

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun–Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master académique
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

M^r.Amara Naceur
M^r.Boudaoud Hamid
M^r.Guechaoui Yassine

Thème

Contrôle de la qualité sanitaire du lait fermenté vendu dans des points non contrôlés commune de Tiaret

Soutenu publiquement le

Jury:

Grade

President: M^r. ACEM K.

Pr

Encadrant: M^r. BENBEGUARA M.

MAA

Co-encadrant: M^{me}. MOULAY M.

MCA

Examineur: M^r. ABBES M. A.

MCA

Année universitaire 2021-2022

Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nos remerciements vont également à notre encadrant M^r. BENBEGUARA M. et Co- encadrant M^{me} MOULAY M. pour leur disponibilité, patience gentillesse, soutien, conseils et leur aide dans notre travail. Nous vous adressons nos remerciements les plus chaleureux.

Nous adressons nos remerciements les plus respectueux aux membres du jury M^r. ABBAS M.A. et M^r. ACEM K. pour le grand honneur qu'ils nous ont fait fond en acceptant d'examiner ce mémoire.

.....

Nous remercions l'ingénieur responsable de laboratoire Microbiologique M^{me}. Soualmi k. pour ses encouragements et ses orientations.

Nous remercions toute personne qui a participé à enrichir nos connaissances et de nous avoir guidés durant toute la période du travail
Nous avons grandement apprécié votre soutien et votre implication.



Dédicace

Avec fierté et gratitude, nous dédions ce travail :

A nos très chers et gracieux parents :

Nos pères un grand merci pour votre soutien, pour votre encouragement tout au long de notre scolarité et votre patience.

A nos mères un grand merci pour votre immense amour, votre grande tendresse, votre compréhension et votre dévouement.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction.....1

Partie bibliographique

I. Généralités sur lait3

I.1 Définition3

I.2 Transformation3

I.3 Fermentation lactique.....3

I.4 Définition du lait fermenté acidifié (L'ben)4

I.5 Microbiologie du Lait4

I.5.1 Flore originale du lait5

I.5.2 Flore de contamination.....5

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes.....6

I.1 Objectif du travail6

I.2 Lieu et période d'étude6

I.3 Echantillonnage6

I.4 Transport des échantillons.....6

I.5 Matériel6

I.6 Protocole expérimentale.....7

I.7 Méthodes9

I.7.1 Analyses physico-chimiques9

I.7.1.1 Mesure de la température9

I.7.1.2 Mesures du pH.....9

I.7.1.3 Détermination de l'acidité titrable9

I.7.1.4 Détermination de la densité.....9

I.7.1.5 Détermination des cendres10

I.7.1.6 Détermination de la conductivité.....10

I.7.2 Analyses microbiologiques10

I.7.2.1 Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale à 30°C.....11

I.7.2.2 Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux (en milieu solide).....11

I.7.2.3	Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux	12
a.	Test de présomption.....	12
b.	Test de confirmation.....	12
I.7.2.4	Recherche des Spores Sulfito-réducteur	12
I.7.2.5	Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
I.7.2.6	Recherche de <i>Salmonella</i>	14
a.	Pré-enrichissement.....	14
b.	Enrichissement	15
c.	Isolement	15
d.	Identification	15
II.	Résultats et discussion	15
II.1	Analyses physico-chimiques.....	15
II.1.1	Température.....	16
II.1.2	pH.....	17
II.1.3	Acidité	17
II.1.4	Cendres.....	18
II.1.5	Conductivité	19
II.1.6	Densité	19
II.2	Analyses microbiologiques.....	20
II.2.1	Flore mésophile aérobie totale à 30°C	21
II.2.2	Coliformes totaux	22
II.2.3	Coliformes fécaux.....	22
II.2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
II.2.5	Germes pathogènes (<i>Salmonella</i> , Spores <i>sulfito-réducteurs</i> , Streptocoques fécaux).....	24
	Conclusion.....	26

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

A : Acidité.

AG : Acide gras.

CF: Coliforme fécaux.

CT: Coliforme totaux.

D : Densité.

E01 : Echantillon un.

E02: Echantillon deux.

E03: Echantillon trois.

E04: Echantillon quatre.

E05: Echantillon cinq.

FMAT: Flore Mésophile Aérobie Totale.

H₂SO₄: Acide sulfurique

JORA : Journal Officiel République Algérienne.

JORA : Journal Officielle de la République Algérienne

NaOH: Hydroxyde de sodium.

PCA: Plate Count Agar.

pH: Potential Hydrométrique.

Rothe D/C: Rothe Double Concentration.

Rothe: S/C Rothe Simple Concentration.

SFB : Bouillon au sélénite de sodium.

SM: Solution mère

UFC/ml : Unité Formant de Colonie par millilitre.

V.F : Viande-Foie.

V.R.B.L : Violet Cristal Rouge neutre Bile Lactose.

Liste des tableaux

Tableau 01 : prélèvement des échantillons.....	6
Tableau 02 : les matériels (Appareillages, verreries) et les réactifs utilisés.....	7
Tableau 03 : Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons analysées.	16
Tableau 04 : Résultats des analyses microbiologiques du l’ben traditionnel	20
Tableau 05 : Normes Algériennes des paramètres microbiologiques J.O.A(2017).	21
Tableau 06 : les milieux de cultures utilisés.	28
Tableau 07 : Compositions des milieux VRBG.....	28
Tableau 08 : composition de milieu PCA.....	29
Tableau 09 : Composition de milieu VF.....	29
Tableau 10 : Composition de milieu BP.	26
Tableau 11 : Composition de milieu Eau peptone tamponnée.....	26
Tableau 12 : Composition de milieu SFB.	27
Tableau 13 : Composition de milieu Rothe	27
Tableau 14 : Résultats de la galerie API 20 ^E	28

Liste des Figures

Figure 01: Protocole expérimentale.....	8
Figure 02: Histogramme représentant les valeurs de la température des cinq échantillons analysés.	16
Figure 03: Histogramme représentant les valeurs de pH des cinq échantillons analysés.	17
Figure 04: Histogramme représentant les valeurs de l'acidité des cinq échantillons analysés	17
Figure 05: Histogramme représentant les valeurs des cendres des cinq échantillons étudiés.	18
Figure 06: Histogramme représentant les valeurs de la conductivité des cinq échantillons étudiés.	19
Figure 07: Histogramme représentant les valeurs de la densité des cinq échantillons de l'ben.	19
Figure 08 : Protocole de préparation des dilutions.	27

Liste des photos

Photo 01: Aspect des colonies des aérobies mésophiles sur milieu PCA.....	22
Photo 02: Aspect macroscopique des coliformes totaux sur gélose VRBL.....	22
Photo 03: Aspect des colonies pour les coliformes fécaux sur gélose VRBL	23
Photo 04 : Aspect des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose BP.....	23
Photo 05: Résultat de test Catalase de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Photo 06: Aspect microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Photo 07: Détermination de pH de L'ben par pH mètre avec un thermomètre.	28
Photo 08: Mesure de l'acidité.....	29
Photo 09: Mesure de la densité.....	29
Photo 10 : Mesure de la conductivité.	26
Photo 11 : Résultat de galerie Api 20 ^E	27



INTRODUCTION

Introduction

Le lait est un liquide sécrété par la femelle de toutes les espèces de mammifères. Principalement pour répondre aux besoins nutritionnels complets du nouveau-né Il y a environ 4500 espèces existantes (environ 80% des espèces de mammifères sont éteintes). Les principales exigences sont l'énergie (fournie par les lipides, le lactose et les protéines), les acides aminés essentiels et groupes aminés pour la biosynthèse des acides non essentiels (fournis par les protéines) acides gras essentiels, vitamines, éléments inorganiques et de l'eau (**Abby Thompson, 1900**).

En Algérie, particulièrement, des statistiques montrent que les laits fermentés sont appelés à se développer intensément dans une proche période. En effet, leur fabrication doit permettre de répondre à divers impératifs, principalement d'ordre nutritionnel, organoleptique, technique, commercial (**Harrati, 1977**).

La transformation du lactose par voie microbienne est à l'origine d'une grande diversité de produits fermenté (l'ben, yaourt, kéfir, etc.) et constitue une des plus anciennes pratiques pour la conservation des constituants du lait. La fermentation conduit à la formation d'un gel acide constitué d'un réseau de protéines et globules gras emprisonnant la phase aqueuse.

L'ben c'est un lait acidifié largement consommé dans les pays chauds et en particulier en Afrique du nord et au Moyen-Orient. et produit par fermentation spontanée du lait cru avec une microflore naturelle. Les conditions hygiènes dans les maisons ou dans les fermes et jusqu'à l'arrive du lait fermente dans ces points de vente non contrôlé imposeur une surveillance de sa qualité bactériologique. Plusieurs facteurs de risque de contamination du lait fermenté aux différents stades de sa production traditionnellement entre en jeu, ce qui nous a passé à entreprendre cette étude.

Les conditions d'hygiènes dans les maisons ou dans les fermes et jusqu'à l'arrive du lait fermenté dans ces points de vente non contrôlés impose une surveillance de sa qualité bactériologique. Plusieurs facteur de risque de contamination du lait fermente aux différents stades de sa productions traditionnellement entre en jeu, ce qui nous a pensé à entreprendre cette étude qui est basée sur la détermination de quelques paramètres physico-chimiques et microbiologiques du lait fermenté du genre l'ben traditionnel vendu par des particuliers dans la ville de Tiaret, notre étude se compose de deux parties ,la première partie est la partie bibliographique qui permet de saisir les différentes informations concernant le lait et le l'ben et une deuxième partie expérimentale qui concerne la détermination des qualité physico-chimiques et microbiologiques et la recherche de certains germes pathogènes . En plus de

connaître s'il présente une menace pour la santé du consommateur. Les analyses faites dans laboratoire de microbiologie et laboratoire de la technologie alimentaire au niveau de la faculté SNV université d'IBN KHALDOUNE Tiaret.



PARTIE I
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur lait

I.1 Définition

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères, comme la vache, la chèvre et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant. Du point de vue physico-chimique, le lait est un produit très complexe. Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ces propriétés physiques et chimiques est indispensable à la compréhension des transformations du lait et des produits obtenus lors des différents traitements industriels (Calore *et al*, 2002).

I.2 Transformation

Le lait peut être transformé, par des actions enzymatiques ou microbiennes, en produits ayant acquis de nouvelles qualités alimentaires et organoleptiques et présentant une conservation accrue. On appelle lait fermenté, un lait pasteurisé, transformé seulement par l'action des microorganismes.

Ces laits résultent du développement de germes particuliers modifiant les composants normaux du lait. Le lactose est transformé en acide lactique ou, dans certains laits, partiellement en alcool éthylique. Les protéides subissent un début de peptonisation qui accroît leur digestibilité. Parfois, le lait se charge en gaz carbonique et devient mousseux (Veisseyre, 1975).

I.3 Fermentation lactique

La fermentation lactique est le processus d'acidification le plus utilisé pour coaguler le lait pendant la fabrication des différents produits laitiers, les bactéries lactiques sont responsables de ce bioprocédé.

La diminution du pH provoquée par la fermentation lactique modifie l'agrégation des micelles de caséine, les modifications conduisent à la formation de la coagulation.

Les changements physico-chimiques induits par la fermentation lactiques exercent une large influence sur la macrostructure et les propriétés sensorielles des produits laitiers fermentés, les caractéristiques finales du lait fermenté dépendent de la composition du lait.

L'intérêt du consommateur s'est accru pour les produits laitiers fermentés traditionnellement en raison de leurs valeurs nutritionnelles et savoureuses (Samet-Bali, 2012).

Les laits fermentés ont une caractéristique commune : ils sont tous obtenus par la multiplication des bactéries lactiques.

Dans une préparation de lait, l'acide lactique coagule ou épaissit le lait et lui confère une saveur acide plus ou moins prononcée. Les caractéristiques propres des différents laits fermentés sont dues à la variation particulière de certains facteurs lactiques ou la flore microbienne autre que lactique (**Luquet, 1990**).

I.4 Définition du lait fermenté acidifié (L'ben)

Le L'ben est le plus traditionnel produit connu en nord d'Afrique et au Moyen-Orient. **Samet-Bali(2012)**, est une boisson préparée par fermentation spontanée du lait cru jusqu'à Coagulation, suivie d'un léger mouillage, puis d'un barattage, permettant de recueillir une part plus ou moins importante de matière grasse sous forme de beurre.

Sa préparation, très simple, est demeurée au stade familial ou artisanal : le lait est abandonné à lui-même dans une jarre de terre cuite ou une outre en peau de chèvre jusqu'à sa coagulation. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48 h suivant la saison.

Le barattage qui lui succède est réalisé soit dans l'outre, qu'un manipulateur doit secouer énergiquement avec les deux mains soit dans une jarre, en utilisant un instrument constitué d'un manche long portant à son extrémité inférieure deux disques en bois de diamètres différents. Dans un cas comme dans l'autre, cette opération dure 30 à 40 min. A la fin du barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau (environ 10 % du volume du lait), chaude ou froide, suivant la température ambiante, de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre. Celui-ci est récupéré, généralement à la main, mais certains fabricants filtrent le L'ben sur une toile, dans le but de recueillir le maximum de beurre produit de grande valeur marchande (**Tantaoui-elaraki, 1983**).

I.5 Microbiologie du lait

Le lait, même provenant d'un trait effectué dans des conditions de propriété et d'hygiène normales, renferme de nombreux germes dont le développement rapide est assuré par sa température à la sortie de la mamelle (35 °C) ainsi que par sa richesse en eau et en glucides.

Par conséquent, il doit être très rapidement refroidit (Température ≤ 6 °C), afin de limiter cette multiplication (**Fredot, 2005**).

I.5.1 Flore originale du lait

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 1000 germes/ml). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques mais aussi streptocoques lactiques (*Lactococcus*) et lactobacilles. Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées <<lacténines>> mais leur action est de très courte durée (1 heure environ).

D'autres micro-organismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade : ils sont généralement pathogènes et au point de vue sanitaire, il peut s'agir de mammites, c'est-à-dire d'infections du pis : *streptocoques* pyogènes (*Streptococcus*), *corynébactéries* pyogènes, *staphylocoques*, etc., il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : *salmonella* ; *Brucella*, agent de la fièvre de Malte, et exceptionnellement *Listeria monocytogenes* listériose; *Mycobacterium*, agent de la tuberculose ; *Bacillus anthracis*, agent du charbon ; *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre Q, et quelque virus

Les germes banaux du pis ne présentent pas de danger sanitaire mais peuvent se développer abondamment dans le lait. Les autres peuvent être responsables de maladies ou d'intoxications généralement limitées par la surveillance vétérinaire des animaux producteurs

I.5.2 Flore de contamination

Le lait se contamine par des apports microbiens d'origines diverses :

- Fèces et tégument de l'animal : coliformes, *entérocoques*, *Clostridium*, éventuellement Entérobactérie pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), etc.
- Sol : *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulées, Spores fongiques, etc.
- Air et eau : flores diverses dont *Pseudomonas* bactéries sporulées, etc. ;
- Équipement de traite et de stockage du lait : *microcoques*, levures et flore lactique avec lactobacilles, streptocoques (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*), *Leuconostoc*, etc. Cette flore est souvent spécifique d'une usine ;
- Manipulateurs : staphylocoques dans le cas de traite manuelle, mais aussi germes provenant d'expectorations, de contaminations fécales, etc.
- Vecteurs divers (insectes en particulier) : flore de contamination fécale.

Parmi ces micro-organismes, il en est d'inoffensifs, d'autres de dangereux du point de vue sanitaire, d'autres capables d'entraîner la détérioration du lait (Guiraud, 2012).



PARTIE II
EXPÉRIMENTALE

I.1 Objectif du travail

L'objectif de notre étude est de évaluer la qualité physico-chimique et microbiologique d'un lait fermenté acidifié (L'ben), acheté dans des points non contrôlés (commune de Tiaret).

I.2 Lieu et période d'étude

Les différentes analyses réalisées ont été menées au niveau des laboratoires de Microbiologie et technologie alimentaire de l'université IBN KHALDOUNE TIARET.

Cette étude a été réalisé pendant une période allant du mois de février jusqu'au mois de Mars 2022.

I.3 Echantillonnage

Les échantillons ont été prélevés dans des différents lieux de la ville de Tiaret ; (Belle vue (Volané), Place du 17 octobre, Cité de 405 lots, Cité 150 lots).

Tableau 01 : prélèvement des échantillons.

Echantillon	Lieu	Date	Heure
1	Cité de 405 lots	28/02/2022	09 :30
2	Bd Ahmed Hallouz (Volané)	06/03/2022	10 :00
3	Place du 17 octobre (1)	07/03/2022	10 :00
4	Place du 17 octobre (2)	13/03/2022	10 :00
5	Cité de 150 lots	22/03/2022	11 :00

I.4 Transport des échantillons

Les échantillons ont été transportés dans une glacière au laboratoire.

I.5 Matériel

La réalisation de l'étude nécessite l'usage de matériel (les appareils et verreries), des réactifs et autres comme le montre le tableau 2.

Tableau 02: les matériels (Appareillages, verreries) et les réactifs utilisés.

Verrerie	Appareillage	Autres	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> ○ Pipette pasteur ○ Lames ○ Tubes à essais ○ Bécher ○ Erlenmeyer ○ Verre de montre ○ Flacons ○ Eprouvette 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Etuve (Binder à 300°C) ○ Autoclave ○ Four pasteur ○ Vortex ○ Balance électrique (GAT120/GAT220, Précision 0,0001g) ○ Agitateur + plaque chauffante+ barreau magnétique ○ Bain marie (Mettler) ○ pH mètre (pH 3HACH) ○ Four à moufle (marque NABERTHEM) ○ Microscope 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Bec bunsen ○ Anse de platine ○ Spatule ○ Pissette ○ Bac de coloration ○ Micropipette 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Violet de gauntine ○ Lugol ○ Alcool ○ Fuchsine ○ NaOH (0,1 N) ○ Phenolphthalein

I.6 Protocole expérimentale

Les étapes suivies dans notre démarche expérimentale sont présentées dans le schéma du protocole expérimental.

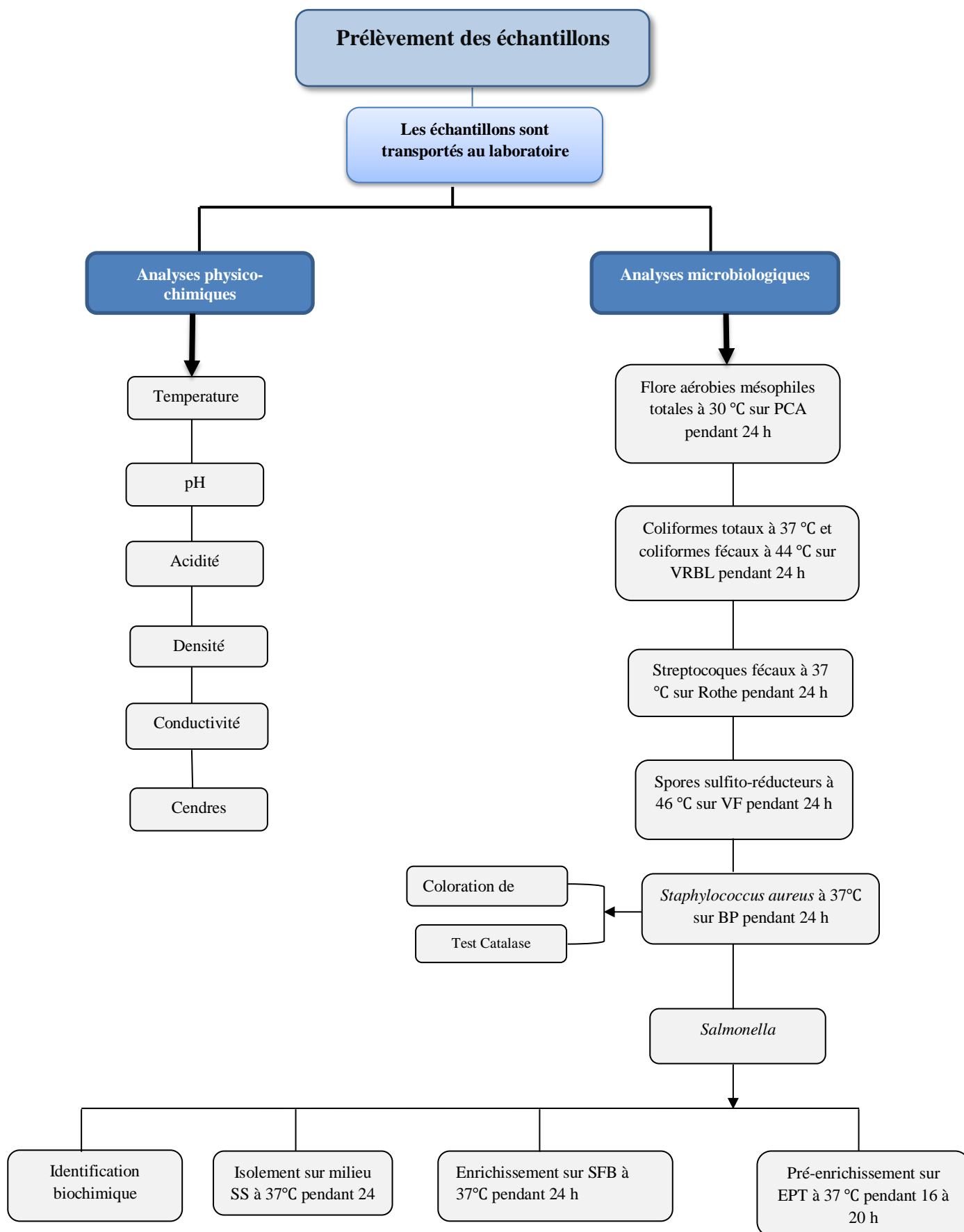


Figure 01: Protocole expérimental.

I.7 Méthodes

Dans cette étude nous effectuons des analyses physico-chimiques sur cinq échantillons de l'ben traditionnels collecté à partir des plusieurs lieux, nous recherchons également la présence de quelques groupes bactériens.

I.7.1 Analyses physico-chimiques

I.7.1.1 Mesure de la température

La température a été mesurée à l'aide d'un thermomètre.

I.7.1.2 Mesures du pH

Le pH est l'unité de mesure de l'acidité. Il varie 0 à 14. Plus la valeur de pH est faible, plus le produit est acide (Afnor ,2009).

Mode opératoire

Le pH a été mesurés à l'aide d'un pH mètre. Avant d'entreprendre des mesures, l'électrode du pH mètre est nettoyer avec de l'eau de robinet, puis rincer à l'eau distillée et séchée avec papier hygiénique, le pH mètre préalablement étalonner à pH 7 et pH 4, Ont plongé l'électrode dans un bécher qui contient 50ml du l'ben.

I.7.1.3 Détermination de l'acidité titrable

Mode opératoire

L'acidité a été déterminée par la technique de titration. Pour cela, 10 ml de lait fermenté ont été prélevés et versés dans un bécher. Trois à 4 gouttes de phénolphtaléine ont été ajoutées au lait fermenté sous une constante agitation. La titration a été faite à température ambiante par ajout gouttes à gouttes de la solution de NaOH de 0,1 N jusqu'au virage au rose, le volume final de la soude a ainsi été noté (AOAC, 2005).

L'acidité a été exprimée en degré Dornic (1°Dornic correspond à 0,1 g d'acide lactique).

I.7.1.4 Détermination de la densité

La densité est mesurée à l'aide d'un thermo-lactodensimètre

Mode opératoire

- Nettoyer une éprouvette avec l'eau distillée puis séchée.
- Verser le l'ben dans un éprouvette tenue incliné pour éviter la formation de mousse la remplir complément.

- Planage doucement le lacto-densimètre dans l'axe de l'éprouvette et en la retenant dans sa descente jusqu'au voisinage de sa position d'équilibre.
- Imprimé un léger mouvement de rotation.
- Après une minute, noter la température et lire la densité.

I.7.1.5 Détermination des cendres

La teneur en cendres est la quantité de matière minérale contenue dans un volume donné de lait, après incinération dans le four à moufle température de 530°C pendant 2 heures (**Amaraglio, 1986**).

Mode opératoire

- Peser la capsule séchée et refroidie.
- Prenez un volume de 5 ml du l'ben et évaporé dans un bain marie 80°C pendant 30 min.
- Mettez la capsule dans un four à moufle à 530 °C pendant 2 heures.
- Retirez la capsule et mettez dans le dessiccateur.
- Laissez refroidir jusqu'à température ambiante.

I.7.1.6 Détermination de la conductivité

La conductivité électrique, est définie par la propriété d'un échantillon à transmettre le courant électrique. Elle se mesure en milli ou en micro-siemens par centimètre (ms ou us / cm). Cette propriété est majoritairement, due aux ions (essentiellement chlorures, et bicarbonate de potassium, sodium, calcium et magnésium) (**Mabrouk, 2003**).

Mode opératoire

La mesure de la conductivité est réalisée à l'aide d'un conductivité- mètre. Après l'introduction de l'électrode, dans un volume de l'ben de 50mL. Ont procédé, par la suite, à l'enregistrement de la valeur affichée par la conductimètre. Après chaque mesure, en rince l'électrode.

I.7.2 Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologies ont pour but de dénombrer les populations microbiennes et déceler les sources de contamination.

Les différents types d'ensemencement sont réalisés selon **Bio-Rad(2011)**.

a. Ensemencement en profondeur

- Placer dans les boîtes stériles 1 ml de chaque échantillon à analyser.
- Verser rapidement 10 à 15 ml de milieu de culture fondu et ramené à une température entre 44 à 47 °C homogénéisé parfaitement.

b. Ensemencement en surface

- Couler le milieu en boîte de pétri et après refroidissement, déposer à la surface 0.1 ml de l'échantillon à analyser, étaler l'inoculum rapidement et soigneusement à l'aide d'un râteau stérile.
- Retourner les boîtes et les incuber dans cette position.

La température et la durée d'incubation varient selon les bactéries que l'on désire dénombrer.

I.7.2.1 Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobique totale à 30°C

La flore aérobique totale c'est l'ensemble des micro-organismes cultivant à une température de 37 °C en aérobiose, leur température optimale de croissance est différente. Dénombrer la flore totale c'est tenter de compter tous les micro-organismes présents, afin d'apprécier la pollution microbienne du produit. Ce dénombrement dépend des conditions de température et de l'oxygénation. En fonction de la température d'incubation (Joffin, 2010).

Mode opératoire

Selon Lapid (2002), A partir des dilutions décimales allant de 10^{-2} à 10^{-5} , porter aseptiquement 1 ml à l'aide d'une micropipette dans une boîte de pétri vide préparée à cet usage et numérotée. Compléter ensuite avec 12 à 15 ml de gélose PCA fondue puis refroidie à $45 \text{ °C} \pm 1$. Faire des mouvements circulaires de va-et-vient en forme de (8) pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée. Laisser le mélange se solidifier sur la paillasse. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 24h à 72 h.

I.7.2.2 Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux (en milieu solide)

Les coliformes appartiennent à la famille des entérobactéries (*Enterobacteriaceae*) et sont des bacilles Gram négatifs aérobies utilisant le lactose, vivent dans l'intestin. Ce sont les coliformes parmi lesquels domine *Escherichia coli*. Ces bactéries existent aussi dans l'environnement, et qui résiste mal dans les conditions externes et signe davantage une contamination fécale récente de l'aliment (Joffin, 2010).

Mode opératoire

Selon Lapid(2002). A partir des dilutions décimales à 10^{-2} , 10^{-4} porter aseptiquement 1 ml à l'aide d'une micropipette dans une boîte de pétri vide préparée à cet usage et numérotée. Cette opération doit être effectuée en double pour chaque dilution car : La première série des boîtes incubées à 37 °C et réservées à la recherche des Coliformes totaux.

La deuxième série des boîtes incubées à 44 °C et réservées à la recherche des coliformes fécaux.

Compléter ensuite avec environ 15 ml de gélose VRBL, fondue puis refroidie à 45 °C ± 1.

Faire ensuite des mouvements circulaires de va-et-vient en forme de (8) pour bien mélanger la gélose à l'inoculum. Les boîtes de pétri sont incubées pendant 24 à 48 h.

Une identification est ensuite complétée par ensemencement sur galerie API 20^E (**Annexe 02**)

I.7.2.3 Recherche et dénombrement des *Streptocoques fécaux*

Les streptocoques fécaux appartiennent à la famille des *Enterococcaceae* et sont des coques Gram positive, cultivant en aérobiose, catalase négative et esculinase positive en général, sont des bactéries des matériel fécales et des hôtes normaux de l'intestin (**Joffin, 2010**). La recherche des streptocoques fécaux ou streptocoques se fait en milieu liquide par la technique du nombre le plus probable (NPP) (**Joffin, 1999**).

Mode opératoire

a. Test de présomption

Ensemencer :

- 3 tubes de 10 ml de Rothe à double concentration avec 10 ml de la solution mère.
- 3 tubes de 10 ml Rothe à simple concentration avec 1mL de la solution mère.
- 3 tubes de 10 ml Rothe à simple concentration avec 0,1ml de la solution mère.

Etuver les tubes 24 à 48 h à 37°C.

b. Test de confirmation

- Agiter les milieux de Rothe positive (louche microbienne) ;
- Reporter une anse du contenu de chacun des tubes de Rothe positive dans un tube du milieu Litsky ;
- Incuber des tubes 24 h à 48 h à 37°C.

Les tubes présentant un trouble homogène et une pastille violette (non constant) au fond contiennent au moins un *Enterococcus*.

I.7.2.4 Recherche des Spores *Sulfito-réducteur*

Les clostridium sont des germes sporulés, la spore étant une forme thermorésistante. C'est pourquoi les clostridium thermorésistants sont recherchés dans les conserves ou ils peuvent facilement prolifère puisque leurs spores sont les seuls être vivants peuvent survivre après un chauffage insuffisant qui assure, de plus, la fragilisation des enveloppes sporales nécessaires à la germination (**Joffin, 2010**).

Les clostridiiums sulfito-réducteurs (ou leur spores), bactéries commensales de l'intestin ou saprophytes du sol.

Mode opératoire

A partir de chaque dilution de l'ben, 5 ml sont prélevés aseptiquement dans un tube stérile. La sélection des formes sporulées est réalisée par chauffage de 10 min à 80°C pour détruire les formes végétatives, 0,5 ml d'une solution à 5 % de sulfite de sodium et 2 à 3 gouttes de solution de citrate de fer à 5 % sont ajoutées. Après agitation, les tubes sont refroidis à température ambiante et 7 ml de gélose viande foie (VF) est ajoutée pour assurer l'anaérobiose.

L'incubation est réalisée à 44°C pendant 24 à 48 heures. Les grosses colonies noires, produisant des sulfures à partir des sulfites qui ont précipité avec les ions de fer, sont considérées clostridies sulfito-réducteurs (Aggad et al, 2009).

1.7.2.5 Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci Gram positif, se divisant selon plusieurs plans dans l'espace de façon à former des amas irréguliers cette bactéries ne sporulent pas mais sont résistants à la dessiccation.

Ils sont largement présents dans les poussières dispersées dans l'air et les surfaces et sont des espèces pigmentées en jaune, plus fréquemment impliquée dans les infections humaines (Joffin, 2010).

Mode opératoire

Le dénombrement est effectué sur milieu Baird Parker, refroidie le milieu à 45°C, 5 ml d'une solution de jaune d'œuf est ajouté au tellurite de potassium à 1 % après étalement de l'inoculum à l'aide d'une micropipette (0,1 ml de chaque dilution) l'incubation est faite à 37°C pendant 24 h à 48 h. *Staphylococcus aureus* donne des colonies noires avec halo clair (Aggad, 2010).

a. Identification

a.1 Coloration de gram

Il existe de nombreuses versions de la procédure de coloration. Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de cristal ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau Courante, traité pendant une minute par la solution de Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec un solvant comme l'éthanol (95 %), l'acétone ou l'acétone iodée.

Il s'agit là de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 1 à 3 secondes seulement, jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. À ce stade, les cellules Gram-négatives seront incolores, les cellules Gram-positives violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre-coloration de 30 secondes à fuchsine basique diluée, pour colorer (en rouge) les cellules Gram-négatif-vers présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objective immersion (grossissement xl.000 environ) (**Jean-Paul, 1997**).

a.2 Test de Catalase

D'après **Marchal et al. (1991)**, la catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O et $\frac{1}{2} O_2$.



La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif (**Marchal et al. ,1991**).

Prélever une colonie (milieu dépourvu de sang) et déposer sur une lame. Ajouter une goutte de H_2O_2 30 % sur les bactéries. Observer le dégagement immédiat de gaz (**Jean-Paul, 1997**).

I.7.2.6 Recherche de *Salmonella*

Les salmonelles sont des bacilles Gram négatif, aéroanaérobies facultatifs, proches d'*Escherichia coli*, de *Shigella* et d'autres bactéries entériques.

Les Salmonelles sont des parasites intestinaux des animaux, qui se retrouvent dans les eaux usées. Toutes les salmonelles sont potentiellement pathogènes pour l'homme. Les *Salmonelles* appartiennent à la famille des entérobactéries (**Martinko, 2007**).

Mode opératoire

a. Pré-enrichissement

Introduire 25 ml de lait fermenté dans 225 ml d'eau peptone tamponnée préalablement stérilisée. La préparation est homogénéisée puis incubée à 37°C pendant 16 à 20 heures.

b. Enrichissement

Introduire 10 ml du liquide pré-enrichi dans 100 ml de bouillon sélénite. Incuber pendant 24 heures à 37°C.

c. Isolement

Isolement sur le milieu sélectif « *Salmonella-Shigella* ». Incuber pendant 24 heures à 37°C

d. Identification

Ensemencement pour l'identification biochimique :

Soit des milieux indiqués par la norme

Soit avec une méthode miniature

Identification biochimique, puis éventuellement identification immunologique à l'aide des sérums O, H et Vi.

Expression des résultats

Les normes AFNOR utilisent un mode de calcul plus complexe, prenant un compte de la boîte de deux dilutions successives la condition qu'elles contiennent moins de 300 colonies et qu'une boîte au moins de la dilution la plus forte contienne au moins 15 colonies (**Joffin, 1999**).

Dans cette méthode, si l'on nomme :

ΣC : somme de colonies comptées sur tous les boîtes retenues,

V : Volume de dilution utilisé (0,1ml sur la surface, 1ml dans la masse.).

n_1 : Nombre de boîtes dans la 1^{ère} dilution.

n_2 : Nombre de boîtes dans la 2^{ème} dilution.

d : Taux de dilution de la 1^{ère} dilution,

$$\text{Alors : } N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0.1.n_2)d}$$

II. Résultats et discussion

II.1 Analyses physico-chimiques

Les résultats des analyses physico-chimiques obtenus sont regroupés dans le tableau 03 ci-dessous.

Tableau 03 : Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons analysés.

Paramètres	Temperature (°C)	pH	Cendres (g/L)	Densité	Conductivité (mS/cm)	Acidité (°D)
E01	14,1	4,09	1,53	1,028	4,3	96°
E02	16	4,10	2,6	1,024	4,54	94°
E03	14	4,27	4,5	1,032	5,1	79°
E04	14.4	4,14	0,85	1,025	4,1	90°
E05	13,8	4,3	3	1,022	4,9	69°

II.1.1 Température

Les valeurs de la Température trouvées sont présentées dans la figure 02.

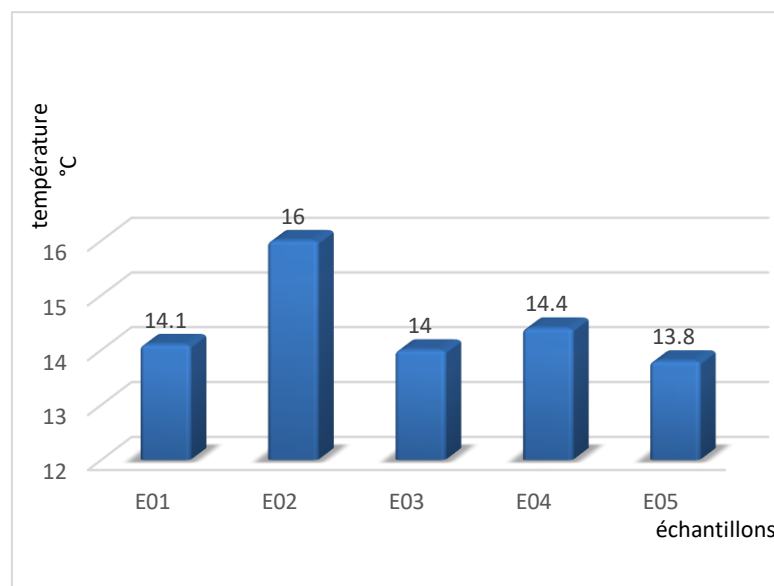


Figure 02: Histogramme représentant les valeurs de la température des cinq échantillons analysés.

Les températures mesurées des cinq échantillons immédiatement avant la manipulation au laboratoire. Les valeurs de température de l'ensemble des échantillons de l'ben analysés varient entre 13,8°C à 16°C, l'échantillon E02 présente la valeur la plus élevée est de 16°C et l'échantillon E05 la plus basse 13,8°C.

Cette différence entre les valeurs de Température expliqué par les conditions de vente des échantillons qui sont mal conditionnée.

II.1.2 pH

Les valeurs de pH sont regroupées dans la figure 03.

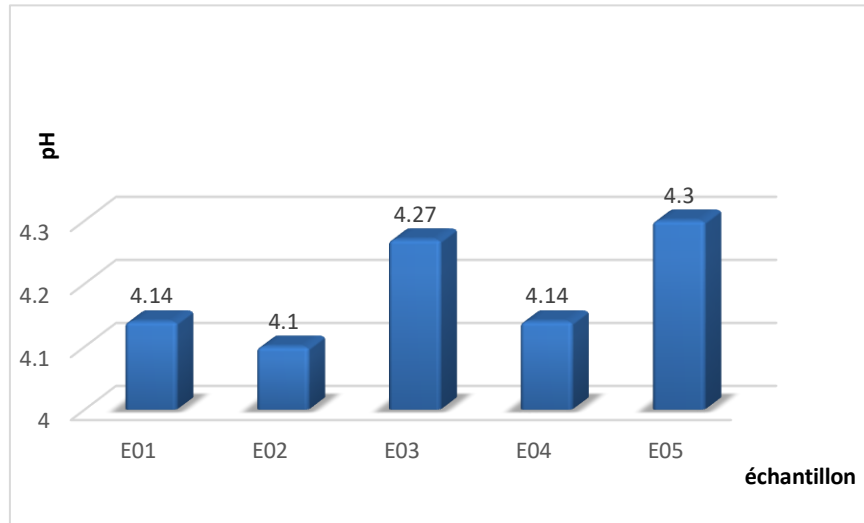


Figure 03: Histogramme représentant les valeurs de pH des cinq échantillons analysés.

Les valeurs de pH sont situées dans l'intervalle 4.09 à 4.3, la valeur la plus élevée est enregistrée dans l'échantillon E05 soit 4,3 et la plus basse est enregistrée dans l'échantillon E03 soit 4,09 les résultats du pH trouvées sont légèrement inférieures aux valeurs trouvées par **Souilah (2007)**, et **Boujema El Marnissi (2013)**, qui ont trouvés des valeurs de 4,81 et 4,5 respectivement.

Selon **Mathieu (1998)**, le pH varie en fonction du climat, stade de lactation, aux disponibilités alimentaires et à l'état de santé des vaches.

II.1.3 Acidité

Les valeurs de l'acidité des échantillons analysés sont illustrées dans la figure 04.

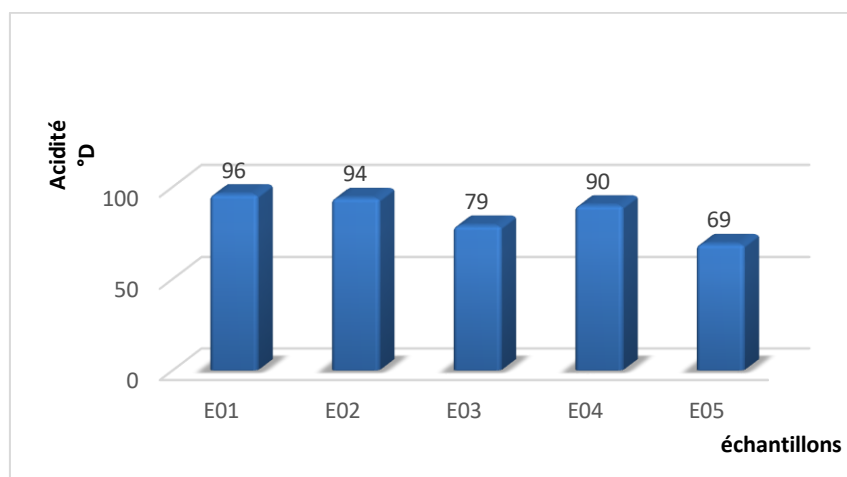


Figure 04: Histogramme représentant les valeurs de l'acidité des cinq échantillons analysés

Les valeurs de l'acidité obtenues sont variées entre 69°D à 96°D, l'échantillon E01 présente la valeur la plus élevée 96°D et E05 présente la valeur la plus faible 69°D, les valeurs des échantillons E01, E02, E04 analysées 96°D, 94°D, 90°D respectivement sont supérieures aux résultats trouvés par **Souilah (2007)** et **Boujemaa El Marnissi (2013)** soit 84,2°D, 80°D respectivement, Nous observons que les valeurs des échantillons E03 et E05 sont 79°D, 69°D sont inférieures aux résultats cités précédemment.

Selon **Guiraud (1998)**, l'augmentation de l'acidité est liée au développement de la flore originale en produisant l'acide lactique par fermentation du lactose en présence des facteurs favorables tels que le non-respect de la chaîne de réfrigération et, selon **FAO (1998)**, l'inégalité de ces paramètres elle peut être liée à une contamination par une flore exogène de Bifidobactéries et des Entérobactéries.

Dans le lait fermenté acidifié les microorganismes dégradent une partie du lactose du lait en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration de l'acide lactique et donc diminution du pH (**Mathieu, 1998**).

II.1.4 Cendres

Les résultats des cendres sont illustrés dans la figure 05.

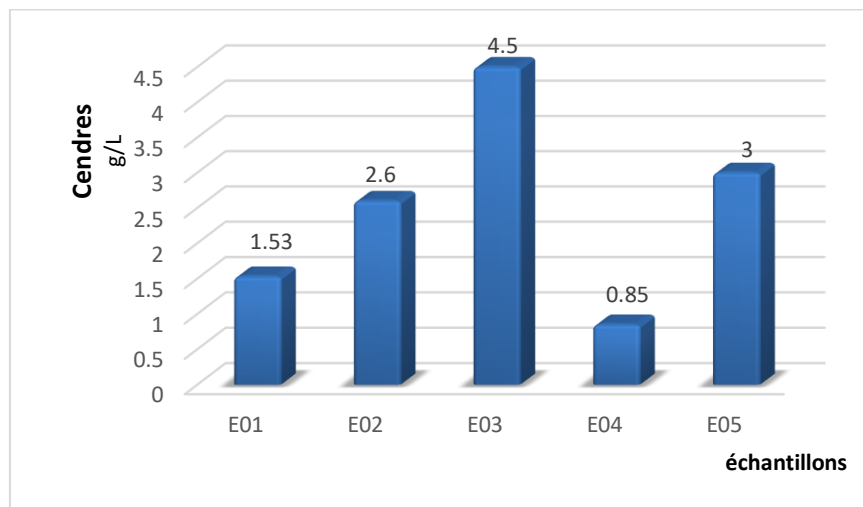


Figure 05: Histogramme représentant les valeurs des cendres des cinq échantillons étudiés.

Les valeurs des cendres obtenues oscillent entre 0,85 g/l à 4,5 g/l, la valeur la plus élevée est enregistrée dans l'échantillon E03 soit 4,5 g/l par contre la valeur la plus faible est enregistrée dans l'échantillon E04 soit 0,85g/l, les valeurs des cendres de tous les échantillons sont inférieures aux résultats trouvés par **Guigues (1929)** et **Souilah (2007)**, soient 6,88 g/L et 4,79 g/l respectivement, selon **Oeno (2000)**, cette différence est due principalement à la présence de certaines fraudes, comme l'addition de l'eau ou d'une solution aqueuse d'acide acétique (teneur en cendres très faible) ou l'addition de substances non volatiles (teneur en

condres très élevée). Selon **Veinglou et al. (1982)**, la variation de valeurs des condres est due principalement aux types des races, l'alimentation et les conditions climatiques.

II.1.5 Conductivité

Les valeurs de la conductivité sont présentées dans la figure 07.

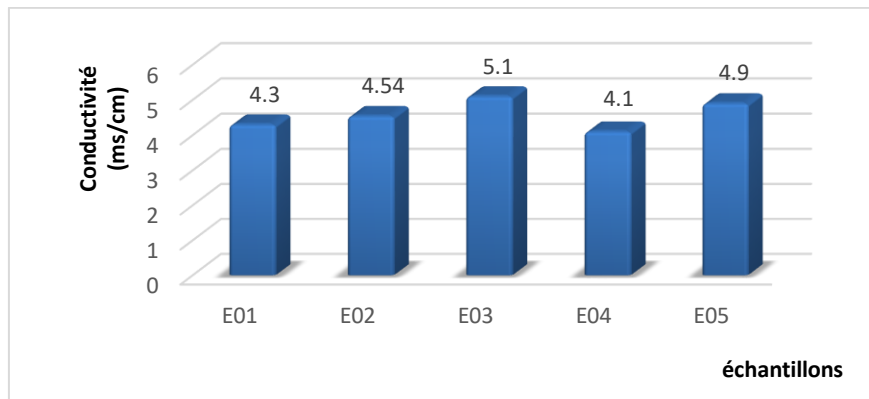


Figure 06: Histogramme représentant les valeurs de la conductivité des cinq échantillons étudiés.

Les valeurs de la conductivité trouvées varient entre 4,1 à 5,1 la valeur la plus élevée est notée dans l'échantillon E04 et la plus basse est notée dans l'échantillon E03, la plupart des valeurs de la conductivité de lait cru trouvées par **Mir et Sadki (2018)** oscillent entre 5 à 6,35 et sont supérieurs aux résultats précédent, selon **Mir et Sadki (2018)**, plusieurs facteurs influencent la conductivité tels que : le traitement par les antibiotiques, l'âge de vache et les conditions hygiéniques.

II.1.6 Densité

Les valeurs de nos échantillons analysés sont résumées dans la figure 08.

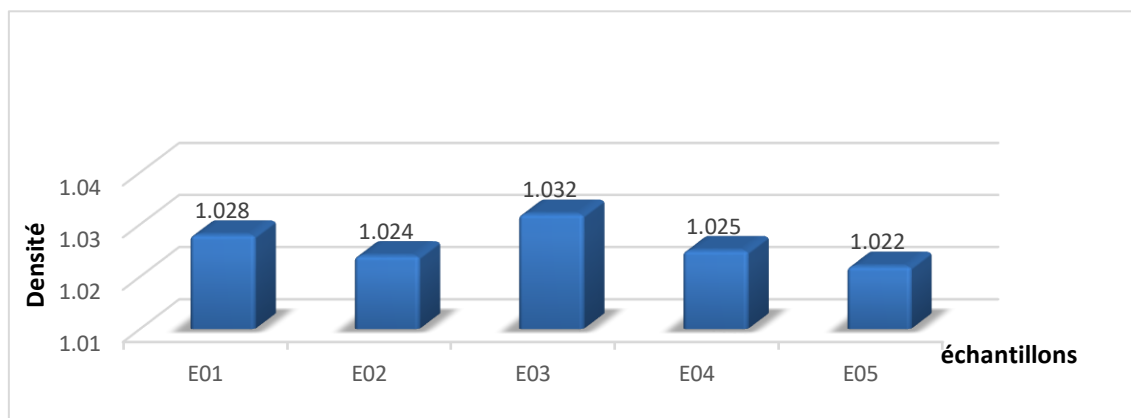


Figure 07: Histogramme représentant les valeurs de la densité des cinq échantillons de l'ben.

Les valeurs de densité de nos échantillons varient entre 1,022 à 1,032. Il est à noter que l'échantillon E03 présente la valeur la plus élevée 1,032 et l'échantillon E05 possède la valeur la plus faible 1,022. Les valeurs de nos échantillons sont inférieures à la valeur trouvée par **Guiges (1929)** qui est 1,0357.

Les facteurs influençant, la densité du lait sont liés à sa richesse en matière sèche. Un lait pauvre aura une densité faible (**Luquet, 1985**).

II.2 Analyses microbiologiques

Les résultats obtenus pour le dénombrement des groupes microbiens et la recherche des bactéries à potentiel pathogène sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 04 : Résultats des analyses microbiologiques du l'ben traditionnel.

	FAMT	C.Totaux	C.fécaux	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptocoques</i>	<i>Salmonella</i>	Spores Sulfito-réducteur
E01	1,23. 10 ⁶	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
E02	1,55. 10 ⁵	1,63. 10 ³	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
E03	1,32. 10 ⁵	ND	3,18. 10 ³	6,63. 10 ³	Abs	Abs	Abs
E04	1,31. 10 ⁴	5. 10 ³	Abs	1,21. 10 ⁴	Abs	Abs	Abs
E05	2,04. 10 ⁴	ND	Abs	2,54. 10 ²	Abs	Abs	Abs
Normes JORA (2017)	/	3. 10 ⁵	3. 10 ²	3. 10 ³	Abs	Abs dans 25 g	Abs

Abs : absence

ND : Non déterminé

L'expression des résultats se fait sous forme d'un nombre d'unités formant colonies (UFC)

Normes bactériologiques algérienne 2017

La qualité microbiologique de lait fermenté doit obéir à des normes définies. En Algérie ces normes sont établies et sont regroupées dans le tableau 04. Ces tests sont tirés du journal officiel de républiques algériennes 2017.

Tableau 05 : Normes Algériennes des paramètres microbiologiques **J.O.A(2017)**.

Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologique (ufc(1)/g ou ufc/ml)	
		n	c	m	M
Laits fermentés (Lben, Raib...)	Coliforme totaux	5	2	3.10^4	3.10^5
	Coliforme thermotolérants	5	2	30	3.10^2
	Staphylocoques à coagulase	5	2	3.10^2	3.10^3
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100	

Selon le **J.O.R.A, (2017)**, les résultats des examens interprétés sur la base de plan de deux classes ; dans le cas où la valeur « C » est égale zéro : Les résultats s'expriment de la façon suivante :

c : nombre maximal d'unités d'échantillonnages de produit analysé qui peut dépasser (m) tout en étant inférieur à (M) sans que le lot ne soit rejeté.

n : nombre des unités constituant l'échantillon.

m : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au-dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante.

M : nombre des germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au-dessous de laquelle la qualité de produit est considérée comme inacceptable.

II.2.1 Flore mésophile aérobie totale à 30°C

Cet examen vise à faire le dénombrement non spécifique du plus grand nombre de microorganismes (**Rodier, 2015**).

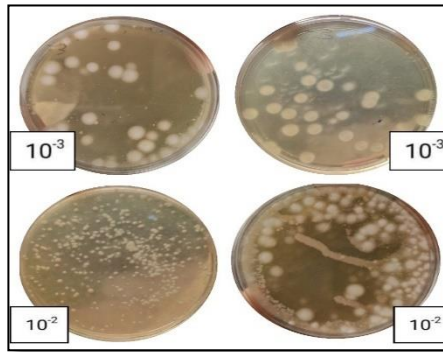


Photo 01: Aspect des colonies des aérobies mésophiles sur milieu PCA.

II.2.2 Coliformes totaux

La recherche des coliformes totaux révèle l'absence totale de ces germes dans E01, et un nombre énorme des colonies dans E03 et E05, le nombre de germes pour E02 et E04 respectivement donne $1,63 \cdot 10^3$; $5 \cdot 10^3$ UFC/ml nous constatons que la contamination du l'ben par ces germes est nettement inférieure et présentent une conformité à la norme $3 \cdot 10^5$. La présence de ces germes et en grand nombre sont un signe d'une mauvaise hygiène au cours de la préparation, transport et vent (**Photo 02**).

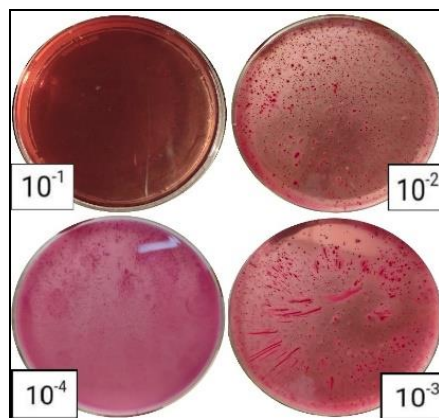


Photo 02: Aspect macroscopique des coliformes totaux sur gélose VRBL.

II.2.3 Coliformes fécaux

La norme algérienne **JORA (2017)** pour les coliformes fécaux étant fixée à $3 \cdot 10^2$ UFC/ml, après l'obtention des résultats nous avons constaté une absence totale de ces germes dans les échantillons E01, E02, E04 et E05, le résultat de l'échantillon E03 donne un nombre de $3,18 \cdot 10^3$ UFC/ml, ce dernier indique la non-conformité aux normes ce qui montre une maîtrise insuffisante de l'hygiène de personne ou les mamelles durant la traite (mamelles non lavées du début de la traite, les premiers jets de lait non éliminés), Selon **Guiraud (1998)**,

La présence de ces germes, traduit une contamination de source fécale, provoque une intoxication alimentaire (**Photo 03**).

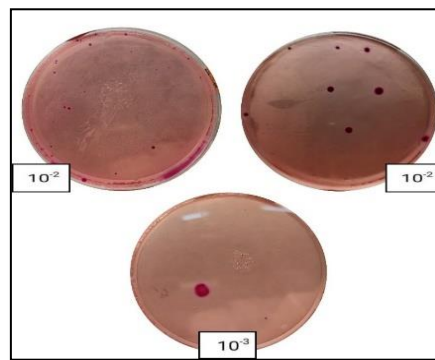


Photo 03: Aspect des colonies pour les coliformes fécaux sur gélose VRBL.

II.2.4 *Staphylococcus aureus*

Concernant le dénombrement de *Staphylococcus aureus*, E01 et E02 caractérisé par l'absence totale de ce germe, E05 donne un nombre de $2,54 \cdot 10^2$ UFC/ml et qui est répond à la norme $3 \cdot 10^3$ UFC/ml, par contre les échantillons E03, E04 donne des mauvais résultats elles sont respectivement $6,63 \cdot 10^3$; $1,21 \cdot 10^4$ UFC/ml (**Photo 04**), généralement la contamination par ce germe révèle une négligence des condition d'hygiène du personnel chargé à la préparation ou bien la vend, selon **Tortora(2016)**, la bactérie *Staphylococcus aureus* responsable a la production des entérotoxines qui provoqué des gastro-entérites.

Après une observation microscopique, les colonies donnent un résultat positif à la coloration de gram, coque, mode d'association en amas se forme de grappes de raisin et une catalase positive ces résultats a été confirmés par (**Wagner et al, 2005**). (**Photo 05, Annexe 03**).

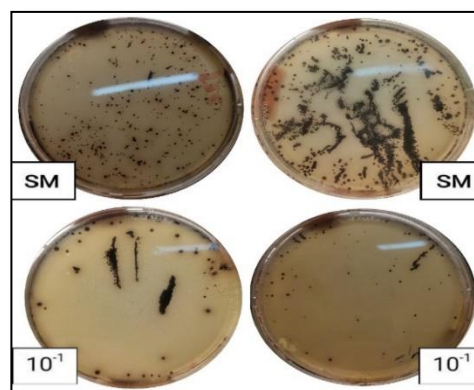


Photo 04 : Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* sur gélose BP

II.2.5 Germes pathogènes (*Salmonella*, Spores sulfito-réducteurs, *Streptocoques fécaux*)

La recherche des germes pathogènes (*Salmonella*, Spores sulfito-réducteurs, *Streptocoques fécaux*) indique l'absence totale de ces germes dans tous les échantillons cette absence peut être liée à une bonne maîtrise des règles d'hygiène de l'environnement et du personnel, par la bonne santé des vaches, et notamment l'absence des infections des mamelles.

Enfin, les résultats de l'analyse microbiologique ont montré que les échantillons E01 E02 sont conforme aux normes et considère comme satisfaisant, en revanche les échantillons E03, E04 et E05 renfermes des germes de contamination ou des germes pathogènes ce qui ne répond pas à la norme algérienne.



CONCLUSION

Conclusion

L'objectif de notre étude est de connaître et évaluer la qualité sanitaire du l'ben traditionnel vendu dans des points non contrôlés dans la commune de Tiaret à partir des différentes analyses physico-chimiques (Température, pH, Acidité, Cendres, Densité, Conductivité) et des analyses microbiologiques (dénombrement de la flore aérobies mésophiles totale, coliformes totaux et fécaux, *staphylococcus aureus*), avec la détection de la présence de quelques germes à potentiel pathogènes (*Streptocoques* fécaux, *Salmonella* et les Spores sulfito-réducteurs).

Les résultats physico-chimiques obtenus montrent que le l'ben analysé est caractérisé par une quantité énorme d'acide dans les échantillons E01, E02 et E04 et sont 96°D, 94°D, 90°D respectivement avec une teneur en cendres très faible dans tous les échantillons oscillant entre 0,85 et 4,5 g/, concernant le côté microbiologique les résultats révèlent la présence de charges importantes de coliformes totaux dans E03, E05 et la présence de coliformes fécaux dans E03 avec un nombre de $3,18 \cdot 10^3$ UFC/ml, le dénombrement de *staphylococcus aureus* révèle la présence de ces germes dans E04 soit $1,21 \cdot 10^4$ UFC/ml.

Ces mauvais résultats révèlent le non-respect des conditions de conservations et d'hygiène avec la présence de certaines fraudes comme l'addition d'eau.

Après l'analyse nous concluons que les échantillons E01, E02 sont conformes aux normes et considérés comme satisfaisants, en revanche les échantillons E03, E04 et E05 renferment des germes de contamination ou des germes pathogènes ce qui ne répond pas à la norme algérienne.

Nous observons que les sites de prélèvement sont caractérisés par la négligence des conditions de conservations et d'hygiène, dépend de ça, certains résultats satisfaisants peuvent être justifiés par le prélèvement dans la période froide.



ANNEXES

Annexe 01

Préparation des dilutions

On parle de diluer au 1/X (exemple au 1/10).

Cela signifie que 1cm^3 de produit initial sera placé dans X - 1cm^3 de diluant (exemple pour diluer au 1/10 : 1cm^3 dans 9cm^3).

La solution finale est telle que les concentrations sont divisées par X (10 dans notre exemple) par rapport au produit initial. Si X = 1, il n'y a pas de dilution (produit pur), donc le produit pur peut être dit dilué au 1/1 ou 10^0 .

Les dilutions utilisées en microbiologie alimentaire sont en général sous-multiples de 10 :

- Au 1/10 ou 10^{-1} ;
- Au 1/100 ou 10^{-2} , etc.

On va fréquemment jusqu'à 10^{-6} .

Si le produit est solide, on ne peut pas pipeter. L'analyse comprend alors obligatoirement la réalisation d'une suspension de l'aliment broyé dans un liquide qui le diluera.

On s'arrange toujours pour que la dilution soit alors au 1/10 (Joffin, 1999).

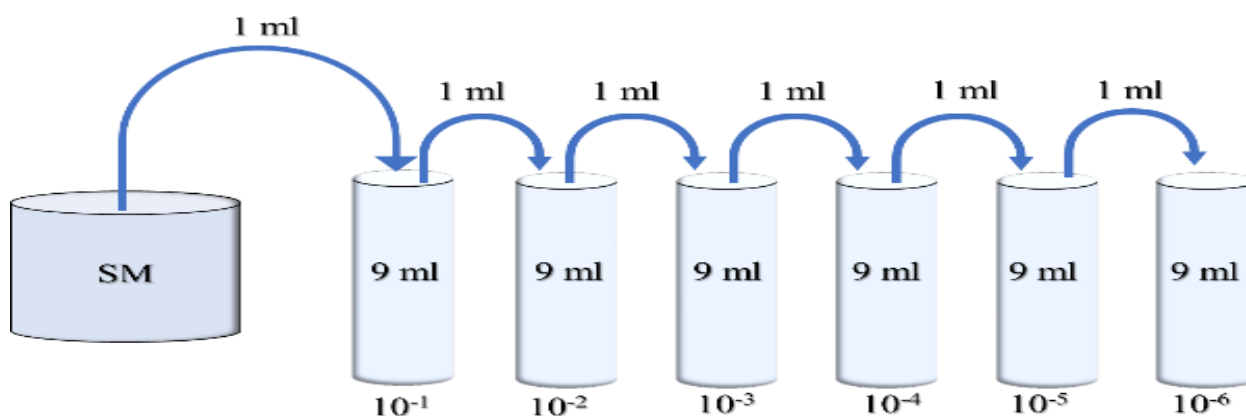


Figure 08 : Protocole de préparation des dilutions.

Annexe 02

Milieux de cultures utilisées

Tableau 6 : les milieux de cultures utilisés.

Milieu solide	Milieu liquide
<ul style="list-style-type: none"> • Gélose VRBG. • Gélose Plate Count Agar (PCA). • Gélose Viande Foie (VF). • Gélose Colombia. • Gélose Braid-Parker (BP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Bouillon Rothe • Eau peptonée tamponée • Bouillon Sélénite Cystéine (SFB)

Compositions des milieux

❖ Milieu VRBG

Tableau 7 : Compositions des milieux VRBG

Constituants	Quantité en g/L
Extrait de levure	5
Sels biliaires	1.5
Glucose/Lactose	10
Chlorure de sodium	5
Rouge neutre	0.03
Cristal violet	0.002
Gélose	12

Principe

La gélose VRBL est recommandée pour la recherche des coliformes dans les aliments et les produits laitiers (Lab-Humeau, 2010).

❖ Milieu PCA (Plat Count Agar)

Tableau 8 : composition de milieu PCA

Constituants	Quantité en g/L
Extrait de	5
Sels biliaires	1.5
Glucose	10
Chlorure de sodium	5
Rouge neutre	0.03
Cristal violet	0.002
Gélose	12

Principe PCA

La croissance de la plupart des bactéries aérobies est favorisée par des substances nutritives apportées par la peptone, les facteurs de croissance de l'extrait de levures, et le glucose utilisé comme source énergétique (**Bio-Rad, 2011**).

❖ Milieu VF (Viande Foie)

Tableau 9 : Composition de milieu VF.

Constituants	Quantité en g/L
Extrait de Viande	30
Glucose	2
Amidon	2
Gélose	12

Principe

Le principe du milieu Viande-foie Sulfite Fer repose sur l'aptitude des bactéries anaérobies sulfito-réductrice à réduire les sulfites d'ammonium en sulfures de fer, responsable de la coloration noire des colonies, en anaérobiose à 37 °C (**Bio-Rad, 2011**).

❖ Milieu BP (Baird-Parker)

Tableau 10 : Composition de milieu BP.

Constituants	Quantité en g/L
Tryptone	10
Extrait de levure	5
Extrait de viande	1
Chlorure de lithium	5
Gélose	20

Principe

La gélose Baird-Parker est recommandée pour la recherche et la numération des staphylocoques coagulase positive. Son utilisation est recommandée par la pharmacopée européenne et américaine et pour la recherche de *Staphylococcus aureus* dans les aliments (Bio-Rad, 2011).

❖ Eau peptonée tamponnée :

Tableau 11 : Composition de milieu Eau peptone tamponnée.

Constituants	Quantité en g/L
Peptone	20
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique	9
Phosphate monopotassique	1,5
Eau distillée	1000

Principe

L'eau peptonée tamponnée est un diluant couramment utilisé pour les préparations des échantillons de produits alimentaires. Il est recommandé pour le pré-enrichissement et pour la récupération de *Salmonella* dans les aliments avant enrichissement sélectif et isolation. (Lab-Humeau, 2010).

Bouillon Sélénite Cystéine (SFB)**Tableau 12:** Composition de milieu SFB.

Constituants	Quantité en g/L
-Peptone	5
- Lactose	4
- Phosphate disodique	10
- Sélénite acide de sodium pH=7	4

Principe

Le bouillon Sélénite Cystine est utilisé pour l'enrichissement sélectif de *Salmonella* dans l'eau ou les denrées alimentaires ainsi que dans les produits pharmaceutiques (**Lab-Humeau, 2010**).

Milieu Rothe

Pour 1 L d'eau distillée

pH : 7,2

Tableau 13: Composition de milieu Rothe

Constituants	Quantité en g/L
- Extrait de bœuf	4.5
- Tryptone	15
- Glucose	7.5
- Chlorure de sodium	7.5
- Azoture de sodium	0.2

Principe

Le Bouillon de Rothe est utilisé pour la confirmation lors des recherches et dénombrements des Streptocoques fécaux dans les eaux d'alimentation et résiduares et les produits surgelés et les autres denrées alimentaires par la méthode du nombre le plus probable. La recherche s'effectue en 2 étapes, un test présomptif en bouillon de Rothe et transfert des cultures positives pour confirmation sur milieu de Litsky (Lab-Humeau, 2010).

Annexes 03



Photo 05: Résultat de test Catalase de *Staphylococcus aureus*.

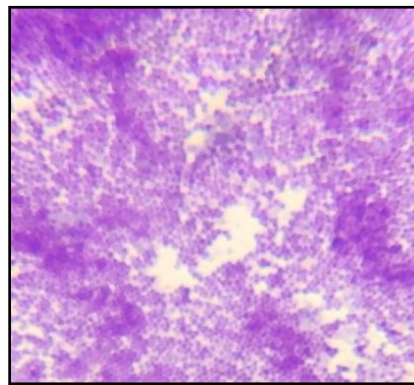


Photo 06: Aspect microscopique de *Staphylococcus aureus*.



Photo 07: Détermination de pH de L'ben par pH mètre avec un thermomètre.



Photo 08: Mesure de l'acidité.



Photo 09: Mesure de la densité.

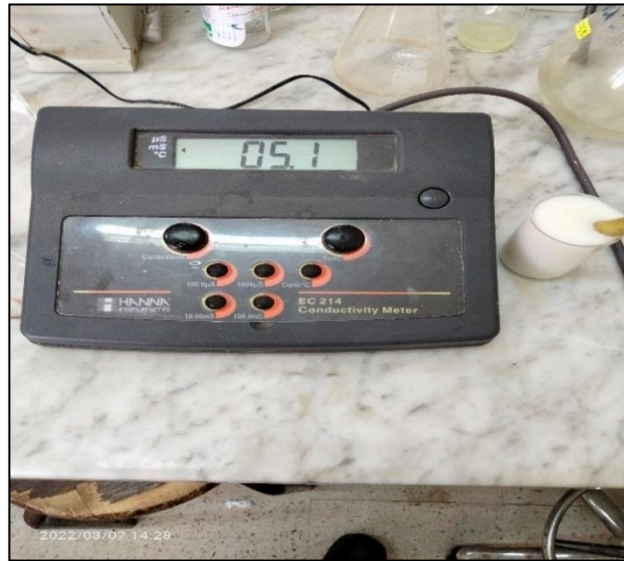


Photo 10 : Mesure de la conductivité.

Annexe 04

API 20 E

Est un système standardisé, conçu dans les années 1970 permettant d'identifier aujourd'hui :

- 21 genres d'entérobactéries, répartis-en 70 espèces ; sous espèces ou biotypes ;
- 18 autres genres de bacilles Gram négative dont les *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*...

Composition de la galerie

La galerie API 20 E est composée de 20 microtubes (surmontés de cupules) contenant de substrat déshydraté, qui permettent de réaliser 21 tests biochimiques du métabolisme respiratoire, glucidique et protéique. Le test oxydase constitue le 21^e test d'identification à effectuer hors galerie (**Delarras, 2007**).

Des tests complémentaires peuvent être réalisés

Inoculer la galerie suivant le mode opératoire du fabricant, en notant que :

- Pour les tests CIT, VP, GEL, les tubes et les cupules doivent être remplis avec la suspension bactérienne ;
- Pour les tests ADH, LDC, ODH, H₂S et URE, les cupules sont remplies d'huile de paraffine afin d'obtenir une anaérobiose.

Incuber à 36 ± 2 °C pendant 18 à 24 heures.

Principe

Le principe du milieu repose sur l'aptitude des coliformes à fermenter le lactose. Le milieu est rendu inhibiteur vis-à-vis des bactéries gram positives et de certaines bactéries de Gram négatives par la présence simultanée des crustales violettes et des sels biliaries (le rouge neutre est un indicateur de pH). (**Bio-Rad, 2011**)



Photo 11 : Résultat de galerie Api 20^E.

Annexe 05

Tableau 14 : Résultats de la galerie Api 20^E.

1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
5			0			2			4			5			7			2	

Code de la souche : 5024572

Résumé

L'objectif de notre étude est de contrôler la qualité sanitaire de lait fermenté vendu de la ville de Tiaret, prélevé à partir des points non contrôlés.

En premier lieu nous avons effectué des analyses physico-chimiques et microbiologiques afin de déterminer la qualité sanitaire de l'ben.

Les résultats obtenus ont montré que l'acidité du lait fermenté dépasse les normes et que les analyses microbiologiques révèlent la présence des coliformes fécaux et *staphylococcus aureus* dans les échantillons analysés.

à la lumière de ces résultats nous pouvons dire que l'ben vendu à des points non contrôlés n'est pas propre à la consommation humaine.

Mots clés : L'ben, Lait fermenté, Analyses physico-chimiques, Analyses microbiologiques, traditionnel, contrôle, hygiènes.

ملخص

الهدف من دراستنا هو الكشف عن الجودة الصحية للحليب المخمر (اللبن) الذي يباع بمدينة تيارت في أماكن غير خاضعة للرقابة، من أجل تحديد جودة اللبن قمنا بإجراء تحاليل فيزيوكيميائية ومكروبيولوجية، وقد أظهرت النتائج المتحصل عليها أن حموضة الحليب المخمر تجاوزت المعايير.

بالنسبة إلى نتائج التحاليل المكروبيولوجية فقد أظهرت وجود *staphylococcus aureus* coliforme totaux et fécaux وعلى هذا يمكننا القول أن اللبن المباع غير صالح للاستهلاك.

الكلمات المفتاحية: اللبن، الحليب المخمر، التحاليل الفيزيوكيميائية، التحاليل المكروبيولوجية، النظافة الرقابة، تقليدي.