelles.