



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABDES LAGHROUR KHENCHELA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE : Biologie

OPTION: Microbiologie générale

Thème

*Analyse bactériologique et
antibiorésistance de la flore de
contamination du lait collecté à
partir d'une ferme de la région de
Khenchela*

Présenté par :

BOUZIDI Nour El Imene.

Encadré par :

CHORFI K.

Soutenu le 31/05/2016

Jury de soutenance

Président : M^r THABET R (M.A.A)

Invité : P^r BOUMAAZA C.

Encadreur : M^{elle} CHORFI K. (M.A.B)

Examineur : M^{elle} YAKHLEF W. (M.A.A)

Examineur : M^r BOUSSAA A. (M.A.B)

Univ. Abbès Laghrou – Khenchela

Univ. Abbès Laghrou – Khenchela

Univ. Abbès Laghrou – Khenchela

Univ. Abbès Laghrou – Khenchela

Univ. Abbès Laghrou – Khenchela

Promotion : 2016

**Ce travail a été réalisé dans les laboratoires pédagogiques de l'université Abbes Laghrou
Khenchela**

Remerciements

*Je remercie **ALLAH** tout puissant qui ma donné le courage et la volonté et de m'avoir bénie jusqu'à la réalisation de ce modeste travail.*

*Je tiens à remercier particulièrement mon encadreur Madame **CHORFI Keltoum** d'avoir proposé et dirigé ce travail, pour toute l'aide qu'elle m'a fournit pendant la préparation de ce mémoire. Merci pour votre patience ainsi que votre générosité. Je n'ai pas assez des mots pour décrire votre noblesse. Malgré vos multiples occupations, vous étiez toujours disponible. Apprendre à vos cotés a été un grand honneur. Que Dieu vous récompense.*

Mes vifs remerciements vont également aux membres de jury:

*M' **THABET R**, Maitre assistant A à l'Université Abbés Laghrour Khenchela qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury. Je le remercie profondément.*

*M^{elle} **YAKHLEF W.** maitre assistant A à l'Université Abbés Laghrour Khenchela, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*M' **BOUSSAA A.** maitre assistant A à l'Université Abbés Laghrour Khenchela, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*M' **BOUMAAZA C.** Professeur à l'Université Abbés Laghrour Khenchela, je vous remercie infiniment pour avoir accepté d'être notre invité d'honneur.*

*Je remercie également M' **ABAYDIA A-L.** pour son aide précieuse.*

*Nos remerciements vont à tous nos enseignants de la Faculté des Sciences de la nature et de la vie et en particulier **Mr Hamada Yousef** doyen de la faculté.*

*Je remercie aussi Madame **CHORFI R.** responsable des laboratoires pédagogiques de l'université Abbes Laghrour Khenchela pour son accueil et son aide dans le déroulement des expérimentations et aussi tout le personnel.*

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*Je tiens tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux,*

Je dédie ce modeste travail :

*A mon père et ma mère. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler, mes parents qui ont su construire pour moi un monde parfait. Qu'**ALLAH** leur procure bonne santé et longue vie.*

*A mes adorables sœurs : **Meriem, Houda, Malak aridje et Dhikra Hanine** vous avez toujours été présentes par vos bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de mes années d'étude et ma vie personnelle. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*A mon unique frère **Ahmed Mohsine Naiim***

*A mon petit adorable neveu **Baraa-Yassine.***

A mes tantes et leurs époux ainsi que mes oncles et leurs épouses

A mes grands parents

*A l'ingénieur de laboratoire « 4 » **Madjda** qui a été toujours gentille et serviable.*

*A mes chères amies : **Fatima, Asma, Yasmine.***

*A mes amis : **Raouf, Nadjib, Oussama, Merah, Youssef, Mohamed.***

A toute l'équipe Empreinte Ness Lkhfir Khenchela

*A toute la promotion de master microbiologie **Khenchela 2015 /2016***

A tous mes chers enseignants et enseignantes, que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect à vous.

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

Nour El IMENE



Le succès n'est pas final, l'échec n'est pas

fatal : C'est le courage de continuer

qui compte.

Winston Churchill

Table des matières

Liste des tableau.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Liste des photographies.....	iv
Liste des annexes.....	v

Revue bibliographique

Introduction.....	02
-------------------	----

Chapitre I: Généralités sur le lait

I. Généralités sur le lait.....	05
I.1 Définition.....	05
I.2 Qualité nutritionnelle du lait de vache par rapport aux autres espèces	
Laitières.....	05
I.2.1. Eau.....	06
I.2.2. Matière grasse.....	06
I.2.3. Glucides.....	07
I.2.4. Matière azotée.....	07
I.2.5. Matière minérale.....	08
I.2.6. Vitamines.....	09
I.2.7. Hormones.....	10
I.2.8. Enzymes.....	10
I.2.9. Cellules somatiques.....	11
I.2.10. gaz dissous.....	11
I.3. Facteurs de variation de la qualité et de la production du lait.....	11
I.3.1. Facteurs intrinsèques.....	11
I.3.1.1. Facteurs génétiques.....	11
I.3.1.2. Stade de lactation.....	12
I.3.1.3. Etat sanitaire.....	13
I.3.1.4. Age et nombre de vêlage.....	13
I.3.2. Facteurs extrinsèques.....	13
I.3.2.1. Conditions de traite.....	13
I.3.2.2. Facteurs climatiques et saisonnières.....	14
I.3.2.3. Alimentation.....	14
I.4. Propriétés physico-chimiques du lait.....	15
I.4.1. Conductivité électrique.....	15
I.4.2. Ph.....	15
I.4.3. Acidité.....	15
I.4.4. Densité.....	15

I.4.5. Point de congélation.....	15
I.4.6. Point d'ébullition.....	16
I.5. Qualité organoleptique du lait.....	16
I.5.1. Saveur.....	16
I.5.2. Odeur.....	16
I.5.3. Couleur.....	16

Chapitre II : Microbiologie du lait

I. Microbiologie du lait.....	18
I.2. Source de contamination du lait.....	18
I.3. Flore originelle ou lactique.....	19
I.4. Flore de contamination.....	20
I.4.1. Flore d'altération.....	20
I.4.1.1. Bactéries.....	20
I.4.1.1.1. La flore psychrotrophe.....	20
I.4.1.1.2. Flore thermorésistante.....	21
I.4.1.1.3. Indicateurs de contamination fécale.....	21
I.4.1.2. Levures et moisissures.....	22
I.4.2. Les microorganismes potentiellement pathogènes.....	22
I.4.2.1. La flore bactérienne.....	22
I.4.2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	22
I.4.2.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	23
I.4.2.1.3. <i>Salmonella</i>	23
I.4.2.1.4. <i>Escherichia coli</i>	24
I.4.2.2. Moisissures.....	24
I.4.2.3. Virus.....	24
II. Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	25
II.1. Définition de l'antibiorésistance bactérienne.....	26
II.2. Types de résistance.....	26
II.2.1. Résistance naturelle.....	26
II.2.2. Résistance acquise.....	26
II.2.3. Mécanismes d'antibiorésistance.....	27
II.3. La multirésistance.....	28
III. Evaluation de l'antibiorésistance.....	28

Chapitre III : Matériels et méthodes

I. Caractéristiques générales du site d'étude.....	30
II. Procédure d'échantillonnage.....	30
III. Les paramètres microbiologiques.....	31
III.1. Les dilutions décimales en série.....	31
III.2. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux.....	32
III.3. Recherche et dénombrements des indicateurs de contamination fécale.....	33
III.3.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux.....	33

III.3.1.1. Test de présomption.....	33
III.3.1.2. Test de confirmation ou test de Mac Kenzie.....	33
III.3.1.3. Repiquage sur milieux sélectifs solides.....	34
III.3.1.4. Revivification et purification.....	34
III.3.1.5. Tests complémentaires.....	34
III.3.1.5.1. Coloration de GRAM.....	34
III.3.1.5.2. Identification biochimique par galerie API 20 E.....	35
III.3.1.6. Antibiogramme.....	37
III.3.2. Recherche des Entérocoques fécaux en milieu liquide.....	39
III.3.2.1. Test de présomption.....	39
III.3.2.2. Test de confirmation ou test de Mac Kenzie.....	39
III.4. Recherche des germes pathogènes.....	40
III.4.1. Recherche des Salmonelles.....	40
III.4.1.1. Pré-enrichissement.....	40
III.4.1.2. Enrichissement.....	40
III.4.1.3. Ensemencement sur milieux sélectifs.....	40
III.4.1.4. Purification et Identification.....	40
III.4.2. Recherche des <i>Staphylococcus aureus</i>	41
III.4.2.1. Test catalase.....	41
III.4.2.2. Test Coagulase.....	41
III.5. Recherche et dénombrement des levures et moisissures.....	42
IV. Control de qualité par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier.....	43
IV.1. Principe de la spectroscopie.....	43
IV.2 Protocole d'une spectroscopie FTIR.....	44
IV.2.1 Préparation de l'échantillon en pastille de KBr.....	44
IV.2.2. Acquisition des spectres d'absorption FTIT.....	44

Chapitre IV : Résultats et discussion

I. Dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux.....	47
II. Dénombrements des indicateurs de contamination fécale.....	47
II.1 Dénombrement des coliformes totaux et fécaux.....	47
II.2 Dénombrement des Entérocoques fécaux.....	48
II.3. Repiquage et purification des coliformes thermotolérants.....	51
II.4. Identification biochimique des isolats.....	53
III. Antibiorésistance des espèces identifiées.....	55
III.1 Multirésistance des espèces identifiées.....	57
IV. Recherche des germes pathogènes.....	58
IV.1. Recherche des <i>Salmonella</i>	58
IV.1.1. Identification biochimique des isolats.....	59
IV.1.2. Profil de résistance aux antibiotiques.....	62
IV.2.3. Multirésistance.....	64
IV.2. Dénombrement et recherches des <i>Staphylococcus aureus</i>	65

IV.2.1. Aspect macroscopiques et microscopiques des isolats.....	65
IV.3. Dénombrement et recherche des moisissures.....	68
V. Control de qualité par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier.....	70
Conclusion générale et perspectives	72
Références bibliographiques	75
Annexes	
Résumé	
Abstract	
Résumé arabe	

Liste des tableaux

Tableau I : Composition chimique moyenne du lait de différentes espèces (g/L).....	06
Tableau II : Composition lipidique moyenne du lait de vache.....	07
Tableau III : Composition vitaminique moyenne du lait cru.....	09
Tableau IV : Caractéristiques des principaux enzymes du lait.....	10
Tableau V : Niveau de production et composition moyenne de la traite matinale du lait de vache selon les stades de lactation.....	13
Tableau VI : Principales caractéristiques des bactéries lactiques.....	19
Tableau VII : Liste des antibiotiques testés, charge et classification des disques.....	38
Tableau VIII : Dénombrement des coliformes totaux et thermorésistants.....	48
Tableau IX : Dénombrement des Entérocoques fécaux.....	49
Tableau X : Résultats de l'étude macro et microscopique des Streptocoques fécaux.....	50
Tableau XI : Critères microbiologiques du lait cru (Arrêté interministériel du 24-01-1998 du JO de la République Algérienne).....	51
Tableau XII : Résultats de l'étude macroscopique et microscopique des souches des coliformes thermotolérants.....	52
Tableau XIII : Résultats d'identification des coliformes thermorésistants par la galerie API 20 E.....	54
Tableau XIV : La classe de résistance aux antibiotiques des coliformes thermotolérants.....	56
Tableau XV : Les taux de résistance aux antibiotiques des coliformes thermotolérants.....	56
Tableau XVI : Résultat de l'identification biochimique des bactéries par les galeries API 20E.....	60
Tableau XVII : La résistance aux antibiotiques des espèces identifiées.....	63
Tableau XVIII : Les taux de résistance aux antibiotiques des espèces identifiées.....	63
Tableau XIX : Résultats de l'étude macroscopique et microscopique des souches identifiées.....	66
Tableau XX : Résultats d'identification des <i>Staphylococcus</i> isolées.....	68

Liste des figures

Figure 01 : Répartition des fractions azotées du lait.....	08
Figure 02 : Composition minérale moyenne d'un litre du lait cru.....	09
Figure 03 : les différentes races des vaches laitières (Jersiaise, Montbéliarde, Holstein, Ayrshire).....	12
Figure 04 : Techniques de traite (manuelle et mécanique).....	14
Figure 05 : Différentes sources de contamination du lait cru.....	18
Figure 06 : Les différents mécanismes d'antibiorésistance.....	27
Figure 07 : L'aspect des bactéries après la coloration de GRAM.....	35
Figure 08 : La galerie API.....	35
Figure 09 : Disposition des disques d'antibiotiques sur les boîtes d'antibiogramme.....	38
Figure 10 : Test de Catalase.....	41
Figure 11 : Principe du test Coagulase.....	42
Figure 12 : Pourcentage d'espèces bactériennes identifiées.....	53
Figure 13 : Pourcentage d'isolats de coliformes thermotolérants résistants à divers antibiotiques.....	53
Figure 14 : Pourcentage d'isolats des coliformes résistants à au moins 1, 2, 3, 4, et 5 antibiotiques.....	57
Figure 15 : Pourcentage d'espèces bactériennes identifiées à partir de la gélose <i>Salmonella</i> – <i>Shigella</i>	62
Figure 16 : Pourcentage des souches résistantes (taux de résistance).....	64
Figure 17 : Pourcentage d'isolats des souches résistantes à au moins 1, 2, 3, 4, 5 antibiotiques.....	65

Liste des photographies

Photographie 01 : Vue générale de la station d'épuration de la ville de Khenchela et le site de notre étude.....	30
Photographie 02 : Les vaches traitées et parcelles de terrain de notre site d'étude.....	31
Photographie 03 : Spectrophotomètre IR à transformée de Fourier (FTIR ou IRTF).....	44
Photographie 04 : Préparation de l'échantillon en pastille de KBr.....	44
Photographie 05 : Presse hydraulique.....	45
Photographie 06 : Pastille finale du lait cru.....	45
Photographie 07 : Résultats d'isolement sur gélose PCA.....	47
Photographie 08 : Résultat du dénombrement des coliformes totaux et fécaux. A : Test présomptif, B : Test Confirmatif.....	48
Photographie 09 : Résultat du dénombrement des Entérocoques fécaux A : Test présomptif, B : Test Confirmatif.....	49
Photographie 10 : Aspect des colonies des Entérocoques fécaux sur BEA.....	49
Photographie 11 : Aspects macroscopique des souches des coliformes thermotolérants après purification.....	51
Photographie 12 : Les espèces bactériennes identifiées et l'aspect de leurs galeries biochimique.....	53
Photographie 13 : Photographies des antibiogrammes des espèces de CTT identifiés.....	55
Photographie 14 : Résultat de l'enrichissement sur bouillon au sélénite et eau peptonée tamponnée.....	58
Photographie 15 : Résultat de la culture sur la gélose <i>Salmonella-Shigella</i> (SS).....	59
Photographie 16 : Aspect macroscopique des cultures pures sur gélose SS.....	59
Photographie 17 : Aspect des galeries biochimique des espèces bactériennes apparues sur la gélose <i>Salmonella-Shigella</i>	61
Photographie 18 : Photographies des antibiogrammes des espèces identifiées.....	62
Photographie 19 : Aspects des colonies sur gélose Chapman.....	65
Photographie 20 : Aspect des colonies des souches identifiées après repiquage.....	66
Photographie 21 : Test de coagulase, 01 Négatif et 02 Positif.....	67
Photographie 22 : Test de catalase.....	67
Photographie 23 : Aspect des champignons sur milieu OGA (dilution 10^{-2}).....	69
Photographie 24 : Aspect des champignons sur milieu OGA (dilution 10^{-1}).....	69
Photographie 25 : Aspect des champignons sur milieu OGA (Solution mère).....	69

Liste des abréviations

% : Pourcentage.
°C : Degré Celsius.
ADH : Arginine dehydrolase.
ADN : Acide désoxyribonucléique.
AFNOR : Agence Française de normalisation.
AK : Amikacine.
AMC : Amoxicilline + acide clavulanique.
AMP : Ampicilline.
API 20 E : Appareillage et Procédés d'Identification des Entérobactéries.
ARN : Acide ribonucléique.
ATB : Antibiotique.
BEA : Bile esculine azide.
BMR : Bactéries multi résistantes.
CIT : Citrate de sodium.
CMB : Concentration minimale bactéricide.
CMI : Concentration minimale inhibitrice.
CN : Gentamicine.
CO₂ : Dioxyde de carbone.
CT : Coliformes totaux.
CT : Colistine.
CTT : Coliformes thermotolérants.
CXT : Céfotaxime.
EPII : Eau peptonnée exempt d'indole.
F : Furanes.
FF : Fosfomycine.
g : Gramme.
G⁻ : GRAM négatif.
G: Grossissement.
G⁺ : GRAM positif.
GLU: Glucose.
h : Heure.
H₂S : Thiosulfate de sodium.
I : Intermédiaire.
IND: Indole.
ISO : Organisation internationale de normalisation.
IβL : les inhibiteurs des β-lactamases.
KAZ : Céfotaxime.
Lac : Lactose.
LDC : Lysine décarboxylase.
MAN: Mannitol.
ml : Millilitre.
mm: Millimètre.

mn : Minute.
ODC : Ornithine décarboxylase.
OFX : Ofloxacine.
OMS : L'Organisation Mondiale de la Santé.
ONPG: Ortho-nitro-phenyl β -D- galactopyranoside.
pH : Potentiel hydrogène.
PLP : Protéines de liaison à la pénicilline.
R : Résistante.
RHA: Rhamnose.
S : Sensible.
S : Streptomycine.
SAC: Saccharose.
SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline.
sp: Espèce.
SS : Salmonella-Shigella.
T : Température.
TB : Taux butyreux.
TDA: Tryptophane Désaminase.
UFC : Unité Formant une Colonie.
URE: Urée.
VBL : bouillon lactosé bilié au vert brillant.
 μ g/l: Microgramme par litre.

Liste des annexes

Annexe 01. Composition des milieux de culture.

Annexe 02. Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E.

Annexe 03. Composition des additifs.

Annexe 04. Composition des colorants de Gram.

Annexe 05. Interface du logiciel d'identification API Excel.

Annexe 06. Résistances naturelles aux β lactamines des espèces de bacilles non exigeants.

Annexe 07. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Entérobactéries*.

Annexe 08. Table de MAC - GRADY

Annexe 09. Matériel et réactifs utilisés.

Introduction

Introduction

La dénomination « lait » est réservée exclusivement aux produits de la sécrétion mammaire normale, obtenus par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction et n'ayant pas été soumis à un traitement thermique. (1)

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec près de trois milliards de litres par an. Cet aliment occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, il apporte la plus grande part des protéines d'origine animale. Acteur clé de l'industrie agroalimentaire, la filière lait connaît une croissance annuelle de 8 % en Algérie. (2)

Le lait est un aliment de haute valeur nutritionnelle très riche en protéines, lipides, glucides et surtout par un apport en oligo-éléments tel que le calcium. Sa production doit être sévèrement contrôlée en raison des risques éventuels qu'il peut présenter pour la santé humaine. En effet, des souches pathogènes pour l'Homme et l'Animal, pouvant avoir acquis des résistances multiples aux antibiotiques peuvent y proliférer. Une évaluation de la qualité hygiénique du lait permet de rechercher la microflore naturelle et des microorganismes témoins de contaminations extra-mammaires éventuelles. (3)

Le lait n'est pas seulement un aliment nutritif pour l'homme mais il est souvent un milieu de culture idéale pour la croissance microbienne. Par conséquent il peut être sujet à de nombreuses altérations et contaminations lors de la traite ou la collecte par les microorganismes dont certains sont potentiellement pathogènes de point de vue sanitaire. Le lait cru et les produits laitiers contaminés ont été associés à des intoxications alimentaires causées par *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* entérohémorragique.

Donc les consommateurs doivent être attentifs aux qualités sanitaires des laits. Ces qualités dépendent en grande partie de la composition physicochimique et microbiologique depuis la matière première jusqu'à la fabrication du produit fini.

Afin de surveiller l'innocuité des aliments, il est impératif d'évaluer le degré de contamination microbiologique du lait cru destiné à la consommation humaine, ce qui nous a motivé pour le choix de ce thème, dont **l'objectif principal** a été la mise en évidence de la qualité hygiénique et sanitaire du lait cru de vache dans la région de Khenchela (Algérie).

Le site choisi pour cette étude est une petite ferme traditionnelle, son propriétaire élève quelques vaches en plus de petites parcelles de terrains cultivés avec différentes cultures

agricoles. Il utilise l'eau traitée à la sortie de la station d'épuration de la ville de kenchela pour irriguer son champ et élever ses vaches.

Notre recherche concernera le dénombrement des germes témoins de défaut d'hygiène : flore mésophile aérobie totale, coliformes totaux, coliformes fécaux, *Escherichia coli* et Entérocoques fécaux, ainsi que les germes pathogènes : *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, aussi que le dénombrement des moisissures et des levures comme microorganismes d'altération.

Chapitre 01

I. Généralités sur le lait

I.1. Définition

Le lait est un liquide blanc, opaque sécrété par les glandes mammaires de la femme et des femelles des mammifères, c'est un aliment très riche en graisses émulsionnées, en protides, en lactose, en vitamines, en sels minéraux et qui assure la nutrition des jeunes au début de leur vie.

(4)

Le Codex Alimentarius en 1999, le définit comme étant la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur. (5)

La dénomination « lait » sans indiquer l'espèce animale dont il provient renvoie uniquement au lait de vache. (6)

Le lait cru est le lait qui sort directement du pis de la vache. N'ayant subi aucun traitement thermique (au-delà de 40°C) ou non thermique afin de réduire la concentration en microorganismes, celui-ci conserve toute la flore microbienne d'origine et doit donc être consommé dans les 48 heures suivant la traite et se conserver au frais (entre 2 et 4°C). (7)

La pasteurisation et la stérilisation à ultra haute température (UHT) sont des techniques de conservation du lait par traitement thermique. La pasteurisation s'effectue à 71,5° pendant 15 secondes, puis le lait est rapidement refroidi à 4°C. Cette technique permet de conserver au mieux les qualités gustatives du lait cru. Le lait pasteurisé doit être conservé au réfrigérateur (entre 7 et 15 jours selon la date indiquée sur l'emballage). La stérilisation UHT consiste à porter le lait à plus de 135°C pendant 3 secondes seulement avant de le refroidir. La rapidité du traitement permet de préserver les qualités nutritionnelles du lait. Le lait UHT se garde entre 90 et 150 jours à température ambiante. (8)

I.2. Qualité nutritionnelle du lait de vache par rapport aux autres espèces laitières

La vache assure de loin la plus grande part de la production mondiale de lait (90%), même en pays tropicaux (70%). (9) Ce lait est de tous le plus connu et les données qui le caractérisent sont sans doute les plus exactes. Il est logiquement aussi le produit laitier le plus consommé et étudié en nutrition humaine.

Les laits sécrétés par les différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composants: eau, protéines, lactose, matières grasses (lipides) et minérales. Cependant, les proportions respectives de ces composants varient largement d'une espèce à l'autre (**Tableau I**). Cette variabilité peut dépendre de la nutrition, du stade de lactation, de l'âge, de l'époque de l'année et du débit lacté.

Tableau I : Composition chimique moyenne du lait de différentes espèces (g/L). **(10)**

	Matière sèche	Matière protéique	Lipides (MG)	Lactose	Cendres (MM)	Calcium (Ca)	Phosphore (P)
Vache	132	35	38	50	7,2	1,25	0,95
Chèvre	115	34	35	45	8	1,35	1
Brebis	185	60	70	45	8,7	1,9	1,5
Buffle	174	38	77	48	7,8	1,8	1,8
Jument	105	25	16	61	4,5	1	0,6
Femme	120	13	39	70	2	0,3	0,15

Chez toutes les espèces, le lait apparaît comme un aliment riche en calcium et en phosphore (à l'exception du lait de femme), en lactose, en matières grasses et en protéines. Parmi ces laits, le lait de vache est un lait relativement pauvre en matière grasse, moyennement riche en lactose et en protéines et assez riche en calcium et en phosphore. Le lait de brebis est particulièrement riche en lipides et en protéines, ce qui explique son utilisation majoritairement dans la fabrication fromagère, alors que la composition du lait de chèvre s'apparente plus celle du lait de vache. **(10)**

Le lait de vache est un liquide très aqueux mais dont la composition pondérale en glucides, lipides et protides est remarquablement équilibrée, avec en plus un choix intéressant en sels, en vitamines et en enzymes. **(11)**

D'un point de vue physico-chimique, le lait est complexe en raison de son organisation, des interactions existant entre ses divers constituants et de la variabilité de sa composition qui dépend de l'espèce, de la race, du régime alimentaire et de la période de lactation. **(12)**

I.2.1. Eau

L'eau est quantitativement le constituant principal du lait : 900 à 905 g par litre. C'est une propriété à ne pas négliger car il contribue ainsi à hydrater l'organisme. **(13)**

L'eau de lait se trouve sous deux formes : l'eau libre (96% de la totalité) et l'eau liée (4%) liée à la matière sèche. **(14)**

I.2.2. Matière grasse

La matière grasse est présente dans le lait sous forme d'une émulsion de globules gras. La teneur en matière grasse du lait est appelée taux butyreux (TB). **(15)**

Le lait contient en moyenne 40 g de matières grasses par Kg. Celles-ci se composent de 97% de triglycérides (trois acides gras attachés à une molécule de glycérol) et de 1% de phospholipides. Le reste étant constitué de stérols et des vitamines liposolubles, qui ont un rôle nutritionnel et organoleptique déterminant. **(16)**

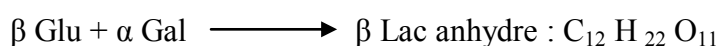
Tableau II : Composition lipidique moyenne du lait de vache. (12)

Classes de lipides	Pourcentage des lipides
Triacylglycérols	97.5
Diacylglycérols	0.36
Monoacylglycérols	0.027
Acides gras libres	0.027
Cholestérols	0.31
Hydrocarbures	Traces
Caroténoïdes	0.008
Phospholipides	0.6

L'origine des acides gras du lait est double : soit synthétisés au niveau de la mamelle à partir de précurseurs sanguins : l'acétate et le butyrate d'origine ruminale. Ces acides gras sont nettement plus abondants dans le lait des ruminants que dans le lait des monogastriques. Soit directement prélevés dans le plasma sanguin. Ils proviennent de l'alimentation, des réserves adipeuses ou d'une synthèse dans d'autres tissus que la mamelle. (12)

I.2.3. Glucides

Le sucre principal du lait est le lactose ; c'est aussi le composé prépondérant de la matière sèche totale. Sa teneur s'élève en moyenne à 50g par litre. C'est un disaccharide constitué par de l' α ou β glucose uni à du β galactose, ce qui est à l'origine de la présence de 2 lactoses. (17)



Le lactose est le seule glucide libre dans le lait, synthétisé par la glande mammaire à partir du glucose prélevé dans le sang. Il joue un rôle nutritionnel particulier et intervient également comme élément de fermentescibilité. Il peut être hydrolysé par les acides forts, mais surtout par la lactase. La saveur sucrée du lactose est faible; lorsqu'on impute au saccharose une valeur arbitraire de 100%, celle du lactose atteint environ le tiers (de 27 à 39%). (15)

I.2.4. Matière azotée

La matière azotée de lait englobe deux groupes, les protéines et les matières non protéiques qui représentent respectivement 95% et 5% de l'azote minérale du lait. Les protéines se répartissent en 2 phases : une phase micellaire représente la caséine totale (environ 78% des protéines du lait) du lait. Elle est formée par quatre protéines individuelles : (17)

- ✓ Alpha-caséine : caséine α_{s1} (36%) et caséine α_{s2} (10%).
- ✓ Beta-caséine : caséine β (34%).
- ✓ Kappa-caséine : caséine κ (13%).

✓ Gamma-caséine : caséine γ (7%) qui est un produit de la protéolyse de la β -caséine.

Une propriété importante des micelles est de pouvoir être déstabilisée par voie acide ou par voie enzymatique et de permettre la coagulation. Elle constitue le fondement de la transformation du lait en fromage et en laits fermentés. (14)

La deuxième phase ou la phase soluble, englobe les protéines du lactosérum (β -lactoglobuline et α -lactalbumine, sérumalbumine et immunoglobuline plus les protéoses peptones) qui représentent 17% de la matière azotée.

Les protéines du lactosérum sont des protéines d'excellente valeur nutritionnelle, riche en acides aminés soufrés, en lysine et tryptophane. Elles ont de remarquables propriétés fonctionnelles mais sont sensibles à la dénaturation thermique. (18)

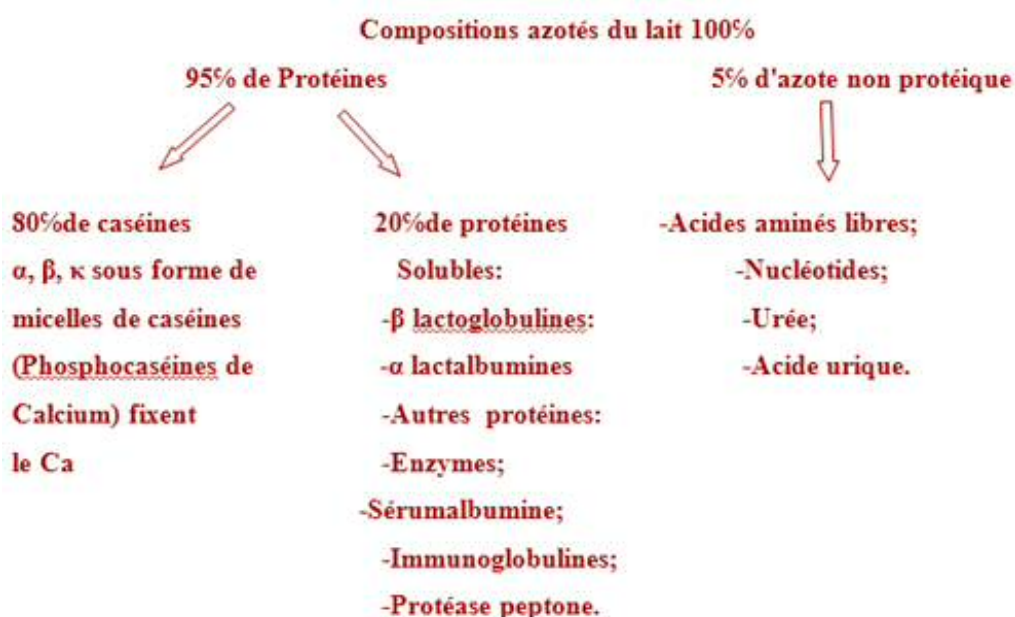


Figure 01 : Répartition des fractions azotées du lait (19)

I.2.5. Matière minérale

Le lait contient tous les éléments minéraux indispensables à l'organisme. La matière minérale et saline du lait constitue environ 9 g/l. Les matières minérales ne se sont pas exclusivement sous la forme de sels solubles (molécules et ions). Une partie importante se trouve dans la phase colloïdale insoluble (micelles de caséines). (20)

Le lait et les produits laitiers sont les principales sources alimentaires du calcium, phosphore, potassium, magnésium, chlore, citrate et sodium, pour lesquels ils couvrent plus de la moitié de nos besoins journaliers. Se sont des éléments plastiques intervenant dans l'ossification, et leurs apport est crucial pour les sujets jeunes et âgés. (21)

Le lait contient également les oligo-éléments indispensables pour l'organisme humain tels que le zinc, le fer, le cuivre, le fluor, l'iode, le sélénium, l'aluminium, le manganèse et le molybdène. (22)

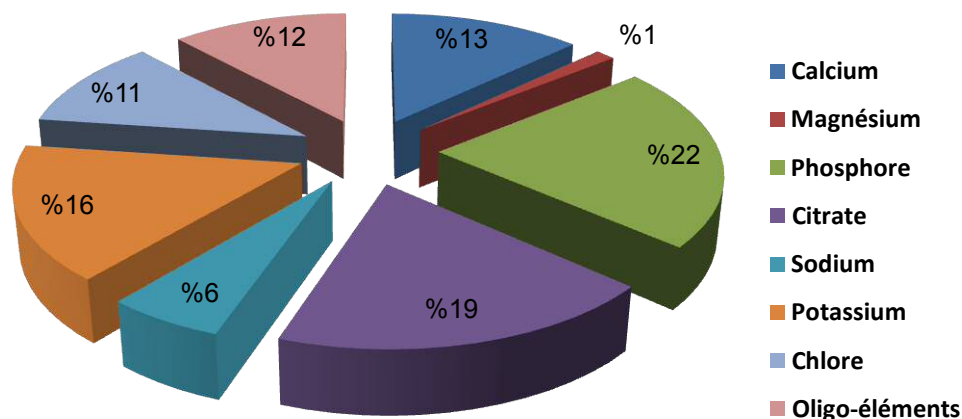


Figure 02 : Composition minérale moyenne d'un litre du lait cru

I.2.6. Vitamines

Les vitamines sont nécessaires au fonctionnement normal des processus vitaux et les aliments doivent en apporter en quantité suffisante. Le lait est une source non négligeable de ces substances. On classe généralement les vitamines en deux catégories :

- ✓ **Les vitamines hydrosolubles** (vitamines du groupe B - proviennent principalement de la biosynthèse des bactéries du rumen- vitamine C) qui se retrouvent dans la phase aqueuse.

- ✓ **Les vitamines liposolubles** (vitamines A, D, E, K – leur taux dépend énormément de facteurs exogènes-) qui sont associées a la matière grasse. (23)

Tableau III : Composition vitaminique moyenne du lait cru (18)

Vitamines liposolubles	Teneur moyenne
Vitamine A (+carotènes)	40µg/100ml
Vitamine D	2.4µg/100ml
Vitamine E	100µg/100ml
Vitamine K	5µg/100ml
Vitamines hydrosolubles	
Vitamine C (acide ascorbique)	2mg/100ml
Vitamine B1 (thiamine)	45µg/100ml
Vitamine B2 (riboflavine)	175µg/100ml
Vitamine B6 (pyridoxine)	50µg/100ml
Vitamine B12 (cyanocobalamine)	0.45µg/100ml
Niacine et niacinamide	90µg/100ml
Acide pantothénique	350µg/100ml
Acide folique	5.5µg/100ml
Vitamine H (biotine)	3.5µg/100ml

I.2.7. Hormones

Ce n'est que tout récemment que des études approfondies ont été entreprises sur la présence des hormones dans le lait.

Les hormones que l'on peut retrouver dans le lait appartiennent aux protéohormones et hormones peptidiques et aux hormones stéroïdes. La principale hormone est la prolactine qui régit la production du lait de la mère. (23)

Personne ne pense qu'avec un verre de lait, il avale un cocktail d'au moins 20 différentes hormones dont le rôle est d'aider l'organisme du jeune veau, à démarrer de façon optimale. Ce sont les hormones de croissances qui sont au même temps impliquées dans les cancers.

Le même verre de lait donne une dose d'hormones sexuelles, œstrogène et progestérone qui interviennent dans des problèmes de stérilité et de puberté précoce chez les femmes et surtout dans le cancer du sein. (24)

I.2.8. Enzymes

Ce sont des substances organiques de nature protidique, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Plus de 60 enzymes principales ont pu être isolées du lait ou dont l'activité a été déterminée. La moitié d'entre elles sont des hydrolases.

Ces enzymes sont soit originelles du lait ou bien produites par des bactéries, dont leurs rôle est très important en fonction de leurs propriétés :

- ✓ Lyses des constituants originels du lait : ayant des conséquences importantes sur le plan technologique et sur les qualités organoleptiques du lait (lipases, protéases).
- ✓ Rôle antibactérien, elles apportent une protection au lait : bactéricide (lactoperoxydase et lysozyme). (17)

Tableau IV : Caractéristiques des principaux enzymes du lait. (18)

Groupe d'enzyme	Classes d'enzymes	pH	T° (°C)	Substrats
Hydrolases	Estérases			
	Lipases	8.5	37	Triglycérides
	Phosphatase alcaline	9-10	37	Esters phosphoriques
	Phosphatase acide	4.0-5.2	37	Esters phosphoriques
	Protéases			
	Lysozyme	7.5	37	Parois cellulaire microbienne
	Plasmine	8	37	Caséines
Déshydrogénases ou oxydases	Sulfhydrile oxydase	7	37	Protéines, peptides
	Xanthine oxydase	8.3	37	Bases puriques
Oxygénases	Lactoperoxydase	6.8	20	Composés réducteurs+H ₂ O ₂
	Catalase	7	20	H ₂ O ₂

I.2.9. Cellules somatiques

Le lait contient toujours une certaine quantité de cellules, en plus de ses différents composants (eau, lactose, gras, protéines, minéraux et vitamines). Les deux grands types de cellules somatiques rencontrés sont les cellules épithéliales et les leucocytes. Les cellules épithéliales sont des cellules qui tapissent normalement l'intérieur du pis et qui se sont détachées des alvéoles, alors que les leucocytes (des lymphocytes (B ou T) : 17 à 27 %, des leucocytes polynucléaires neutrophiles : 0 à 11 %) sont des cellules du système immunitaire. (25) Même en l'absence d'infection intra-mammaire, plus de 85% des cellules somatiques du lait sont des leucocytes, alors que cette proportion passe à plus de 99% si le quartier doit combattre une infection (cas de mammite). (26)

Le nombre de cellules par ml de lait varie normalement entre 5000 et 10 millions environ, pour un échantillon composite du lait des 4 quartiers d'une vache. (27)

I.2.10. gaz dissous

Le lait contient des gaz dissous, essentiellement du dioxyde de carbone (CO₂), du diazote (N₂) et du dioxygène (O₂).

I.3. Facteurs de variation de la qualité et de la production du lait

La composition chimique du lait et ses caractéristiques varient sous l'effet d'un grand nombre de facteurs. Ces principaux facteurs de variation sont bien connus, ils sont soit intrinsèques liés à l'animal (facteurs génétiques, stade de lactation, âge, état sanitaire ...) soit extrinsèques liés au milieu et à la conduite d'élevage (conditions de traite, climat, alimentation).

Les facteurs génétiques et alimentaires restent donc les principaux leviers d'action. Mais si la sélection génétique a un effet moyen et a long terme, l'alimentation, elle peut agir rapidement. (20)

I.3.1. Facteurs intrinsèques

I.3.1.1. Facteurs génétiques

La génétique a une forte influence sur le niveau de production et plus encore sur les taux, notamment de matière grasse (qui décide du rendement en beurre) et de protéines (qui commandent fortement le rendement en fromage). (28)

Il existe de grands écarts dans la composition chimique du lait d'une race à l'autre, surtout pour la teneur en matière grasse. En effet, les races Jersey et Guernesey sont connues par des laits très riches en matière grasse, alors que les races Holstein et Ayrshire se distinguent par des laits relativement plus dilués.

Pour le taux protéique, il a été montré que les races Jersey, Guernesey et Montbéliarde se distinguent par des laits très riches en protéines, par rapport aux laits produits par les races Holstein et Ayrshire. (29)



Figure 03 : les différentes races des vaches laitières (Jersiaise, Montbéliarde, Holstein, Ayrshire)

I.3.1.2. Stade de lactation

Le stade de lactation a eu un effet sur la quantité de lait produite, corrélée avec la qualité physico-chimique du lait.

Les teneurs du lait en matières grasses et protéiques évoluent de façon inverse à la quantité de lait produite. Elles sont élevées en début de lactation, elles chutent jusqu'à un minimum au deuxième mois de lactation après un palier de 15 à 140 jours. Les taux croissent plus rapidement dans les trois derniers mois de lactation. (30)

Tableau V : Niveau de production et composition moyenne de la traite matinale du lait de vache selon les stades de lactation. (31)

Stade de lactation et quantité (L)	Densité (g/kg)	Matières grasses (g/kg)	Matières protéiques (g/kg)	Lactose (g/kg)	Matières minérales (g/kg)	Point de congélation (°C)
début 12.24	1030	39.8	32.4	42.1	6.47	-0.49
milieu 10.07	1031	38.7	32.9	43.3	6.64	-0.50
Fin 7.87	1031	41.9	34.2	44.7	6.86	-0.52

I.3.1.3. Etat sanitaire

En cas d'infection, l'altération de la capacité de filtration de la mamelle conduit à une mobilisation accrue des éléments d'origine sanguine, ce qui provoque l'augmentation de la teneur du lait en protéines solubles et en minéraux. (29)

La numération des cellules somatiques du lait est un bon indicateur de l'état sanitaire mammaire de la vache. (26)

I.3.1.4. Age et nombre de vêlage

La quantité de lait augmente généralement du 1^{er} vêlage au 5^{eme}, puis diminue sensiblement et assez vite à partir du 7^{eme} vêlage.

Le vieillissement des vaches provoque un appauvrissement de leur lait, ainsi la richesse du lait en matière sèche tend à diminuer. Ces variations dans la composition sont attribuées à la dégradation de l'état sanitaire de la mamelle ; en fonction de l'âge, le nombre de mammites croit et la proportion de protéines solubles augmente en particulier celles provenant du sang. (17)

I.3.2. Facteurs extrinsèques

I.3.2.1. Conditions de traite

La production d'un lait de bonne qualité nutritionnelle et hygiénique n'exige pas des installations coûteuses dans la ferme, mais surtout un suivi rigoureux et permanent des bonnes pratiques d'hygiène tout le long du circuit de sa production notamment à la traite (hygiène de trayeur et de la vache même).

Trayeur

✓ Bon état de santé : pour éviter la pollution du lait et la contagion de certaines maladies (tuberculose) à la vache.

✓ Propreté : le vacher, avant de commencer à traire, doit se laver soigneusement les mains et les essuyer avec un linge propre. (17)

✓ Lorsque la machine à traire est mal installée, mal réglée ou mal utilisée, elle favorise l'apparition ou la dissémination de mammites. Elle peut agir en étant de vecteur de microbes. Pour comprendre son influence sur la santé des mamelles, il est nécessaire de bien connaître son fonctionnement. (32)



Figure 04 : Techniques de traite (manuelle et mécanique). (33)

Vache

✓ Propreté de la mamelle : elle sera acquise par le passage sur le pis d'un linge propre trempé de solution légèrement antiseptique tiède.

✓ Santé : on détectera précocement et systématiquement les maladies particulièrement dangereuses : tuberculose, mammites. (34)

✓ Ejection des 4 premiers jets de chaque mamelon (pour éliminer le lait qui a séjourné longtemps dans le canal de trayon, ce lait est généralement plein de bactéries). (35)

I.3.2.2. Facteurs climatiques et saisonnières

La saison a une influence importante qui se rajoute aux autres facteurs (alimentation, stade de lactation, âge) de façon immuable, le TB passe par un minimum en juin – juillet et par un maximum à la fin de l'automne. La teneur en protéines passe par deux minimums : un à la fin de l'hiver et l'autre au milieu de l'été et par deux maximums à la mise à l'herbe et à la fin de la période de pâturage. (36)

Les variations dans la concentration des paramètres nutritionnels du lait selon la saison s'expliquent surtout par la disponibilité alimentaire. La saison chaude, se caractérise par un appauvrissement du pâturage et à un épuisement des stocks alimentaires. (37)

I.3.2.3. Alimentation

L'alimentation joue un rôle important ; elle permet d'agir à court terme et de manière différente sur les taux de matière grasse et de protéines. En effet, le taux protéique varie dans le même sens que les apports énergétiques, il peut aussi être amélioré par des apports spécifiques en acides aminés (lysine et méthionine). Quant au taux butyreux, il dépend à la fois de la part

d'aliment concentré dans la ration, de son mode de présentation et de distribution (finesse de hachage, nombre de repas, mélange des aliments). (38)

I.4. Propriétés physico-chimiques du lait

I.4.1. Conductivité électrique

Elle est utilisée pour évaluer la teneur ionique totale du lait et est définie comme la mesure de la résistance électrique de la solution en ohms réciproques (ohms). Les éléments qui contribuent le plus à la conductivité sont le sodium, le potassium et les ions de chlorure. Comme les quantités de sodium et de chlorure augmentent en cas de mammite, des mesures de la conductivité du lait sont employées pour détecter des cas cliniques de la maladie. (39)

I.4.2. pH

Le pH du lait normal est de l'ordre de 6.7, cela est due en grande partie aux groupements basiques ionisables et acides dissociables des protéines, aux groupements esters phosphoriques de caséines et aux acides phosphoriques et lactique. Les valeurs du 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. (40)

I.4.3. Acidité

L'acidité titrable du lait exprimée en degrés DORNIC correspond à une quantité d'acide lactique que l'on neutraliserait avec de la soude en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré, de telle sorte qu'1°D équivaldrait à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait. (41)

L'acidité naturelle du lait est principalement due à la présence de protéines, surtout les caséines et la lactalbumine, de substances minérales telles que les phosphates, CO₂, et acides organiques le plus souvent l'acide citrique. L'acidité du lait est de 14 à 17° D. (42)

Sous l'effet des bactéries lactiques, la teneur en acide lactique augmente et donne une nouvelle acidité nommée acidité développée. (43)

I.4.4. Densité

La densité du lait d'une espèce donnée n'est pas une valeur constante. À 15°C elle varie de 1.028 à 1.035 pour une moyenne de 1.032. (40) Deux facteurs de variation opposés la déterminent :

- ✓ La concentration des éléments dissous et en suspension (solides non gras). La densité varie proportionnellement à cette concentration.
- ✓ La proportion de matière grasse. Celle-ci ayant une densité inférieure à 1. La densité globale du lait varie de façon inverse à la teneur en graisse. (20)

I.4.5. Point de congélation

La mesure du point de congélation du lait de troupeau est couramment utilisée pour contrôler l'absence de mouillage lors de la traite, de la conservation ou de la collecte. Le cas échéant, la quantité d'eau additionnée est évaluée en comparant cette mesure au point de congélation authentique du lait, qui est normalement compris entre - 0,525 et - 0,530° C. (44)

I.4.6. Point d'ébullition

En raison des composants dissous, le point d'ébullition du lait est plus élevé que celui de l'eau pure et se situe entre 100,07 et 100,15°C. (39)

I.5. Qualité organoleptique du lait

I.5.1. Saveur

Il est difficile de définir cette caractéristique du lait normal car elle provient de l'association d'éléments diversement appréciés selon l'observateur. En effet, on distingue la saveur douce du lactose, la saveur salée du NaCl, la saveur particulière de lécithines qui s'équilibre et qui est atténuée par la masse des protéines. (43)

I.5.2. Odeur

L'odeur est caractéristique du lait du fait de la matière grasse qu'il contient et qui fixe des odeurs animales. Elles sont liées à l'ambiance de la traite, à l'alimentation (les fourrages à base d'ensilage favorisent la flore butyrique, le lait prend alors une forte odeur), à la conservation (l'acidification du lait à l'aide de l'acide lactique lui donne une odeur aigrelette). (45)

I.5.3. Couleur

Le lait est un liquide blanc mat, cette couleur est due en grande partie à la matière grasse. (46) La couleur varie du blanc au jaune en fonction de la coloration (teneur en carotène) de la matière grasse). (40)

Chapitre 02

I.1. Microbiologie du lait

Un litre de lait cru contient plusieurs milliards d'êtres microscopiques. Cette caractéristique différencie le lait cru des laits traités thermiquement ou microfiltrés. Ce monde microbien appelé flore microbienne a des implications à plusieurs niveaux. La diversité microbienne est utile pour la transformation des produits laitiers mais peut aussi impliquer la présence de bactéries potentiellement dangereuses pour la santé humaine, (47) avec pour résultante l'altération du produit ou les infections/intoxications chez les consommateurs. (27)

Le lait, même provenant d'une traite effectuée dans des conditions de propreté et d'hygiène normale renferme de nombreux germes dont le développement rapide est assuré par sa température à la sortie de la mamelle (37°C) ainsi que par sa richesse en eau et en glucides. (43)

Les microorganismes du lait sont quatre groupes : Virus, bactéries, levures, moisissures ; répartis selon leur importance en deux grandes classes : la flore indigène ou originale et la flore de contamination, cette dernière est subdivisée en deux classes : la flore d'altération et la flore pathogène. (48)

I.2. Source de contamination du lait

Le lait d'un animal parfaitement sain traité aseptiquement, est normalement dépourvu de micro-organismes, les sources de contamination probables du lait sont schématisées sur la Figure 05.

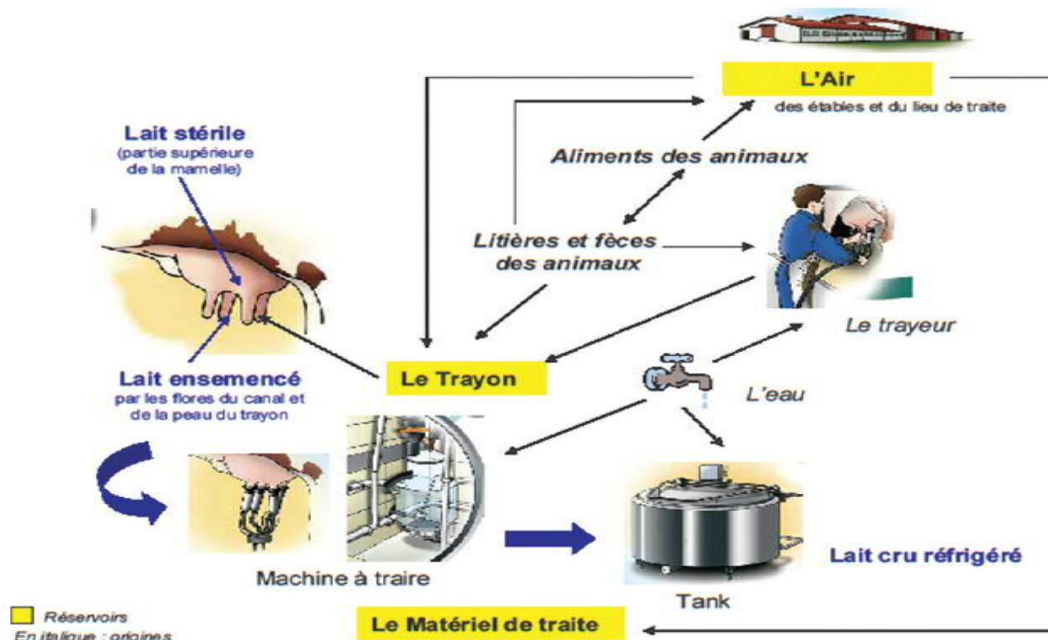


Figure 05 : Différentes sources de contamination du lait cru. (49)

À la sortie de la mamelle, le lait est à la température de l'animal (37°C). Malgré cette condition favorable à la multiplication de nombreux germes, ceux-ci sont inexistants pendant les quelques heures qui suivent la traite, en raison du pouvoir bactériostatique du lait frais (09). Dans

le lait, il existe des inhibiteurs naturels qui peuvent agir sur le développement des microorganismes. Parmi eux, on distingue les systèmes liés à la composition physicochimique du lait (système lactoperoxydase-thiocyanateperoxyde d'hydrogène, lactoferrine, acides gras libres), et ceux liés à l'état immunitaire de l'animal (production d'anticorps, de cellules). Cependant la traite n'est jamais réalisée dans des conditions aseptiques. Ainsi le lait recueilli se contamine très rapidement en traversant le conduit papillaire puis au contact du matériel de traite. Le nombre de germes est très faible, généralement inférieur à 5000 UFC/mL. Ils proviennent de l'extérieur et pénètrent dans la mamelle par le canal du trayon.

Ainsi, hormis les maladies de la mamelle, la contamination du lait se fait pour l'essentiel au cours des diverses manipulations dont il est l'objet à partir de la traite. Le niveau de contamination est étroitement dépendant des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées ces manipulations, à savoir l'état de propreté du trayeur, de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (eau de traite, seaux à traire, machines à traire) et, enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves, tanks). (50)

I.3. Flore originelle ou lactique

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et d'autres facteurs. (35)

Les bactéries lactiques sont dépourvues de pouvoir pathogène, elles peuvent avoir un intérêt technologique hygiénique ou être indifférentes. (42)

Les genres dominants de la flore indigène sont principalement des microorganismes mésophiles tel que : *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*.

Les bactéries lactiques par leurs propriétés acidifiantes, aromatisantes et texturantes sont largement utilisées dans les produits dérivés du lait et leurs propriétés pro-biotiques sont très utiles à la santé, en effet, elles améliorent les fonctions digestives. (51)

Tableau VI : Principales caractéristiques des bactéries lactiques (52)

Caractère genre	Gram	Forme de la cellule	Mode de regroupement	fermentation	catalase
<i>Streptococcus</i>	(+)	Cocci	Paire, chaîne	Homo	(-)
<i>Lactobacillus</i>	(+)	Bâtonnet / Coccobacilles	Isolée, chaîne	Homo ou Hétéro	(-)
<i>Lactococcus</i>	(+)	Cocci	chaîne	Homo	(-)
<i>Entérocooccus</i>	(+)	Cocci	chaîne	Homo	(-)
<i>Leuconostoc</i>	(+)	Cocci	Paire, chaîne	Hétéro	(-)
<i>Bifidobacterium</i>	(+)	Coccoïde	Chaîne étoile	Hétéro	(-)

Les bactéries lactiques sont des bactéries Gram positif produisant de l'acide lactique par fermentation des glucides simples tels que le glucose et le galactose. Elles se développent généralement dans des conditions anaérobies, voire anaérobies facultatives, et jouent un rôle majeur dans l'acidification du lait et du caillé. (53) Elles sont hétérotrophes et chimio organotrophes. Le plus souvent immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative. (54)

Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites :

- ✓ Homo-fermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose ;
- ✓ Hétéro-fermentaires : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂, et autres acides organiques. (55)

I.4. Flore de contamination

La flore contaminante est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait de la récolte jusqu'à la consommation, elle peut se composer d'une flore d'altération et/ou d'une flore pathogène. (56)

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. (34)

I.4.1. Flore d'altération

La flore d'altération cause des défauts sensoriels de goût, d'arôme, d'apparence ou de texture et réduit la vie des produits laitiers. Certains microorganismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes. La présence de l'un n'exclut pas celle de l'autre. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont *Pseudomonas sp*, les coliformes, soit principalement le genre *Escherichia* et *Enterobacter*, les bactéries Gram positif sporulées telle que *Bacillus sp*, *Clostridium sp*, ainsi que certaines levures et moisissures. (40)

I.4.1.1. Bactéries

I.4.1.1.1. La flore psychrotrophe

La détérioration microbienne, une des principales causes de la perte des aliments dans le monde entier, peut affecter des produits traités thermiquement, y compris ceux qui sont stockés sous réfrigération (57). L'extension de la réfrigération a certes amélioré la qualité et la durée de vie microbiologique du lait. Toutefois, ce type de conservation est responsable de la sélection de la flore psychrotrophe. Ce sont les microorganismes qui ont la faculté de se développer à une température égale ou inférieure à 7 °C, indépendamment de leur température optimale de croissance (58). En général, dans le lait, c'est le genre *Pseudomonas* qui domine. Dans le lait refroidi, cette flore peut devenir la flore dominante, notamment quand le lait n'est pas récolté

dans d'excellentes conditions hygiéniques et qu'il est maintenu plus de 24 à 48 heures dans les conditions habituelles de réfrigération (+3 à +4 °C). La plupart des bactéries psychrotrophes sont facilement détruites au cours de la pasteurisation et de la stérilisation UHT; cependant, leurs enzymes extracellulaires résistent à la chaleur et causent la détérioration et la pourriture des produits laitiers pendant le stockage à froid.

Pseudomonas fluorescens est l'une des plus importantes bactéries psychrotrophes responsables des saveurs désagréables des produits laitiers en raison de sa métalloprotéase caséinolytique extracellulaire résistante à la chaleur. (59)

Les genres *Bacillus* et *Paenibacillus* ont été identifiés comme dominants des genres des bactéries à Gram-positif sporulées dans les environnements des fermes laitières, les installations de traitement et des laits pasteurisés. Les *Bacillus* spp. sont détectés principalement au début de la conservation du lait pasteurisé et ont des activités enzymatiques pouvant être responsables de l'acidification, la coagulation ou la protéolyse des laits par contre les *Paenibacillus* sont prédominantes à la fin de la conservation (60).

I.4.1.1.2. Flore thermorésistante

Un certain nombre de bactéries sont capables de résister aux traitements thermiques usuels utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes. Leur développement ultérieur peut provoquer la protéolyse et le caillage non acide du lait pasteurisé et parfois, être dangereux pour la santé.

L'ensilage est considéré comme la principale source de contamination du lait par les spores de *Clostridium tyrobutyricum*, une bactérie causant des défauts des fromages (61).

I.4.1.1.3. Indicateurs de contamination fécale

Les coliformes totaux sont utilisés depuis très longtemps comme indicateurs de la qualité microbienne parce qu'ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale. Ils peuvent aussi démontrer un mauvais nettoyage et une mauvaise désinfection d'appareils. (62)

Ils élaborent diverses substances qui provoquent le gonflement précoce des produits laitiers dont le fromage. (63)

Les coliformes totaux sont définis comme étant des bactéries en forme de bâtonnet, aérobies ou anaérobies facultatives, possédant l'enzyme β -galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose à 37°C. Les principaux genres inclus dans le groupe sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Serratia*. Des coliformes banals absorbés en quantité massive (1 million à 1 milliard de germes) peuvent déclencher des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements et diarrhée), habituellement de courte durée. Mais la presque totalité des espèces

sont non pathogènes et ne représentent pas de risque direct pour la santé, à l'exception de certaines souches d'*Escherichia coli* ainsi que de rares bactéries pathogènes opportunistes. (27)

I.4.1.2. Levures et moisissures

Pour les levures et moisissures, elles se manifestent dans le fromage et peu dans le lait. Ainsi, *Mucor* est responsable de l'accident dit " poil de chat " principalement en fromage à pâte molle (Camembert), se caractérisant par un défaut d'aspect des fromages, et par l'apparition de mauvais goûts. On rencontre aussi des levures nuisibles responsables de certaines dégradations détectées par des odeurs d'alcool, par un gonflement des emballages et du fromage dû à la production de gaz et par le limonage. Ces dégradations entraîneront une perte de rendement. (48)

Les moisissures rendent le lait moisi et d'une couleur et texture atypique plus un mauvais goût ; donc ils touchent la salubrité du lait.

I.4.2. Les microorganismes potentiellement pathogènes

L'origine des contaminations par les (bactéries, virus, champignons) pathogènes varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation. La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, et elle fait alors suite à une excrétion mammaire de l'animal malade ; elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux, personnel). (64)

I.4.2.1. La flore bactérienne

Les germes pathogènes associés aux produits laitiers auxquels on accorde une importance particulière, en raison de la gravité ou de la fréquence des risques qu'ils présentent sont : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp*, *Echerichia coli*, *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei*, *Citrobacter*. (22)

I.4.2.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est le micro-organisme pathogène le plus souvent incriminé dans des cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) par le lait et les produits laitiers. L'intoxication résulte de l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SE) produites dans les aliments par des souches de *Staphylococcus aureus* productrices de SE. Elle déclenche des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et maux de tête voire des conséquences plus graves chez les jeunes enfants, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées. (53)

La contamination du lait cru à la production est due à la flore présente dans la mamelle en cas d'infection (mammites), de la flore de contamination apportée par le milieu extérieur au

cours des différentes manipulations. Si le lait cru reste la principale source de contamination des produits laitiers en staphylocoques, il faut préciser que la pasteurisation détruit facilement ces bactéries mais pas l'enterotoxine produite dans le lait.

I.4.2.1.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un petit bacille saprophyte à Gram positif, ubiquiste et largement répandue dans la nature, isolé ou en chaînettes, mobile à 20-25 °C, non sporulé. Aéro-anaérobie facultatif, catalase positive, hydrolysant l'esculine, oxydase négative. Les souches de *Listeria monocytogenes* sont généralement β -hémolytiques. Cette bactérie responsable d'infections sporadiques sévères chez l'homme et les animaux est invasive, capable de traverser le placenta et de pénétrer le système nerveux central (méningoencéphalites). (65)

La listériose est une infection alimentaire due à *Listeria monocytogenes*. Chez l'adulte, elle se manifeste principalement par une septicémie ou une infection du système nerveux central (méningite ou méningo-encéphalite). Chez la femme enceinte, elle peut provoquer un avortement, un accouchement prématuré ou une infection néonatale. Les formes non-invasives semblent rares et regroupent des gastro-entérites aiguës fébriles, des formes cutanées isolées ou d'exceptionnelles formes oculaires. (66)

Les produits laitiers les plus fréquemment contaminés par *Listeria monocytogenes* sont les fromages à pâte molle et au lait cru.

I.4.2.1.3. *Salmonella*

Salmonella est une bactérie mésophile de forme allongée, flagellée, Gram-négatif naturellement présente dans l'intestin des animaux (en particulier chez les volailles et les porcs), des oiseaux, des reptiles, de certains animaux de compagnie et de certaines personnes. Elle est également présente dans l'environnement et peut contaminer le lait à la production à la ferme. Les personnes qui consomment du lait contaminé par *Salmonella* sont susceptibles de contracter la salmonellose. (67)

Comme dans le cas d'autres toxi-infections alimentaires, les symptômes de la salmonellose ressemblent à ceux de la grippe. Ils se manifestent habituellement de 12 à 72 heures après l'ingestion d'aliments contaminés et durent généralement jusqu'à sept jours. La plupart des gens s'en remettent sans traitement. Les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes dont le système immunitaire est affaibli sont les plus à risque de développer des complications graves comme la septicémie et une déshydratation avec insuffisance rénale. (47)

Des épidémies de fièvre typhoïde et paratyphoïde ont pour origine la consommation de lait, crème, beurre, crème glacée, etc., n'ayant pas subi de traitement d'assainissement ou qui ont été recontaminés. (68)

I.4.2.1.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie bacillaire, Gram-négatif, elle fait partie du groupe des coliformes totaux et constitue le seul membre de ce groupe que l'on trouve exclusivement dans les matières fécales des humains et des animaux. Sa présence dans le lait indique non seulement une contamination récente par des matières fécales, mais aussi la présence possible de bactéries, virus et protozoaires pathogènes. (69) Les *Escherichia coli*, dont certaines (*Escherichia coli* O157H7), peuvent être responsables de graves toxi-infections et d'une insuffisance rénale, voire la mort suite à la consommation d'aliments contaminés par les matières fécales, comme de la viande hachée crue ou mal cuite, du lait cru, et les légumes. (70)

La pathogénicité des souches entéropathogènes est due à la production de toxines dénommées toxines Stx (pour « Shiga-like toxin »), et elle est aussi appelée vérotoxines en raison de leur toxicité sur les cellules Véro, cellules épithéliales rénales du singe vert d'Afrique. (70)

I.4.2.2. Moisissures

Les moisissures sont disséminées par l'émission de spores qui peuvent être véhiculées par l'environnement (air, eau) et se retrouver dans le lait. Aussi elles sont présentes considérablement dans la paille et le foin. (71)

Les moisissures pathogènes sont pour la plupart toxigènes, c'est-à-dire qu'elles produisent des mycotoxines dans les aliments. (48)

Comme exemple des moisissures pathogènes on cite *Aspergillus* qui secrète des Aflatoxines et/ou des Ochratoxines A.

De très nombreuses données épidémiologiques ont montré des associations fréquentes entre la consommation de certains aliments et l'incidence de certains cancers; par exemple, le cancer du foie et la contamination en aflatoxine B1. Actuellement, la question de l'implication d'une autre mycotoxine, l'ochratoxine A, dans les cancers des voies urinaires sont posée. (72)

Le contact avec les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités aiguës et chroniques allant de la mort à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire et l'appareil respiratoire, ainsi que sur l'appareil digestif. Le pouvoir qu'ont certaines d'altérer les réactions immunitaires et, ainsi, de réduire la résistance aux infections. (73)

I.4.2.3. Virus

Le lait cru peut renfermer divers virus (ex : *Enterovirus*, *Flavivirus*) potentiellement pathogènes pour l'homme. Le virus le plus rencontré dans le lait cru est le virus de l'encéphalite à tique.

L'encéphalite à tiques est une encéphalite ou une méningo-encéphalite aiguë, due à un *flavivirus* : le virus TBE (Tick Born Encephalitis Virus). Elle est directement liée à la

multiplication du virus dans le cerveau. L'incubation dure une à deux semaines. Le début est brutal, marqué par de la fièvre, des céphalées, des frissons. (74)

La transmission du virus est effectuée essentiellement par les tiques, à l'occasion d'un repas sanguin. Les ruminants domestiques excrètent le virus dans le lait (non pasteurisé). (75)

D'où le risque de contamination par l'ingestion de lait cru d'animal infecté, mais ce mode de transmission est secondaire. (74)

II. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques ou antibiorésistance est un phénomène de portée universelle, il n'a cessé d'augmenter de manière progressive au cours de ces dernières années. Ce problème de santé publique touche à la fois la santé animale et la santé humaine. (76)

La diffusion d'un grand nombre de bactéries pathogènes résistantes à plusieurs antimicrobiens a été reconnue par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme un problème sérieux en raison de la fréquence avec laquelle de nouveaux phénotypes de résistance apparaissent parmi les agents pathogènes et même chez les microorganismes commensaux. (77)

La quantité d'antibiotiques consommée dans le monde a augmenté de façon considérable ces dernières années et leur utilisation s'est complètement banalisée. Aujourd'hui, ils sont utilisés de manière anarchique. Ainsi, outre la médecine humaine et vétérinaire, on utilise les antibiotiques comme facteurs de croissance dans les élevages, en biotechnologie dans les organismes génétiquement modifiés et dans plusieurs autres secteurs. Cette surconsommation, tous secteurs confondus, favorise le développement rapide d'un phénomène global, celui de la résistance bactérienne aux antibiotiques, associé à la transmission de résidus d'antibiotiques et de gènes bactériens résistants à l'homme par la chaîne alimentaire. Le risque dû à la présence de résidus d'antibiotiques dans l'alimentation existe, le transfert de bactéries pathogènes résistantes à l'homme est possible mais il est difficile de les mettre en évidence, de les quantifier et d'en mesurer les conséquences. La résistance bactérienne reste aujourd'hui très préoccupante du fait de son ampleur et des conséquences qu'elle peut avoir sur le traitement des infections chez l'Homme et les animaux. (78)

Des travaux scientifiques récents démontrent la présence de bactéries porteuses de résistance dans certains produits laitiers, et suggèrent que les antibiotiques utilisés dans l'alimentation animale ou lors de traitements vétérinaires pourraient en être la cause.

II.1. Définition de l'antibiorésistance bactérienne

Après la découverte de la pénicilline en 1928, on croyait que le problème des infections bactériennes était résolu. Cependant, avec l'utilisation croissante et parfois injustifiée de ces molécules, les bactéries ont appris à se défendre et à s'adapter et certaines sont devenues résistantes aux antibiotiques.

La « résistance à un antibiotique » est une propriété d'une bactérie qui lui confère une capacité pour inactiver ou exclure l'antibiotique, ou un mécanisme qui bloque les effets bactéricides ou bactériostatiques des antibiotiques. En d'autre terme, c'est un caractère phénotypique et/ou génotypique caractérisant la capacité d'une bactérie à survivre (et à se multiplier), en présence de cet antibiotique, à une concentration qui est habituellement bactéricide ou bactériostatique. (79)

II.2. Types de résistance

Selon leur origine, on distingue deux types de résistance bactérienne aux antibiotiques :

II.2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque constitue un critère d'identification bactérienne, (80) c'est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes). (81)

II.2.2. Résistance acquise

En opposé à la résistance naturelle, propriété d'espèce ou de genre, la résistance acquise qui est une propriété de souche. Cette dernière correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce. (82)

La résistance peut être acquise de manière endogène par mutation ou de manière exogène par transfert génétique.

Les mutations qui résultent d'une modification spontanée, ponctuelle et rare d'un locus du chromosome bactérien (qui contrôle la sensibilité à un antibiotique donné) ont comme principale caractéristique, en termes de désamination, d'être héritées de façon stable par la descendance. (83)

Les bactéries peuvent aussi échanger de l'ADN grâce à trois mécanismes génétiques propres aux bactéries : la transformation, la conjugaison et la transduction. La dissémination de la résistance aux antibiotiques dans les conditions naturelles est fréquemment due à une combinaison de mécanismes de transfert de gènes.

La transformation est le résultat d'un réarrangement de séquences d'ADN échangées entre 2 bactéries. On peut alors obtenir de nouveaux gènes de résistance. Ce processus se fait généralement entre bactéries de genre proche car il doit y avoir une forte analogie entre les séquences nucléotidiques pour permettre la recombinaison. (84)

La Conjugaison c'est un processus au cours duquel de l'ADN est transféré d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse par un mécanisme nécessitant le contact entre les deux bactéries. C'est le phénomène le plus répandu des trois. (79)

La transduction est un mécanisme de transfert de l'ADN par l'intermédiaire d'un virus bactérien ou bactériophage. Ce mécanisme est jusqu'à présent le moins étudié dans le transfert horizontal des gènes de résistance mais il semblerait qu'il joue un rôle non négligeable dans l'échange de matériel génétique entre bactéries. (83)

II.2.3. Mécanismes d'antibiorésistance

Indépendamment des supports génétiques, plusieurs mécanismes biochimiques sont impliqués dans l'expression de la résistance. Ainsi, quatre types de mécanismes biochimiques de résistance bactérienne aux antibiotiques sont décrits : (85)

- ✓ La non-fixation de l'antibiotique suite à la modification de sa cible;
- ✓ La synthèse d'enzymes bactériennes modifiant ou inactivant l'antibiotique;
- ✓ La diminution de la perméabilité de la bactérie à l'antibiotique;
- ✓ L'utilisation d'une nouvelle voie métabolique remplaçant la voie inhibée par l'antibiotique.

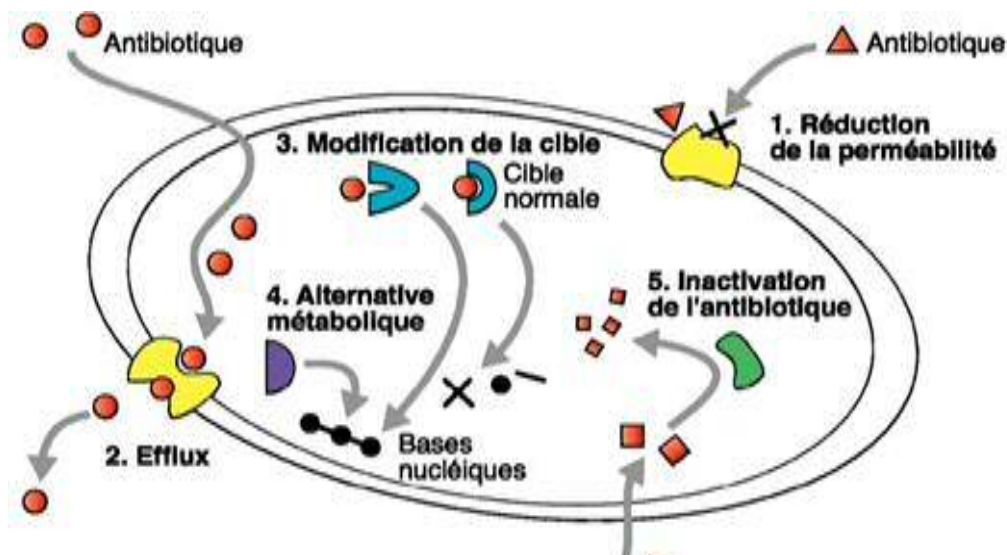


Figure 06 : Les différents mécanismes d'antibiorésistance (86)

II.3. La multirésistance

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation des résistances naturelles et acquises, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique. La multirésistance tend généralement vers la totorésistance (résistance à tous les antibiotiques). (87)

III. Evaluation de l'antibiorésistance

Considérant que la résistance des bactéries aux antibiotiques est très variable et semble en augmentation, l'isolement et l'identification ne suffisent souvent plus pour mettre en œuvre une antibiothérapie efficace. (88) Alors faire appel aux laboratoires de bactériologie pour réaliser des tests de sensibilité semble être nécessaire.

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Elles consistent à déposer à la surface d'une gélose Muller Hinton préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier, des disques de papier imprégnés d'un antibiotique donné. Il se forme alors un gradient de concentrations en antibiotique autour du disque de papier et la croissance bactérienne est bloquée jusqu'au diamètre où les concentrations du gradient sont égales ou supérieures à la CMI. Avec la mesure du diamètre de la zone d'inhibition et grâce à des abaques, on pourra classer la bactérie en sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R). (89)

Matériel et Méthodes

I. Caractéristiques générales du site d'étude

Le site choisi pour cette étude est une petite ferme située à proximité de la station d'épuration des eaux usées (ONA). Son propriétaire élève quelques vaches en plus de petites parcelles de terrains cultivés avec différentes cultures agricoles. Il utilise l'eau traitée à la sortie de la station d'épuration pour irriguer son champ et élever ses vaches.



Photographie 01 : Vue générale de la station d'épuration de la ville de Khenchela et le site de notre étude.

II. Procédure d'échantillonnage.

Les échantillons à analyser sont du lait de vache cru entier obtenu après une traite manuelle des quatre vaches femelles présentes au niveau de notre site d'étude. La collecte a eu lieu en mois de Mars (3 fois) 2016 à 8h du matin.

Le lait a été prélevé dans des flacons en verre lavés puis rincés, ensuite, ils ont été séchés à l'abri de l'air et enfin stérilisés par la chaleur au four Pasteur à 180 °C pendant 30 min. Avant la traite manuelle, on a désinfecté les trayons avec de l'alcool dilué afin d'éviter la contamination de la mamelle par les nombreux microorganismes présents sur le pis et des trayons de la vache. L'échantillon est transporté à température ambiante à l'obscurité jusqu'au laboratoire. Les analyses ont lieu à 8h30 du matin, 30 minutes après le prélèvement. (90)



Photographie 02 : Les vaches traitées et parcelles de terrain de notre site d'étude

III. Les paramètres microbiologiques

Ce travail a été réalisé au sein des laboratoires pédagogiques de Biologie de l'Université Abbés Laghrour Khenchela. Il a consisté :

✓ à effectuer un dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale à savoir : Les coliformes totaux, les coliformes fécaux et les Entérocoques fécaux sur des milieux appropriés au moyen des méthodes normalisées actuellement en vigueur. Les méthodes d'analyse se basent sur des procédures normalisées : Les milieux de culture et réactifs proviennent de l'Institut Pasteur d'Algérie.

✓ à effectuer une recherche des germes pathogènes à savoir : Les Staphylocoques, les Salmonelles et les champignons sur des milieux sélectifs appropriés au moyen des méthodes normalisées actuellement en vigueur. Les méthodes d'analyse se basent sur des procédures normalisées : Les milieux de culture et réactifs proviennent de l'Institut Pasteur d'Algérie.

✓ à prélever les différentes colonies caractéristiques et procéder à leur purification ceci à partir de repiquage sur les cultures de l'étape précédente.

✓ à identifier les souches correspondantes, au moyen de tests complémentaires et biochimiques spécifiques, (galerie API).

✓ à évaluer la résistance de ces souches vis à vis de différents antibiotiques utilisés en thérapeutique clinique.

III.1. Les dilutions décimales en série

Les dilutions sont nécessaires car on doit prélever de très faibles volumes à cause de la charge bactérienne souvent très élevée, et permettent d'obtenir seulement les microorganismes dominants dans les dilutions les plus élevées. On dilue successivement l'échantillon de lait à analyser à l'aide de l'eau physiologique.

Toutes les manipulations ont été effectuées avec un maximum de précision et d'une manière aseptique selon la norme **NF EN ISO 6887-1** relative à la suspension mère et dilutions décimales; règles générales. Et la norme **NF V08-057-2** microbiologie alimentaire directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique. (1)

✓ On a d'abord bien homogénéisé l'échantillon en agitant vigoureusement le flacon afin de permettre une répartition homogène des microorganismes, puis à l'aide d'une pipette graduée stérile on a prélevé 1 ml. On prélève 25 ml de lait cru, qui serviront à l'analyse bactériologique classique. Le lait étant un produit liquide constituant d'emblée une solution mère égale à 1.

✓ A partir de la solution mère, 1 ml est introduit stérilement dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique. On obtient ainsi une dilution au 1/10, le tube est ensuite agité manuellement,

✓ Puis on prélève 1 ml de la dilution 1/10 et on l'introduit dans un deuxième tube contenant 9 ml d'eau physiologique, on obtient ainsi une dilution 1/100.

✓ Puis on prélève 1 ml de la dilution 1/100 et on l'introduit dans un troisième tube contenant 9 ml d'eau physiologique, on obtient ainsi une dilution 1/1000.

✓ Une homogénéisation par au moins 10 secondes d'agitation est nécessaire avant chaque dilution.

III.2. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux.

La recherche de la FTAM a été effectuée suivant une méthode normalisée actuellement en vigueur. La Norme **NF V 08-051** relative au dénombrement des micro-organismes, méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C et la norme **XP V 08-102** relative aux règles générales pour le comptage des colonies et l'expression des résultats. (1)

Le principe consiste à étaler en surface 0.1 ml de la solution mère et des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} sur gélose PCA préalablement coulée dans des boîtes de Pétri et déjà numérotées. L'incubation des boîtes couvercle en bas se fait à 30°C pendant 72 heures avec:

- Première lecture après 24 heures d'incubation,
- Deuxième lecture après 48 heures, et
- Troisième lecture après 72 heures.

Pour le dénombrement : on compte toutes les colonies apparues à la surface de la PCA seules les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies seront prises en considération.

On calculera le nombre N, de microorganismes dénombrés à 37°C par ml de lait cru en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante : $N = \Sigma c / 1,1 \times d$

où : Σc : est la somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

III.3. Recherche et dénombrements des indicateurs de contamination fécale.

Le premier objectif des études qualitatives et quantitatives sur la flore microbiologique des laits crus est de dénombrer les marqueurs de contamination fécale : **les coliformes totaux, les coliformes fécaux et les entérocoques fécaux.**

III.3.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux.

Norme **NF ISO 4813** relative au dénombrement des coliformes, technique du nombre le plus probable après incubation à 37°C. Norme **NF V 08-017** relative au dénombrement des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* (**NF V 08-015** et **NF V 08-016**). **(1)**

Par cette méthode, les Coliformes Totaux, Coliformes Thermo-Tolérants et *Escherichia coli* sont dénombrés en milieu liquide à l'aide du bouillon VBL (bouillon lactosé bilié au vert brillant) réparti à raison de 10 ml par tubes munis d'une cloche de Durham. par la technique du NPP (nombre le plus probable). La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- ✓ **Le test de présomption** : réservé à la recherche des Coliformes totaux.
- ✓ **Le test de confirmation** : appelé encore test de Mac Kenzie et réservé à la recherche de Coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

III.3.1.1. Test de présomption

On Prépare dans un portoir une série de tubes contenant le milieu sélectif (VBL) à raison de trois tubes par dilution. A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , on porte aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée. On Chasse le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et on mélange bien le milieu et l'inoculum. Puis on incube les tubes à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Après l'incubation on considère comme positifs les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement gazeux (au niveau de la cloche),
- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de **Mac Grady** qui se trouve en **(Annexe 08)**.

III.3.1.2. Test de confirmation ou test de Mac Kenzie.

Les tubes de VBL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une à deux gouttes dans respectivement :

- Un tube de VBL muni d'une cloche et sur,
- Un tube d'eau peptonée exempte d'indole.

On chasse le gaz présent éventuellement dans les Cloches de Durham et on mélange bien le milieu et l'inoculum. On incube les tubes cette fois-ci à 44°C pendant 24 heures.

Après l'incubation on considère comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement gazeux dans les tubes de VBL,
- Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia Coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kowacs dans le tube d'eau peptonée exempte d'indole.

(91)

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady en tenant compte du fait qu'*Escherichia Coli* est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C.

III.3.1.3. Repiquage sur milieux sélectifs solides

Les tubes de VBL et d'eau peptonée exempte d'indole trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage sur gélose Hektoen, par étalement de 0.1 ml dans des boîtes pétris déjà coulées et numérotées. On incube les boîtes couvercle en bas à 37°C pendant 24h.

III.3.1.4. Revivification et purification

Après incubation 12 colonies isolées ont été reprises de manière aléatoire et déposées séparément dans des tubes de bouillon glucosé tamponné (BGT) pour assurer leur revivification et leur enrichissement en les incubant à 37°C pendant 30 minutes.

Puis et à l'aide d'une anse bouclée on prélève une goutte de chaque suspension séparément et on l'ensemence par stries en quadrant à la surface d'une gélose Hektoen. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

III.3.1.5. Tests complémentaires

III.3.1.5.1. Coloration de GRAM

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet la distinction des bactéries Gram (+) et Gram (-) sur la base de différence de composition chimique et d'ultra structure des parois cellulaires. C'est une technique qui se déroule comme suit :

- ✓ Réaliser sur une lame propre un frottis puis le fixer.
- ✓ Recouvrir la lame de violet de gentiane phénique pendant 1 minute puis rincer.
- ✓ Recouvrir la lame d'une solution de Lugol durant 1 minute.
- ✓ Laver la lame à l'éthanol jusqu'à ce que la dernière goutte soit transparente.
- ✓ Laver rapidement à l'eau et recouvrir la lame de Fuschine phénique pendant 1 minute puis rincer à l'eau distillée, ensuite, sécher la lame à l'aide d'un papier buvard.
- ✓ L'observation s'effectue à immersion (objectif × 100) après avoir déposé une goutte d'huile de cèdre sur la lame (observation à immersion).

Les bactéries Gram positif sont colorées en violet alors que celles colorées en rose sont Gram négatif. (92)

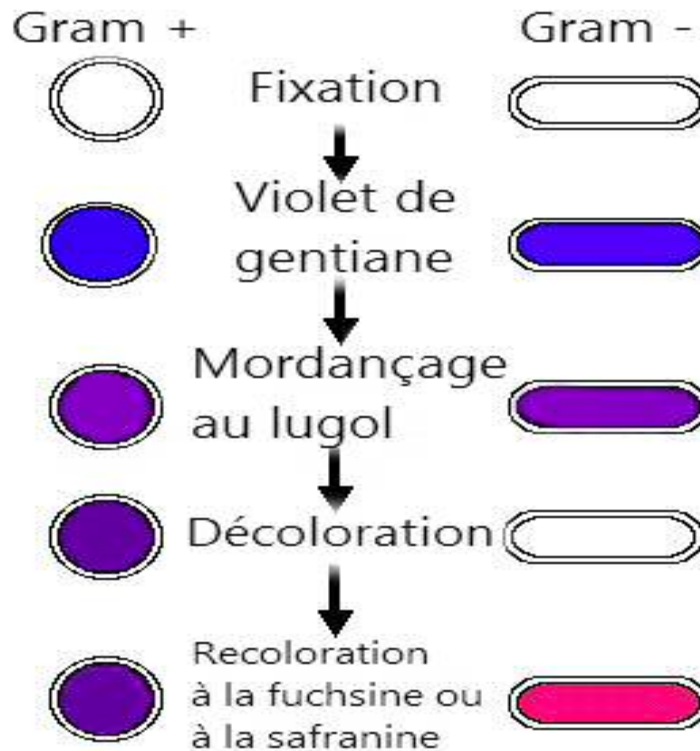


Figure 07 : L'aspect des bactéries après la coloration de GRAM

III.3.1.5.2. Identification biochimique par galerie API 20 E

Les souches bactériennes purifiées ont fait l'objet d'une étude des caractères biochimiques. L'identification biochimique est l'étape qui précède toujours l'antibiogramme et elle est prise à partir des cultures pures représentées par des colonies que l'on peut différencier par leur aspect.

L'identification a été réalisée par les galeries d'identification biochimiques. Le système API Bio Mérieux est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Une galerie API (Appareil et Procédés d'Identification) est un ensemble de petits puits et cupules prêts à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques. (85)

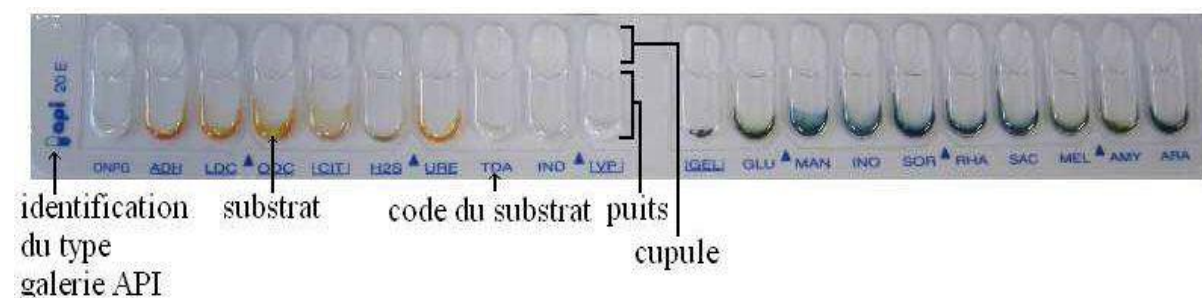


Figure 08 : La galerie API.

La galerie API 20 E est destinée à l'identification des entérobactéries et autres bacilles Gram négatif, elle se présente sous la forme d'une bandelette comportant 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés (urée, L-arginine, gélatine, inositol, etc.). Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. (93)

Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne pure effectuée en eau physiologique. Les différents tests réalisés sont :

- ONPG (recherche de bêta-galactosidase).
- L'arginine-dihydrolase.
- Lysine-décarboxylase.
- L'ornithine-décarboxylase.
- Utilisation du citrate.
- Production du H₂S.
- Uréase.
- Tryptophane désaminase.
- Production d'indole.
- La réaction de Voges-Proskauer (production d'acétoïne).
- Gélatinase.
- Fermentation / oxydation de Glucose, Mannitol, Inositol, Sorbitol, Rhamanose, Saccharose, Melibiose, Amygdaline et l'Arabinose.

La préparation de la galerie se déroule selon les étapes suivantes :

✓ **Préparation de l'inoculum** : on prélève à l'aide d'une pipette ou une anse une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé puis on la met dans un 9 ml d'eau physiologique pour obtenir une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. La suspension est étuvée pendant 30 min. (85)

✓ **Inoculation de la galerie** : pour les tests : CIT, VP et GEL on remplit tubes et cupules avec la suspension bactérienne en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour les autres tests on remplit uniquement les tubes et non les cupules. Dans les tests ; ADH, LDC, ODC, URE, H₂S on remplit les cupules avec l'huile de paraffine pour créer une anaérobiose.

Après la préparation de la galerie il faut répartir environ 5 ml d'eau physiologiques dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide puis réunir le fond et couvercle. Un fond et un couvercle complètent la galerie et permettent de constituer une boîte d'incubation.

Un délai de 18 à 24h est nécessaire pour pouvoir observer les réactions entre bactéries et substrats. La lecture des résultats se fait soit de manière directe, lorsque la réaction enzyme bactérienne-substrat est révélée par un changement de couleur du milieu du puits (en raison d'un

changement de pH), soit de manière indirecte, auquel cas il faut rajouter certains révélateurs dans les puits concernés. (93) La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture (Annexe 02) et l'identification obtenue à l'aide du Logiciel d'identification API Excel (Annexe 04).

Après purification et identification des colonies reprises précédemment, le profil de résistance aux antibiotiques pour chaque espèce est déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton.

III.3.1.6. Antibiogramme

C'est le test destiné à montrer la sensibilité d'une souche bactérienne à divers antibiotiques, la souche est déclarée sensible, intermédiaire ou résistante. En vue de sélectionner l'antibiotique le plus efficace pour lutter contre ce germe. (94)

L'antibiogramme consiste à mettre en contact la bactérie isolée avec des disques imbibés d'antibiotiques : l'antibiotique diffuse dans le milieu de culture (gélose) avec une concentration décroissante à partir du disque. Le diamètre d'inhibition de la culture (cercles transparents) permet de définir la concentration minimale inhibitrice dans la boîte. (95)

✓ Principe

L'Antibiogramme standard consiste à disposer des disques de papier buvard imprégnés de concentration déterminée d'antibiotiques à la surface d'un milieu gélosé. Dès l'application des disques, l'antibiotique diffuse à partir du disque de manière uniforme dans la gélose. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. (96)

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques. Les antibiotiques testés sont représentés dans le **Tableau VII**. Le mode opératoire est pratiqué selon la standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS.

✓ Mode opératoire

- **Milieu** : La gélose Mueller-Hinton fondue au bain-marie a été coulée en boîte Pétri en respectant une épaisseur d'environ 4 mm.
- **Inoculum** : On prépare la suspension à partir d'une souche bactérienne de 18 heures. On prélève des colonies de la bactérie étudiée à l'aide d'un écouvillon ou d'une anse de platine qu'on introduit dans un tube contenant 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile.
- **Ensemencement** : à l'aide d'un écouvillon trempé dans la suspension, on ensemence par stries serrées toute la surface du milieu en 3 reprises en changeant d'angle à chaque fois (30°), enfin on écouvillonne partout autour du bord de la surface de la gélose.

- **Application des disques d'antibiotiques** : on a déposé les disques à l'aide d'une pince bactériologique stérile. Il y a des précautions à respecter lors de l'application, les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé et finalement presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de la pince pour s'assurer de son application. Les disques d'antibiotiques utilisés sont résumés dans le **Tableau VII**.

En ce qui concerne les β -lactamines, et les autres disques d'ATB la disposition des disques se fait par l'ordre suivant :

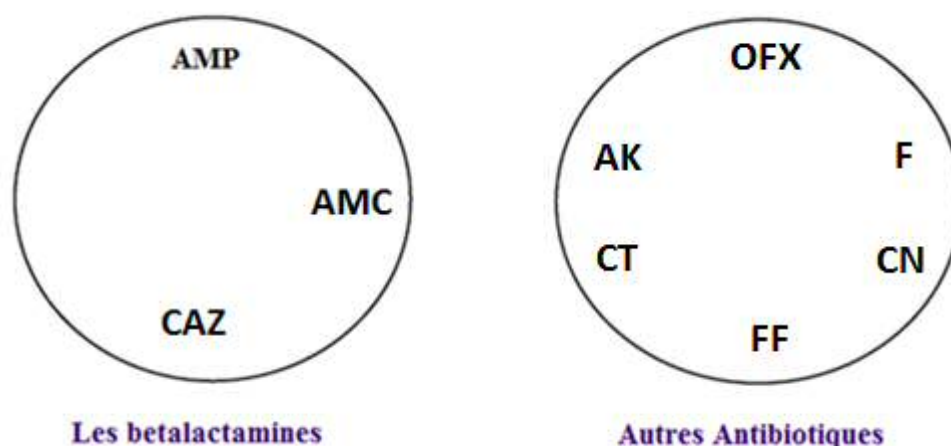


Figure 09 : Disposition des disques d'antibiotiques sur les boîtes d'antibiogramme (97)

Tableau VII : Liste des antibiotiques testés, charge et classification des disques.

Antibiotique	Abréviation	Charge du disque	Classe
Ampicilline	AMP	10 μ g	β -lactames (famille des pénicillines)
Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	30 μ g	β -lactames (famille des pénicillines et des clavames)
Céftazidime	KAZ	30 μ g	β -lactames (famille des céphalosporines 1 ^{ère} génération)
Ofloxacin	OFX	05 μ g	Fluoroquinolones
Furanes	F	300 μ g	Furanes
Gentamicine	CN	10 μ g	Aminosides
Fosfomycine	FF	200 μ g	Acides phosphoniques
Colistine	CT	50 μ g	Polypéptides
Amikacine	AK	30 μ g	Aminoside

- **Incubation** : les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas.
- **Lecture** : Après avoir retiré les boîtes de pétri de l'étuve, la zone entourant le disque où aucune croissance bactérienne n'est visible détermine la zone d'inhibition. Son diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse métallique et comparé aux diamètres critiques figurant dans les tables de lecture (**Annexes 07**). La souche est ainsi classée sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) à l'antibiotique, les souches I étant ensuite incluses dans la catégorie R.

Des souches de référence, *Escherichia coli* ATCC 25922, ont servi pour le contrôle de la qualité de l'antibiogramme.

III.3.2. Recherche des Entérocoques fécaux en milieu liquide.

Dans les laits et produits laitiers, les Entérocoques fécaux sont recherchés par la méthode classique par le nombre le plus probable en milieu liquide à 37°C (milieu de Rothe puis milieu de Litsky). La technique fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- ✓ le test de présomption : Réservé à la recherche des Entérocoques fécaux sur milieu de Rothe,
- ✓ le test de confirmation : Réservé à la confirmation sur milieu EVA Lytski, des tubes trouvés positifs dans des tests de présomption.

III.3.2.1. Test de présomption.

On prépare dans un portoir une série de 9 tubes contenant le milieu sélectif de Rothe à raison de trois tubes par dilution.

A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , on porte aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée. On mélange bien le milieu et l'inoculum. On incube les tubes à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Après l'incubation sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien. Ces derniers feront systématiquement l'objet d'un test de confirmation, sans qu'il y ait de dénombrement à ce niveau. **(91)**

III.3.2.2. Test de confirmation ou test de Mac Kenzie.

Ce dernier consiste à repérer et à numéroter les tubes positifs sur milieu de Rothe qui feront l'objet d'un repiquage (2 à 3 gouttes) sur milieux Eva Lytski, ces derniers seront, incubés à 37°C pendant 24 heures,

Après incubation seront considérés comme positifs, les tubes présentant **à la fois** :

- Un trouble microbien,
- Une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady en tenant compte uniquement des tubes Eva Lytski positifs ou négatifs.

Etant donné le caractère sélectif du milieu Eva Lytski; ne pousseront théoriquement dans ce bouillon que les Entérocoques fécaux. Un autre test de confirmation a quand même été pratiqué, il consiste à prélever aseptiquement quelques gouttes du milieu Eva Lytski positif puis les étaler par stries en cadrans sur gélose Bile esculine azide (BEA) en boîte de pétri, le milieu est incubé à 37°C, pendant 24 heures; les colonies des Entérocoques fécaux apparaîtront alors sous forme de petites colonies légèrement bombées et lisses, esculine positive. On a ensuite effectué une coloration de Gram sur quelques colonies caractéristiques. (98)

III.4. Recherche des germes pathogènes

III.4.1. Recherche des *Salmonella* (99)

III.4.1.1. Pré-enrichissement

On prélève 25 ml du lait cru qu'on introduit dans un flacon contenant 225 ml d'eau peptonée tamponnée. Le flacon est ensuite incubé à 37°C pendant 18 heures.

III.4.1.2. Enrichissement

Après incubation 10 ml de la solution du pré-enrichissement est introduite dans un flacon Sélénite Cystéiné. Cette opération est répétée deux fois, l'incubation se fait de la manière suivante

Le premier flacon de Sélénite sera incubé à 37°C pendant 24 h.

Le deuxième flacon de Sélénite sera incubé à 42°C pendant 24 h.

III.4.1.3. Inoculation sur milieux sélectifs

Après incubation chaque flacon de Sélénite fera l'objet d'un isolement par étalement en surface sur deux milieux gélosés sélectifs différents à savoir :

- Le milieu gélosé Hektoen
- Le milieu gélosé *Salmonella-Shigella* (SS).

Après incubation à 37°C pendant 24 h, les *Salmonella* se présenteront de la façon suivante :

- Colonies roses ou incolores apparaîtront avec ou sans un centre noir sur milieu *Salmonella-Shigella* (SS)..
- Colonies le plus souvent gris bleu à centre noir apparaîtront sur gélose Hektoen.

III.4.1.4. Purification et Identification.

Après incubation quelques colonies isolées suspectes ont été reprises de manière aléatoire et introduites séparément dans le milieu liquide bouillon glucosé tamponné (BGT) pour la revivification des bactéries, on étuve les tubes à 37°C pendant 30 minutes.

Après 30 minutes d'incubation, on prélève une goutte de chaque tube qu'on étale par stries sur le même milieu d'origine (SS). Les boîtes seront incubées à 37°C pendant 24 heures.

L'identification des souches suspectes de *Salmonella* a été réalisée par la galerie API20E selon le protocole cité précédemment.

Après purification et identification des colonies reprises précédemment, On a effectué une coloration de Gram puis une étude de la sensibilité de ces germes aux antibiotiques par la technique d'antibiogramme sur Muller Hinton.

III.4.2. Recherche des *Staphylococcus aureus*.

A partir de la solution mère et des dilutions décimales (10^{-3} à 10^{-1}), on porte aseptiquement 0.1 ml dans une boîte de pétri contenant de la gélose Chapman, qu'on étale par râteau. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h à 84h.

Les staphylocoques pathogènes forment des colonies luxuriantes, pigmentées, entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol. Les staphylocoques non pathogènes forment en général de petites colonies rouges qui ne modifient pas la teinte du milieu. (100)

Après une étape de revivification et repiquage de quelques colonies suspectes sur le même milieu d'origine (Chapman). On incube les boîtes à 37°C pendant 24h à 48h.

Après l'incubation, les colonies caractéristiques pures feront l'objet de trois tests complémentaires à savoir : une coloration de GRAM, une recherche de l'enzyme catalase et une Staphylocoagulase.

III.4.2.1. Test catalase

On dépose sur une lame propre et sèche **une goutte d'eau oxygénée H_2O_2** (peroxyde d'hydrogène), à l'aide d'une pipette Pasteur on prélève une colonie et on la dissocie dans la goutte d'eau oxygénée.

Si la bactérie possède la catalase, elle dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la **formation de bulles**. (101)

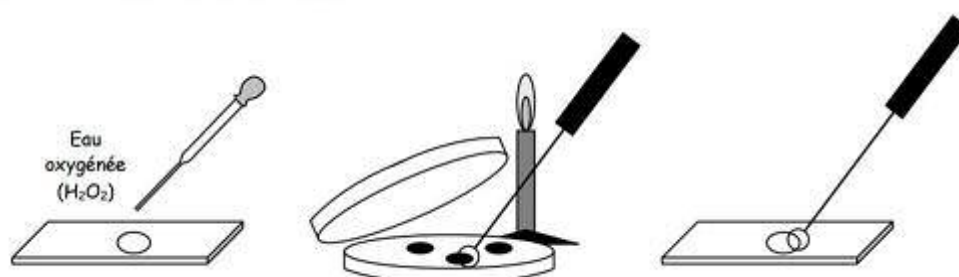


Figure 10 : Test de Catalase.

III.4.2.2. Test Coagulase

Ce test permet la recherche de la coagulase, exoenzyme capable *in vitro* de coaguler le plasma oxalaté de lapin. Parmi les Cocci Gram +, catalase +, seules les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma oxalaté de lapin. (102)

Au laboratoire, la détection de la coagulase a été effectuée en mettant 0.5 ml de plasma humain hépariné avec 0.5 ml de la suspension bactérienne à étudier dans un tube à hémolyse. On mélange bien le plasma avec l'inoculum puis on incube les tubes à 37°C; la prise en masse du mélange est réalisée en 3 à 6 ou parfois en 24 heures ; la coagulation peut être suivie d'une dissolution du caillot par suite de l'action de la Staphylokinase.

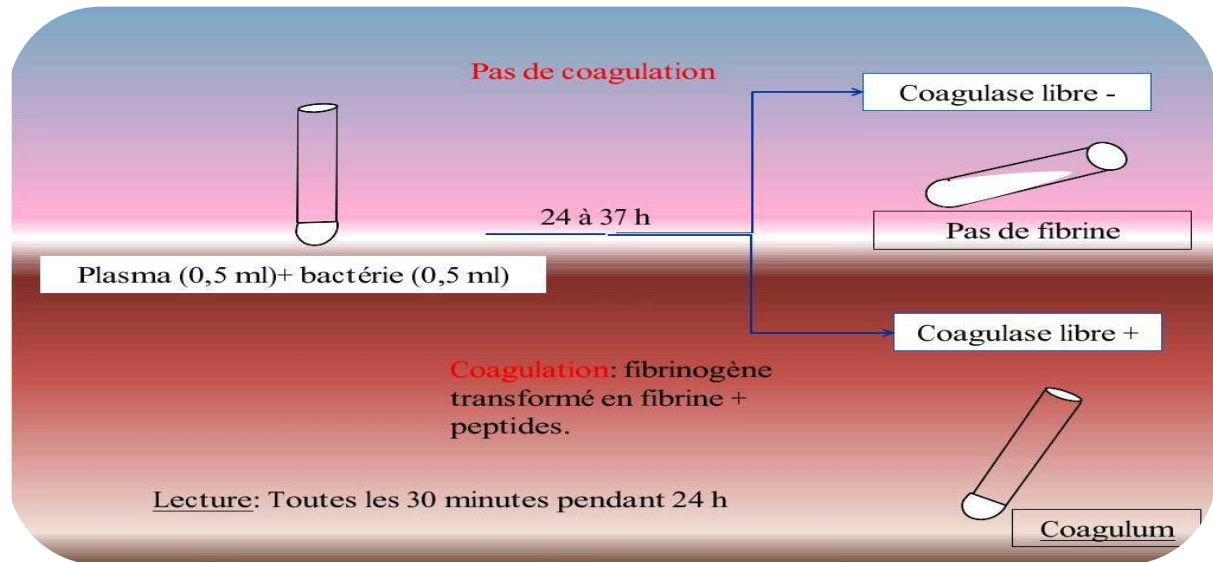


Figure 11 : Principe du test Coagulase.

III.5. Recherche et dénombrement des levures et moisissures.

L'ISO 21527-1:2008 spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des levures et des moisissures viables présentes dans les produits destinés à la consommation par l'homme ou à l'alimentation des animaux, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95 (œufs, viande, produits laitiers (excepté le lait en poudre), fruits, légumes, pâtes fraîches, etc.), au moyen de la technique par comptage des colonies à 22 -25°C. (1)

A partir de la solution mère et des dilutions décimales, 10^{-3} à 10^{-1} , on porte aseptiquement 4 gouttes dans une boîte de pétri contenant de la gélose OGA ou Sabouraud au Chloramphénicol.

On étale les gouttes à l'aide d'un râteau stérile, puis on incube à 22°C pendant 5 jours.

Dans le souci de ne pas se trouver en face de boîtes envahies soit par les Levures soit par les Moisissures, on doit effectuer des lectures et des dénombrements tous les jours, Levures à part et les Moisissures à part.

Lecture :

- Etant donné d'une part, qu'on a pris 4 gouttes des dilutions décimales,
- Etant donné d'autre part, qu'on considère que dans 1 ml, il y a 20 gouttes,
- Pour revenir à 1 ml, il faut multiplier le nombre trouvé par 5.

- Par ailleurs, étant donné qu'on a travaillé avec des dilutions décimales, on doit multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution correspondante, faire ensuite la moyenne arithmétique, puis exprimer le résultat final en ml ou en gr de produit à analyser.

IV. Control de qualité par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier.

Les données acquises par les spectrophotomètres constituent des spectres. Il s'agit d'ensemble d'un grand nombre de variables exploitables en analyse chimique quantitative moyennant l'établissement de modèles de calibrage par des méthodes chimiométriques. L'avantage de cette méthode d'analyse instrumentale est utilisé dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique pour l'identification des substances de base (analyse qualitative) et le contrôle de qualité des produits finis (analyse quantitative).

La spectroscopie moyen infrarouge (IR) a été longtemps utilisée uniquement pour l'élucidation de structure des molécules. Depuis près de vingt ans grâce à l'avènement des spectrophotomètres à transformée de Fourier (TF) l'utilisation de la spectroscopie IR s'est généralisée aussi en analyse quantitative. Le dosage des constituants du lait tel qu'il s'est développé dans les laboratoires de contrôle laitier est un exemple révélateur des capacités de la technique dans l'analyse rapide et le contrôle de qualité systématique des produits agroalimentaires.

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

IV.1. Principe de la spectroscopie

Exposer l'échantillon à une gamme de rayonnements électromagnétiques de l'IR moyen. Certains d'entre-eux provoquent des modifications de l'état énergétique vibrationnel de la molécule étudiée. Traiter le signal obtenu pour faire apparaître les bandes (ou pics) d'absorption qui correspondent aux radiations absorbées, celles dont l'énergie a été convertie en énergie vibro-rotationnelle. Essayer ensuite sur le spectre d'absorption ainsi obtenu d'identifier des bandes qui caractérisent les modes normaux de vibrations de groupes d'atomes et de groupements fonctionnels remarquables, présents dans la molécule.



Photographie 03 : Spectrophotomètre IR à transformée de Fourier (FTIR ou IRTF).

IV.2. Protocole d'une spectroscopie FTIR.

IV.2.1. Préparation de l'échantillon en pastille de KBr

L'échantillon (LAIT CRU) est incorporé à un support qui n'absorbe pas dans l'IR moyen, ici le bromure de potassium. Un mélange homogène à environ 1% de poudre lait cru/poudre KBr est préparé puis finement broyé. Il est déposé dans un moule (**Photographie 04**) puis soumis à une très forte pression dans une presse hydraulique (**Photographie 05**). Il est ensuite extrait du moule sous la forme d'une pastille (**Photographie 06**).

IV.2.2. Acquisition des spectres d'absorption FTIT.

Le porte-échantillon contenant la pastille KBr/lait cru est placé dans le compartiment de mesure du spectro sur le trajet du faisceau incident (**Photographie 03**). La qualité de la pastille conditionne celle du spectre.



Photographie 04 : Préparation de l'échantillon en pastille de KBr.



Photographie 05 : Presse hydraulique.



Photographie 06 : Pastille finale du lait cru.

Résultats et

Discussions

Résultats et discussions

I. Dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux.

La photographie 07 montre les résultats d'isolement sur le milieu gélosé PCA après incubation à 30°C pendant 72 h. On remarque l'apparition de colonies à la surface des milieux de culture, On compte toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes.

On calcule le nombre N , de microorganismes dénombrés à 30°C par ml de lait cru en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

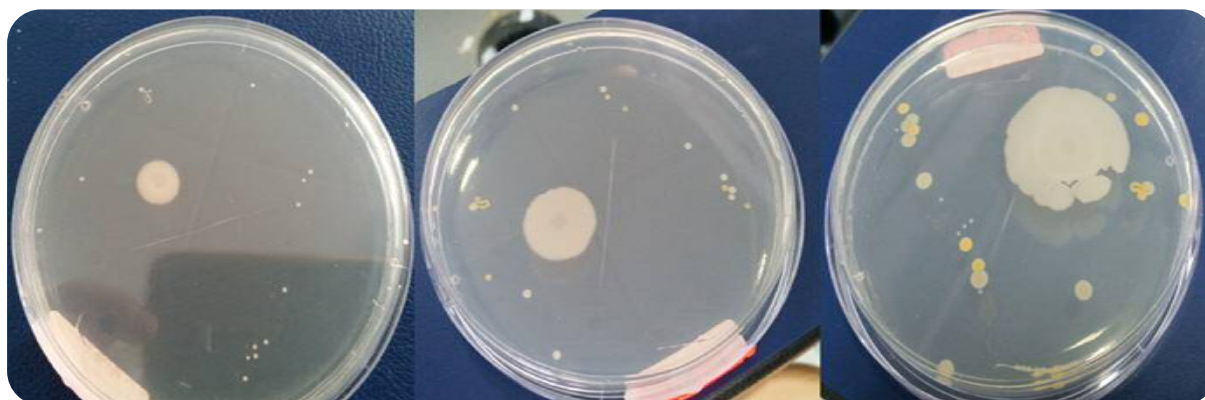
$$N = \frac{\sum C}{1.1 \times d}$$

où : $\sum c$: est la somme des colonies comptées sur les boîtes retenues.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

Le dénombrement se fait par comptage de colonies formées sur le milieu solide (il s'exprime alors en unités formant colonies : UFC). Seules les boîtes contenant entre 15 et 300 UFC ont été prises en considération.

Le résultat du dénombrement est le suivant : 3×10^3 UFC/ml



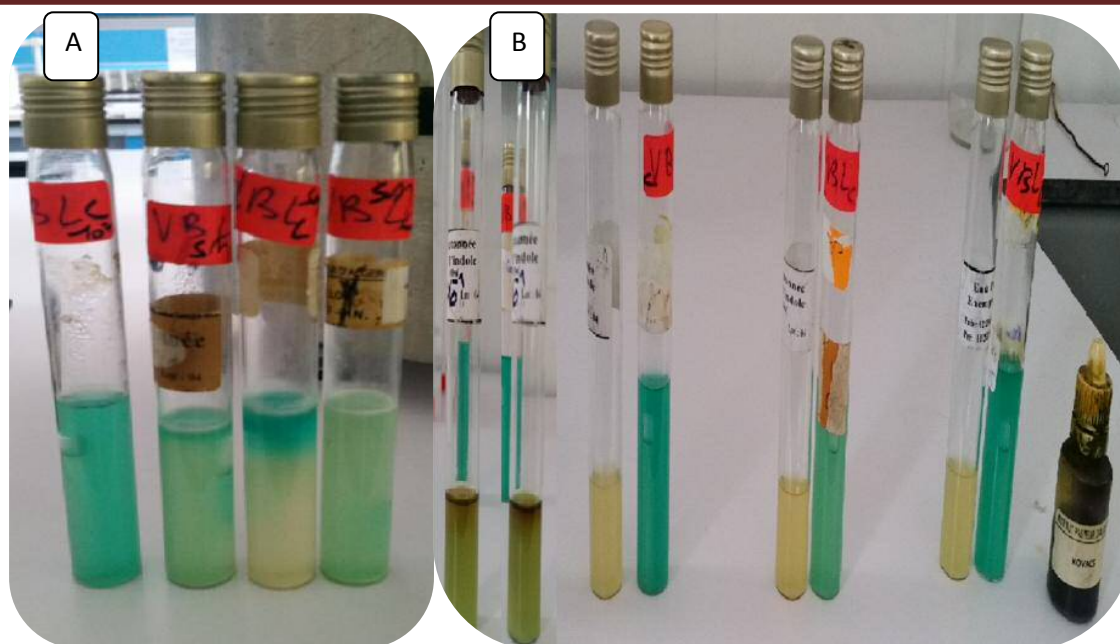
Photographie 07 : Résultats d'isolement sur gélose PCA.

II. Dénombrements des indicateurs de contamination fécale.

II.1 Dénombrement des coliformes totaux et fécaux.

Les photographies 08 A et 08 B montrent les résultats de dénombrement des indicateurs de contamination fécale (coliformes totaux et coliformes thermotolérants) sur les milieux liquides VBL (test préemptif, incubation à 37°C) et l'eau peptonée exempte d'indole (test confirmatif, incubation à 44°C). Les résultats sont résumés dans le **Tableau VIII**

Résultats et discussions



Photographie 08 : Résultat du dénombrement des coliformes totaux et fécaux. A : Test présumptif, B : Test Confirmatif

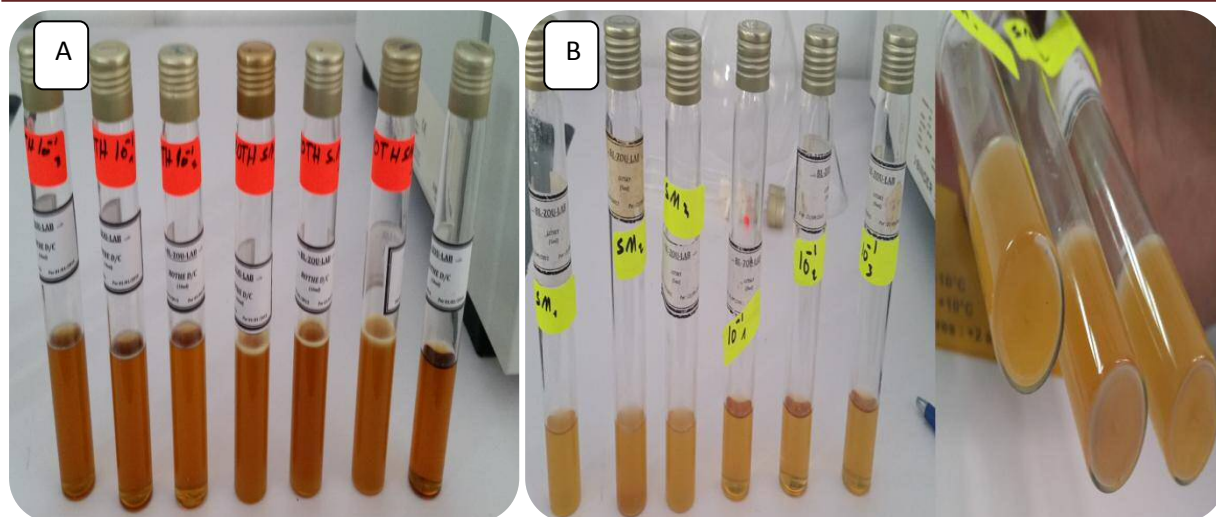
Tableau VIII : Dénombrement des coliformes totaux et thermorésistants.

Inoculum	Test de préemption VBL. 37°C	Nombre caractéristique	Test de confirmation		Nombre caractéristique
			VBL.44°C	EPEI.44°C	
SM	+	3	+	+	2
	+		+	+	
	+		-	-	
10 ⁻¹	+	1	+	+	1
	-				
	-				
10 ⁻²	-	0			0
	-				
	-				
CT. CTT UFC/ml	CT : 4.5×10= 45		CTT : 1.5×10= 15		

II.2 Dénombrement des Entérocoques fécaux.

Les photographies 09 A et 09 B montrent les résultats de dénombrement des Entérocoques fécaux sur les milieux liquides Roth (test présumptif, incubation à 37°C) et EVA Litsky (test confirmatif, incubation à 37°C). Les résultats sont résumés dans le **Tableau IX**

Résultats et discussions



Photographie 09 : Résultat du dénombrement des Entérocoques fécaux A : Test présomptif, B : Test Confirmatif

Tableau IX: Dénombrement des Entérocoques fécaux.

Dilutions	Test de présomption	Test de confirmation	Nombre Caractéristique
SM	+	+	3
	+	+	
	+	+	
10^{-1}	+	-	0
	+	-	
	+	-	
10^{-2}	-		0
	-		
	-		
UFC/ml	Streptocoques fécaux : $2.5 \times 10 = 25$		

Quelques gouttes du milieu Eva Litsky positif ont fait l'objet d'un test de confirmation sur gélose Bile esculine azide; La photographie 10 montre l'aspect des colonies apparues à la surface du milieu de culture après incubation sur le milieu Bile esculine azide (BEA) après une incubation à 37°C. Une coloration de Gram a été pratiquée sur des colonies prises au hasard.



Photographie 10 : Aspect des colonies des Entérocoques fécaux sur BEA.

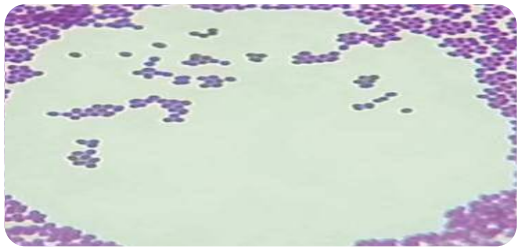
Résultats et discussions

La gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA) est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et dénombrement des bactéries du genre *Streptococcus* appartenant au groupe D et les bactéries du genre *Enterococcus* dans les produits alimentaires. Son utilisation est basée sur les principes suivants :

- ✓ L'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries contaminantes à Gram négatif.
- ✓ La bile de bœuf empêche la croissance des bactéries à Gram positif.
- ✓ Les entérocoques hydrolysent l'esculine en glucose et en esculetine. Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer (agent révélateur : apport de fer III).

Les résultats de l'étude des différents caractères macroscopiques et microscopiques des colonies sont représentés dans le **Tableau X**.

Tableau X : Résultats de l'étude macro et microscopique des Streptocoques fécaux.

Milieu de culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
Gélose BEA	- Petites colonies légèrement bombées et lisses, translucides entourées d'un halo noir Esculine +	 <p>Diplocoques ou courtes chainettes, à Gram positif.</p>

Les résultats du dénombrement des indicateurs de contamination fécale sont interprétés selon les critères microbiologiques de l'arrêté interministériel du **24-01-1998** du JO N°: **35/98** de la République Algérienne, présentés dans le tableau II. Cette norme fixe un **plan à trois classes de contamination** :

- Celle inférieure ou égale à « m » : tous les résultats égaux ou inférieurs à ce critère sont considérés de qualité satisfaisante ;
- Celle comprise entre « m » et le seuil « M », dans ce cas les résultats sont acceptables ;
- Celle supérieure au seuil limite « M », au delà duquel les résultats ne sont plus satisfaisants sans pour autant que le produit soit toxique. « m » et « M » expriment le nombre de germes présents dans un millilitre de lait.

M = 10 m, lors de dénombrement en milieu solide.

M = 30 m, lors de dénombrement en milieu liquide.

n : Nombre d'unité composant l'échantillon (égale à 1 pour le lait cru)

Résultats et discussions

Plan à deux classes de contamination Les résultats de l'examen permettent de déterminer deux classes de contamination, correspondant aux expressions : « Absence dans » : les résultats sont considérés comme satisfaisants; « Présence dans » : les résultats sont considérés comme non satisfaisants (Arrêté interministériel du 24-01-1998 du JO de la République Algérienne]

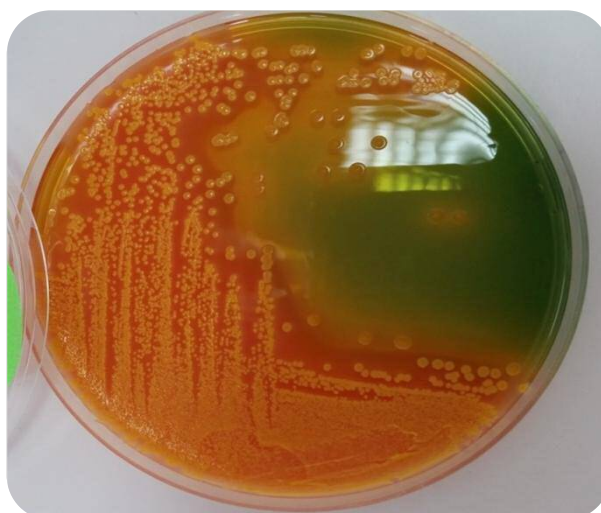
Tableau XI : Critères microbiologiques du lait cru (Arrêté interministériel du 24-01-1998 du JO de la République Algérienne) (1).

Lait cru	n	m	M	Notre résultat
Flore aérobie totale mésophile	1	10^3 mo ml ⁻¹	10^6 mo ml ⁻¹	3.10^3 UFC/ml.
Coliformes fécaux	1	10^3 mo ml ⁻¹	3.10^4 mo ml ⁻¹	$1,5.10 = 15$
Entérocoques fécaux	1	Absence / 0.1 ml	-	$2,5.10 = 25$

Concernant la qualité globale de notre échantillon d'étude (Tableau XI), les streptocoques fécaux sont la première cause de non conformité : 100% des échantillons non satisfaisants, La flore aérobie mésophile totale et les coliformes fécaux, ne dépassant pas la limite d'acceptabilité selon la norme Algérienne (Arrêté interministériel du 24-01-1998 du JO de la République Algérienne).

II.3. Repiquage et purification des coliformes thermotolérants

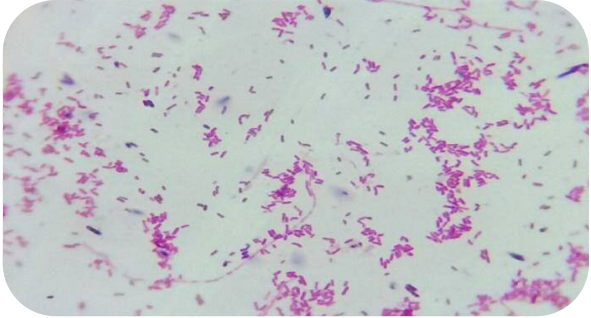
La photographie 11 montre l'aspect des colonies après repiquage et purification sur gélose Hektoen. Une coloration de Gram a été pratiquée sur quelques colonies prises au hasard. Les résultats de l'étude des différents caractères macroscopiques et microscopiques des colonies sont représentés dans le Tableau XII.



Photographie 11 : Aspects macroscopique des souches des coliformes thermotolérants après purification.

Résultats et discussions

Tableau XII : Résultats de l'étude macroscopique et microscopique des souches des coliformes thermotolérants.

Milieu de culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
Gélose Hektoen	- Colonies saumon, lisses, bombées, arrondies, à contour régulier et parfois irrégulier, de consistance crémeuse, de 1 à 2mm de diamètre.	 <p>Bacilles isolées ou en courtes chainettes, à Gram négatif.</p>

La gélose Hektoen est un milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries à partir de différents prélèvements. Son utilisation est basée sur les principes suivants :

✓ L'inhibition de la flore à Gram positif est due à la présence des sels biliaires qui peuvent également inhiber légèrement la croissance de quelques souches de microorganismes à Gram négatif.

✓ Le milieu contient trois glucides : lactose, saccharose et salicine. La forte concentration en lactose favorise la visualisation des entérobactéries en évitant le problème des fermentations tardives. Les autres glucides ont été introduits afin d'assurer une différenciation plus performante et de réduire la toxicité engendrée par les indicateurs colorés.

✓ En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies.

✓ Le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en saumon les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les lactose négatif

Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine).

L'observation microscopique des lames colorées par la technique de Gram, montre des bacilles isolées ou en courtes chainettes colorés en rose. Les colonies apparues à la surface de la gélose sont donc issues de bacilles à Gram négatif, ceci concorde avec le caractère de la gélose Hektoen qui est un milieu sélectif pour les bacilles Gram négatif.

Résultats et discussions

II.4. Identification biochimique des isolats.

Les colonies lactose positif purifiées par repiquage sur gélose Hektoen ont subi un test d'identification biochimique sur galerie API 20 E.

La lecture des galeries biochimiques est réalisée à l'aide du tableau de lecture (**Annexe 02**) et du logiciel **API Excel (Annexe 05)**, la lecture des résultats se fait soit de manière directe, par un changement de couleur du milieu du puits (en raison d'un changement de pH), soit de manière indirecte, dans ce cas il faut rajouter certains révélateurs dans les puits concernés (réactif TDA, Kovacs, VP1 et VP 2). Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau XIII**



Escherichia coli



Kluyvera spp

Photographie 12 : Les espèces bactériennes identifiées et l'aspect de leurs galeries biochimique.

Au total 12 souches ont été identifiées à partir du lait cru. Le nombre de bactéries de chaque espèce est présenté dans la **figure**

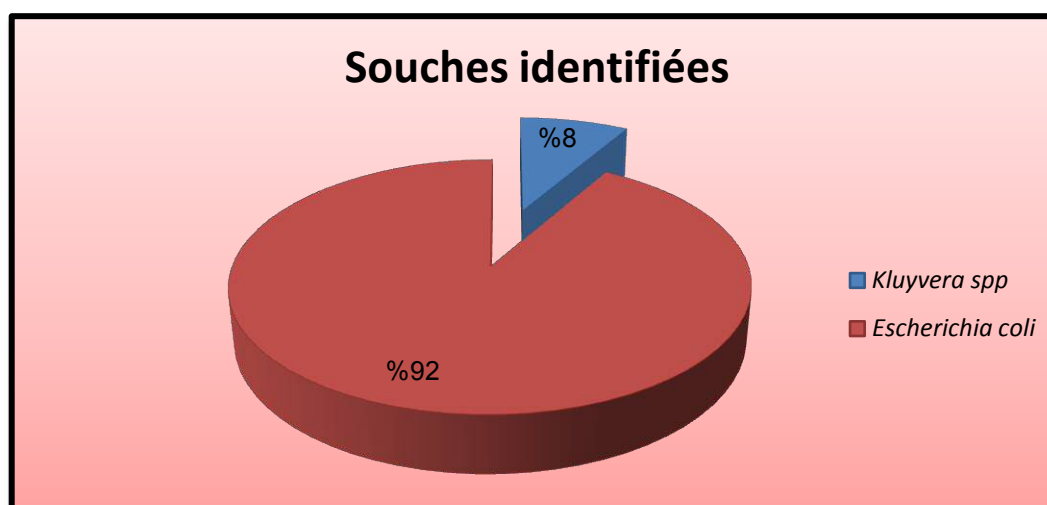


Figure 12 : Pourcentage d'espèces bactériennes identifiées

Résultats et discussions

Tableau XIII : Résultats d'identification des coliformes thermorésistants par la galerie API 20 E.

Tests Bactéries	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Espèces
CTT1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Kluyvera spp</i>
CTT3	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT4	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT5	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT6	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT7	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT8	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT9	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT10	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT11	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>
CTT12	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i>

(+) : Résultat positif, (-) : Résultat négatif; (ONPG) : β -galactosidase ; (ADH) : Arginine-dihydrolase ; (LDC) : Lysine-décarboxylase ; (ODC) : Ornithine-décarboxylase ; (CIT) : Citrate ; (H₂S) : Production du sulfure d'hydrogène ; (URE) : Uréase ; (TDA) : Tryptophane-désaminase ; (IND) : Indole ; (VP) : Réaction de Voges-Proskauer ; (GEL) : Gélatine ; (GLU) : D-glucose ; (MAN) : D-mannitol ; (INO) : Inositol; (SOR) : D-sorbitol ; (RHA) : L-rhamnose ; (SAC) : D-saccharose ; (AMY) : Amygdaline ; (MEL) : D-melibiose; (ARA) : L- arabinose.

Résultats et discussions

Les résultats obtenus montrent une prédominance d'*Escherichia coli* avec 11 souches soit **92%** suivie de *Kluyvera spp* avec une seule souche (**08%**).

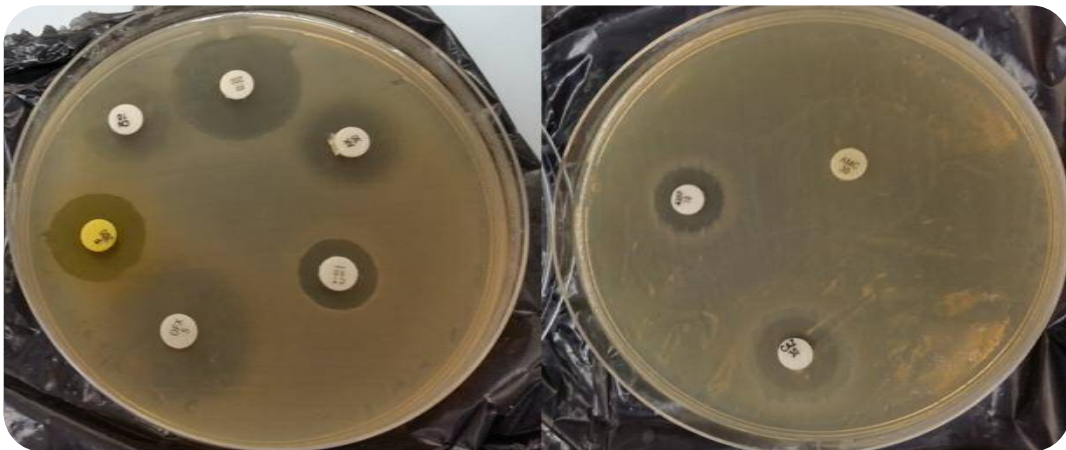
L'espèce *Escherichia coli* est le principal indicateur d'une contamination fécale récente. La contamination du lait par *Escherichia coli* peut être due à l'excrétion mammaire ou à une contamination de l'eau utilisée pour les différentes opérations de nettoyage. Ils peuvent entraîner des toxi-infections alimentaires. La présence de ces bactéries indique l'origine humaine de la contamination. **(103)**

Kluyvera spp est une entérobactérie largement répandue dans l'environnement humide (eaux de boisson, eaux usées, sol, aliments, évier d'hôpital. . .). C'est un commensal du tube digestif, des voies respiratoires et du tractus urinaire de l'homme. Elle est d'origine clinique et elle a été incriminée comme responsable de différents types d'infections, parfois sévères, voire mortelles malgré un traitement antibiotique adapté. **(104)**

III. Antibiorésistance des espèces identifiées

La résistance aux antibiotiques a été testée pour chacune des bactéries identifiées vis-à-vis de 09 antibiotiques. Les résistances naturelles des souches isolées n'ont pas été prises en considération.

La **photographie 13** montre les résultats des antibiogrammes obtenus, les valeurs des diamètres d'inhibitions sont comparées aux valeurs du tableau de lecture (**Annexe 07**). Les valeurs obtenues nous ont permis de classer les bactéries en sensible (**S**), intermédiaire (**I**) ou résistante (**R**) à chaque antibiotique. **Tableau XIV**



Photographie 13 : Photographies des antibiogrammes des espèces de CTT identifiées.

Les taux de résistance pour chaque antibiotique sont calculés, les espèces Intermédiaires étant ensuite incluses dans la catégorie R. les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau XV**.

Résultats et discussions

Tableau XIV: La classe de résistance aux antibiotiques des coliformes thermotolérants

ATB \ Bactéries	AMP	AMC	CAZ	OFX	F	CN	FF	CT	AK
<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	S	R	S	S	R	I
<i>Kluyvera spp</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	R	R	I	S	S	S	S	R	I
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	I	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	S	R	I	S	S	S	S	R	I
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	I
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	S	S	S	R	I
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	S	S	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	I
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S

S : Sensible

I : Intermédiaire

R : Résistante

Tableau XV : Les taux de résistance aux antibiotiques des coliformes thermotolérants.

ATB \ % de R	% de résistance des bactéries	% de sensibilité des bactéries	% d'intermédiaire des bactéries
AMP	33.33%	66.67%	0%
AMC	41.66%	58.34%	0%
CAZ	16.66%	66.68%	16.66%
OFX	0%	100%	0%
F	8.33%	83.34%	8.33%
CN	0%	100%	0%
FF	0%	100%	0%
CT	83.33%	16.67%	0%
AK	0%	50%	50%

On observe que les taux de résistance varient nettement d'un antibiotique à l'autre. L'Amoxicilline/Acide clavulanique (AMC) est l'antibiotique qui présente le taux de résistance le plus haut avec **41.66%**, le taux de résistance pour l'Ampicilline AMP est 33.3 % même taux de résistance pour la ceftazidime, ces antibiotiques sont très utilisés sans limite d'usage puisqu'ils appartiennent à la famille d'antibiotiques la plus prescrite en pratique ambulatoire les bêta-lactamines. Cette résistance est due à la production d'une céphalosporinase à bas niveau.

Un taux de résistance élevée est retrouvé aussi pour la colistine avec un taux de 83.33 %.

Les aminosides sont les antibiotiques les plus actifs puisque le taux de résistance est nul

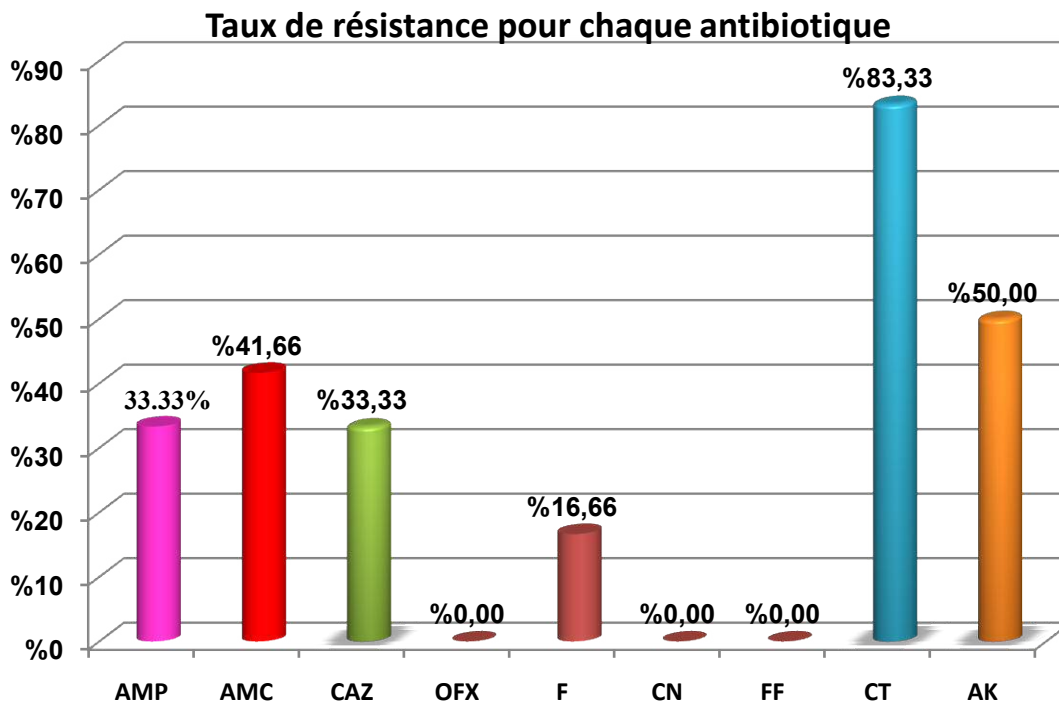


Figure 13: Pourcentage d'isolats de coliformes thermotolérants résistants à divers antibiotiques.

III.1. Multirésistance des espèces identifiées.

Notre travail a également permis d'étudier le phénomène de multi résistance. Une souche multirésistante est une souche qui présente une résistance à au moins deux antibiotiques. Les pourcentages de souches résistantes à au moins un antibiotique, à au moins deux antibiotiques, à au moins trois antibiotiques, à au moins quatre antibiotiques et à au moins cinq antibiotiques ont été calculés et rapportés dans la figure.

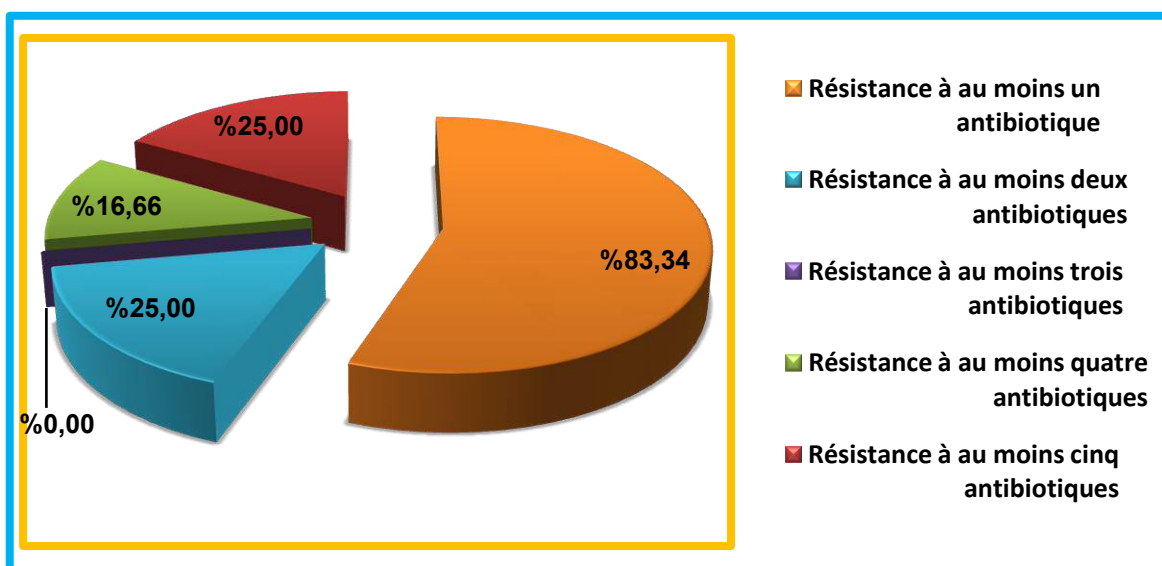


Figure 14 : Pourcentage d'isolats des coliformes résistants à au moins 1, 2, 3, 4, et 5 antibiotiques.

Résultats et discussions

Parmi la totalité des 12 espèces des coliformes thermotolérants identifiées **16.66%** sont sensibles et **83.34%** résistent à au moins un antibiotique, **25%** résistent à au moins deux antibiotiques, **00%** résistent à au moins trois antibiotiques, **16.66%** résistent à au moins quatre antibiotiques, et **25%** de résistance à au moins cinq antibiotiques.

IV. Recherche des germes pathogènes.

IV.1. Recherche des *Salmonella*

La Photographie 14 montre le résultat de pré-enrichissement des bactéries dans l'eau péptonée tamponnée et l'enrichissement dans le bouillon au sélénite, incubé à 37°C pendant 24h.



Photographie 14 : Résultat de l'enrichissement sur bouillon au sélénite et eau peptonée tamponnée.

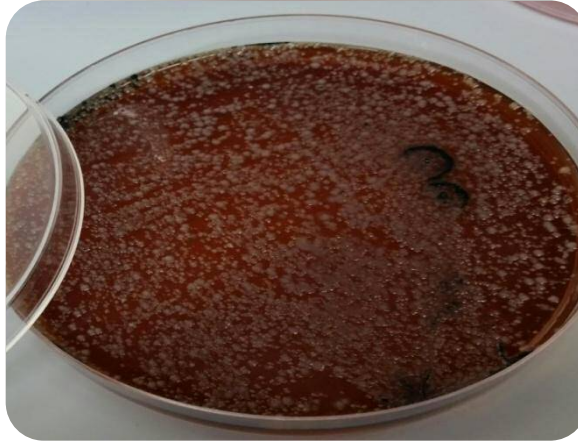
La photographie 15 montre le résultat de l'isolement des échantillons du lait cru enrichis sur sélénite et eau peptonée tamponnée sur gélose *Salmonella-Shigella* (S.S.), on remarque qu'après incubation, plusieurs types de colonies à la surface du milieu sont apparus, ces colonies sont incolores due à l'absence d'acidification du milieu donc sont des bactéries **lactose -**, avec ou sans centre noir (production de sulfure de fer noir due à la réduction du thiosulfate en H₂S: **souche H₂S +/-**).

La gélose *Salmonella-Shigella* est utilisée pour l'isolement des salmonelles et des shigelles dans les produits alimentaires ainsi que dans les autres prélèvements (d'origine animale, par exemple) susceptibles d'en contenir, après enrichissement préalable. Son utilisation est basée sur les principes suivants :

- La gélose SS est un milieu modérément sélectif où l'inhibition des microorganismes à Gram positif est due à la présence de sels biliaires, de vert brillant et de citrate de sodium.
- Les concentrations élevées en citrate et thiosulfate de sodium limitent le développement des coliformes et évitent l'envahissement du milieu par les *Proteus*.

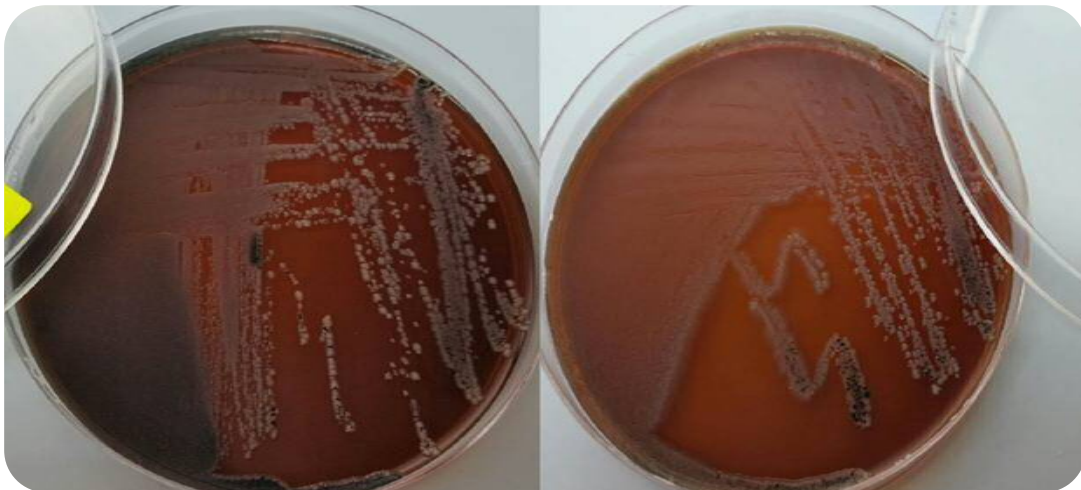
Résultats et discussions

- La fermentation du lactose en acide est révélée, en présence de rouge neutre, par la formation de colonies rouges. Les microorganismes lactose-négatif présentent des colonies incolores.
- En présence de thiosulfate et de citrate ferrique, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène donnent des colonies à centre noir.



Photographie 15 : Résultat de la culture sur la gélose *Salmonella-Shigella* (SS).

La photographie 16 montre le résultat du repiquage et la purification des colonies obtenues dans la gélose SS sur la même gélose, après l'incubation on remarque des colonies incolores avec ou sans centre noir (cultures pures).



Photographie 16 : Aspect macroscopique des cultures pures sur gélose SS.

IV.1.1. Identification biochimique des isolats.

L'identification biochimique des souches a été réalisée par les galeries biochimiques API 20E, elles permettent de réaliser plusieurs tests des métabolismes glucidiques, protéiques et enzymatiques visant à identifier la bactérie en basant sur la lecture de ces caractères.

Résultats et discussions

Tableau XVI : Résultat de l'identification biochimique des bactéries par les galeries API 20E.

Tests Bactéries	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Espèces
C1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella arizonae</i>
C2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter braakii</i>
C3	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella arizonae</i>
C4	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Citrobacter freundii</i>
C5	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Citrobacter youngae</i>
C6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia fonticola</i>
C7	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Citrobacter freundii</i>
C8	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter braakii</i>

(+) : Résultat positif, (-) : Résultat négatif; (ONPG) : β -galactosidase ; (ADH) : Arginine-dihydrolase ; (LDC) : Lysine-décarboxylase ; (ODC) : Ornithine-décarboxylase ; (CIT) : Citrate ; (H₂S) : Production du sulfure d'hydrogène ; (URE) : Uréase ; (TDA) : Tryptophane-désaminase ; (IND) : Indole ; (VP) : Réaction de Voges-Proskauer ; (GEL) : Gélatine ; (GLU) : D-glucose ; (MAN) : D-mannitol ; (INO) : Inositol; (SOR) : D-sorbitol ; (RHA) : L-rhamnose ; (SAC) : D-saccharose ; (AMY) : Amygdaline ; (MEL) : D-melibiose; (ARA) : L-arabinose.

Résultats et discussions

Les galeries biochimiques ont été lues à l'aide du logiciel **API Excel**, La lecture des résultats se fait soit de manière directe, par un changement de couleur du milieu des puits (en raison d'un changement de pH), soit de manière indirecte, auquel cas il faut rajouter certains révélateurs dans les puits concernés. Les résultats des différents caractères biochimiques obtenus sont regroupés dans le **Tableau XVI**

L'aspect des galeries obtenues après lecture est représenté sur la **photographie 17** Au total 08 colonies ont été identifiées, les résultats montrent que les genres retrouvés sont : *Salmonella arizonae*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter youngae*, *Serratia fonticola*.



Salmonella arizonae



Citrobacter braakii



Citrobacter freundii



Citrobacter youngae



Serratia fonticola

Photographie 17 : Aspect des galeries biochimique des espèces bactériennes apparues sur la gélose *Salmonella –Shigella*.

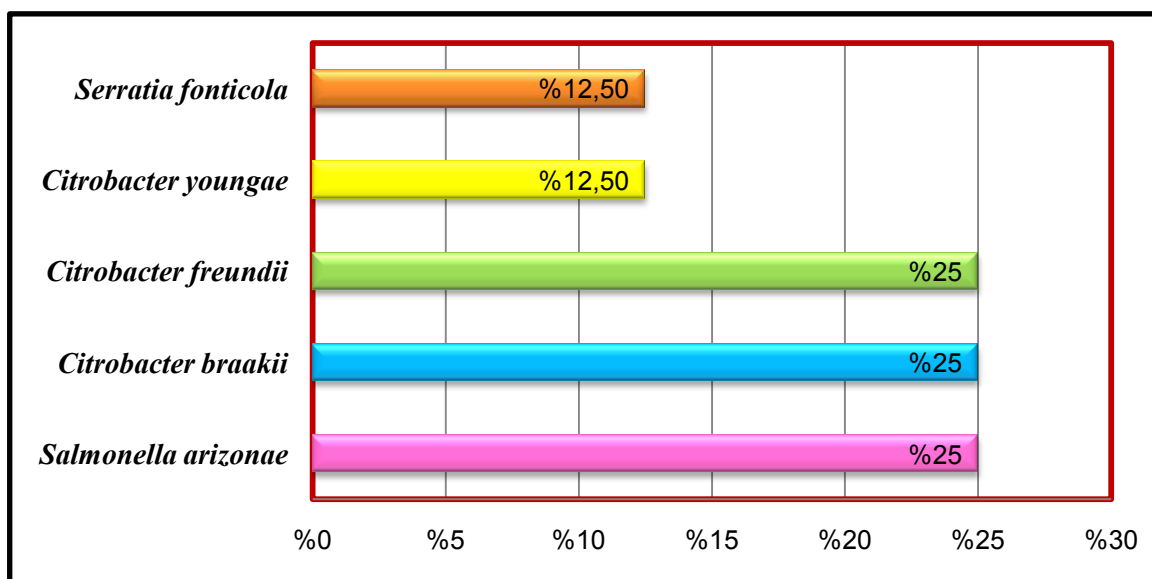


Figure 15 : Pourcentage d'espèces bactériennes identifiées à partir de la gélose *Salmonella - Shigella*.

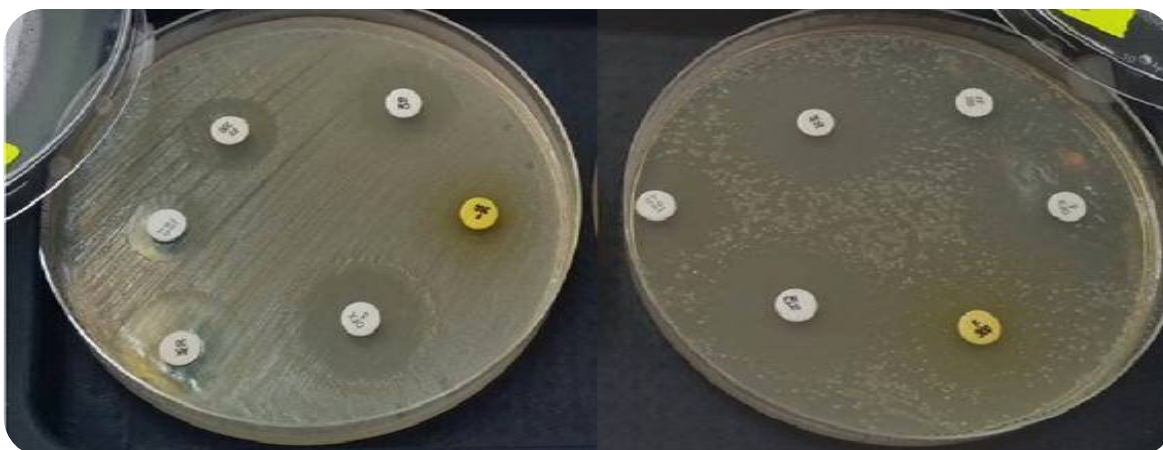
IV.1.2. Profil de résistance aux antibiotiques.

La résistance aux antibiotiques a été testée pour chacune des bactéries identifiées vis-à-vis de 09 antibiotiques déjà mentionnés dans la partie précédente. Les résistances naturelles des souches isolées n'ont pas été prises en considération.

La **photographie 18** montre les antibiogrammes obtenus, les valeurs des diamètres d'inhibitions sont comparées aux valeurs du tableau de lecture (**Annexe 07**).

Les valeurs obtenues nous ont permis de classer les bactéries en sensible (**S**) ou résistante (**R**) à chaque antibiotique. **Tableau XVII**.

Les taux de résistance pour chaque antibiotique sont calculés, les espèces Intermédiaires étant ensuite incluses dans la catégorie R. les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau XVIII**



Photographie 18 : Photographies des antibiogrammes des espèces identifiées.

Résultats et discussions

Tableau XVII : La résistance aux antibiotiques des espèces identifiées.

ATB \ Bactéries	AMP	AMC	CAZ	OFX	F	CN	FF	CT	AK
<i>Salmonella arizonae</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter braakii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Salmonella arizonae</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter youngae</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Serratia fonticola</i>	R	R	S	S	R	S	S	R	S
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	S	R	S	R	S	S
<i>Citrobacter braakii</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	S

S : Sensible

R : Résistant

Tableau XVIII : Les taux de résistance aux antibiotiques des espèces identifiées.

ATB \ % de R	% de résistance des bactéries	% de sensibilité des bactéries
AMP	87.5%	12.5%
AMC	75%	25%
CAZ	25%	75%
OFX	12.5%	87.5%
F	25%	75%
CN	100%	00%
FF	12.5%	87.5%
CT	12.5%	87.5%
AK	100%	00%

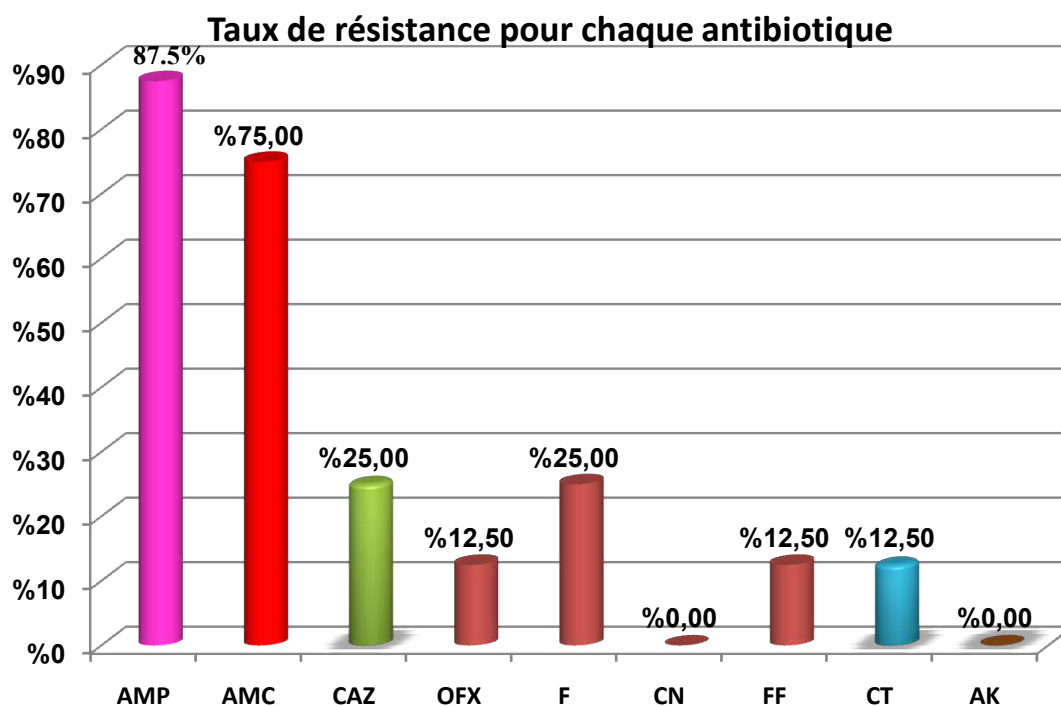


Figure 16 : Pourcentage des souches résistantes (taux de résistance).

On observe que les taux de résistance varient nettement d'un antibiotique à l'autre. L'Ampicilline (AMP) est l'antibiotique qui présente le taux de résistance le plus haut avec **87.5%**. Cet antibiotique est très utilisé sans limite d'usage puisqu'il appartient à la famille d'antibiotiques la plus prescrite en pratique ambulatoire, ce qui peut expliquer la présence de nombreuses souches résistantes à son égard. Cette résistance est due à la production d'une pénicillinase à bas niveau.

Le taux de résistance à l'association Amoxicilline/Acide clavulanique (AMC) est plus bas que celui de l'Ampicilline ce qui est cohérent avec l'effet de l'acide clavulanique. Cet inhibiteur de β -lactamases est utilisé en association avec les β -lactames telles l'Amoxicilline pour contrer les résistances dus à la présence de β -lactamases. 25% des souche sont résistantes à la Cefotaxime (CAZ).

Les aminosides sont les antibiotiques les plus actifs puisque le taux de résistance est nul

IV.1.3. Multirésistance.

Une souche multirésistante est une souche qui présente une résistance à au moins deux antibiotiques.

La totalité des 08 espèces des souches identifiées c'est-à-dire **100%** résistent à au moins un antibiotique, **37.5%** résistent à au moins deux antibiotiques, **12.5%** résistent à au moins trois antibiotiques, **12.5%** résistent à au moins quatre antibiotiques, et même pourcentage **12.5%** de résistance à au moins cinq antibiotiques, et aucune résistance à au moins sept à huit antibiotiques.

Résultats et discussions

Les pourcentages de souches multirésistantes ont été calculés et rapportés dans la Figure

17

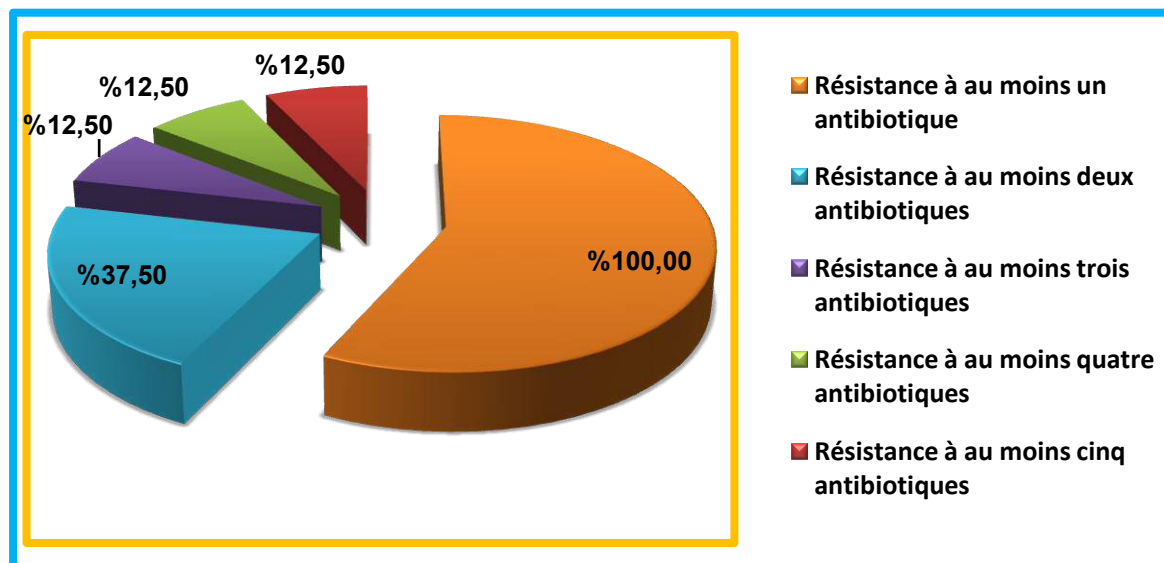


Figure 17 : Pourcentage d'isolats des souches résistantes à au moins 1, 2, 3, 4, 5 antibiotiques.

IV.2. Recherches des *Staphylococcus aureus*.

IV.2.1. Aspect macroscopiques et microscopiques des isolats.

La présence des staphylocoques dans le lait cru représente un risque pour la santé humaine, parce que certaines souches appartenant principalement à l'espèce *Staphylococcus aureus* produisent des entérotoxines dont l'ingestion provoque une toxiinfection alimentaire à staphylocoques. (64)

Sur le milieu Chapman, les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté dans le cas contraire, les colonies sont non pigmentées, de couleur blanche. Ces colonies sont brillantes, crémeuses, arrondies à bords réguliers de 1 mm de diamètre après 24 heures d'incubation à 37°C. (Photographie 19),



Photographie 19 : Aspects des colonies sur gélose Chapman.

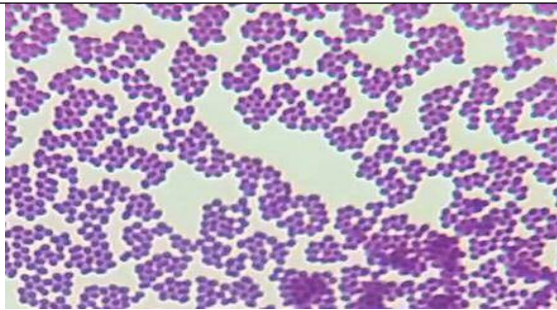
Résultats et discussions

La photographie 20 montre les résultats obtenus après repiquage et purification sur la même gélose Chapman, Une coloration de Gram a été pratiquée sur six colonies suspectes. Les résultats de l'étude des différents caractères macroscopiques et microscopiques des colonies sont représentés dans le **Tableau XIX**.



Photographie 20 : Aspect des colonies des souches identifiées après repiquage.

Tableau XIX : Résultats de l'étude macroscopique et microscopique des souches identifiées.

Milieu de culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
Gélose Chapman	- Colonies de petite taille moyenne, lisse, brillantes, pigmentées en jaune (due à la fermentation du mannitol) ou non pigmentées.	 <p>coques isolées ou sous forme de grappes, à Gram positif.</p>

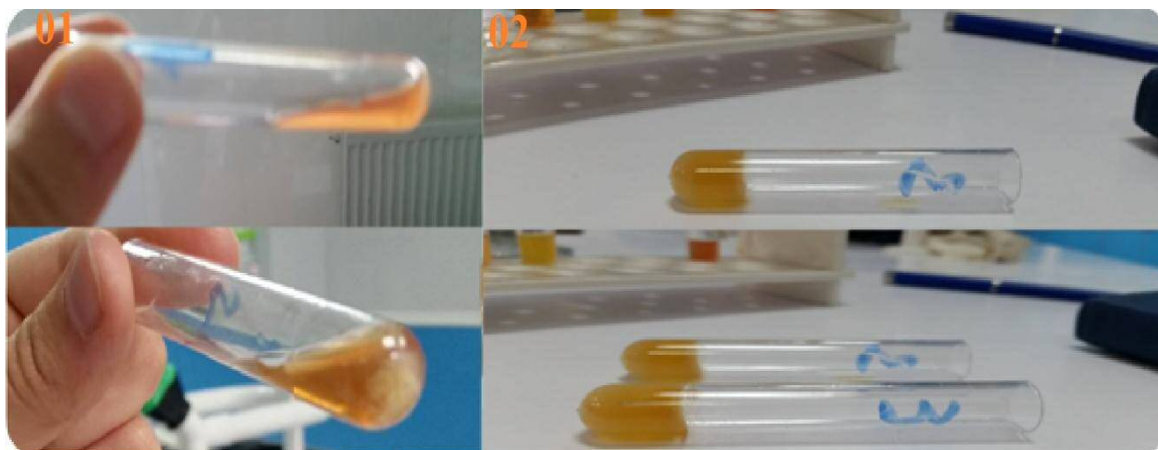
La gélose de Chapman au mannitol permet l'isolement sélectif, la recherche et le dénombrement des staphylocoques pathogènes dans le lait. Elle se caractérise par :

- La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que les staphylocoques.
- La fermentation du mannitol, mise en évidence par le virage au jaune de l'indicateur pH (rouge de phénol), permet d'orienter le diagnostic.
- La mise en évidence des staphylocoques pathogènes devra être confirmée par la recherche de la coagulase et la catalase.

Résultats et discussions

Coagulase positive : Il y a formation d'un coagulum de fibrine. Le fibrinogène (soluble) a donc été transformé en fibrine (insoluble) la bactérie possède donc une coagulase libre. Elle est dite coagulase libre (+) ou encore coagulase (+).

Coagulase négative : Il n'y a pas de formation d'un coagulum de fibrine. Le fibrinogène (soluble) n'a donc pas été transformé en fibrine (insoluble) la bactérie ne possède donc pas de coagulase libre. Elle est dite coagulase libre (-) ou encore coagulase (-).



Photographie 21 : Test de coagulase, 01 Négatif et 02 Positif.

Un test catalase a été pratiqué sur quelques colonies, l'apparition d'un dégagement de bulles met en évidence un test catalase positif.



Photographie 22 : Test de catalase.

A partir des résultats obtenus et résumés dans le **Tableau XX**, On peut conclure que 50% des espèces sont *Staphylococcus epidermidis* ,(non pathogène) et 50% des espèces sont *Staphylococcus aureus*.

Résultats et discussions

Tableau XX : Résultats d'identification des *Staphylococcus* isolées.

Souches purifiées	Test catalase	Test coagulase	Souches suspectes
01	Positif	Négatif	Staphylocoque non pathogène
02	Positif	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>
03	Positif	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>
04	Positif	Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>
05	Positif	Négatif	Staphylocoque non pathogène
06	Positif	Négatif	Staphylocoque non pathogène

La norme concernant le *Staphylococcus aureus* est l'absence du germe dans le lait cru. Les résultats obtenus présentent une présence de *Staphylococcus aureus* dans 50% de notre échantillon. Cela veut dire que le lait est non conforme à la norme. Cette non conformité est l'œuvre d'une mauvaise hygiène du personnel chargé à la traite. (1)

IV.3. Dénombrement et recherche des moisissures.

Les photographies 22, 23, 24 montrent l'aspect des colonies des moisissures qui sont apparues sur le milieu OGA dont la solution mère et les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} :

Levures :

- Colonie de contour bien défini, de couleur beige rosé à bleu vert, colonie pouvant apparaître en relief, normalement sans centre de couleur intense.

Moisissures :

- Grandes colonies aux contours diffus, couleur variable (moisissures pouvant produire leur propre pigmentation), colonies apparaissant plates, le centre de la colonie présente normalement une coloration intense.

La gélose glucosée à l'oxytétracycline est utilisée pour la recherche et le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires et les produits cosmétiques. Son utilisation est basée sur les principes suivants :

- La croissance des levures et des moisissures est favorisée en présence de glucose et d'extrait de levure.

- L'addition extemporanée d'oxytétracycline permet d'inhiber les bactéries, y compris les Lactobacilles

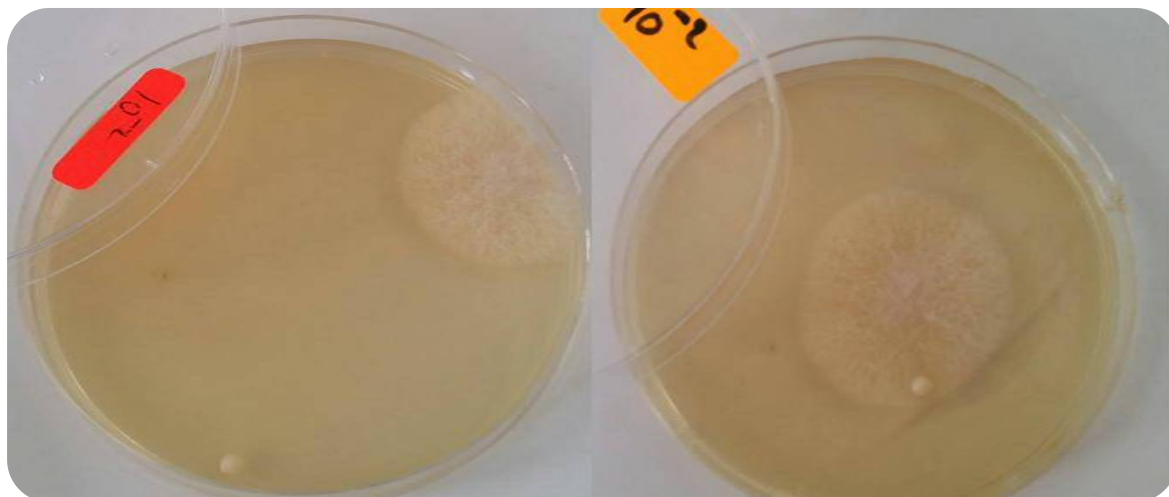
Selon la norme NF ISO 7218 : on prend en considération seules les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies en considération. (105)

Dans notre cas les 2 boîtes d'OGA qui représentent la dilution 10^{-1} ont été prises en considération, dont le nombre est 1.36×10^4 UFC/ml.

Résultats et discussions

Les niveaux de levures et moisissures rencontrés dans les laits sont faibles, bien souvent inférieurs à 100 ufc/ml, mais avec une grande variabilité en fonction des élevages. (53)

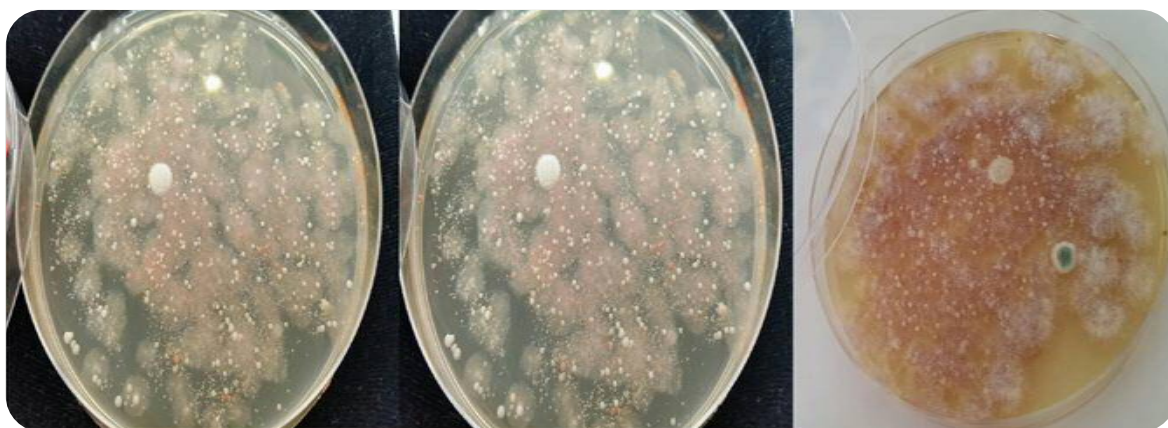
Leur présence est assez importants dans l'ensemble des prélèvements, il est difficile d'avoir une conclusion pratique particulière, car ce sont des éléments permanents de l'environnement.



Photographie 23 : Aspect des champignons sur milieu OGA (dilution 10^{-2}).



Photographie 24 : Aspect des champignons sur milieu OGA (dilution 10^{-1}).



Photographie 25 : Aspect des champignons sur milieu OGA (Solution mère).

Résultats et discussions

V. Control de qualité par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier.

Les analyses du lait jouent un rôle capital dans le secteur laitier : elles permettent d'évaluer la qualité bactériologique et la composition du lait de chaque ferme, et donc sa valeur marchande

La structure de la matrice laitière, en particulier les structures des protéines et des lipides et les interactions protéines-protéines et protéines-lipides d'un lait peut fournir des informations utiles sur la qualité du lait. Actuellement, Très peu de techniques permettent d'étudier de manière non invasive la structure de la matrice laitière. Récemment, la spectroscopie moyen infrarouge (MIR) couplée à la chimiométrie a permis de caractériser la structure moléculaire du lait de manière exacte.

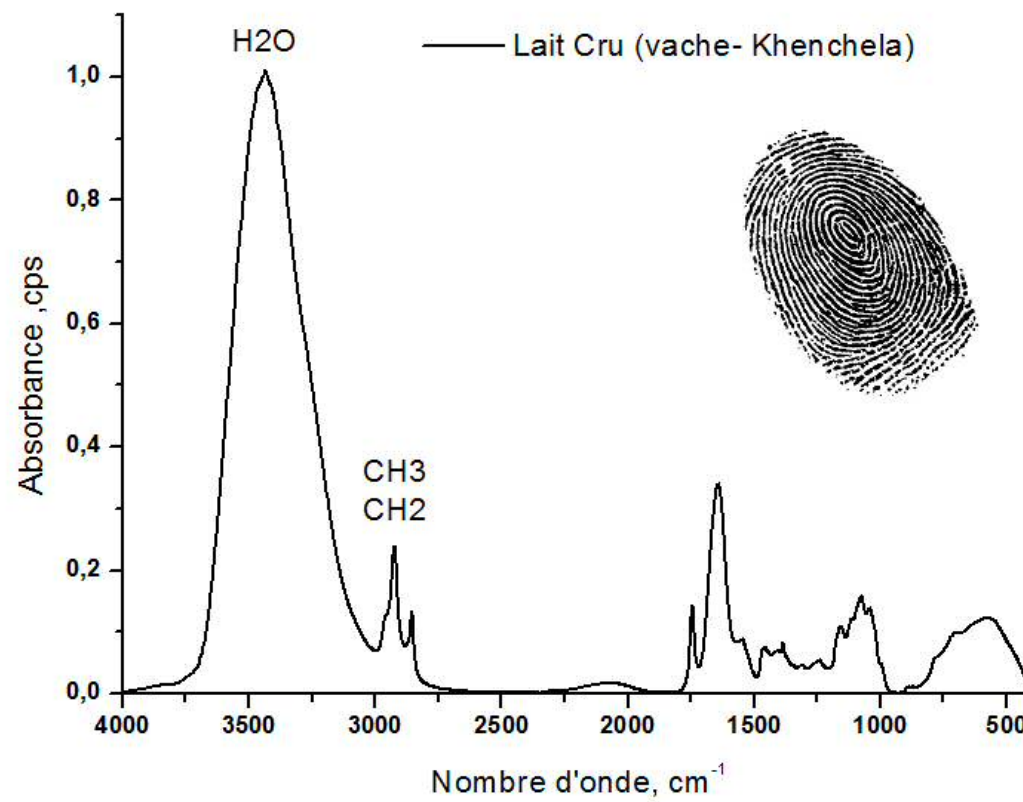
.Les spectres obtenus par cette technique ont été comparés avec des études similaires et a porté surtout sur la teneur en matières grasse, en protéines et en lactose.

La région 1240 -1560 cm^{-1} est caractéristique des protéines (Spectre a-b). Elle est dominée par les bandes dites amide II vers 1240 cm^{-1} et amide III vers 1560 cm^{-1} liées aux liaisons peptidiques.

La région 1740-2900 cm^{-1} est très intéressante pour l'identification et le dosage des acides gras. (Spectre a-b).

La région 1000 -12000 cm^{-1} est caractéristique des protéines (Spectre a-b) du lactose.

Résultats et discussions



-Spectre du lait de vache-Khenchela

Résultats et discussions

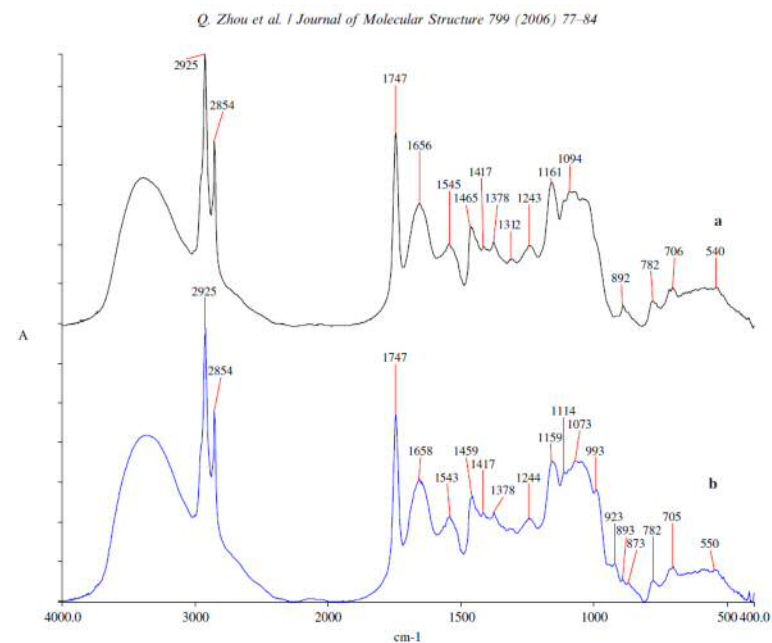
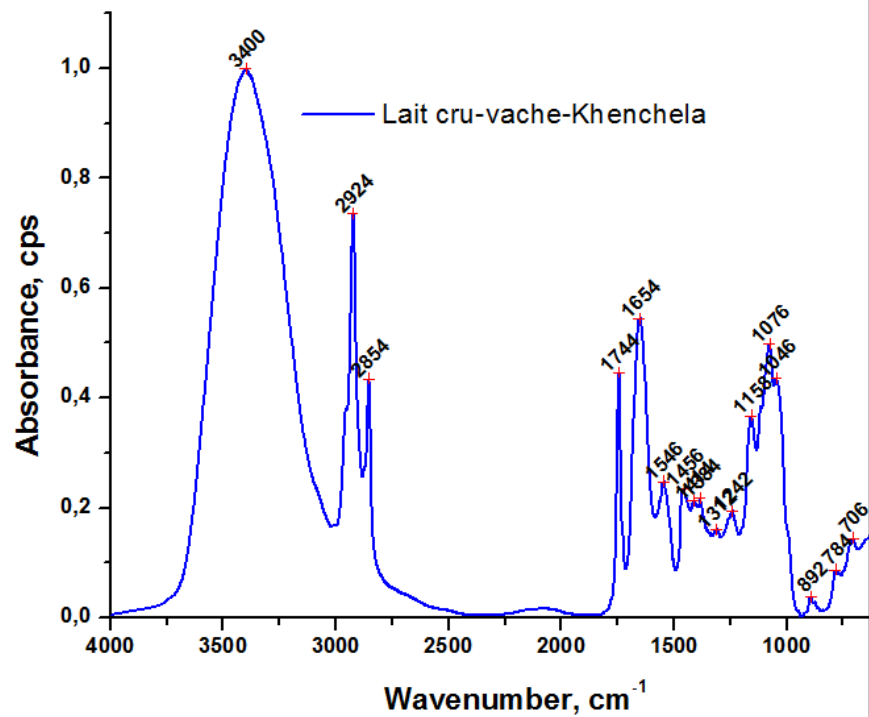
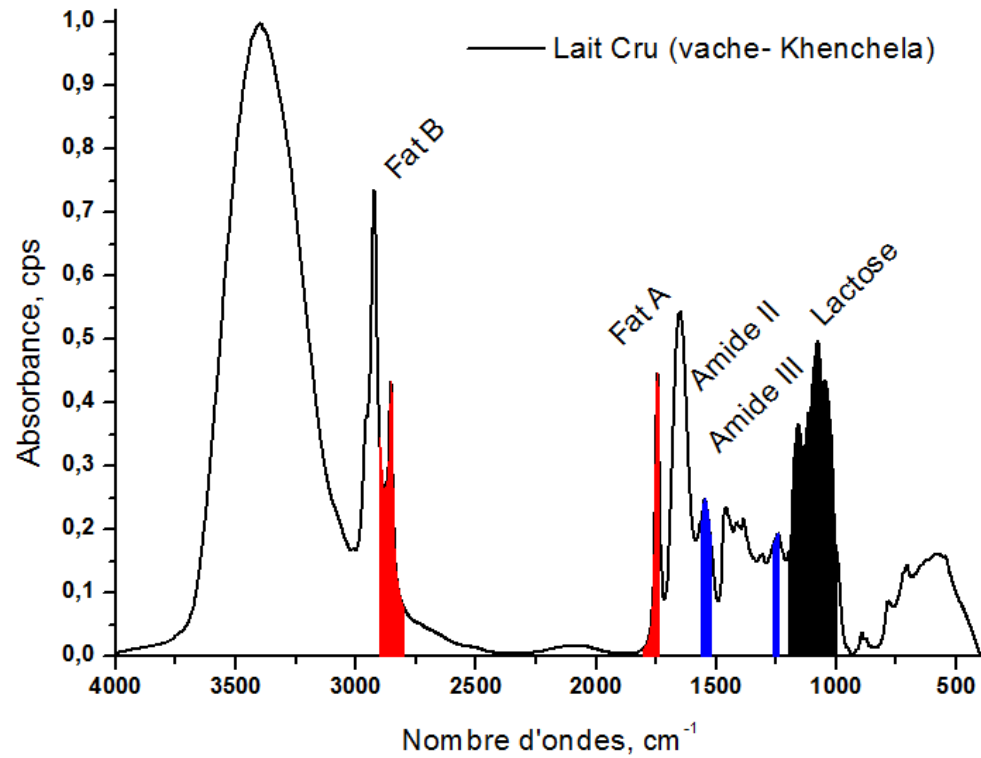


Fig. 1. FT-IR spectra of WMP (a) and Sweet WMP (b).

-Comparaison de notre spectre avec celui de la référence citée ci-dessous. (106)

Résultats et discussions



(a)

-(a)- Spectre FTIR (Fourrier Transform Infra Red) du lait de vache-Khenchela,

-(b)- Zones prédites par FTIR (107).

● Average spectral heritabilities

Traits	Estimated heritability (2009)	Spectral heritability (range)
Lactose	0.38	0.25 (0.054 - 0.38)
Fat	0.30	0.22 (0.041 - 0.385)
Protein	0.35	0.25 (0.017 - 0.39)

1000 - 1200 cm^{-1}

1740 - 1800 cm^{-1} (Fat A)
2800 - 2900 cm^{-1} (Fat B)

1240 - 1260 cm^{-1} (amide III)
1520 - 1560 cm^{-1} (amide II)

Contents are predicted from FTIR spectra

(b)

Résultats et discussions

Table 2

Quantitative analysis by curve-fitting of the major component bands of the FTIR spectra of unused, used and brushed wooden shelves and Reblochon rind for the following spectral windows: 920–1180 cm^{-1} , 1180–1485 cm^{-1} , 1485–1780 cm^{-1} , and 2820–2990 cm^{-1} .

	Unused wood shelves	Wood shelves before cleaning	Wood shelves after cleaning and drying	Reblochon rind	Assignment ^a
<i>Polysaccharides region 920–1180 cm^{-1}</i>					
946	–	–	3.9	–	None
976	–	3.8	–	–	Could be attribute to mannans from <i>Geotrichum</i> cell wall
989	15.6	–	27.2	–	None
1030	32.9	49.3	31.3	33.3	Sugars or polysaccharides
1057	38.5	–	25.9	–	Cellulose, hemicellulose
1078	–	32.1	–	59.5	Glycogen, nucleic acids
1108	10.2	10.5	10	–	OH association from COOH in wood
1155	2.7	4.2	1.6	7.1	Esters (lipids), cellulose, hémicellulose
<i>Mixed region 1180–1485 cm^{-1}</i>					
1206	1.7	–	6.4	4.3	None
1237	14.9	22.8	–	32.8	Nucleic acids, phospholipids
1266	24.4	–	15.2	–	Lignin
1312	15.3	9.2	3.8	13	None
1338	6	–	0.15	–	Cellulose
1373	17.4	13	16.5	15.8	Lignin, hemicellulose
1410	–	42.6	49.5	27	Proteins or carboxyl functions
1423	11.7	–	–	–	Lignin
1459	8.7	12.4	8.3	4.4	Proteins, lipids, lignin
<i>Proteins region 1485–1780 cm^{-1}</i>					
1510	4.9	–	3.7	–	Lignin
1516	–	0.6	–	1.1	Tyrosin
1544	3	18.8	3.6	17.8	Amide II (antiparallel β -sheet)
1565	–	–	4.7	–	Amide II
1586	13.2	–	13.4	–	Lignin
1627	32.6	56.8	–	56.1	Amide I
1643	16.4	14.2	68.1	13.3	Amide I (antiparallel β -sheet)
1673	14.2	9.5	2.2	8.6	Amide I (antiparallel β -sheet)
1692	6.4	–	4.2	–	Amide I
1725	9.2	–	–	–	Lipids, polysaccharides
1742	–	–	2	–	None
<i>Lipids region 2820–2990 cm^{-1}</i>					
2851	17.7	13.3	2.2	6.7	ν_s CH ₂ from lipids, cellulose
2879	–	9.7	7.6	4.5	ν_s CH ₃ from lipids
2896	43.6	–	–	–	CH from methyl groups
2925	32.7	62.1	70.1	48.4	ν_{as} CH ₂ from lipids
2944	–	–	–	27.2	none
2961	6	14.9	20.1	–	ν_{as} CH ₃ from lipids
2973	–	–	–	1.2	None

^a Galichet et al. (2001), Legal, Manfait, and Theophanides (1991), Maquelin et al. (2002), Naumann et al. (2005), Pandey (2005), Polovka et al. (2006), Sockalingum et al. (1997).

Tableau de comparaison (108).

Conclusion

Conclusion et perspectives

Nous avons mené une étude microbiologique de lait de vache cru collecté à partir d'une ferme traditionnelle de la wilaya de Khenchela pendant le mois de Mars en utilisant des méthodes normalisées pour l'isolement et l'identification des microorganismes. L'analyse effectuée a portée principalement sur la quantification des bactéries indicatrices d'hygiène à savoir les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants et les entérocoques fécaux, et des bactéries potentiellement pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*) aussi les moisissures et levures comme indicateurs d'altération.

Concernant la qualité globale de notre échantillon d'étude, Entérocoques fécaux sont la première cause de non conformité : 100% des échantillons non satisfaisants, La flore aérobie mésophile totale et les coliformes fécaux, ne dépassant pas la limite d'acceptabilité selon la norme Algérienne (Arrêté interministériel du 24-01-1998 du JO de la République Algérienne).

Les résultats montrent aussi une contamination du lait par les *Staphylocoques* dont 50% sont à coagulase positive il s'agit de l'espèce *Staphylocoques aureus*. Les espèces identifiées lors de la recherche des Salmonelles sont *Citobacter* dans **62.5%** des échantillons *Salmonella arizonae* **25 %** et *Serratia* **12.5 %**. Les résultats obtenus montrent que la qualité bactériologique du lait cru de vache étudié est non satisfaisante par rapport aux critères retenus en Algérie.

Les résultats de l'antibiogramme montrent que les bactéries présentent des profils inquiétants de résistance surtout aux bêtalactamines. Les bactéries testées montrent une résistance majoritaire pour l'**Ampiciline (87.5%)** et l'**Amoxiciline + acide clavulanique (75%)** plus la **Colistine avec 83.33%** et l'**Amikacine (50%)**, on a pu observer des bactéries multirésistantes.

Dans cette étude on a également dénombré des champignons (moisissures et levures) qui ont présenté une charge très élevés : **1.36×10^4 UFC/ml** et non conforme aux normes.

En générale le nombre et le type des microorganismes qui contamineront le lait seront influencés par: la santé et la propreté de l'animal ; l'environnement dans lequel l'animal est maintenu et l'environnement de traite ; les procédures de nettoyage et désinfection de l'équipement de traite et de stockage ; la température et le temps de stockage.

Sur le plan nutritionnel, l'accroissement des activités métaboliques microbiennes conduit à un abaissement de la valeur nutritionnelle du lait et de ses dérivés, du fait de la dégradation de ses constituants.

Pour notre part, nous suggérons de suivre les perspectives suivantes :

- ✓ Approfondir cette étude par des analyses complémentaires et une caractérisation microbiologique complète
- ✓ Instaurer une politique de qualité avec la vulgarisation des bonnes pratiques d'élevage et insister sur la propreté des animaux, de leur environnement immédiat et la salubrité de la traite. De plus la diffusion d'un avis recommandant à la population de faire bouillir le lait local avant toute consommation devrait être faite.
- ✓ La prévention des toxi-infections d'origine alimentaire à staphylocoques passe par la mise en place d'un programme d'action contre les mammites bovines, le maintien du lait à température de réfrigération et le strict respect des règles d'hygiène lors des manipulations à la ferme et aux points de vente, afin de limiter le nombre de *S. aureus* présents dans le lait
- ✓ Instauration d'une politique de traçabilité et de bonnes pratiques pour l'utilisation des antibiotiques dans la filière laitière afin d'assurer la salubrité durant toute la chaîne de production du lait.
- ✓ instaurer des outils de rémunération universels, ce qui suppose de généraliser les contrôles à tous les échantillons de lait livré, de pénaliser les fraudeurs et de faire bénéficier ceux qui s'appliquent de primes conséquentes.
- ✓ Améliorer ou changer la source d'abreuvement et d'alimentation des vaches.

Références

Bibliographiques

1. **ARRÊTÉ INTERMINISTÉRIEL du 27 octobre 1993** (JORA) relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. JORA N°69, 1993, Algérie.
2. **Berber, A., Boubekour, S., Hamiroune, M., (2014).** Qualité bactériologique du lait cru de vaches locales et améliorées vendu dans les régions de Jijel et de Blida (Algérie) et impact sur la santé publique. École Nationale Supérieure Vétérinaire (ENSV), B.P. 161, El Harrach, Alger, Algérie, Département des Sciences vétérinaires, Université SAAD Dahleb, B.P. 270, Route de Soomâa, Blida, Algérie.
3. **Benzakour, A., Berny, E-H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., Labioui, H., Ouhssine, M., (2009).** Étude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Qualité, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, BP 133, 14000 Kénitra, Maroc.*
4. **Dictionnaire: LAROUSSE, (2005).** 100^e Edition, Paris, 1927p.
5. **Codex Alimentarius. (1999).** Norme générale pour l'utilisation de termes de laiterie CODEX STAN 206-1999. pp : 1-4.
6. **Cazet, M., (2007).** Bilan du taux de contamination et étude préparatoire au dosage de résidus de produits phytosanitaires dans le lait de grand mélange bovin. Thèse de doctorat, université Claude-Bernard, Lyon I, 167p.
7. **Haller, C., Floquet, K. (2002).** Le lait de la vache a la brique.
8. <http://www.cerin.org/question-aux-dieteticiens/difference-entre-lait-pasteurise-et-uhf.html> (site consulté le 17/04/2016).
9. **FAO (1998).** Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, Collection FAO: Alimentation et nutrition, n° 28, ISBN 92-5-20534-6.
10. **Alves d'Oliveira L., (2007).** Composition chimique du lait, [en ligne], Cours de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon, Alimentation des Animaux, mis à jour le 27/02/2007, [http://www2.vet-lyon.fr/ens/nut/webBromato/cours/cmlait/compolai.html] (consulté le 29/04/16).
11. **Charles, A., Guy, L., (1997).** Biochimie alimentaire. 4e Edition., Masson, Paris, 248p.
12. **Gérard, B., Pierre, S., Romain, J., Thomas, C., (2007).** Science des aliments. Volume 2., LAVOISIER, Paris, 456p.
13. <http://www.lousonna.ch/dossier/produits/ilait.html> Lousonna., (site consulté le 16/02/2016). Lait.

14. **Ramet, J.-P., (1985).** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Archives de documents de la FAO.
15. **Florence, C-L., (2010).** Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse de Doctorat, Ecole nationale vétérinaire, Alfort, 122p.
16. **Rouillé, B., Peyraud, L., Hurtaud, C., Brunshwig, Ph., (2011).** La composition en acides gras du lait de vache. Institut de l'Elevage, Paris, 6p.
17. **Bachtarzi, N., (2012).** Qualité microbiologique de lait cru destinier à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'Est Algérien. Mémoire de Magister en science alimentaire, université Mentouri Constantine, 83p.
18. **Ghaoues, S., (2011).** Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algerien. Mémoire de Magister en sciences alimentaires. Université Mentouri (I.N.A.T.A.A), Constantine, 190p.
19. **Bessas, F., Mechouar, M., Trari, F., (2012).** Contrôle de qualité bactériologique et physico-chimique du lait cru et du lait pasteurisé, Université de Tiaret.
20. **Boubezari, M-T., (2010).** Contribution à l'étude des caractères physico-chimiques et mycologiques du lait chez quelques races bovines, ovines et caprines dans quelques élevages de la région de Jijel. Mémoire du Magister en médecine vétérinaire, université Mentouri, Constantine, 112p.
21. **Gérard, B., Michel, M., Pierre, S., Romain, J., Thomas, C., (2008).** Les produits laitiers. 2^e édition. LA VOISIER, Paris.
22. **Arrour, K., Bennaceur, B., (2010).** Estimation des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de collecte dans la région Constantine. Mémoire du diplôme d'ingénieur d'état en nutrition et technologies agro-alimentaires, Université Mentouri, I.N.A.T.A.A, Constantine.
23. **laits et produits laitiers Vache .Brebis. Chèvre.1., (1985).** Collection : sciences et techniques agro-alimentaires, Volume 1. lavoisier, Paris.
24. **Ane, B., Karen., Troels, V., (2014).** Le lait et la sante: Ce qu'en disent aujourd'hui des chercheurs indépendants. BoD - Books on Demand. Paris, France, 164p.
25. **Serigne, A-C., (1997).** Contribution a l'étude de la pasteurisation du lait : faisabilité de la technique et contrôle de la qualité dans la région de Kolda. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, Université Cheikh Anta Diop DAKAR, Sénégal.

26. **Haj Mbarek, R., M'sadak, Y., (2014).** Facteurs de variation cellulaire du lait de vache chez des petits et moyens troupeaux hors sol menés en milieu semi-aride (TUNISIE LITTORALE), Institut Supérieur Agronomique de Chott Mariem, Université de Sousse, Tunisie.
27. **Mireille, Kouame-sina S., (2013).** Contribution à la gestion des risques de contamination microbienne et diversité génotypique des espèces du genre bifidobacterium isolées de la chaîne de production du lait local à Abidjan. République de Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat. Université Nangui Abrogoua.
28. **Roger, W., (1988).** Alimentation de la vache laitière. 3^e édition 97. Edition : France Agricole. INRA, Paris.
29. **Abdelilah, A., (2011).** Productions bovines-support de cours- Département De Productions Et Biotechnologies Animales, Institut Agronomique et Vétérinaire HASSAN I.
30. **Adjas, R-C., (2015).** Effet de stade de lactation sur la qualité et la composition physico-chimique du lait et son aptitude. Mémoire de Master en science et technique de production animal, Université Eljilali Bounaama, Khemiss Meliana.
31. **Benyounes, A., Bouriache, H-E., Lamrani, F., (2013).** Effet du stade de lactation sur la qualité physico-chimique du lait de vache Holstein élevée en région Est d'Algérie, Université 8 mai 1945, Guelma, Université Houari Boumediene.
32. **Thierry, J., (2005).** Traire un lait de qualité: une attention de tous les jours. Problèmes rencontrés par les producteurs : causes et solutions. Comité du lait, Battice.
33. <http://www.gettyimages.fr/detail/vid%C3%A9o/milking-a-cow-3-shots-film/166499358> (Site consulté le 10/04/2016).
34. **Mehnoune, S., Ferhoul, K., (2015).** Contrôle de la propreté hygienique de lait de vache cru avec application de la préparation du fromage frais « petit suisse ». Mémoire de master en Analyse Biologique et Biochimique, Université Khemis Miliana.
35. **Mezdoud, A., (2011).** Identification des facteurs ayant un impact sur la qualité du lait de vache produit à la ferme ; Proposition des bonnes pratiques d'hygiène. Mémoire de Master en Gestion de la qualité des aliments, Université Mentouri (I.N.A.T.A.A), Constantine.
36. **Lazar, L., (2014).** Effet de l'alimentation de la vache sur la qualité du lait. Mémoire de Master en production et amélioration végétale, Université de Tlemcen.

37. **Kalandi, M., Sow, A., Guigma, W-V-H., Zabre, M-Z., Bathily, A et Sawadogo, G-J., (2015).** Evaluation de la qualité nutritionnelle du lait cru dans les élevages traditionnels de Kaolackau Sénégal, Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV), Sénégal.
38. **Coulon, J-B., Hoden, A., (1991).** Maitrise de la composition du lait : influence des facteurs nutritionnels sur la quantité et les taux de matières grasses et protéiques. INRA, production animal.
39. **Betelgeux, S-L.** Formation relative à la sécurité alimentaire en fromagerie, Chapitre 3: Composition du lait et caractéristiques physiques et chimiques. OAPEE.
40. **Baira, S., Cheraa, K., (2013).** Analyse microbiologique, physicochimique et organoleptique d'un produit laitier fermenté : l'exemple du Lben. Mémoire d'ingénieure d'état en nutrition, Alimentation et Technologie Agroalimentaire, Université Mentouri, I.N.A.T.A.A, Constantine.
41. **Hadef, A., (2015).** Recherche de bactéries lactiques à activité Antimycotoxinogène isolées à partir du lait caillé. Mémoire de Master en biotechnologie fongique, Université Mentouri, Constantine.
42. **Belili, A., Boulahdid, R., (2014).** Evaluation de la qualité microbiologique de deux types de laits :lait pasteurisé partiellement écrémé et lait entier pasteurisé conditionné, produits a la laiterie de Numidia de Constantine. Mémoire de Master en microbiologie générale, Université Mentouri, Constantine.
43. **Benallegue, H., Debbeche, S-N., (2015).** Etude de la qualité physico-chimique et microbiologique de 3 marques de lait U.H.T, (Candia, Obeï et Hodna). Mémoire de Master en Toxicologie et santé. Université des Frères Mentouri Constantine.
44. **Parguel, P., Corrot, G., Sauvée, O., (1994).** Variations du point de congélation et principales causes du mouillage du lait de vache, Institut de l'Élevage, Paris.
45. **Fidjel, Y., (2015).** Diagnostique pour la mise en place d'une démarche qualité dans la laiterie ENNADJAH-MAGHNIA. Mémoire de Master en Agronomie, Université ABOU-BEKR BELKAID. Tlemcen.
46. **Mesmoudi, S., Benamar, A., (2014).** Etude comparative entre crème glacée a base de lait cru et crème glacée a base de lait en poudre. Mémoire d'ingénieur en Agronomie, Université ABOU-BEKR BELKAID. Tlemcen.
47. **Renard, J., (2014).** A propos de lait cru. Direction générale opérationnelle de l'Agriculture et des Ressources naturelles et de l'Environnement du Service public de Wallonie.

48. **Vignola., Carole, L., (2002).** Science et technologie du lait, transformation de lait. Ecole polytechnique de Montréal. Québec.
49. **Renard, J., (2014).** A propos de lait cru. Direction générale opérationnelle de l'Agriculture et des Ressources naturelles et de l'Environnement du Service public de Wallonie.
50. **Adesiyun, A., Stoute S. et David B. (2007).** Pre-processed bovine milk quality in Trinidad: prevalence and characteristics of bacterial pathogens and occurrence of antimicrobial residues in milk from collection centres. Food Control.
51. **Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamiti, R., Belkhou, R et Zerrouq, F., (2014).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. Laboratoire Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments (LASSA), Université Sidi Mohammed Ben Abdallah, Ecole Supérieure de Technologie, Fès, Maro.
52. **Boulahdid, R., (2014).** Mémoire de Mastère en Microbiologie Général. Evaluation de la qualité microbiologique de deux types de lait : lait pasteurisé partiellement écrémé et lait entier pasteurisé conditionné produits a la laiterie Numidia de Constantine. Université Constantine 1.
53. **Tormo, H., (2010).** Diversité des flores microbiennes des laits crus de chèvre et facteurs de variabilité. Thèse de doctorat en Génétique et Nutrition. Université Toulouse III. France.
54. **Idder, Z., (2014).** Mémoire de Mastère en Microbiologie. Etude du pouvoir acidifiant des bactéries lactique appartenant au genre Leuconostoc. UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMEN.
55. **Mahi, M., (2010).** Mémoire de Magistère en Microbiologie Alimentaire. Etude technologique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de Brebis. Université d'Oran.
56. **Daoudi, A., (2006).** Mémoire de Magistère en science alimentaire. Qualité d'un fromage local a base de lait de chèvre. Université Hassiba Ben Bouali. Chlef.
57. **Jos H.J. Huis in't Veld., (1996).** Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. International Journal of Food Microbiology.
58. **Cousin M.A., Jay J.M. & Vasavada P.C., (2001).** Psycrotrophic microorganisms. In: Downes, F.P., Ito, K. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington, pp. 159-166.

59. **Mansel, W- G., (2008). Nouveaux outils de contrôle de la qualité microbiologique du lait.** Semaine en science et technologie laitières - Québec 2008 Department of Food Science, University of Guelph, Ontario, CANADA.
60. **Ranieri ML et Boor KJ., (2010).** Tracking and eliminating sporeformers in dairy systems. Australian Journal of Dairy Technology.
61. **Vissers M.M.M., Driehuis F., Giffel M.C.T., De Jong P. et Lankveld J.M.G., (2007).** Concentrations of butyric acid bacteria spore in silage and relationships with aerobic deterioration. Journal of Dairy Scienc.
62. **Sous-ministériat à la santé animale et à l'inspection des aliments., (2009).** Lignes directrices et normes pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaires. Bibliothèque nationale du Québec. Canada.
63. **Mohamadou, D., (2001).** Thèse de doctorat en médecine vétérinaire. Contribution a l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur le marché dakarais. UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR. Sénégal.
64. **Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., Collette, C., Garin-Bastuji, B., Thorel, M-F., (1999).** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. Centre national d'études vétérinaires et alimentaires. France.
65. **Agence nationale de sécurité sanitaire., (2011).** Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Listeria monocytogenes*. Institut Pasteur, Paris.
66. **Alexandre, L., Édith, L., Mathieu, T., (2014).** Listériose humaine : une zoonose d'origine alimentaire. Département des maladies infectieuses, Centre national de référence et Centre collaborateur de l'OMS des *Listeria*. Paris.
67. **Clinquart, A., Daube, G., Korsak, N., (2004).** *Salmonella* spp. dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique ? Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège.
68. **Fiche d'information sur la Salmonella** du Conseil des Viandes du Canada ,305-955 croissant Green Valley, Ottawa.
69. **Rodrigue, S., Poueme, N., 2006.** Contribution à l'étude de la qualité Microbiologique du lait dans la filière artisanale Au Sénégal. Ecole Inter-Etats Des Sciences Et Medecine Veterinaires (E.L.S.M.V.) Universite Cheikh Anta Diop De Dakar.
70. **Loukiadis, E., (2007).** Thèse de doctorat en Microbiologie. Facteurs de virulence et dissémination dans l'environnement via les effluents d'abattoirs d'animaux de

boucherie d'Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC). UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER, France.

71. **Cécile, L., (2011). Microflore du lait cru.** Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation. Institut de l'Élevage. GIS Alpes Jura.
72. **Tozlovanu, M., (2008).** Thèse de Doctorat en Vétérinaires Agronomiques. Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérigènes (notamment l'ochratoxine A) : Validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE. France.
73. **Coker, R., Pineiro, M., Nagler, M.** Manuel sur l'application du System de l'analyse des risques - points critiques. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO).
74. **Direction générale de la santé. (2012).** Guide des vaccinations Édition 2012. Comité technique des vaccinations.
75. **Sophie, R., Paul, H., Marina, D- F., Sirkka,V., Yves, Van d- S., Ann, B-C., Paul, T., Alexandre, D., Hendrik, D-B., Philip, V., Carole, M., and Stefan, R. (2011).** Chien Séropositif pour le Virus de l'Encéphalite à Tiques Détecté en Belgique: Dépistage Multi-Espèce de Sentinelles pour la Santé Publique. Bruxelles, Belegique.
76. **Faye K. (2005).** Le point sur l'usage vétérinaire des antibiotiques: impact sur l'antibiorésistance des bactéries en santé animale et humaine. Masson, Paris.
77. **Chaalal, W., (2013).** Occurrence et profil d'antibiorésistance des Staphylococcus aureus isolés de produits alimentaires. Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de Magister. Université d'Es-Senia Oran Faculté des Sciences Laboratoire de Microbiologie Appliquée.
78. **Bensouda, K., (2012).** Rapport entre l'alimentation et la résistance bactérienne aux antibiotiques. Thèse pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie UNIVERSITE MOHAMMED V FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE. RABAT.
79. **Hamames, M., (2012).** Thèse de Magistère. Etude in vitro de l'effet antibactérien des associations d'antibiotiques : cas des bactéries isolées de Sebkheth Ouled M'barek (El-Mahmel, wilaya de Khenchela).. Université de Khenchela.
80. **Lavigne, J-P., (2007).** EFFETS DES ANTIBIOTIQUES et MÉCANISMES DE RÉSISTANCE. Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes, France.

81. **Lozniewski, A., Nancy., RABAUD, C., (2010).** Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins. RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES.
82. **Mendaci, A., Mihoubi, S., (2015).** Mémoire de Master en Microbiologie. Profil de sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries uropathogènes (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*). Université des Frères Mentouri Constantine.
83. **Delery, L., (1999).** Thèse d'ingénieria. Antibiorésistance bactérienne dans l'eau : problématique de la transmission de l'animal à l'homme. Ecole nationale de la santé publique.
84. **Antibiorésistance des Souches bactériennes d'origine équine.** ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET EXEMPLE DE L'HOPITAL VETERINAIRE DE ST-HYACINTHE.
85. **Mahdi, F., Merah, W., (2015).** Mémoire de Master en Microbiologie. Antibiorésistance des bactéries fécales présentes dans les eaux d'Oued BAGHAI (Wilaya de Khenchela). UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA. Algérie.
86. **Hémonic, A., (2014).** Journée quiaa « EcoAntibio en production porcine ». Institut du porc.
87. **Julie, B-M., (2010).** Une bactérie hautement résistant est diagnostiquée chez un patient : que faire ? CHU d'Amiens.
88. **Rennie R., Turnbull L., Brosnikoff C. (2008).** Comparison of Oxoid M.I.C. Evaluator device with broth microdilution and E test device from AB Biodisk for antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae. Clinical Microbiololgy and Infectious Diseases.
89. **Jorgensen J.H., Ferraro M.J. (2009).** Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clin. Infect.
90. **Abderrahim, B., El Hassan, B., Hicham, L., Laarousi, F., Mohamed E-Y., Mohammed, O., (20009).** Étude Physicochimique et microbiologique de laits crus. Maroc.
91. **Lebres, E., (2005).** Manuel des travaux Pratiques analyses des aliments. Séminaire de recyclage. Laboratoires d'hygiène des Wilaya de l'EST. Institut Pasteur D'Aagerie.

92. **Chorfi, K., (2012).** Etude microbiologique des effluents hospitaliers de la wilaya de Khenchela (Cas de l'établissement hospitalier 120 lits). Thèse de Magistère. Université Abbés Laghrour Khenchela.
93. **Bio-Mérieux, (2009).** Catalogue Analytique API 20 E. Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux (Réf. 20100/20160).biomérieux.
94. **Boukhemis, A., Boutersa, A., (2015).** Mémoire de Master en microbiologie. Identification et antibiorésistance de souches d'Escherichia coli et de Klebsiella pneumoniae des infections urinaires à l'aide des moyens classiques et des moyens automatisés. Université des Frères Mentouri Constantine.
95. **Analyse de lait : Antibiogramme., (2005).** Chambres d'agriculture de Bretagne.
96. **Soude S.G.A.A., (2005).** Bactéries isolées des hémocultures au laboratoire du centre national hospitalier et universitaire Hubert Koutoukou Maga De Cotonou. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en pharmacie diplôme d'état. République du Mali, université de Bamako, faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.
97. **Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. 2005.** 4eme édition.
98. **Agence Française de normalisation (AFNOR), (1990).** Eaux : méthodes d'essai ; recueil de normes françaises AFNOR, Paris.
99. **Recherche des salmonelles., (2005).** Journal officiel de la République Algérienne N° 42., 8 Joumada El Oula 1426. Arrêtes, Décisions et avis.
100. **Biokar Diagnostics** – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
101. **1ère STL.** Fiche technique, La Catalase., (2006).
102. **Larcher, C.** Recherche *S. aureus*.
103. **Aziz, H., Mustapha, B., Rachid, C., Zakaria, M., (2012).** Qualité hygiénique du lait de colportage prélevé des points de vente de la ville de Rabat. LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE - 2012, Volume 7, N°26.
104. **Bellaoui N., Belabbes H., Lahsoune M. et El Mdaghri N., 2009.** Bactériémies à Kluyvera : à propos d'une épidémie dans un CHU au Maroc. Médecine et maladies infectieuses 39 :133–135p.
105. **ISO 7218:2007(E) :** Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.

- 106. Chang-Hua, X., Isao, N., Lu, Y., Qun, Z., Su-Qin, S., Xin-Rong, Z., (2006).** Sequential changes of main components in different kinds of milk powders using two-dimensional infrared correlation analysis. *Journal of Molecular Structure* 799 (2006) 77–84.
- 107. Ådnøy, T., Dagnachew, B., (2011).** Genetic and Environmental Info in goat milk FTIR spectra. Department of Animal and Aquacultural Sciences, Norwegian University of Life Sciences.
- 108. Adt, I., Carnet-Pantiez, A., Degraeve, P., Mariani, C., Notz, E., Oulahal, N., (2009).** Examination of wooden shelves used in the ripening of a raw milk smear cheese by FTIR spectroscopy. *Food Control*, journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont.

Annexes

Annexe 01. Composition des milieux de culture**Gélose glucosée à l'extrait de levure (PCA)**

La gélose glucosée à l'extrait de levure, appelée par les Anglo-Saxons "Plate Count Agar" ou PCA, est utilisée en bactériologie alimentaire pour le dénombrement des bactéries aérobies psychrotrophes, mésophiles dans le lait, les viandes, les produits à base de viande, les autres produits alimentaires, ainsi que pour l'analyse des produits pharmaceutiques, des produits cosmétiques et de leurs matières premières.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée. pH final à 25°C : 7,0 ± 0,2

-Tryptone.....	5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	2,5 g
- Glucose.....	1,0 g
- Agar agar bactériologique.....	12,0 g

Milieu VBL

Milieu de culture déshydraté, utilisé pour la recherche et le dénombrement des coliformes.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée. pH=7.4

-Peptone de viande.....	10 g
-Bile de boeuf desséchée.....	20 g
- Lactose.....	10 g
- Vert brillant.....	23ml

Dissoudre de **40g** dans un litre d'eau distillée.

Eau peptonée exempte d'indole

L'eau peptonée exempte d'indole permet la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières. Ce milieu est surtout employé au cours du test de Mackenzie pour l'identification d'*Escherichia coli* par la production d'indole.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée. pH final à 25°C : 7,2 ± 0,2

- Tryptone.....	10,0 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g

Gélose Hektoen

La gélose Hektoen est un milieu sélectif différentiel des bactéries entéro-pathogènes, particulièrement de *Salmonella* et de *Shigella*. La composition du milieu permet la différenciation des colonies fermentant rapidement un des 3 sucres (virage du bleu au rouge-saumon) et/ou produisant de l'H₂S (centre noir).

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée. Ph final à 25°C : 7,5 ± 0,2

Peptone	12,00	Chlorure de sodium.....	5,00
Extrait de levure.....	3,00	Thiosulfate de sodium.....	5,00
Sels biliaires N° 3.....	9,00	Citrate ferrique ammoniacal.....	1,50
Lactose.....	12,00	Bleu de bromothymol.....	0,065
Saccharose.....	12,00	Fuchsine acide.....	0,10
Salicine.....	2,00	Agar.....	14,00

Bouillon de ROTHE

Le bouillon de Rothe est utilisé pour effectuer le test présomptif de recherche et de dénombrement des entérocoques dans les eaux d'alimentation, les produits surgelés et les autres produits alimentaires par la méthode du nombre le plus probable.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée. pH du milieu final à 25°C : 6,8 ± 0,2.

Polypeptone	20,0 g
Glucose	5,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Phosphate monopotassique.....	2,7 g
Phosphate dipotassique.....	2,7 g
Azide de sodium.....	0,2 g

Milieu EVA LITSKY

Le Milieu de Litsky est utilisé pour la confirmation lors des recherches et dénombrements des Streptocoques fécaux dans les eaux d'alimentation et résiduaires, les produits surgelés et les autres denrées alimentaires par la méthode du nombre le plus probable. Après une culture positive sur milieu de Rothe, la présence d'éthyl violet et d'azide de sodium du milieu de Litsky inhibe la croissance des tous les micro-organismes autres que les Streptocoques fécaux.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée. pH final à 25°C : 7,0 ± 0,2

- Peptone de viande	10,00 g
-Phosphate monopotassique.....	2,70 g
-Peptone de caséine.....	10,00 g
-Chlorure de sodium	5,00 g
-Glucose	5,00 g
-Azide de sodium.....	0,30 g
-Phosphate dipotassique.....	2,70 g
-Ethyl violet.....	0,0005 g

Gélose Bile-Esculine-Azide (BEA)

La Gélose Bile-Esculine-Azide est un milieu sélectif pour l'isolement et la numération des Entérocoques dans les produits pathologiques et les eaux. Les Entérocoques développent de petites colonies translucides entourées d'un halo noir, témoignant de l'hydrolyse de l'esculine.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone	3,00 g	Azide de sodium.....	0,15 g
Esculine.....	1,00 g	Bile de boeuf.....	10,00 g
Peptone de caséine.....	17,00 g	Chlorure de sodium	5,00 g
Citrate ferrique ammoniacal	0,5 g	Agar.....	15,00g
Extrait de levure.....	5,00 g		

pH final à 25°C : 7,1 ± 0,2

Le milieu en tubes, flacons ou boîtes se conserve entre 15 et 25°C.

Gélose Chapman

Le milieu de Chapman est utilisé pour l'isolement des Staphylocoques pathogènes qui donnent des colonies jaunes par fermentation du mannitol et virage du rouge de phénol. Sa forte teneur en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des autres espèces.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée. pH final à 25°C : $7,4 \pm 0,2$

-Peptones	10,00 g
-Extrait de viande de boeuf.....	1,00 g
-D-mannitol	10,00 g
-Chlorure de sodium.....	75,00 g
-Rouge de phénol	0,025 g
-Agar.....	15,00 g

Eau peptonée tamponnée

L'eau peptonée tamponnée est un diluant destiné à la préparation des suspensions mères de laits en poudre et concentrés, de yaourts, de produits laitiers, de produits d'origine animale et d'autres produits alimentaires.

Ce milieu est également utilisé pour le préenrichissement préalable aux phases d'enrichissement sélectif et d'isolement des salmonelles en permettant notamment de revivifier les microorganismes ayant subi des traitements sublétaux.

Il est utilisé comme milieu de suspension et de revivification pour le dénombrement des *Listeria monocytogenes*.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Peptone.....	10,0 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Phosphate disodique dodécahydraté.....	9,0 g
- Phosphate monopotassique	1,5 g

pH final à 25°C : $7,0 \pm 0,2$

Bouillon Sélénite Cystine

Le bouillon Sélénite Cystine est utilisé pour l'enrichissement sélectif de *Salmonella* dans les selles ou les denrées alimentaires. Il est recommandé par l'AOAC et la Pharmacopée Américaine.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Tryptone.....	5,00 g
Lactose.....	4,00 g
Sélénite acide de sodium.....	4,00 g
Phosphate disodique.....	10,00 g
L-cystine.....	0,01 g

pH final à 25°C : $7,0 \pm 0,2$

Le milieu en flacons ou en tubes se conserve à l'obscurité entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Gélose *Salmonella-Shigella* (S.S.)

La gélose *Salmonella-Shigella* (S.S.) est utilisée pour l'isolement sélectif des *Salmonella* et des *Shigella* dans les prélèvements cliniques (selles) et les denrées alimentaires.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Protéose peptone.....	5,00	Sels biliaires N° 3.....	8,50
Citrate ferrique ammoniacal.....	1,00	Vert brillant.....	0,00033
Extrait de viande de bœuf.....	5,00	Citrate de sodium.....	8,50
Thiosulfate de sodium.....	8,50	Agar.....	13,50
Lactose.....	10,00		
Rouge neutre.....	0,025		

pH final à 25°C : 7,0 ± 0,2

Le milieu en flacons ou boîtes se conserve à l'obscurité entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Gélose glucosée à l'oxytétracycline (OGA)

La gélose glucosée à l'oxytétracycline est utilisée pour la recherche et le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires et les produits cosmétiques.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Extrait autolytique de levure.....	5,0 g
- Glucose.....	20,0 g
- Oxytétracycline.....	0,1 g
- Agar agar bactériologique.....	15,0 g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 6,6 ± 0,2.

Gélose Mueller Hinton

La gélose Mueller-Hinton est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques. Sa formulation est conforme aux recommandations du de l'O.M.S.

Elle peut également être additionnée de sang pour réaliser l'antibiogramme des germes fragiles, tels que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *Enterococcus sp* et *Streptococcus pneumoniae*.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Infusion de boeuf.....	30,00 g
Peptone de caséine.....	17,50 g
Amidon.....	1,50 g
Agar.....	17,00 g

Ph final à 25°C : 7,3 ± 0,2

Le milieu en flacons ou boîtes se conserve entre 2 et 8°C.

Annexe 02. Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultat	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactosidase	β galactosidase	Incolore	jaune
ADH	Arginine	Arginine déshydrogénase	Jaune	Rouge /orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge /orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pale/ jaune	Bleu vert/ bleu
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Incolore/ grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
UREE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA Immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND 2 min max	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1 + VP2 10 min	
			Incolore	Rose/ rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-Rhamanose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
OX	Sur papier filtre	Cytochrome oxydase	Disques d'Ox / 5-10 min	
			Incolore	Coloration violette

Annexe 03. Composition des additifs

Kovacs

Le réactif de Kovacs est utilisé pour la mise en évidence de la production d'indole par les micro-organismes possédant une tryptophanase. Le tryptophane, acide aminé notamment présent dans les peptones tryptiques, est dégradé en indole qui réagit avec le P-Diméthylaminobenzaldéhyde du réactif. Une réaction positive, de la présence d'indole, est révélée par la coloration au rouge du réactif de Kovacs.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée

P-Diméthylaminobenzaldéhyde.....	5,00 g
Alcool amylique.....	75,00 ml
Acide chlorhydrique pur.....	25,00 ml

Conserver en flacon ambré entre 2 et 8°C.

Réactif de Voges – Proskauer 1 et 2

Solution réactionnelle pour la mise en évidence de la présence d'acétyl-méthyle carbinol (acétoïne dans) le milieu. Ce composé est un produit de dégradation de l'acide pyruvique par les bactéries qui empruntent la voie de fermentation butanediolique caractéristique de certaines Entérobactéries.

VP1 : Soude caustique (NaOH)

VP2 : Alpha naphthol.

Réactif TDA

Solution réactionnelle pour la mise en évidence de la présence, dans le milieu, de l'acide indol-pyruvique formés par les bactéries possédant le tryptophane désaminase.

Composition

Chlorure de fer.....**80 g/l**

Annexe 04. Composition des colorants de gram**Cristal violet ou violet de gentiane****Solution mère A**

Cristal Violet ou Violet de Gentiane...**25 g**
 Ethanol à 96 %**250 ml**

Solution mère B

Oxalate d'Ammonium.....**5 g**
 Eau Distillée.....**500 ml**

Conservation A : Quelques années en flacon brun Hermétiquement bouché.

Conservation B : 2 à 3 mois dans un flacon hermétiquement bouché.

Mélanger 100 ml de solution A avec 400 ml de solution B. Conserver dans un flacon brun.

Fuchsine**Fuchsine mère saturée**

Fuchsine Basique.....**25 g**
 Ethanol à 96 %.....**250 ml**

Conservation : Quelques années dans un flacon brun hermétiquement bouché.

- **Solution mère aqueuse de Phénol à 5 % (v/v) :**

Phénol Cristallisé fondu.....**50ml**
 Eau distillée.....**950ml**

Conservation : Quelques mois dans un flacon hermétiquement bouché.

Fuchsine (solution de travail)

Solution saturée de Fuchsine Basique, filtrée.....**100ml**
 Solution aqueuse de Phénol à 5 %.....**900ml**

Conservation : Au moins 2 ans.

Lugol faible (pour coloration de Gram)

C'est à la fois un colorant et un liquide de mordantage (qu'on appelle mordant), qui permet une coloration indirecte : cela signifie qu'il prépare l'objet à colorer à recevoir un autre colorant. Il provoque une combinaison chimique entre deux corps qui n'ont au départ aucune affinité chimique l'un pour l'autre. Il se forme entre le tissu à colorer, le mordant et le colorant, une triple combinaison colorée suffisamment stable pour résister aux agents de décoloration (acides, alcools, eau).

Iodure de Potassium (KI)**2,34 g**
 Iode en Cristaux ou Iode Sublimée...**1,66 g**
 Eau Distillée.....**500 ml**

Conservation : non filtré : 3 mois. Le Lugol doit avoir une coloration brun rouge.

Alcool Éthylique Ou Éthanol

Alcool primaire, liquide incolore, d'odeur agréable, miscible à l'eau en toutes proportions, miscible à de nombreux solvants organiques, l'éthanol ou alcool éthylique, $\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{OH}$,

Annexe 05 : Interface du logiciel d'identification API Excel.

The screenshot shows the Microsoft Excel interface for the API software. The spreadsheet displays the following data:

Row	Column A	Column B	Column C	Column D
1	API 20E	Taxon le plus probable	probabilité	
2	Escherichia coli 1	Excellente Id	0,998	
3	T	0,93		
4		ONPG +		
5		ADH -		
6		LDC +		
7		ODC -		
8		CIT -		
9		H2S		
10		URE -		
11		TDA -		
12		IND +		
13		VP -		
14		GEL -		
15		GLU +		
16		MAN +		
17		INO -		
18		SOR +		
19		RHA +		
20		SAC -		
21		MEL +		
22		AMY -		
23		ARA +		
24		OX -		

Callouts in the image provide the following information:

- Taxon le plus probable**: Points to the 'Escherichia coli 1' cell in row 2, column B.
- test de l'identification en fonction de l'indice de typicité**: Points to the '0,998' cell in row 2, column D.
- Rappel de la valeur de l'indice de typicité**: Points to the '0,93' cell in row 3, column C.
- rappel de la probabilité du taxon**: Points to the '0,998' cell in row 2, column D.
- Zone d'introduction des données**: Points to the list of biochemical tests in column B, rows 4-24.

The software interface includes a ribbon with tabs: Accueil, Insertion, Mise en page, Formules, Données, Révision, Affichage. The status bar at the bottom shows 'Prêt' and a zoom level of 100%.

Annexe 06. Résistances naturelles aux β lactamines des espèces de bacilles non exigeants (Cavallo *et al.*, 2004).

Espèces	PEN	OXA	AM	AMC	TIC	TCC	PIP	C1G	FOX	CTT	MA	CXM	CTX	CAZ	IPM
Entérobactéries															
<i>Escherichia coli</i>	R	R													
<i>Proteus mirabilis</i>	R	R													
<i>Shigella</i> spp.	R	R													
<i>Salmonella</i> spp.	R	R													
<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	R		R										
<i>Citrobacter koseri</i>	R	R	R		R										
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R				R	R	R					
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R	R				R	R	R					
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R				R	R	R					
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R				R			R	R			
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R	R					R				R			
<i>Morganella morganii</i>	R	R	R	R				R				R			
<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R	R				R							
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R			R	R		R	R			
Bacilles à Gram négatif non fermentaires															
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R				R	R	R	R	R	R		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	R				R	R	R	R	R			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R		R
<i>Burkholderia cepacia</i>	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R			R
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	R	R	R	R				R	R	R	R	R	R		
<i>Flavobacterium</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Meningosepticum</i>															
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	

R : résistance naturelle ; PEN : pénicilline G ; OXA : oxacilline ; AM : aminopénicillines ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; TIC : ticarcilline ; TCC : ticarcilline + acide clavulanique ; PIP : pipéracilline ; C1G : céphalosporines de première génération ; FOX : céfoxitine ; CTT : céfotétan ; MA : céfamandole ; CXM : céfuroxime ; CTX : céfotaxime ; CAZ : ceftazidime ; IPM : impénème.

Annexe 07. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Entérobactéries*.

Conditions du test :

Milieu : Mueller Hinton.

Control de qualité :

Inoculum : Colonies en suspension, 0.5

Escherichia coli ATCC 25922

Mc Farland .

Incubation : 37°C, atmosphère ordinaire,
18 à 24h

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
βlactamines : Ampicilline	10µg	≤13	14-16	≥17	≥32	≤8
Amoxicilline + Ac. clavulanique	20/10µg	≤13	14-17	≥18	≥32/16	≤8/4
Céfazoline	30µg	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
Céfoxitine	30µg	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
Céfotaxime	30µg	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8
Ceftriaxone	30µg	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8
Imipenème	10µg	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4
Aminosides : Amikacine	30µg	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16
Gentamicine	10µg	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
Quinolones : Ofloxacine	5µg	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2
Ciprofloxacine	5µg	≤15	16-20	≥20	≥4	≤1
Autres : Chloramphénicol	30µg	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8
Furanes	300µg	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32
Fosfomycine	200µg	≤12	13-15	≥16	≥256	≤64
Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38

Tableau extrait à partir de standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS 4eme édition 2005

Annexes 08. TABLE DE MAC - GRADY

Nombre Caractéristique	Nombre de Micro-organismes
000	0,0
001	0,3
010	0,3
011	0,6
020	0,6
100	0,4
101	0,7
102	1,1
110	0,7
111	1,1
120	1,1
121	1,5
130	1,6
200	0,9
201	1,4
202	2,0
210	1,5
211	2,0
212	3,0
220	2,0
221	3,0
222	3,5
223	4,0
230	3,0
231	3,5
232	4,0
300	2,5
301	4,0
302	6,5
310	4,5
311	7,5
312	11,5
313	16,0
320	9,5
321	15,0
322	20,0
323	30,0
330	25,0
331	45,0
332	110,0
333	140,0

Annexes 09. Matériel et réactifs utilisés

Matériel et appareillages

- Bec bunsen.
- Portoir pour tubes à essai.
- Pipettes Pasteur stériles.
- des flacons de 1000ml.
- Bain marie.
- Boîtes de pétri.
- Marqueur.
- Des lames.
- Anse de platine.
- Etuve électrique.
- Microscope optique.
- Pince.

Milieux de culture et additifs

- Eau physiologique stérile.
- Milieu VBL.
- Eau peptonée exempt d'indole.
- Milieu Rothe.
- Milieu EVA Litsky.
- Eau peptonée tamponnée.
- Milieu de Sélénite – Cysteïné.
- Gélose Chapman.
- Gélose SS.
- Gélose PCA.
- Gélose BEA.
- Gélose Hektoen.
- Gélose Mueller Hinton.
- Disques d'antibiotiques.
- Réactif Kovacs.
- Réactif TDA.
- Réactif de Voges – Proskauer 1et 2.

Colorants de Gram

- L'huile de cèdre.
- Violet de Gentiane.
- Lugol.
- Alcool.
- Fuchsine.

Résumés

Bacteriological analysis and antimicrobial resistance of the contamination flora of the milk collected from a farm in khenchela

Abstract

The production of cow's milk, is often hampered by the quality management problem which penalizes both producers and processors, this is why many samples of raw cow's milk intended for human consumption of a traditional farm in the province of Khenchela, were analyzed during the month of March.

We have conducted a microbiological study of raw cow's milk collected from a traditional farm in Khenchela during the month of March. In this study, normalized methods are used for the isolation and identification of microorganisms. The analysis has focused mainly on the quantification of hygiene's indicator bacteria namely: total coliforms, thermotolerant coliforms, fecal enterococci and potentially pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*) also molds and yeasts as alteration indicators.

The levels of contamination were interpreted on the basis of microbiological criteria defined by the ministerial decree of 24 January 1998. The enumeration of the total aerobic mesophilic flora, allows to emphasize the low contamination of analyzed samples with 3×10^3 CFU / ml. The milk samples are weakly contaminated by total and fecal coliforms and the fecal enterococci. 92% of samples were positive for human fecal contamination by *Escherichia coli*.

The results show also a milk contamination by staphylococci whereas 50% are coagulase positive, it's *Staphylococcus aureus*. The identified species while searching for Salmonelles are *Citobacter* in 62.5% of Samples, 25% *Salmonella arizonae* and 12.5% *Serratia*. The enumeration result of molds and yeasts is 1.36×10^4 CFU / ml. The obtained results show that the bacteriological quality of raw milk is not satisfying compared to the criteria held in Algeria.

The results of the antibiotic susceptibility testing show that the bacteria have a disturbing profiles of resistance especially to beta-lactams. The tested bacteria show a majority resistance to ampicillin (87.5%) and amoxicillin + clavulanic acid (75%) also to colistin 83.33% and amikacin (50%), As well, we could observe many Multiresistant bacteria.

Key words : Raw milk, microbiological analysis, total coliforms, fecal coliforms, Fecal enterococci, *Staphylococcus*, *Salmonella*, molds and yeasts, antimicrobial resistance.

Résumé

La production du lait de vache, se heurte souvent au problème de gestion de la qualité qui pénalise tant les producteurs que les transformateurs, pour cela des échantillons de lait cru de vache, destinés à la consommation humaine d'une ferme traditionnelle dans la wilaya de Khenchela, ont été analysés, pendant le mois de Mars.

Nous avons mené une étude microbiologique de lait de vache cru collecté à partir d'une ferme traditionnelle de la wilaya de Khenchela pendant le mois de Mars en utilisant des méthodes normalisées pour l'isolement et l'identification des microorganismes. L'analyse effectuée a portée principalement sur la quantification des bactéries indicatrices d'hygiène à savoir les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants et les entérocoques fécaux, et des bactéries potentiellement pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*) aussi les moisissures et levures comme indicateurs d'altération.

Les niveaux de contamination ont été interprétés sur la base des critères microbiologiques définis par l'arrêté interministériel du 24 janvier 1998. Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale, permet de souligner la faible contamination des échantillons analysés avec 3×10^3 UFC/ml. Les échantillons de laits sont faiblement contaminés par les coliformes totaux et fécaux, les Entérocoques fécaux. 92 % des échantillons sont positif pour une contamination fécale humaine par *Escherichia coli*.

Les résultats montrent aussi une contamination du lait par les *Staphylocoques* dont 50% sont à coagulase positive il s'agit de l'espèce *Staphylocoques aureus*. Les espèces identifiées lors de la recherche des Salmonelles sont *Citobacter* dans **62.5%** des échantillons *Salmonella arizonae* **25 %** et *Serratia* **12.5 %**. Le résultat du dénombrement des moisissures et levures est **1.36×10^4 UFC/ml**. Les résultats obtenus montrent que la qualité bactériologique du lait cru de vache étudié est non satisfaisante par rapport aux critères retenus en Algérie.

Les résultats de l'antibiogramme montrent que les bactéries présentent des profils inquiétants de résistance surtout aux bêtalactamines. Les bactéries testées montrent une résistance majoritaire pour l'**Ampiciline (87.5%)** et l'**Amoxiciline + acide clavulanique (75%)** plus la **Colistine avec 83.33%** et l'**Amikacine (50%)**, on a pu observer des bactéries multirésistantes.

Mots clés : Lait cru, analyse microbiologique, Coliformes totaux, Coliformes fécaux, Entérocoques fécaux, Staphylocoques, Salmonelles, moisissures et levures, antibiorésistance.

ملخص

التحليل البكتريولوجي ومقاومة المضادات الحيوية للميكروبات الملوثة للحليب

- عينة الحليب تم جمعها من مزرعة في منطقة خنشلة -

إن عملية إنتاج حليب البقر غالبا ما تصطدم بمشكلة إدارة الجودة، التي تعاقب كل من المنتجين والمصنعين، الشيء الذي أدى الى اخذ عيرة من الحليب الخام الموجه للاستهلاك البشري من مزرعة تقليدية في ولاية خنشلة خلال شهر مارس وتحليلها. أجرينا دراسة علم الأحياء الدقيقة على حليب البقر الخام الذي تم جمعه من مزرعة تقليدية في ولاية خنشلة خلال شهر مارس باستخدام أساليب معيارية موحدة لعزل الكائنات الحية الدقيقة والتعرف عليها. إن أساس التحليل كان المقياس الكمي للبكتيريا بالاعتماد على مؤشر النظافة و مجموع القولونيات - القولونية المقاومة للحرارة، المكورات المعوية البرازية والبكتيريا المسببة للأمراض-، ويحتمل أن تكون المكورات العنقودية الذهبية والسالمونيلا، الفطريات والخمائر مؤشرات أخرى للتغيير.

فسرت مستويات التلوث على أساس معايير ميكروبيولوجية حددها القرار الوزاري المؤرخ في 24 جانفي 1998 من خلال حساب مجموع البكتيريا المتوسطة الحرارة الهوائية، التي سمحت لنا بتحديد التلوث المنخفض في العينات التي تم تقديرها ب: 3×10^3 خلية / مل. عينات الحليب كانت ملوثة جزئيا بالقولونيات الكلية، البرازية والمكورات المعوية البرازية. حيث لانت 92٪ مرها إيجابية التلوث للبراز البشري عن طريق اشيريشيا كولي.

أظهرت النتائج أيضا تلوث الحليب بالمكورات العنقودية، حيث 50٪ من العينة كانت إيجابية التخثر ما يثبت أنها م كورات عنقودية ذهبية. حيث أن الأنواع التي تم تحديدها أثناء البحث عن سالمونيلا هي سيتروباكتير بنسبة 62.5٪ ، سالمونيلا اريزونا بنسبة 25 ٪ و سراسيا بنسبة 12.5٪. حيث كانت نتائج حساب الفطريات والخمائر 1.36×10^4 خلية / مل. النتائج المحصل عليها أظهرت أن الجودة البيكتيرية لحليب البقر الخام غير مرضية مقارنة بالمعايير المستخدمة في الجزائر. نتائج اختبار مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية وضحت أن هاته الأخيرة لديها قدرة مقاومة مقلقة خاصة للبيتا لكتام. البكتيريا المختبرة أظهرت مقاومة كبيرة للأميسيلين بنسبة 87.5٪ ، أموكسيسيلين + حمض كلافيلانيك بنسبة 75 ٪ ، كوليستين بنسبة 83.33 ٪ وأميكاسين بنسبة 50٪. كما استطعنا ملاحظة بكتيريا متعددة المقاومة.

كلمات المفتاحية: الحليب الخام ، التحليل الميكروبيولوجي، مجموع القولونيات، القولونية البرازية، المكورات العنقودية البرازية ،

المكورات العنقودية، السالمونيلا، الفطريات والخمائر، مقاومة المضادات الحيوية.

Année universitaire 2015/2016

Présenté par : BOUZIDI Nour El Imene

Analyse bactériologique et antibiorésistance de la flore de contamination du lait collecté à partir d'une ferme de la région de Khenchela

Mémoire présente en vue l'obtention du diplôme de Master En Microbiologie général

Résumé

La production du lait de vache, se heurte souvent au problème de gestion de la qualité qui pénalise tant les producteurs que les transformateurs, pour cela des échantillons de lait cru de vache, destinés à la consommation humaine d'une ferme traditionnelle dans la wilaya de Khenchela, ont été analysés, pendant le mois de Mars.

Nous avons mené une étude microbiologique de lait de vache cru collecté à partir d'une ferme traditionnelle de la wilaya de Khenchela pendant le mois de Mars en utilisant des méthodes normalisées pour l'isolement et l'identification des microorganismes. L'analyse effectuée a porté principalement sur la quantification des bactéries indicatrices d'hygiène à savoir les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants et les entérocoques fécaux, et des bactéries potentiellement pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*) aussi les moisissures et levures comme indicateurs d'altération.

Les niveaux de contamination ont été interprétés sur la base des critères microbiologiques définis par l'arrêté interministériel du 24 janvier 1998. Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale, permet de souligner la faible contamination des échantillons analysés avec 3×10^3 UFC/ml. Les échantillons de laits sont faiblement contaminés par les coliformes totaux et fécaux, les Entérocoques fécaux. 92 % des échantillons sont positifs pour une contamination fécale humaine par *Escherichia coli*.

Les résultats montrent aussi une contamination du lait par les *Staphylocoques* dont 50% sont à coagulase positive il s'agit de l'espèce *Staphylocoques aureus*. Les espèces identifiées lors de la recherche des Salmonelles sont *Citobacter* dans 62.5% des échantillons *Salmonella arizonae* 25 % et *Serratia* 12.5 %. Le résultat du dénombrement des moisissures et levures est 1.36×10^4 UFC/ml. Les résultats obtenus montrent que la qualité bactériologique du lait cru de vache étudié est non satisfaisante par rapport aux critères retenus en Algérie.

Les résultats de l'antibiogramme montrent que les bactéries présentent des profils inquiétants de résistance surtout aux bêtalactamines. Les bactéries testées montrent une résistance majoritaire pour l'Ampiciline (87.5%) et l'Amoxiciline + acide clavulanique (75%) plus la Colistine avec 83.33% et l'Amikacine (50%), on a pu observer des bactéries multirésistantes.

Mots clés : Lait cru, analyse microbiologique, Coliformes totaux, Coliformes fécaux, Entérocoques fécaux, Staphylocoques, Salmonelles, moisissures et levures, antibiorésistance.

Laboratoire de recherche : laboratoires pédagogiques de l'université Abbes Laghrour Khenchela

Devant le jury

Président : M^r THABET R (M.A.A)

Invité d'honneur : P^r BOUMAAZA C.

Encadreur : M^{elle} CHORFI K. (M.A.B)

Examineur : M^{elle} YAKHLEF W. (M.A.A)

Examineur : M^r BOUSSAA A. (M.A.B)

Date de soutenance : 31/05/2016