

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR- KHENCHELA



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE : Sciences Biologiques

OPTION : Microbiologie appliquée

Thème

**Occurrence et profil
d'antibiorésistance des *Pseudomonas*
isolés du lait de vache cru**

Présenté par :

HOUHA Manel

Soutenu le: 29/06/2017

Membres du jury

Président : Mr ABAIDIA A. (M.A.A)

Université Abbès Laghrou – Khenchela

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

Université Abbès Laghrou – Khenchela

Examineur : Mr BOUSSAA A. (M.A.A)

Université Abbès Laghrou – Khenchela

Promotion : 2016/2017

Remerciements

En préambule à ce mémoire je remercie ALLAH qui m'a aidé et m'a donné la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

*Monsieur **Abaidia** .Vous m'avez fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.*

*Monsieur **Boussaa H.**, Vous nous avez fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail et nous avons eu la chance d'être vos étudiants. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.*

*Je remercie notre promoteur de thèse M^{elle} **CHORFI. K** d'avoir accepté d'encadrer notre travail et pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

Mes remerciements vont aussi au corps professoral et administratif de la Faculté des Science de la nature et de la vie, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

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

Enfin, un immense merci à, mes camarades de promotion, mes amies et mes collègues de travail pour les encouragements et soutiens inaltérables, sans qui ce travail de thèse n'aurait pas été possible.

Merci à tous et à toutes.



Dédicaces

A Mes Très Chers Parents

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

A mes très chers frères

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mes très chères sœurs

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je vous porte. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A tous les membres de ma famille, Petits et grands, veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de ma profonde affection.

A Toutes mes Amies

Merci pour votre amour, votre amitié. Vous êtes toujours là pour me soutenir, m'aider et m'écouter. Que Dieu vous protège et vous procure joie et bonheur



*Oh Dieu,
J'aimerais te remercier
du fond du cœur pour
ta présence à mes côtés
et ton amour infini.*

Table des matières

Liste des tableaux	I
Listes des figures	II
Liste des photographies	III
Liste des abréviations	IV

Revue bibliographique

Introduction	01
--------------	----

Chapitre 1 : Généralités sur le lait

I. Généralités sur le lait	03
I.1. Définitions du lai	03
I.2. Qualité nutritionnelle du lait de vache par rapport aux autres espèces laitières	03
I.3. Composition du	04
I.3.1. L'eau	04
I.3.2. Matière grasse	04
I.3.3. Les glucides	04
I.3.4. Matière azotée	05
I.3.5. Les enzymes	05
I.3.6. Vitamines	06
I.3.7. Sels minéraux	06
I.4. Les caractéristiques physico-chimiques du lait	06
I.4.1. Le pH	06
I.4.2. La densité	06
I.4.3. L'acidité de titration ou acidité Dornic	07
I.4.4. Le point de congélation	07
I.5. Les caractéristiques organoleptiques du lait	07
I.5.1. Couleur	07
I.5.2. Odeur	07
I.5.3. Saveur	07
I.5.4. Viscosité	07
I.6. Microbiologie du lait cru	08
I.6.1. Origine de la diversité microbienne du lait cru	08
I.6.2. Flore microbienne du lait	09
I.6.2.1. Flore originelle	09
I.6.2.2. Flore de contamination	09

Chapitre 2 : La flore d'altération psychrotrophe du lait cru

I. La flore d'altération du lait cru	13
I.1. La flore d'altération psychrotrophe	13
I.1.1. Définition de la flore psychrotrophe	14
I.1.2. Caractéristiques des bactéries psychrotrophe	14
I.2. Principales bactéries psychrotrophes	15
I.2.1. Agents de toxi-infections alimentaires	15
I.2.2. Agents d'altérations des aliments	15
I.3. Présentation du genre <i>Pseudomonas</i>	15
I.3.1. Caractères généraux	15
I.3.2. Classification	16
I.3.3. Caractéristiques nutritionnelles du genre <i>Pseudomonas</i>	16
I.3.4. Caractères culturels du genre <i>Pseudomonas</i>	16
I.3.5. L'activité enzymatique des <i>Pseudomonas</i>	17
I.3.6. Habitat et distribution environnementale	17
I.3.7. Métabolisme et caractères physiologiques	18
I.3.8. Espèces appartenant au genre <i>Pseudomonas</i>	18
I.4. Principales activités microbiennes dans le lait	20
I.5. Principales activités enzymatiques des <i>Pseudomonas</i> dans le lait cru	20
I.5.1. La lipolyse	21
I.5.2 Protéolyse	21

Matériel et méthodes

I. Caractéristiques générales du site d'étude	23
II. Procédure d'échantillonnage	23
III. Les paramètres microbiologiques	23
III.1. Les dilutions décimales en série	24
III.2. Isolement des <i>Pseudomonas</i>	24
III.3. Identification physiologique	25
III.3.1. Mise en évidence de la production des pigments	25
III.4. identification microscopique	26
III.4.1. Coloration de Gram	26
III.5. Identification biochimique	28

III.5.1. Test d'oxydase	28
III.5.2. Identification biochimique par galerie API 20 NE	28
IV. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques	29
Résultats et discussion	
I. Caractéristiques microbiologiques	33
I.1. Aspect macroscopique et microscopique des isolats	33
I.3. Identification biochimiques	34
I.3.1. Identification biochimiques sur galerie API 20 NE	34
I.3.1.1. L'espèce <i>Pseudomonas</i> 1	35
I.3.1.2. L'espèce <i>Pseudomonas</i> 2	35
I.3.1.3. l'espèce <i>Pseudomonas</i> 3	36
I.4. Antibiorésistance des espèces identifiées	37
I. 5. Multirésistance de genre <i>Pseudomonas</i>	40
Conclusion et perspectives	42
Références bibliographiques	44
Annexes	
Résumé	
Abstract	
Résumé Arabe	

Liste de figures

Figure 01	Flux microbien dans les étables de production laitière	09
Figure 02	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (a) colonies sur gélose ordinaire, (b) coloration de Gram (x1000)	19
Figure 03	L'aspect des bactéries après la coloration de GRAM	25
Figure 04	Pourcentage d'espèces bactériennes identifiées	37
Figure 05	Pourcentage d'isolats de genre <i>Pseudomonas</i> résistantes à divers antibiotiques	40

Liste de tableaux

Tableau I	Composition chimique moyenne du lait de différentes espèces	04
Tableau II	Classification des micro-organismes selon leur température optimale de croissance.	14
Tableau III	Liste des antibiotiques testés, charge et classification des disques	30
Tableau IV	Résultats des tests biochimiques des différentes espèces isolées.	35
Tableau V	Classes de résistance obtenues après lecture de l'antibiogramme	38
Tableau VI	Les taux de résistance et de sensibilité pour chaque antibiotique	39

Liste des Photographies

Photographie 01	Vaches traitées et parcelles de terrain de notre site d'étude	23
Photographie 02	Ensemencement en surface de la gélose cétrimide	25
Photographie 03	Chambre noire à ultra violet (UV)	26
Photographie 04	Un microscope équipé d'un appareil photographique numérique	27
Photographie 05	La galerie API 20 NE	28
Photographie 06	Résultats d'isolement sur gélose Au cétrimide	33
Photographie 07	Résultats d'isolement sur gélose nutritive et sur milieu King A et King B	33
Photographie 08	Résultats de la coloration de gram	34
Photographie 06	Résultats de l'identification sur galerie API 20 NE de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Photographie 07	Résultats de l'identification sur galerie API 20 NE de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	36
Photographie 08	Résultats de l'identification sur galerie API 20 NE de <i>Pseudomonas putida</i>	37
Photographie 09	Photographie des antibiogrammes de <i>Pseudomonas</i>	39

Liste des abréviations

ADH : Arginine dehydrolase.

AK : Amikacine..

API 20 E : Appareillage et procédés d'Identification des Entérobacteries

ATB : Antibiotique.

CN : Gentamicine.

CT : Colistine

G- : GRAM négatif.

G: Grossissement.

G+ : GRAM positif.

GLU: Glucose.

I : Intermédiaire.

IND: Indole

ISO : Organisation internationale de normalisation **KAZ** : Céfotazidime.

Lac : Lactose.

LDC : Lysine décarboxylase.

MAN: Mannitol.

NF: l'une des marques de certification leader en Europe

ODC : Ornithine décarboxylase.

OMS : L'Organisation Mondiale de la Santé.

ONPG: Ortho-nitro-phenyl β -D- galactopyranoside.

pH : Potentiel hydrogène.

R : Résistante

S : Sensible.

sp: Espèce.

T : Température.

UFC : Unité Formant une Colonie

UHT : *lait de longue conservation, stérilisé par Upérisation à Haute Température.*

Introduction



Introduction

Le lait, matière première d'une industrie où la notion de qualité est primordiale, doit pouvoir être produit, conservé et transporté jusqu'à son lieu de transformation dans des conditions optimales (**Alais C, 1975**).

La première qualité du lait est avant tout sa qualité sanitaire, c'est à dire sa capacité à être consommé sans danger pour l'homme. Les autres qualités du lait sont plus directement liées à sa composition. En effet, les protéines, les matières grasses, les minéraux et les vitamines peuvent varier quantitativement et qualitativement en fonction des conditions de production, de conservation et de transformation. Au-delà, la qualité technologique est économiquement importante pour la filière (**Le Roux, 1994**).

L'industrie laitière porte une importance particulière à la préservation de la qualité microbiologique du lait. Le lait est un excellent milieu de croissance pour les microorganismes et leur nombre peut augmenter rapidement dans le lait si les conditions d'entreposage ne sont pas bien contrôlées. La qualité microbiologique du lait cru a été nettement améliorée par la réfrigération à la ferme et dans les usines de transformation. Cependant, l'entreposage à basse température du lait cru a créé des conditions sélectives pour la croissance des bactéries psychrotrophes. Agents de toxi-infections alimentaires ou d'altération de la qualité marchande des denrées, elles constituent un facteur limitant la conservation des produits réfrigérés (**Bornert, 2000**).

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 et qui sécrètent des protéases extracellulaires thermorésistantes, responsables d'une protéolyse des laits lors de leur conservation (**Andriamahery Rasolofo, 2010**).

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 est l'une des plus importantes bactéries psychrotrophes responsables des saveurs désagréables des produits laitiers en raison de sa métalloprotéase caséinolytique extracellulaire résistantes à la chaleur (**Mankaï M et al., 2003**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude. Elle se donne comme **objectif principal** connaître l'Occurrence et le profil d'antibiorésistance des *Pseudomonas* isolés du lait de vache cru.

Pour atteindre cet objectif nous avons réalisé une analyse bactériologique d'un lait de vache cru collecté à partir d'une petite ferme aux alentours de la wilaya de kenchela qui a consisté à :

- Isoler et identifier des souches de *Pseudomonas* dans le lait de vache cru collecté à partir d'une ferme de la wilaya de kenchela.

- Etudier la résistance des souches identifiées vis-à-vis de certaines familles d'antibiotiques.

- Déterminer le pourcentage de résistance aux antibiotiques et mettre en évidence le caractère multirésistant des souches selon leur profil de sensibilité aux familles d'antibiotiques.

Chapitre 1



I. Généralités sur le lait

I.1. Définitions du lait

Le lait a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum» (Alais, 1975).

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

Selon **Deforges et al.**, en 1999, le lait cru est un lait non chauffé au-delà de 40°C ni soumis à un traitement non thermique d'effet équivalent notamment du point de vue de la réduction de la concentration en micro-organismes

La dénomination « lait » sans indiquer l'espèce animale dont il provient renvoie uniquement au lait de vache. (Benzakour et al., 2009).

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%). (FAO, 1998). 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. La composition des différents laits d'animaux varie considérablement d'une espèce à l'autre, mais aussi à l'intérieur d'une même espèce, voire à l'intérieur des types ou des races d'espèces identiques. 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).

Tableau I : Composition chimique du lait de différentes espèces (g/L) (Alves d'Oliveira, 2007).

	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

I.3. Composition du lait

Le lait de vache est un lait caséineux. Sa composition en générale varient en fonction d'une multiplicité de facteurs : race animale, alimentation et état de santé de l'animal, période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite. (**Roudaut et Lefrancq., 2005**).

I.3.1. L'eau

L'eau est l'élément quantitativement le plus important : 900 à 910 g par litre. En elle est dispersés tous les autres constituants du lait, tous ceux de la matière sèche (**Mathieu, 1998**).

I.3.2. Matière grasse

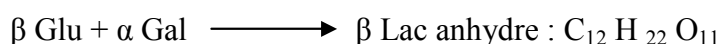
La matière grasse ou taux butyreux représente 25 à 45 g par litre (**Luquet, 1985**). Elle est constituée par 98,5% de glycérides, 1% de phospholipides polaires et 0,5% de substances liposolubles cholestérol, hydrocarbures et vitamines A, D, E, et K (**Goursaud, 1985**).

La matière grasse est dispersée en émulsion, sous forme de micro gouttelettes de triglycérides entourées d'une membrane complexe, dans la phase dispersante qu'est le lait écrémé (**Boutonnier, 2008**).

Cet état globulaire est fragile ; toute altération de la membrane par voie chimique, physique et microbienne conduit à la déstabilisation de l'émulsion. Cette évolution peut être accidentelle, elle se traduit alors le plus souvent par une séparation de la phase grasse sous forme d'huile ou d'agrégats et/ou par l'apparition de flaveurs indésirables; lorsqu'elle est dirigée, elle permet la concentration de la phase grasse sous forme de beurre après barattage, ou sous forme d'huile de beurre et de matière grasse laitière anhydre après chauffage et centrifugation (**Madji, 2009**).

I.3.3. Les 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 (**Luquet, 1985**).



Le lactose est fermentescible par de nombreux micro-organismes et il est à l'origine de plusieurs types de fermentations pouvant intervenir dans la fabrication de produits laitiers (**Morrissey, 1995**).

- Fermentation lactique : due aux bactéries lactiques naturelles ou ajoutées (ferments lactiques) qui utilise le lactose en le transformant en acide lactique.

- Fermentation propionique : due aux bactéries propioniques qui transforment le lactose en acide propionique et en acide acétique responsables de la flaveur des fromages à pâte cuite et en gaz carbonique induisant l'ouverture de ces fromages (**Luquet, 1985**).

- Fermentation butyrique : par des bactéries du genre *Clostridium* qui utilisent l'acide lactique déjà produit en le transformant en acide butyrique.

- Fermentation alcoolique : due à des levures qui hydrolysent le lactose en glucose et galactose et qui transforment ensuite le glucose en alcool éthylique.

I.3.4. Matière azotée

La matière azotée du lait englobe deux groupes, les protéines et les matières non protéiques qui représentent respectivement 95% et 5% de l'azote minéral du lait (**Goursaud, 1985**). Les protéines se répartissent en deux phases : une phase micellaire et une phase soluble.

La phase micellaire représente la caséine totale (80% des protéines du lait) du lait. Elle est formée par quatre protéines individuelles :

- Alpha caséines ou caséines α_1 36 % et α_2 10 %,
- Bêta-caséine ou caséine β 34 %,
- Kappa- caséine ou caséine κ 13 %
- Gamma-caséines ou caséine γ 7 % (produits de la protéolyse de la β - caséine) (**Goy et al., 2005**).

Une micelle de caséine contient environ 92 à 93% de protéines, les caséines, et 8% de minéraux. La partie minérale de la micelle comporte 90% de phosphate de calcium et 10% d'ions citrate et de magnésium (**Cayot et Lorient., 1998**). La présence de phosphate de calcium lié à la caséine est l'une des forces responsables de la stabilité de la structure des micelles de caséine (**Marchin, 2007**).

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 (**Ramet, 1985**). L'autre fraction protéique (environ 17%) du lait est présente dans le lactosérum. Les deux principales protéines sériques sont la β lactoglobuline et l' α lactalbumine (**Cayot et Lorient, 1998**).

I.3.5. Les enzymes

Ce sont des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, 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 (**Blanc, 1982; Pougheon, 2001**).

- Rôle antibactérien, elles apportent une protection au lait (lactoperoxydase et lysozyme).

- Indicateurs de qualité hygiénique (certaines enzymes sont produites par des bactéries et des leucocytes), de traitement thermique (phosphatase alcaline, peroxydase, acétyl esterase, sont des enzymes thermosensibles) et d'espèces (test de la xanthine-oxydase pour détecter le lait de vache dans le lait de chèvre) (**Pougheon, 2001**).

I.3.6. Vitamines

Ce sont des molécules complexes de taille plus faible que les protéines, de structure très variées ayant un rapport étroit avec les enzymes, car elles jouent un rôle de coenzyme associée à une apoenzyme protéique.

On classe les vitamines en deux grandes catégories :

- Les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) de la phase aqueuse du lait.

- Les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, et K) associées à la matière grasse, certaines sont au centre du globule gras et d'autres à sa périphérie (**Debry, 2001**).

I.3.7. Sels minéraux

Les minéraux sont présents, soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble. Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont particulièrement biodisponibles. Les ions calcium, phosphore, magnésium et soufre existent dans les deux fractions (**Mathieu, 1998**).

Le lait apporte également des oligo-éléments à l'état de traces : Zinc ($3,5 \cdot 10^{-1}$ g/l) ; Iode 2 à $10 \cdot 10^{-5}$ g/l cuivre. Par contre, il est carencé en fer ($0,3 \cdot 10^{-3}$ g/l) ; il contient peu de sodium (0,5g/l) (**Brulé et al., 2008**).

I.4. Les caractéristiques physico-chimiques du lait

I.4.1. Le pH

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H_3O^+) et donc une diminution du pH, car : $pH = \log 1/[H_3O^+]$. A la différence avec l'acidité titrable qui elle mesure tous les ions H^+ disponibles dans le milieu, dissociés ou non (acidité naturelle + acidité développée), reflétant ainsi les composés acides du lait (**CIPC lait, 2011**).

I.4.2. La densité

Elle oscille entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,032 à 20°C. La densité des laits écrémés

est supérieure à 1,035. Un lait à la fois écrémé et mouillé peut avoir une densité normale (Vierling, 2008).

I.4.3. L'acidité de titration ou acidité Dornic

L'acidité de titration indique le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. Un lait frais a une acidité de titration de 16 à 18°Dornic (°D). (**1g d'acide lactique par litre de lait=10°D**). Conservé à la température ambiante s'acidifie spontanément et progressivement (Mathieu, 1998). C'est la raison pour laquelle on distingue l'acidité naturelle, celle qui caractérise le lait frais, d'une acidité développée issue de la transformation du lactose en acide lactique par divers microorganismes (CIPC lait, 2011).

I.4.4. Le point de congélation

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes. Sa valeur moyenne, si l'on considère des productions individuelles de vache, se situe entre -0,54 °C et - 0,55°C (Mathieu, 1998). La mesure de ce paramètre permet l'appréciation de la quantité d'eau éventuellement ajoutée au lait. Un mouillage de 1% entraîne une augmentation du point de congélation d'environ 0,0055°C (Goursaud, 1985)

I.5. Les caractéristiques organoleptiques du lait

I.5.1. Couleur

Le lait est un liquide blanc mat, opaque à cause des micelles de caséinates, ou parfois bleuté ou jaunâtres du fait du β carotène ou de la lactoflavine contenue dans la matière grasse (Jacques, 1998) .

I.5.2. Odeur

Elle est toujours faible et variable en fonction de l'alimentation de la femelle productrice. Le lait n'as pas d'odeur propre, il s'en charge facilement au contact de récipients mal odorants, mal lavés. C'est surtout la matière grasse qui réalise fortement ces fixations. Lors de l'acidification du lait. L'odeur devient aigrelette sous l'influence de la formation d'acide lactique (Chetoune, 1982).

I.5.3. Saveur

La saveur normale d'un bon lait est agréable et légèrement sucré, ce qui est principalement due à la présence de matière grasse, la saveur du lait se compose de son gout et de son odeur (Horola, 2002).

I.5.4. Viscosité

Elle est en fonction de l'espèce, on distingue :

Un lait visqueux chez les monogastriques (jument, ânesse, carnivores et femme). On parle de lait albumineux.

Un lait moins visqueux chez les herbivores (lait de brebis plus visqueux que celui de la vache). Le lait est dit caséineux (Alais, 1984).

I.6. Microbiologie du lait cru

I.6.1. Origine de la diversité microbienne du lait cru

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.

Le lait cru contient une flore microbienne diversifiée. Pourtant, chez un animal sain, le lait ne contient pas de micro-organismes lorsqu'il est produit dans le pis (en sortie directe des cellules sécrétrices des glandes mammaires). La colonisation par la flore microbienne commence donc après la sécrétion du lait dans le pis (à partir des trayons).

Au moment de la traite, trois sources possibles de contamination du lait cru peuvent être distinguées : à l'intérieur du pis, à l'extérieur du pis et via le matériel qui entre en contact avec le lait.

Le nombre de microorganismes et le type de microorganismes qui contamineront le lait seront influencés par (Figure 01) :

- 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

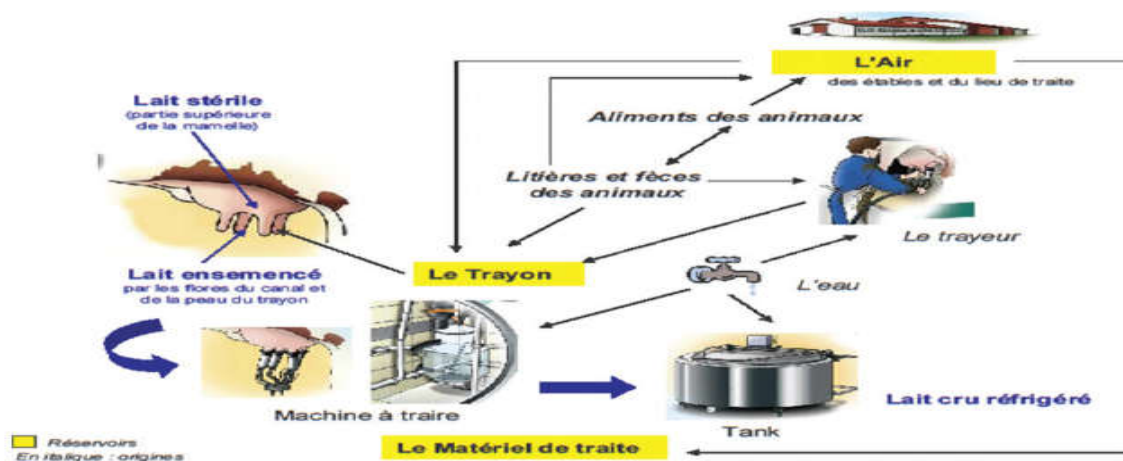


Figure 01: Flux microbien dans les étables de production laitière (Renard, 2014).

Donc, la flore du lait provient de l'environnement de traite et de l'animal lui-même. La composition de la flore est susceptible de varier à chaque traite et à chaque lieu de traite.

I.6.2. Flore microbienne du lait

Les microorganismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais, on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire des virus. De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue, pour elles, un excellent substrat nutritif. Au cours de leur multiplication dans le lait, elles libèrent des gaz, des substances aromatiques, de l'acide lactique, diverses substances protéiques, voire des toxines pouvant être responsables de pathologie chez l'homme (**Anonyme, 2009**).

L'importance et la nature des bactéries contaminants le lait, dépendent, de l'état sanitaire de l'animal, de la nature des fourrages (**Agabriel et al., 1995**), mais aussi des conditions hygiéniques observées lors de la traite, de la collecte, de la manutention et de la température de conservation du lait (**Robinson, 2002**).

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 (**Larousse, 2005**).

I.6.2.1. Flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes/ml). À sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et est protégé par des substances inhibitrices appelées lacténines à activité limitée dans le temps (une heure environ après la traite) (**Cuq, 2007**).

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (**Vignola, 2002**). Il s'agit de microcoques, mais aussi streptocoques lactiques et lactobacilles. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation (**Guiraud, 2003**), et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (**Varnam et Sutherland, 2001**).

I.6.2.2. Flore de contamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (**Vignola, 2002**).

Ces contaminations par divers microorganismes peuvent provenir de l'environnement : Entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, Microcoques, Corynébactéries, *Bacillus*, etc., par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière. Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'entérobactéries Coliformes et, éventuellement, d'Entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Yersinia*. Ceci explique l'importance d'un contrôle rigoureux du lait (**Leyral et Vierling, 2007**).

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait, lorsqu'il est issu d'un animal malade. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infections du pis : *Streptococcus pyogenes*, *Corynebactérium pyogenes*, *Staphylocoques* etc. Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : *Salmonella* ; *Brucella*, agent de la fièvre de Malte, et exceptionnellement *Listeria monocytogenes*, agent de la listériose; *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium Tuberculosis*, agents de la tuberculose ; et quelques virus.

Hormis les maladies de la mamelle, le niveau de contamination est étroitement dépendant des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées ces manipulations, à savoir l'état de propreté de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (seaux à traire, machines à traire) et, enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves, tanks) (**FAO, 1995**).

Chapitre 2



I. La flore d'altération du lait cru

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 (Baira., Cheraa. 2013).

I.1. La flore d'altération psychrotrophe

Les bactéries psychrotrophes sont des microorganismes aérobies pouvant croître en sept à dix jours à des températures avoisinant les 7 °C. On peut inclure plusieurs genres de bactéries à Gram négatif tel le genre *Pseudomonas*, qui est le plus abondant et connu pour son rôle protéolytique et lipolytique dans la dégradation du lait pendant sa conservation. On peut aussi trouver les genres *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter* et *Flavobacterium*. Les genres microbiens à Gram positif les plus fréquemment isolés du lait sont *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*. On peut aussi retrouver certains pathogènes dans le groupe des psychrophiles tels *Listeria monocytogenes* et *Yersinia enterocolitica* (Weber, 1985).

Les sources de contamination du lait aux bactéries psychrotrophes sont l'air (entrant dans l'enceinte par les fenêtres et les portes), le sol (équipements déposés au sol, mal lavés) ou l'eau. Un bris de la chaîne de froid ou une conservation prolongée peut favoriser la multiplication de ces microorganismes. Les bactéries constituant ce large groupe peuvent atteindre des concentrations jusqu'à 10⁶UFC/ml dans le lait cru. Il s'agit d'une communauté de microorganismes qui a son importance non seulement parce qu'elle constitue la population dominante lorsque le lait cru est entreposé, mais aussi parce son activité enzymatique est directement reliée à l'altération du lait (Bornert, 2000).

Un lait de bonne qualité consiste en une bonne apparence (couleur et texture) et une bonne odeur (agréable et légèrement sucrée), ce qui devrait lui conférer un bon goût. Pour se faire, la flore totale du lait devrait contenir moins d'un dixième de bactéries psychrotrophes, mais peut monter à plus du trois quarts pour des échantillons de mauvaise qualité. Un lait riche en bactéries psychrotrophes peut aussi signifier des baisses de rendements fromagers dues à l'hydrolyse des protéines par les enzymes protéolytiques, en plus d'une altération de goût du produit fini (Lavoie, 2011).

Pseudomonas fluorescens est l'une des plus importantes bactéries psychrotrophes responsables des saveurs désagréables des produits laitiers en raison de sa métalloprotéase caséinolytique extracellulaire résistantes à la chaleur (Mansel, 2008).

I.1.1. Définition de la flore psychrotrophe

Il est possible de classer les bactéries en différents groupes, selon la valeur de la température optimale de croissance. On distingue ainsi les bactéries thermophiles, mésophiles et psychrophiles. Cette classification fait cependant l'objet de controverses et les valeurs présentées au tableau II diffèrent selon les auteurs (Leclerc et Mossel, 1989).

Tableau II : Classification des micro-organismes selon leur température optimale de croissance.

	Thermophiles	Mésophiles	Psychrotrophes
Valeurs entre lesquelles se situe la température optimale de croissance du micro-organisme considérés	+40°C et +55°C	+20°C et +40°C	+5°C et +20°C

On rassemble sous le nom « psychrotrophe » des microorganismes capables de se développer à une température égale ou inférieure à 7° C, quelle que soit leur température optimum de croissance.

Autrement dit, ils se caractérisent par leur aptitude à se développer dans un intervalle de température très large.

Selon cette définition, les bactéries psychrophiles appartiennent aussi au groupe des psychrotrophes, mais en pratique les principales bactéries psychrotrophes d'intérêt alimentaire sont mésophiles.

Il faut noter que le monde des micro-organismes psychrotrophes ne se limite pas aux seules bactéries. On rencontre aussi un nombre très important d'espèces de micromycètes, agents de l'altération au froid des denrées alimentaires (Bornert, 2000).

I.1.2. Caractéristiques des bactéries psychrotrophe

A des températures proches de 0°C, les micro-organismes subissent des désordres métaboliques et des lésions cellulaires pouvant être importants. Cet état physiologique de "stress froid (Druesne, 1996) est principalement la conséquence d'une fragilisation des liaisons hydrophobes, induite par la réfrigération. Il en résulte une perte de fonctionnalité des protéines enzymatiques, par modification de leur conformation dans l'espace. La structure quaternaire est profondément modifiée, avec une dissociation des complexes polymériques. L'assemblage des

ribosomes est inhibé, ce qui provoque une diminution des synthèses protéiques. La fluidité des membranes est réduite et l'ensemble des fonctions membranaires telles que le transport des ions ou des nutriments s'en trouve affecté (Gounot, 1991).

Les bactéries psychrotrophes possèdent une relative capacité de résistance au «stress froid», mettant en jeu des mécanismes dont les principaux sont la synthèse d'enzymes adaptées à fonctionner à basse température, l'adaptation de la composition des membranes en acides gras insaturés et la synthèse de protéines «de choc thermique» (Gounot, 1991).

I.2. Principales bactéries psychrotrophes

Il est possible de classer les bactéries psychrotrophes en deux groupes, en fonction de leurs effets : les agents de toxi-infections alimentaires et les agents d'altérations des aliments.

I.2.1. Agents de toxi-infections alimentaires

En se basant sur les statistiques actuellement disponibles concernant la fréquence de la contamination des produits alimentaires et compte-tenu de l'actualité récente, il faut retenir la place prépondérante de *Listeria monocytogenes* en tant que bactérie psychrotrophe pathogène pour l'homme. Les espèces *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* et *Clostridium botulinum* de type E sont impliquées dans des accidents d'origine alimentaire. D'autres bactéries présentent un intérêt pratique mineur, en particulier *Aeromonas hydrophila* et *Plesiomonas shigelloides*.

Enfin, il faut noter que certaines souches de *Salmonella* et de *Escherichia coli* sont susceptibles de se développer entre +5°C et +7°C, mais que ces souches restent atypiques de sorte que ces micro-organismes ne sont pas considérés parmi les psychrotrophes.

I.2.2. Agents d'altérations des aliments

Les bactéries psychrotrophes agents d'altérations des aliments sont beaucoup plus nombreuses et variées, mais la famille des *Pseudomonadaceae* est souvent la plus représentée. Elle regroupe des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, mobiles par ciliature polaire et aérobies stricts. Le genre *Pseudomonas* possède la meilleure capacité de développement au froid et présente une activité significative jusqu'à une température de +2°C. Les genres *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Alteromonas* et *Flavobacterium* sont aussi fréquemment rencontrés dans les denrées alimentaires (Bornert, 2000).

I.3. Présentation du genre *Pseudomonas*

I.3.1. Caractères généraux

Les *Pseudomonas* et genres apparentés appartiennent au **phylum** des *Proteobacteria*, **classe** des *Gammaproteobacteria*, **ordre** des *Pseudomonales*. Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 µm

(Palleroni, 1984). Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche et certaines espèces possèdent des flagelles à gaines (Tortora *et al.*, 2003). Elles se cultivent sur des milieux usuels non enrichis et sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie.

C'est un genre bactérien comportant un nombre important d'espèces, pour la plupart présentes à l'état naturel sur toute la surface du globe, dans le sol, les eaux et les plantes

I.3.2. Classification

Dans la deuxième édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", l'ordre des *Pseudomonadales* est défini sur la base des séquences des ADNr 16S et il est constitué de la famille des *Pseudomonadaceae* et de la famille des *Moraxellaceae*. En 1895, Migula inclut dans le genre *Pseudomonas* des bactéries possédant une ciliature monotriche ou lophotriche dont l'espèce "*Pseudomonas pyocyaneae*" (aujourd'hui *Pseudomonas aeruginosa*).

Par la suite, le genre *Pseudomonas* a accueilli un très grand nombre d'espèces constituées de bacilles à Gram négatif, mobiles (ciliature polaire) ou immobiles et à métabolisme oxydatif.

I.3.3. Caractéristiques nutritionnelles du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* constituent un groupe avec une grande diversité et adaptabilité dans leurs voies métaboliques et sont résistants à des nombreux facteurs (milieux pauvres en nutriments, traitement thermique, antibiotiques...etc.) ils ont la possibilité d'échanger ou d'acquérir facilement du matériel génétique (mutations ou acquisitions d'éléments génétiques exogènes) pour s'adapter à différentes conditions de milieu (Leriche et Fayolle, 2004 ; Anses, 2010).

Tous catalase positif les *Pseudomonas* vivent dans les conditions aérobies (métabolisme oxydatif avec l'oxygène comme acceptateur final d'électrons). La plupart des espèces sont chimio-organotrophes (utilisent des composés organiques) (Leriche et Fayolle, 2004).

Les *Pseudomonas* n'utilisent pas le lactose cependant, ils peuvent utiliser l'acide lactique produit par les bactéries lactiques lorsqu'il y a un manque d'éléments carbonés dans le milieu. Cette compensation peut ralentir la décroissance de l'acidité, en transformation fromagère (Kive *et al.*, 2005).

Les *Pseudomonas* sont incapables de fermenter les glucoses, ce qui est un des critères de leur identification (Leriche et Fayolle, 2004).

I.3.4. Caractères culturels du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* sont des germes psychrotrophe, ils se développent à des températures minimales autour de 0° C avec un optimum de croissance à 30°C (Rajmohan *et al.*, 2002).

La culture des *Pseudomonas* peut être obtenue sur les milieux peptonés. Toutes les souches ne cultivent pas à 37 °C (l'incubation à 30 °C est donc conseillée). La capacité à croître à des températures extrêmes (4 °C ou 41 °C), permet de caractériser certaines espèces. La plupart des espèces sont prototrophes.

Leur développement est inhibé en dessous de pH 4 et est ralenti entre pH 4 et pH 5. Ils sont exigeants en eau libre car leur développement est favorisé lorsque l'activité de l'eau est supérieure à 0.98 (**Bornet, 2000**).

Les *Pseudomonas* se multiplient sur des milieux très simples et présentent également une extrême tolérance aux conditions du milieu :

- Tolérance à la température : $T^{\text{opt}} = 30\text{-}35^{\circ}\text{C}$, mais la plupart peuvent se développer entre 4°C et 42°C.
- Résistance à de nombreux inhibiteurs
- Se développent sur les milieux sélectifs des Entérobactéries,
- Se développent en présence de certains antiseptiques (ex: gélose au cétrimide = milieu sélectif des *Pseudomonas*, dont le caractère sélectif peut être renforcé pour *Ps. aeruginosa* en ajoutant de l'acide nalidixique et en incubant à 42°C)
- Résistent à de nombreux antibiotiques.

I.3.5. L'activité enzymatique des *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* sont impliqués dans les accidents de fromagerie du fait de leur production d'enzymes extracellulaires protéolytiques et lipolytiques thermorésistantes qui dégradent les fromages (**Arslan et al., 2011 ; Costa et al., 2001**).

L'activité enzymatique libère dans le milieu les éléments nutritionnels azotés et carbonés nécessaires aux *Pseudomonas* pour se développer (**Kives et al., 2005**). Ces enzymes sont alors responsables du goût d'amertume si elles sont présentes en grandes quantités. Les enzymes lipolytiques catalysent la dégradation des triglycérides en acides gras libres qui provoquent d'autres défauts de goût (**Arslan et al., 2011**).

Le refroidissement du lait peut donc induire une forte protéolyse en aval de la transformation par la production de protéase en grande quantité pendant le refroidissement pour le stockage du lait à basse température, dès lors que la population de *Pseudomonas* est suffisamment grande (**Leriche et Fayolle, 2004 ; Wang et Jarayao, 2001 ; Costa et al., 2001**).

I.3.6. Habitat et distribution environnementale

Les *Pseudomonas* vivent principalement dans l'eau et les sols humides. Elles contaminent notamment les siphons d'éviers, les réservoirs d'eau ...

Elles se rencontrent également sur les plantes, pour lesquelles certaines espèces sont pathogènes (*Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas Syringae* ...).

Seules quelques espèces se trouvent chez l'homme ou l'animal, en tant que commensales ou pathogènes, seules *Pseudomonas mallei* et *Pseudomonas pseudo-mallei* sont des pathogènes stricts pour les animaux (morve des chevaux).

I.3.7. Métabolisme et caractères physiologiques

La caractéristique physiologique la plus importante des *Pseudomonas* est la production de pigments hydrosolubles diffusant dans les milieux de culture. Deux types de pigments peuvent être synthétisés : des pigments fluorescents (pyoverdines), des pigments phénaziniques bleus non fluorescents (**Jerome et al., 2004**).

Il existe de rares souches produisant d'autres pigments (noir pyomelanine ou rouge brun pyorubine) et des souches apigmentées (moins de 5% des souches sauvages ne produisent aucun pigment et sont fréquemment isolées chez des patients sous antibiotiques) (**Venier, 2011**).

La présence ou l'absence d'un pigment fluorescent (pyoverdine) permet de séparer les espèces du genre en deux groupes, les *Pseudomonas* « fluorescents » (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*) et les *Pseudomonas* non-fluorescents (*Pseudomonas stutzeri*). La pyoverdine est un pigment de couleur jaune-verte, soluble dans l'eau. Sa synthèse dépend de la concentration en ions Fe^{2+} et dans les milieux carencés en fer sa production est abondante. Le milieu de King B et la gélose cétrimide (milieu sélectif des *Pseudomonas*) favorisent la production de pyoverdine.

Pseudomonas aeruginosa produit un pigment de couleur bleue soluble dans le chloroforme, spécifique à cette espèce et appelé la pyocyanine. La pyocyanine est un accepteur d'électrons permettant à *P. aeruginosa* de croître en anaérobiose. Elle possède une activité bactériostatique, notamment vis-à-vis des bactéries à Gram positif. Le milieu de King A favorise la production de pyocyanine.

Les *Pseudomonas* constituent le modèle des bactéries oxydantes ou dites oxybiontiques. Elles présentent un type respiratoire aérobie strict et un type métabolique chimio-organotrophe oxydatif, certaines espèces sont capables d'utiliser l'ion nitrate au lieu de dioxygène comme accepteur final des électrons. Ce processus est appelé respiration anaérobie et fournit presque autant d'énergie que la respiration aérobie (**Tortora et al., 2003**).

I.3.8. Espèces appartenant au genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* regroupe plus de 140 espèces dont les principales sont :
Pseudomonas aeruginosa (espèce type)

<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Comamonas acidovorans</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i>
<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Pseudomonas vesicularis</i>
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	<i>Pseudomonas mesophilica</i>

Les espèces les plus communs dans les produits laitiers sont : Les espèces *Pseudomonas aeruginosa*- *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*

Pseudomonas aeruginosa : également connu sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie que l'on trouve partout dans la nature, et en particulier dans les milieux humides et chauds. Habituellement, cette bactérie est peu agressive envers l'homme, mais elle peut devenir pathogène (responsable d'une maladie) dans certaines circonstances. Très résistante face aux traitements antibiotiques, elle est notamment en cause dans une part croissante des maladies nosocomiales, les maladies contractées lors d'un séjour dans une structure de soins.

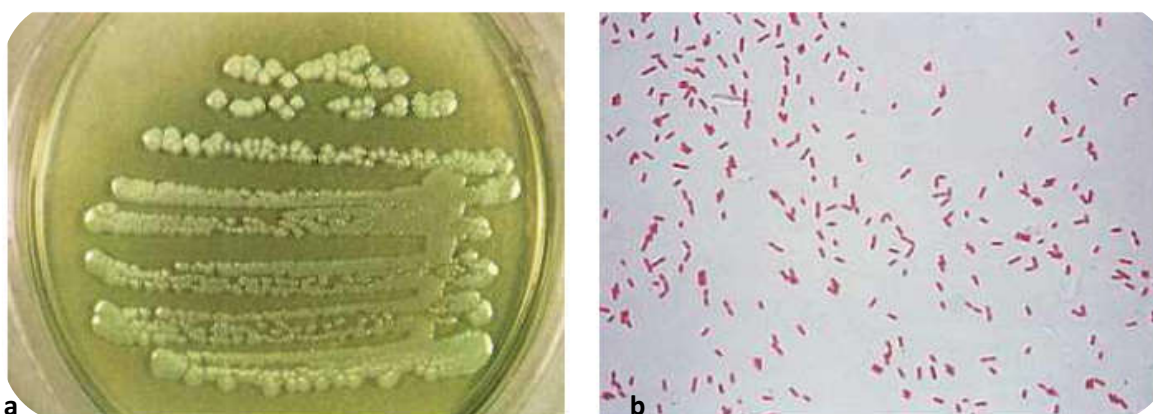


Figure 02 : *Pseudomonas aeruginosa* (a) colonies sur gélose ordinaire, (b) coloration de Gram (x1000) (Salton et Kim, 1996)

Ce germe qui atteint en priorité les patients immunodéprimés, c'est-à-dire dont les défenses immunitaires sont diminuées, peut être responsable de multiples infections notamment urinaires, pulmonaires ou post-opératoires essentiellement chez des patients fragilisés. Le traitement repose sur des antibiotiques.

Pseudomonas fluorescens : c'est une bactérie à Gram négatif, aérobie strict qui se présente sous forme de bâtonnet. Elle évolue à un pH neutre et sa température optimale de croissance est de 25 à 30 °C (Palleroni, 1984). mais elle peut aussi se développer à une

température aussi basse que 4 °C. La bactérie *Pseudomonas fluorescens* ne forme pas de spores ou d'autres structures de survie et ne peut pas se développer dans des conditions acides (inférieur à pH 4,5) (Holt, 1994). Comme sa demande nutritionnelle est modeste, elle peut survivre et se multiplier pendant plusieurs mois dans des environnements humides. La plupart des souches sont des chimio-organotrophes strictement aérobies nécessitant à la fois de l'oxygène et du carbone organique pour leur croissance (Holt, 1994).

Pseudomonas putida : c'est un aérobie strict, à Gram négatif, en forme de bâtonnet, qui ne forme pas de spore et qui doit sa mobilité à un ou à plusieurs flagelles polaires; il mesure de 0,5 à 1,0 × 1,5 à 5,0µm. Cette souche représente la souche type de l'espèce. *Pseudomonas putida* se distingue de *Pseudomonas aeruginosa* par son incapacité à liquéfier la gélatine, à produire des pigments de phénazine, à dénitrifier ou à dégrader le jaune d'œuf, et à croître à 41 °C. En effet, la température optimale de croissance de *Pseudomonas putida* se situe entre 25 et 30 °C, alors que pour *Pseudomonas aeruginosa*, elle est de 37 °C (Palleroni, 2005; Stanier *et al.*, 1966). *Pseudomonas putida* se distingue de *Pseudomonas fluorescens* (Bossis *et al.*, 2000; Chapalain *et al.*, 2007; Palleroni, 2005; Stanier *et al.*, 1966). par son incapacité à liquéfier la gélatine, à métaboliser le L-arabinose et à dénitrifier ou à dégrader le jaune d'œuf..

I.4. Principales activités microbiennes dans le lait

Les altérations du lait sont associées à la multiplication de levures, moisissures et bactéries. Cependant et compte tenu de leurs caractères écologiques, les contaminations bactériennes sont les plus fréquentes et les plus importantes et leurs potentialités de développement les plus à craindre.

Ces processus de dégradation sont possibles, lorsque les conditions du milieu environnant sont favorables à la prolifération microbienne et à l'activité enzymatique. De graves défauts de goût et d'odeur peuvent apparaître par accumulation des produits issus, soit du métabolisme cellulaire, soit de l'action de systèmes enzymatiques complexes sur les constituants du lait. Le plus fréquemment, il s'agit de lait acide, amer, fruité, rance, malté, à goût étranger (Kim *et al.*, 1982).

I.5. Principales activités enzymatiques des *Pseudomonas* dans le lait cru

Lors de développement des *Pseudomonas* dans le lait et les produits laitiers, les bactéries psychrotrophe (genre *Pseudomonas*, principalement mais également *Bacillus*) peuvent produire des enzymes (les lipases et les protéases extracellulaires, généralement thermostable. Ces enzymes peuvent provoquer des défauts de goût dans les fromages (goût de rance, amertume) ou être responsable (protéase) de la déstabilisation des laits (Hermier *et al.*, 1992).

I.5.1. La lipolyse

Résulte de l'action d'enzymes, appelées lipases, qui décomposent les globules gras de la matière grasse du lait et libèrent des acides gras libres (AGL) qui en s'oxydant, provoquent l'apparition de défauts de goût des produits laitiers (goût de rance, amertume...). Le niveau de lipolyse mesuré dans le lait traduit les effets additifs de trois formes de lipolyse : la lipolyse spontanée causée par des lipases naturelles, la lipolyse induite par des chocs thermiques ou mécaniques et enfin, la lipolyse microbienne par principalement les pseudomonas qui produisent ces enzymes (les lipases).

L'indice de lipolyse est l'un des critères de la qualité du lait, il renseigne sur le degré d'altération de la matière grasse. Il est utilisé pour le paiement du lait à la qualité dans certaines régions. Les causes de variation de la lipolyse sont multiples et cumulatives. Chaque facteur pris séparément n'a pas forcément un impact important mais, le cumul de plusieurs facteurs peut entraîner une augmentation de la lipolyse (**Chilliaro., Lamberet, 1984**).

I.5.2. Protéolyse

Le lait contient une grande variété de micro-organismes capables de synthétiser des protéases. La réfrigération du lait dans la ferme et son stockage pendant un temps plus ou moins long sélectionne des bactéries psychrotrophes qui peuvent devenir alors la flore dominante. Parmi ces bactéries le genre *Pseudomonas* est le plus fréquent. Bien que ces bactéries soient détruites par la pasteurisation, elles peuvent avoir sécrété auparavant des protéases exocellulaires et thermorésistantes, capables de dégrader les constituants du lait et d'occasionner des défauts en cours de stockage.

Il existe, à l'heure actuelle, peu de travaux permettant d'établir une corrélation valable entre le nombre des bactéries psychrotrophes et la production de protéases.

La synthèse de protéases exocellulaires par les bactéries psychrotrophes s'effectue pendant la phase exponentielle de la courbe de croissance et le maximum de production a lieu en fin de phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. L'addition de poudre de lait, de caséines ou d'acides aminés libres à des milieux synthétiques ou complexes entraîne une forte augmentation de la production de protéases. A l'inverse, la présence d'agents chélateurs semble inhiber la formation de protéases dans le milieu. La plupart des souches de *Pseudomonas fluorescens* semblent être plus protéolytiques lorsqu'elles se développent à des températures comprises entre 20 et 25° C et moins protéolytiques à des températures comprises entre 5 et 8° C, certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* seraient susceptibles de produire une plus forte quantité de protéases à basse température. L'aération du milieu de culture peut également avoir une influence sur la production de protéases (**Miranda et Gripon, 1986**).

A decorative oval frame containing the title. The frame is composed of a pinkish-red brushstroke border. Inside the oval, there are several butterflies in shades of red, purple, and blue. The bottom and right sides of the oval are adorned with colorful, swirling patterns, including spirals, dots, and floral-like motifs in various colors like pink, purple, blue, and orange.

**Matériel et
méthodes**

I. Caractéristiques générales du site d'étude

Le site choisi pour cette étude est une petite ferme aux alentours de la ville de Khenchela. Son propriétaire élève quelques vaches en plus de petites parcelles de terrains cultivés avec différentes cultures agricoles.



Photographie 01 : Les vaches traitées et parcelles de terrain de notre site d'étude

II. Procédure d'échantillonnage

Les échantillons à analyser sont du lait de vache cru entier obtenu après une traite manuelle des quatre vaches présentes au niveau de notre site d'étude. La collecte a eu lieu en mois de Mars 2017 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. Le canal du trayon est toujours contaminé, même chez un animal sain ; de ce fait, les premiers jets de lait obtenus lors de la traite doivent être éliminés. L'échantillon est transporté à température ambiante à l'obscurité jusqu'au laboratoire où il a été stocké au réfrigérateur à 4°C pendant 4 jours (ce qui permet la prolifération notable des bactéries psychrotrophe). L'analyse a lieu après cette durée.

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 une recherche des germes indicateurs d'altération du genre *Pseudomonas* sur des milieux appropriés au moyen des méthodes normalisées actuellement en vigueur. 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 cette souche 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.

✓ On a d'abord bien homogénéisé l'échantillon en agitant vigoureusement le flacon afin de permettre une répartition homogène des microorganismes. 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. Isolement des *Pseudomonas*

0.1 ml de la solution mère et de chaque dilution sont déposés à la surface du milieu gélosé au cétrimide coulé en boîte de pétri. L'inoculum a été étalé soigneusement sur toute la surface gélosée grâce à un râteau étaleur. (**Fayolle et Leriche., 2011**).

La technique requiert certaines précautions : on a séché au préalable, à l'étuve à 37°C, les milieux gélosés afin de faire évaporer l'eau de cristallisation, la surface de la gélose doit être complètement sèche sinon on obtient une « pâte de colonies » sur la boîte de pétri



Photographie 02 : Ensemencement en surface de la gélose cétrimide

Les boîtes de Pétri (10 boîtes) sont ensuite mises dans l'étuve couvercle en bas pour une incubation. Cinq boîtes (5) de pétri incubées à 41°C pendant 48 heures pour la recherche de *Pseudomonas aeruginosa* et cinq (5) autres boîtes de pétri à 37°C pendant 24 heures pour la recherche des autres espèces du genre *Pseudomonas*.

Après incubation, on considère comme colonie caractéristique, toute colonie beige ou vertes, lisses, bombées, arrondies, à contour régulier et parfois irrégulier de taille moyenne 1 à 2 mm de diamètre. (Fayolle et Leriche., 2011).

Vingt cinq (25) colonies caractéristiques ont été reprises de manière aléatoire pour purification par repiquage successif sur gélose nutritive. Après purification chaque colonie a été conservée par culture pure sur bouillon nutritif.

Les souches microbiennes purifiées sont identifiées en se basant sur leurs caractères microscopiques, physiologiques et biochimiques.

III.3. Identification physiologique

III.3.1. Mise en évidence de la production des pigments

Les milieux King A et King B permettent de différencier les espèces du genre *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigmentations spécifiques.

Les 25 souches microbiennes purifiées sont ensemencées sur milieu King A et King B (tubes inclinés) en réalisant des stries médianes à la surface de la pente, les capsules des tubes sont ensuite remplacées et revissées. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 heures.

✓ Le milieu King A est utilisé pour mettre en évidence la pyocyanine, pigment caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa*. Les cultures typiques sont colorées en bleu-vert.

✓ Le milieu King B est utilisé pour mettre en évidence la pyoverdine pigment vert fluorescent produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas* du groupe fluorescent. (Rejsek, 2002).

On considère comme colonie caractéristique toute colonie présentant une fluorescence allant du bleu-vert au vert en périphérie sous rayonnement ultraviolet (254 nm).



Photographie 03 : Chambre noire à ultra violet (UV).

III.4. Identification microscopique

III.4.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet la distinction des bactéries à Gram (+) et à 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 phéniqué 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 phéniquée 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 $\times 100$) 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.

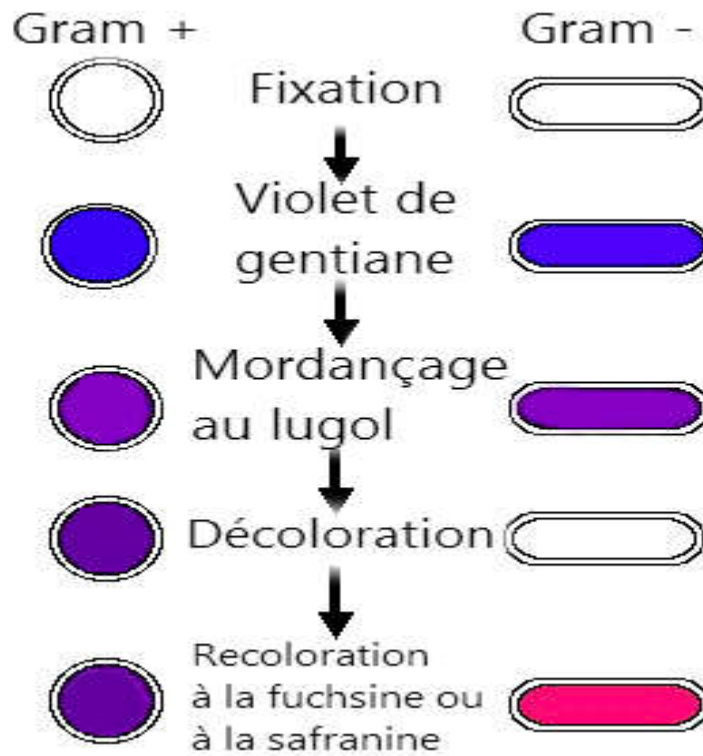


Figure 03 : L'aspect des bactéries après la coloration de Gram

Une fois séchées, les lames sont examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif à immersion (x 100). Les bactéries Gram négatif apparaissent colorées en rose tandis que les bactéries Gram positif sont colorées en violet. (Prescott *et al.*, 2003)

Des microphotographies sont réalisées à l'aide d'un microscope trinoculaire doté d'un appareil photographique numérique



Photographie 04 : Un microscope équipé d'un appareil photographique numérique

III.5. Identification biochimique

III.5.1. Test d'oxydase

C'est un test très important pour l'orientation des bacilles à Gram négatif, les Gram positif ne possédant pas cette enzyme en général (le cytochrome oxydase). Il est basé sur l'étalement d'une quantité de la culture bactérienne à tester sur le disque d'oxydase imprégné du réactif. Un résultat positif est obtenu par la formation d'une tache violette sur le disque (**Joffin et Leyral, 2006**).

III.5.2. Identification biochimique par galerie API 20 NE

Les souches bactériennes purifiées ont fait l'objet d'une étude des caractères biochimiques. 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 (**Bio-Mérieux, 2006**).

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le tableau d'identification. (**Voir annexe 04**)

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant chacune un substrat spécifique déshydraté. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.



Photographie 05 : La galerie API 20 NE

- **Préparation de la galerie**

Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis, puis environ 5 ml d'eau distillée stérile sont répartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. La référence de la souche est inscrite sur la languette latérale de la boîte. Sortir la galerie de son emballage individuel et placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture jeune (18-24 heures), une à quatre colonies d'aspect morphologique identique sont prélevées par touches successives puis mises en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile.

- **Inoculation de la galerie**

Les tubes des tests NO₃ à PNG sont remplis en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation des bulles au fond des tubes, qui empêcheraient le contact entre les bactéries à identifier et le réactif ou substrat à tester, la pointe de la pipette est posée sur le côté de la cupule tout en inclinant légèrement la boîte d'inoculation vers l'avant. Les tubes et cupules des tests | GLU | à | PAC | sont remplis en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe.

Enfin, les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) sont remplies d'huile de paraffine en formant un ménisque convexe. A la fin la boîte d'incubation est fermée et incubée à 37 °C pendant 24 heures jusqu'à 48 heures

- **Lecture et identification**

Après incubation, la lecture de ces réactions après l'addition des réactifs nécessaire est réalisée à l'aide du tableau de lecture (**Annexe 03**) et l'identification obtenue à l'aide du Logiciel d'identification API Excel (**Annexe 04**) (**Bio-Mérieux, 2006**).

IV. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques

Le profil de résistance des souches bactériennes purifiées a été déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton. Des antibiotiques communément utilisés en thérapie humaine ont été retenus.

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est ensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose.

L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration décroissante. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits.

Le mode opératoire est pratiqué selon la Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS.

* **Milieu** : c'est la gélose Mueller Hinton (MH), coulé en boîte Pétri sur une épaisseur de 4 mm. Les géloses sont séchées avant l'emploi.

* **Inoculum** : à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, on prépare une suspension bactérienne en utilisant 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %.

* **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 l'angle à chaque fois (60°).

* **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.

Tableau III : Liste des antibiotiques testés, charge et classification des disques

Les Antibiotiques	Abréviations	Charge des disques (µg)
PENICILLINES		
Ticarcilline	TIC	75
Ticarcilline + Acide clavulanique	TCC	75+10
Pipéracilline	PRL	100
CEPHALOSPORINES		
Ceftazidime	CAZ	30
CARBAPENEMES		
Imipénème	IMP	10
AMINOSIDES		
Amikacine	AK	30
Gentamycine	CN	10
Tobramycine	TOB	10
QUINOLONES / FLUOROQUINOLONES		
Ciprofloxacine	CIP	05
Lévofloxacine	LVX	5
DIVERS		
Colistine	CT	10

***Lecture :** Une fois la période d'incubation écoulée, la zone entourant le disque où aucune croissance bactérienne n'est visible détermine la zone d'inhibition. Son diamètre est mesuré et comparé aux diamètres critiques figurant dans les tables de lecture. La souche est ainsi classée sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) à l'antibiotique, les souches I sont ensuite incluses dans la catégorie R.

Des souches de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont servi pour le contrôle de la qualité de l'antibiogramme.

Le nombre d'antibiotiques actifs contre *Pseudomonas* est limité. Il s'agit surtout des céphalosporines de troisième génération, carbapénèmes, fluoroquinolones, particulièrement la ciprofloxacine et les aminoglycosides. La liste d'antibiotiques testés est présentée dans le **Tableau IV**.

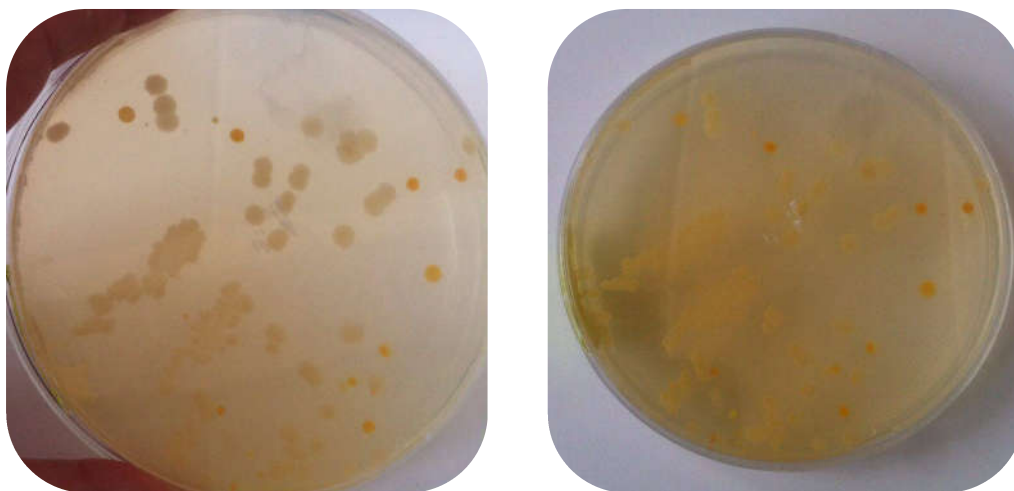
A decorative oval frame containing the text. The frame is composed of a light pink, brush-stroke-like border. Inside the oval, there are several colorful butterflies in shades of red, purple, and blue. The background of the oval is filled with intricate, colorful swirls and floral patterns in various colors including pink, purple, blue, orange, and green. The text is centered within this decorative area.

**Résultats et
Discussion**

I. Caractéristiques microbiologiques

I.1. Aspect macroscopique et microscopique des isolats

Une fois la période d'incubation écoulée, des colonies sont apparues à la surface de la gélose au Cétrimide. Des colonies de taille moyenne beige, bombées, lisses ont été prises en considération les résultats obtenus figurent sur la **photographie 06**.



Photographie 06 : Résultats d'isolement sur gélose Au Cétrimide

25 colonies caractéristiques ont été reprises de manière aléatoire et purifiées par repiquage successif sur gélose nutritive puis inoculées en bouillon nutritif pour conservation.

Les vingt cinq colonies purifiées ont fait l'objet d'un test de confirmation sur gélose nutritive et d'un test de mise en évidence des pigmentations spécifiques aux espèces du genre *Pseudomonas* sur gélose King A et King B. Après la période d'incubation les milieux de culture sont observés sous lampe ultraviolette (UV), les résultats obtenus sont représentés sur la photographie 07.



Photographie 07 : Résultats d'isolement sur milieu King A et King B

Toutes les colonies ont donné une réaction positive avec le King B, elles produisent donc seulement de la pyoverdine. Une seule colonie a donné un résultat positif sur King A et King B (fluorescence observée sous une lampe ultraviolette), elles produisent donc la pyoverdine ainsi que la pyocyanine. De plus, une odeur de la fleur de seringa (jasmin) s'est exhalée des cultures.

La sécrétion de ces deux pigments est caractéristique des bactéries du genre : *Pseudomonas*. Ces observations ont fortement orienté le diagnostic et l'identification vers l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ; seule capable de produire ces deux pigments, les autres *Pseudomonas* synthétisent seulement la pyoverdine (**Dworkinet *et al.*, 2006** ; **Joffin et Leyral, 2005**).

Une coloration de Gram a été pratiquée sur quelques colonies, l'observation des frottis colorés au microscope optique à l'objectif à l'immersion (G x 100) ont révélé de petits bâtonnets de coloration rose, ils appartiennent donc à la classe des Gram négatif



Photographie 08 : Résultats de la coloration de gram

I.2. Identification biochimique

I.2.1. Test Oxydase

Pour le test oxydase un résultat positif est obtenu par la formation d'une tache violette sur le disque (**Joffin et Leyral, 2006**). Des bacilles à Gram négatif, possédant une enzyme en général (le cytochrome oxydase)

I.3. Identification biochimiques sur galerie API 20 NE

En utilisant le tableau de lecture (Annexe 05) et le logiciel d'identification (Annexe 06) des galeries API20NE, on a pu identifier trois espèces bactériennes différentes dont les caractéristiques biochimiques sont représentées sur le **Tableau IV**.

Grace aux tests biochimiques, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries analysées. Plusieurs résultats ont été obtenus, ce qui nous renseigne sur la voie d'attaque des glucides, la présence d'enzymes respiratoires, les voies fermentatives et le métabolisme des acides aminés.

Tableau IV : Résultats des tests biochimiques des différentes espèces isolées.

	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAG	OX
1	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
2	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
3	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+

I.3.1. L'espèce *Pseudomonas 1*

Pour l'identification biochimique de l'espèce *Pseudomonas 1* sur galerie API 20 NE, on a noté, qu'elle ne produit pas d'indole. Elle oxyde le Glucose, le mannitol, le N-acétylglucosamine, le gluconate, le caprate, l'adipate, le malate. Les tests d'assimilation montrent qu'elle n'assimile pas l'arabinose, le mannose, le maltose et le phenylacétate. La présence d'une coloration rouge après l'addition du réactif nitrite 1 et nitrite 2 signifie que la souche possède une nitrate réductase très active. Une réponse positive est obtenue pour les tests de l'arginine dihydrolase, et l'hydrolyse de la gélatine. Par contre, une réaction négative est obtenue pour le test de l'esculinase, l'uréase et la β - galactosidase. Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche comme étant *Pseudomonas fluorescens*.

La souche est selon le résultat du King A et King B une *Pseudomonas fluorescens* pyocyanine - pyoverdine +.



Photographie 09 : Résultats de l'identification sur galerie API 20 NE de *Pseudomonas fluorescens*

I.3.2. l'espèce *Pseudomonas 2*

Pour l'identification biochimique de l'espèce *Pseudomonas 2* sur galerie API 20 NE,

on a noté, qu'elle ne produit pas d'indole. Elle oxyde le Glucose et aussi le malate et elle n'oxyde pas l'adipate. Une réponse positive est obtenue pour les tests de l'arginine dihydrolase, une réaction positive est obtenue pour le test de l'esculinase, l'uréase et la β - galactosidase. . Les tests d'assimilation montrent qu'elle assimile le glucose et le potassium gluconate, elle assimile l'acide ceprique, elle assimile aussi le malate elle n'assimile pas le mannitol, elle réduit le nitrate en nitrite grâce à une nitrate réductase Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche comme étant *Pseudomonas putida*.

La souche est selon le résultat du king B une pseudomonas puitda (production de pyoverdine). La pyoverdine jaunit le milieu.



Photographie 10 : Résultats de l'identification sur galerie API 20 NE de *Pseudomonas putida*

I.3.3. L'espèce *Pseudomonas 3*

Pour l'identification biochimique de l'espèce *Pseudomonas 3* sur galerie API 20 NE, on a noté, qu'elle ne produit pas d'indole. Elle oxyde le Glucose, le mannitol, le N-acétylglucosamine, le gluconate, le caprate, l'adipate, le malate et le citrate. Les tests d'assimilation montrent qu'elle n'assimile pas l'arabinose, le mannose, le maltose et le phenylacétate. La présence d'une coloration rouge après l'add ition du réactif nitrite 1 et nitrite 2 signifie que la souche possède une nitrate réductase très active. Une réponse positive est obtenue pour les tests de l'arginine dihydrolase, et l'hydrolyse de la gélatine. Par contre, une réaction négative est obtenue pour le test de l'esculinase, l'uréase et la β - galactosidase. Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche comme étant *Pseudomonas aeruginosa*.

La souche est selon le résultat du King A et King B une *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanine + pyoverdine +



Photographie 11 : Résultats de l'identification sur galerie API 20 NE de *Pseudomonas aeruginosa*

Globalement le profil bactériologique des isolats est marqué par une prédominance de *Pseudomonas fluorescens* 68% (17 souches) par rapport à 28% (07 souches) de *Pseudomonas putida* et 4% de *Pseudomonas aeruginosa*. (01 souche)

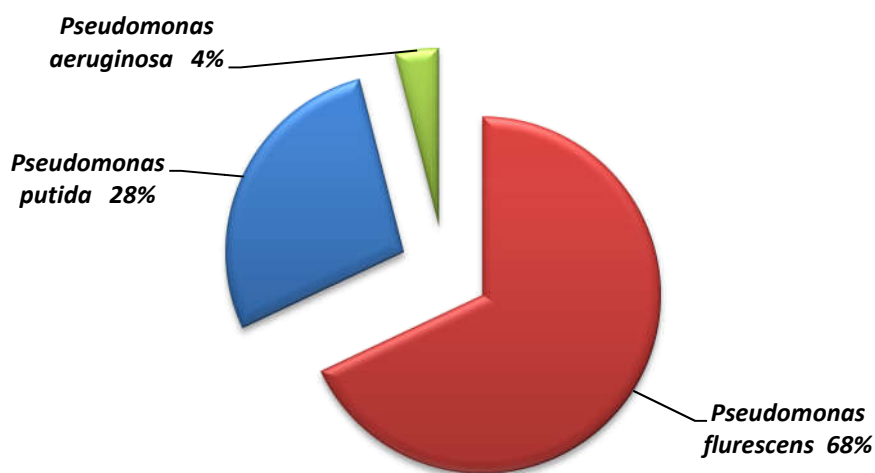


Figure 04 : Pourcentage d'espèces bactériennes identifiées

I.4. Antibiorésistance des espèces identifiées

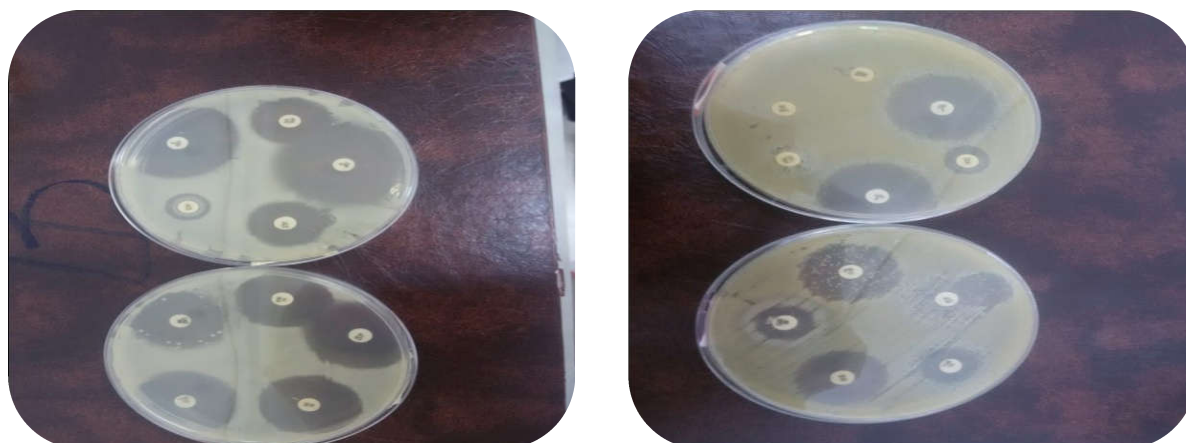
Le profil de résistance a été déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton (9 ml d'eau physiologique + une colonie pure de *pseudomonas*). 11 antibiotiques communément utilisés en thérapie humaine ont été retenus.

La photographie 15 montre les antibiogrammes obtenus, les valeurs des diamètres d'inhibitions sont comparées aux valeurs du tableau de lecture (**Annexe 05**).

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

Tableau V : Classes de résistance obtenues après lecture de l'antibiogramme

Suspension	Antibiotique	Ticarcilline (75 µg)	Ticarillie +acide Clavulanique(75/10µg)	Lévofoxacine(5 µg)	Colistine (10 µg)	Pipéracilline (100 µg)	Ciprofloxacine (5 µg)	Tobramycine (10µg)	Céftazidime (30 µg)	Impénème (10 µg)	Gentamicine (10 µg)	Amikacine (30 µg)
	Abréviation	TC	TIM	LEV	CT	PRL	CIP	TOB	CAZ	IPM	CN	AK
S1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S6	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
S7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S15	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
S16	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
S17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S18	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
S19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S21	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
S22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S24	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
S25	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S



Photographie 12 : Photographies des antibiogrammes de *Pseudomonas*

Les taux de résistance et de sensibilité pour chaque antibiotique sont calculés, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau

Tableau VI : Les taux de résistance et de sensibilité pour chaque antibiotique

Profil de résistance	Pourcentage de résistance des bactéries	Pourcentage de sensibilité des bactéries
TC	8%	92%
TIM	8%	92%
LEV	0%	100%
CT	12%	88%
PRL	8%	92%
CIP	8%	92%
TOB	4%	96%
CAZ	8%	92%
IPM	0%	100%
CN	12%	88%
AK	0%	100%

On observe que les taux de résistance varient nettement d'un antibiotique à l'autre, le taux de résistance le plus élevé est celui des Aminosides, principalement la résistance à la gentamycine et la colistine (12 %) suivit de celles des β lactamines, la ticarcilline, la ticarciline + l'acide clavulanique, piperacilline et céftazidim (8 %). Le même taux de résistance (8 %) pour la ciprofloxacine appartenant à la famille des Fluoroquinolones.

Le taux de résistance à l'Amikacine, l'Imipénème et la Lévofloxacine est nul.

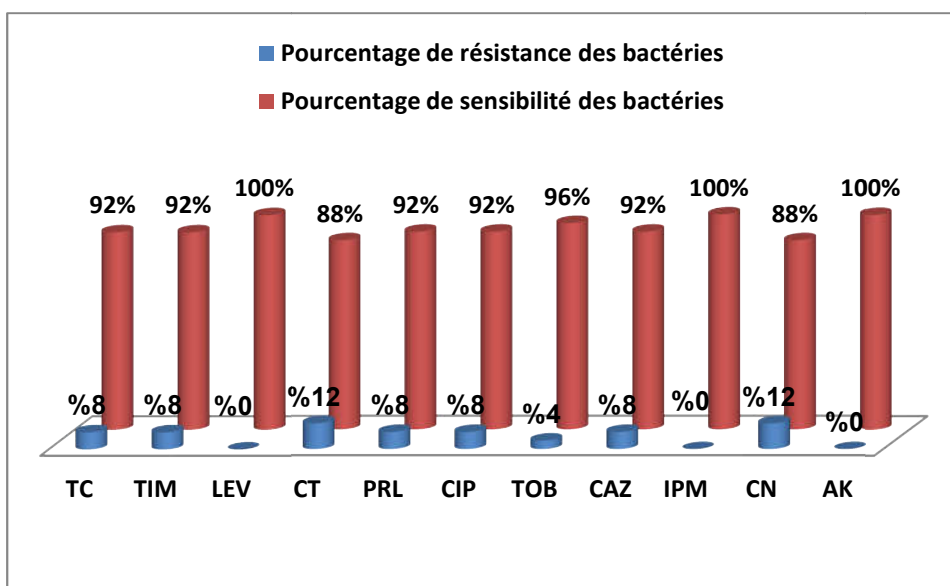



Figure 05 : Pourcentage d'isolats de genre *Pseudomonas* résistantes à divers antibiotiques.

CAZ : Ceftazidime; IMP : Imipenème ; PRL : Piperacilline ; CN : Gentamicine; TOB: Tobramycine; CIP : Ciprofloxacine; CT : Colistine

I. 5. Multirésistance de genre *Pseudomonas*

Notre travail a également permis d'étudier le phénomène de multirésistance. Une souche multirésistante est une souche qui présente une résistance à au moins deux antibiotiques. Nos résultats montrent un cas de multiresistance acquise à 4 antibiotiques principalement aux β lactamines et aux aminosides.

A decorative oval frame containing the text. The frame is composed of a light pink, textured brushstroke border. Inside the oval, there are several colorful butterflies in shades of red, purple, and blue. The background of the oval is filled with vibrant, swirling patterns in pink, purple, and blue, interspersed with small, colorful spheres and star-like shapes.

**Conclusion et
Perspectives**

Conclusion et perspectives

A travers cette étude, nous avons évalué le degré de contamination du lait de vache cru en germe psychrotrophes appartenant au genre *Pseudomonas*, ce lait est collecté à partir d'une ferme traditionnelle située aux alentours de la ville de Khenchela.

Nous avons mené cette étude microbiologique durant le mois de Mars en utilisant des Méthodes normalisées pour l'isolement, l'identification et le profil de résistance des microorganismes (psychrotrophe) aux antibiotiques.

Globalement le profil bactériologique des isolats est marqué par une prédominance de *Pseudomonas fluorescens* suivit de *Pseudomonas putida* et finalement de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, *Pseudomonas fluorescens* est l'une des plus importantes bactéries psychrotrophes responsables des saveurs désagréables des produits laitiers en raison de sa métalloprotéase caséinolytique extracellulaire résistantes à la chaleur.

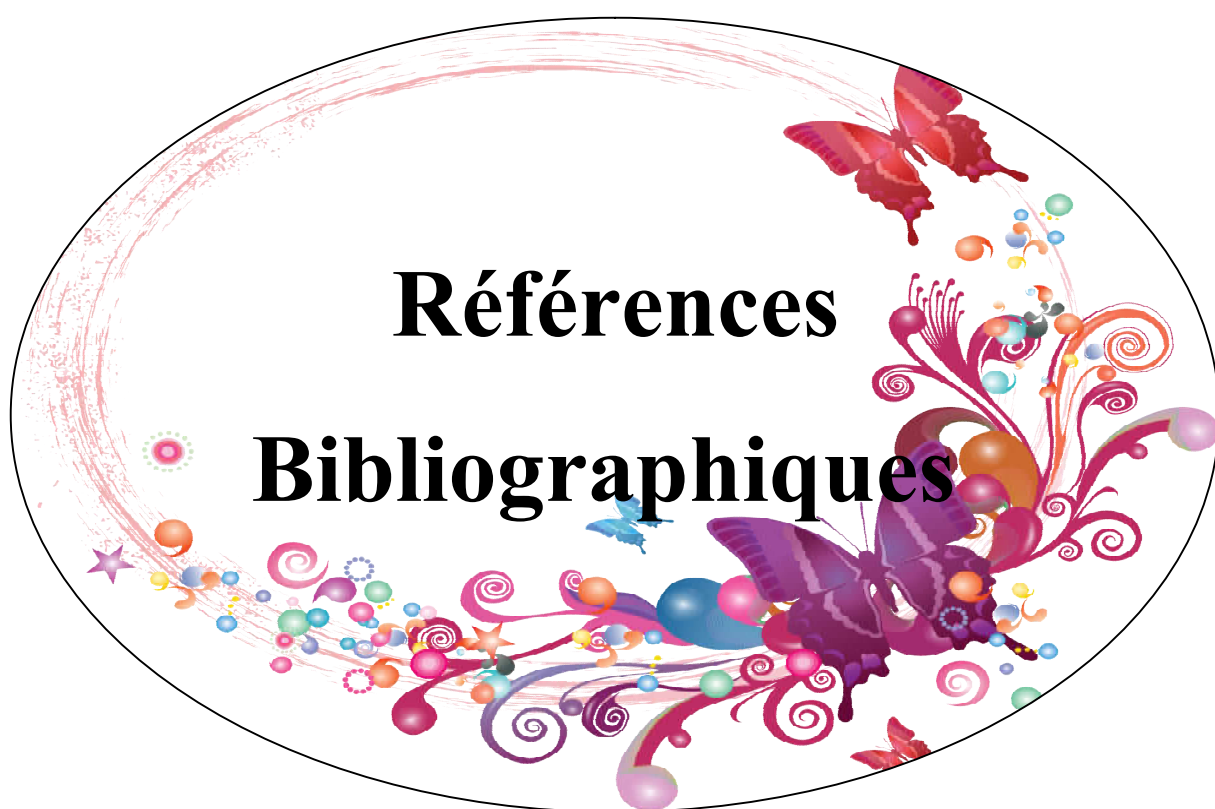
Les résultats de l'antibiogramme montrent que le taux de résistance le plus élevé est celui des Aminosides, principalement la résistance à la gentamycine et la colistine suivit de celles des β lactamines et des Fluoroquinolones. Le taux de résistance à l'Amikacine, l'Imipénème et la Lévofoxacine est nul.

Sur le plan technologique, ces laits sont considérés comme fortement pollués et risquent de compromettre le bon déroulement des opérations surtout en transformation fromagère

La portée de ces résultats, qui corroborent en grande partie ceux d'autres études doit toutefois être complété par d'autres échantillonnages prospectant le même site et d'autres sites judicieusement choisis. Ainsi dans nos perspectives d'avenir il nous semble intéressant de compléter utilement cette approche par :

- La réalisation de nouveaux prélèvements complémentaires sur ce site et d'autres sites pour valider nos premiers résultats.

- Etudier une population plus importante, pendant une période plus longue;
- Recherche des gènes de résistance par séquençage.



Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- 1) **Agabriel, C., Coulon, J.B., Brunshwig, G., Sibra, C. et Nafidi, C. (1995).** Relations entre la qualité du lait livré et les caractéristiques des exploitations. INRA Prod. Anim., 8 (4). pp : 251-258.
- 2) **Alais C. (1975).** Sciences du lait. Principes des techniques laitières. 37^{ème} éditions, Paris. Appontais, p 807
- 3) **Alais C. (1975).** Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Edition Sepaic, Paris.
- 4) **Alves de Oliveira L.,(2007).** Composition chimique du lait, [en ligne], Cours de l'Ecole 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 26/06/09).
- 5) **Ann Burns Fire Disasters. (2008).** Dec 31; 21(4): 210–218. Publication en ligne French. PMID: PMC3188199 Language: French | English **Le Pseudomonas: Experience du Centre des Brules D'Annaba et Revue de la Littérature**
- 6) **Anonyme. (2009) :** Traite des vaches laitières : Matériel, installation, entretien. 1 réédition. France Agricole, institut de l'élevage : 554p.e
- 7) **Baira, S., Cheraa, K., (2013).** Analyse microbiologique, physicochimique et organoleptique d'un produit laitier fermenté : l'exemple du Lben. Mémoire d'ingénieur d'état en nutrition, Alimentation et Technologie Agroalimentaire, Université Mentouri, I.N.A.T.A.A, Constantine.
- 8) **Benzakour, A., Berny, E-H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., Labioui, H., Ouhsine, 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.*
- 9) **Blanc, B. (1982).** Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. International dairy journal, 62. pp : 350-395.
- 10) **Bornert, G. (2000).** Revue Méd. Vét., 151, 11, 1003-1010 Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires
- 11) **Boutonnier, JL. (2008).** Matière grasse laitière Composition, organisation et propriétés. Dans Techniques de l'ingénieur, Traité Agroalimentaire (F 6320),paris
- 12) **Cayot P. et Lorient D. (1998).** Structures et Technofonctions des Protéines du Lait. Edition Tec et Doc Lavoisier Paris.
- 13) **Chilliaro, Y et Lamberet, G. (1984),** 64, 544-578 La lipolyse dans le lait: les différents types, mécanismes, facteurs de variation, signification pratique .

- 14) **CIPCLait. (2011).** Commission Interprofessionnelle des Pratiques Contractuelles (2011). Avis relatif à la définition et aux méthodes d'analyse de l'acidité du lait -02.
- 15) **Cuq, J.L. (2007).** Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du Languedoc. Université de Montpellier. pp: 20-25
- 16) **Debry G., (2001) ;** lait, nutrition et santé. Ed : Technique et documentation, Lavoisier. Paris : 566p.
- 17) **Deforges J., Derens E., Rosset R. et Serrand M. (1999).** Maitrise de la chaine du froid des produits laitiers réfrigérés. Edition Cemagref Tec et Doc, Paris
- 18) **Dictionnaire: Larousse, (2005).** 100^e Edition, Paris, 1927p.
- 19) **Druesne, A. 1996.** Le stress bactérien ; conséquences sur l'efficacité des traitements thermiques. 2^{ème} partie : le stress bactérien. Bull. Liaison CTSCCV, 6 , 2, 71-81.
- 20) **Dupin, H. (1973).** Alimentation et nutrition humaine, presse universitaire de France. Paris Fournier, S, Le producteur de lait québécois, février 2002, P 39
- 21) **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.
- 22) **FAO. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO Alimentation et nutrition n°28
- 23) **Gounot, A.-M. (1991).** Bacterial life at low temperature ; physiological aspects and biotechnological implications. J. Applied Bacteriol., 71, 386-397.
- 24) **Goursaud, J. (1985).** Composition et propriétés physico-chimiques. Dans Laits et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laitière. Luquet F.M.. Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris
- 25) **Goy, D., Häni, JP. , Wechsler, D. et Jakob, E. (2005).** Valeur de la teneur en caséine du lait de fromagerie. Edition, Agroscope Liebfeld-Posieux. Groupe de discussions Gruyère N°27
- 26) **Gripon JC., Desmazeaud MJ., Le Bars D. et Bergère JL. (1975).** Étude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. Influence de la présure commerciale. Le Lait 55.pp: 502-516.
- 27) **Guiraud, J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. pp : 136-139
- 28) **Hermier, J. (1992).** Les groupes microbiens d'intérêt laitier.Coordonné par. Lenoir & F. Weber. Edition CEPIL, Paris.
- 29) **JEROME J. P. et JAMES T. S. et STEPHEN L. (2004).** Microbiologie. Ed. Dunod. Paris. P 479.

- 30) **Joffin J. N. et Leyrol G. (2006).** Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. 4^{ème} édition. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. ISBN : 2-86617-515-8. 363 p.
- 31) **Kim, H., Hardy J., Novak G., Ramet J.P. et Weber W. (1982).** Les goûts anormaux du lait frais et reconstitué. Collection FAO Alimentation et nutrition n°35.
- 32) **Lavoie, K. (2011).** Caractérisation microbiologique des laits du terroir québécois servant à la production de fromages de spécialité Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Maître es science (M. Se.).
- 33) **Leclerc, H. et MOssel, D.A.A. (1989).** Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments, 529 pages, Doin Editeur, Paris,
- 34) **Leriche F., Fayolle K.,(2012).** J. Dairy Science, Analyse de l'évolution de la contamination par *Pseudomonas spp* de laits de chèvre collecté, 95 (5), 2299-2306.
- 35) **Leyral, G. et Vierling, É. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4^e édition Biosciences et techniques. 87p
- 36) **Lilet, C., Bourdon, J ., Toma, B, Marchal ,N et Balbastre ,C. (1983)** ; Bactériologie médicale et vétérinaire- systématique bactérienne ; Edition DOIN. PP 150-190.
- 37) **Luquet, F. M. (1985).** Laits et produits laitiers - Vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits De la mamelle à la laiterie. Tech. & Doc., Coll. STAA, Lavoisier, Paris.
- 38) **Madji, A. (2009).** Séminaire sur les fromages AOP ET IGP.INAT. Tunisie
- 39) **Mankai M., Mnasser H. et Boudabous A. (2003).** Influence de la durée de réfrigération sur la microflore psychrotrophe, la protéolyse et la composition chimique et minérale du lait cru de collecte tunisien. Editions de Courcelles vol. 120, no12. pp :12-17.
- 40) **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.
- 41) **Marchin, S. (2007).** Dynamique de la micelle de caséines : caractérisation structurale. Thèse INRA/ Agrocampus Rennes
- 42) **Mathieu, J. (1998).** Initiation à la physicochimie du lait. Guides Technologiques des IAA. Edition Lavoisier Tec et Doc, Paris
- 43) **Miranda, G et Gripon, J-C. (1986).** Origine,nature et Incidences technologiques de la protéolyse dans le lait ,66,1-1
- 44) **Morrissay, PA. (1995).** Lactose : chemical and physicochemical properties. dans : Developments in dairy chemistry 3. (FOX PF). Elsevier, London
- 45) **Natsch, A., Keel, C., Pfirter, H.A., Haas, D. and Défago, G., (1994).** Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO introduced into soil microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2553-2560.

- 46) **Palleroni, N. J. (1984).** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1984, 237AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 141–199. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- 47) **Palleroni, N. J. (2005).** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237AL (Nom. Cons., Opin. 5 of the Jud. Comm. 1952, 121). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 323– 379. Edited by G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg & J. T. Staley. New York: Springer. Peix, A., Rivas, R., Mateo.
- 48) **Pougheon, S. (2001).** Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse doctorat d'état en médecine vétérinaire, université Paul Sabatier de Toulouse, France.
- 49) **Prescott L. M.; Harley J. P.; Klein D. A., (2003).** *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp: 1164.
- 50) **Rahal B. (2001).** Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en milieu vétérinaire. Dans *Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques*. Projet de l'OMS, 3ème rapport d'évaluation. pp: 68-91
- 51) **Ramet, J.P. (1985).** La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Collection FAO Alimentation et nutrition n°48.
- 52) **Rejsek F., (2002).** Analyse des eaux : Aspects réglementaires et techniques. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine (CRDP). Bordeaux. 358 p.
- 53) **Richard J. (1983).** Nature de la flore microbienne dominante et sous-dominante des laits crus très pollués. *Le lait* n°63, pp: 148-170.
- 54) **Rnam, A.H. et Sutherland, P. (2001).** *Milk and Milk Products: Technology, Chemistry, and Microbiology*. Volume 1 Food products series. An Aspen Publication. New York. pp: 35- 37.
- 55) **Robinson, R.K. (2002).** **Dairy microbiology handbook. The microbiology of milk and milk products.** Third edition. Edition John Wiley and sons, INC. New York. 780p
- 56) **Roudaut, H. et Lefrancq, E. (2005).** *Alimentation théorique*. Edition Sciences des Aliments. Thème : Gestion des écosystèmes microbiens des laits et des fromages Page 6/6
- 57) **Salton, M.J.R., Kim, K.S.;1996;** *Structure*. Baron's Med.Microbiol.(Baron S et al, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.
- 58) **Stoll W. (2003).** Vaches laitières: l'alimentation influence la composition du lait. *RAP Agri*. N° 15/2003, vol. 9, Suisse.
- 59) **Sutra L., Federighi M. et Jouve J.L. (1998).** *Manuel de bactériologie alimentaire*. Edition Polytechnica. 9p.

- 60) **Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition du renouveau pédagogique. Canada. 945p.
- 61) **Triki M. (2011).** Recherche et identification des souches psychrotrophes Durant toute la chaine de fabrication du fromage type Camembert dans la laiterie Safilait. Mémoire d'ingénieur d'état en nutrition et technologies agro alimentaire. Université de Constantine. 32p.
- 62) **Veisseyre R. (1979).** Technologie du lait constitution, récolte, traitement et transformation du lait. 3ème édition. Edition la maison rustique, Paris.
- 63) **Vignola, C. (2002).** Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp. 3-75.
- 64) **Weber F. (1985).** Réfrigération du lait à la ferme et organisation des transports. Collection FAO Alimentation et nutrition n°47.
- 65) **Weber, F. (1985).** **Food and Agriculture Organization of the United Nations** Réfrigération du lait à la ferme et organisation des transports
- 66) www.biomériaux.com

Annexes



Annexe 01 : Composition des colorants de gram**Cristal violet ou violet de gentiane (pour coloration de Gram)**• **Solution mère A**

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

La solution est vigoureusement agitée à trois reprises dans la même journée. On laisse déposer. La Solution est prête à l'emploi dès le lendemain.

Conservation : Quelques années en flacon brun Hermétiquement bouché.

• **Solution mère B**

Oxalate d'Ammonium (NH₄)₂C₂O₄.H₂O.....5 g
 Eau Distillée..... 500 ml

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

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 fondu50 ml
 Eau distillée..... 950 ml

conservation : Quelques mois dans un flacon hermétiquement bouché.

Fuchsine (solution de travail)

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

Conservation : Au moins 2 ans.

Fuchsine diluée (pour coloration de Gram)

Fuchsine Phéniquée 01 ml
 Eau Distillée..... 09 ml

Conservation : 1 mois tout au plus, et Faire la dilution avant chaque coloration.

Lugol faible (pour coloration de Gram)

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.

S'il est jaune, il ne fonctionnera plus et doit être jeté.

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, CH₃—CH₂OH

Annexe 02 : Composition des milieux de culture.**Gélose Au Cétrimide**

La gélose au cétrimide (CEtylTRImethylammonium broMIDE) est utilisée pour l'isolement et l'identification présomptive de *Pseudomonas aeruginosa*. Le cétrimide est un ammonium quaternaire qui inhibe la croissance de la plupart des autres espèces bactériennes. *Pseudomonas aeruginosa* colore ce milieu en bleu-vert par production de pyocyanine. Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone	20,00
Chlorure de magnésium	1,40
Sulfate dipotassique	10,00
Cétrimide	0,30
Glycérol	10 ml
Agar	13,60

pH final à 25°C : 7,2 ± 0,2

Le milieu en tubes ou flacons se conserve entre 15 et 25°C, et entre 2 et 8°C pour les boîtes

Gélose King A

La gélose King A est utilisée pour la caractérisation des *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de pyocyanine. Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone	20,00
Sulfate de potassium	10,00
Chlorure de magnésium	1,40
Agar	15,00

pH final à 25°C : 7,2 ± 0,2

Le milieu en tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration.

Gélose King B

est utilisée pour la caractérisation des *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de fluorescéine (pyoverdine).

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

Peptone de viande	10,00
Peptone de caséine	10,00
Phosphate dipotassique	1,50
Sulfate de magnésium	1,50
Agar	15,00

pH final à 25°C : 7,2 ± 0,

Le milieu en tubes se conserve entre 15 et 25° jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Gélose Nutritive

La Gélose Nutritive est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée. pH final à 25°C : $6,8 \pm 0,2$

Peptone	5.00
Extrait de viande de boeuf	3.00
Agar	1,5

Le milieu en flacons et tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. Le milieu en boîtes se conserve entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

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 bœuf	30,00 g
Peptone de caséine	17,50 g
Amidon	1,50 g
Agar	17,00 g

Ph final à 25°C : 7,3 et 0,2

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

Bouillon Nutritif

Le Bouillon Nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants. Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

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

Peptone	5,00	pH final à 25°C : $6,8 \pm 0,2$
Extrait de viande de bœuf.....	3,00	

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

Annexe 03 : Tableau de lecture de la galerie API 20 NE

Tests	Composants actifs	Réactions/enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
NO ₃	Potassium nitrate	Réduction des nitrates en nitrites	NIT ₁ +NIT ₂ /5min	
			Incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en azote	Zn/5min	
			Rose	incolore
TRP	L-tryptophane	Formation d'indole (TRyptOPhane)	James/immédiat	
			Incolore vert pale/jaune	Rose
GLU	D-glucose	Fermentation (GLUCose)	Bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune	orange/rose/ rouge
URE	Urée	UREase	Jaune	orange/rose/ rouge
ESC	Esculine citrate de fer	Hydrolyse (β-glucosidase)	Jaune	Gris/marron/ noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPC	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	Assimilation (GLUCose)	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	Assimilation (ARABinose)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	Assimilation (ManNosE)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	Assimilation (MANitol)	Transparence	Trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	Assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	Assimilation (MALtose)	Transparence	Trouble
GNT	Potassium gluconate	Assimilation (potassium GlucoNaTe)	Transparence	Trouble
CAP	Acide caprique	Assimilation (acide CAPrique)	Transparence	Trouble
ADI	Acide adipique	Assimilation (acide ADIrique)	Transparence	Trouble
MLT	Acide malique	Assimilation (MaLaTe)	Transparence	Trouble
CIT	Trisodium citrate	Assimilation (trisodium CITrate)	Transparence	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	Assimilation (acidePhényLACétique)	Transparence	Trouble

Annexe 04 : Interface du logiciel d'identification API Excel.

profil2_8		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>																0,991	0,67	0	Excellente Id	TB typicité						
2	<i>Burkholderia pseudomallei</i>																0,009	0,26	0	mauvaise identifi	Bonne typicité						
3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>																0,000	0,09	0	mauvaise identifi	mauvaise typicité						
4	<i>Chromobacterium violaceum</i>																0,000	-0,25	2	mauvaise identifi	mauvaise typicité						
5	<i>Burkholderia cepacia</i>																0,000	-0,19	0	mauvaise identifi	mauvaise typicité						
API 20 NE 7.0 (02/20)		NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARAa	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	AD1a	MLTa	CITa	PACa	OX	classement	P (taxon/ profil)	P (taxon/ profil)	P (plus typique)	
profil		+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+			
<i>chromobacter (Alcaligenes)</i>		84	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100	23	####	0,0%	####	
<i>chromobacter (Alcaligenes)</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100	15	####	0,0%	####	
<i>chromobacter baumannii cal</i>		2	0	0	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0	30	####	0,0%	####	
<i>chromobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0	37	####	0,0%	####	
<i>chromobacter jussii johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	0	99	4	95	70	0	0	41	####	0,0%	####	
<i>chromobacter lwoffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	0	70	20	46	1	36	0	48	####	0,0%	####	
<i>chromobacter radioresistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	0	97	100	2	2	97	0	53	####	0,0%	####	
<i>pseudomonas hydrophila: cav</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99	9	####	0,0%	####	
Introduction / base new / API 20 E+ V4.1 / API 10E / API 10 S v3.1 / RapID 20E v3 / Id32E / API20 NE v7.0 / API 20 Strepto v7 / rapid ID32 strept v3.0 / API 20 Staph v		Nb (non vides) : 21																									

Annexe 05 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotiques testés	Charge de disque	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
<u>B-Lactamines</u>						
Ticarcline	75µg	≤14	-	≥15	≥128	≤64
Ticarcline + Ac. Clavulanque	75/10µg	≤14	-	≥15	≥128/2	≤64/2
Piperacilline	100µg	≤17	-	≥18	≥128	≤64
Ceftazidime	30µg	≤14	15 – 17	≥18	≥32	≤8
Aztreonam	10µg	≤15	16 – 21	≥22	≥32	≤8
Imipenem	10µg	≤13	14 - 15	≥16	≥16	≤4
<u>Aminosides</u>						
Amikacine	30µg	≤14	15 – 16	≥17	≥32	≤16
Gentamicine	10µg	≤12	13 – 14	≥15	≥8	≤4
Tobramycine	10µg	≤12	13 - 14	≥15	≥8	≤4
<u>Quinolones</u>						
Ciprofloxacine	5µg	≤15	16 – 20	≥21	≥4	≤1
<u>Tétracyclines</u>						
Tétracycline	30µg	≤14	15 – 18	≥19	≥16	≤4
<u>Autres</u>						
Chloramphénicol	30µg	≤12	13 – 17	≥18	≥32	≤8
Rifampicine	30µg	≤14	14 – 18	≥19	≥16	≤4
Fosfomycine	30µg	<14	-	>14	≥32	≤32
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	1.25/23.7 5µg	≤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 5^{eme} édition 2008

Annexes 06 : Matériel et réactifs utilisés

Matériel et appareillages

Pipettes graduées stériles de 1 ml

- Bec bunsen
- Portoir pour tubes à essai
- Pipettes Pasteur stériles.
- Bain marie
- Boîtes de pétri
- Marqueur
- Des lames
- Applicateur de disque
- Pied à coulisse
- Anse de platine
- Etuve électrique
- Microscope optique
- Chambre noire à Lampe ultraviolet

Milieux de culture

- Eau distillée stérile en tubes
- Gélose Au Cétrimide
- Gélose Mueller Hinton
- King A
- King B
- Disques d'antibiotiques
- Galeries API 20 NE

Résumés



Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Pseudomonas* isolés du lait de vache cru

Résumé

Le lait cru de vache est un aliment consommé sans aucun traitement dans la plupart des pays africains. En vue d'apprécier les risques microbiologiques liés à la consommation de cet aliment, nous avons mené une étude sur la flore d'altération psychrophile du genre *Pseudomonas* du lait de vache cru. Le site choisit pour cette étude est une petite ferme traditionnelle de la wilaya de Khenchela.

Nous avons mené cette étude microbiologique durant le mois de Mars en utilisant des Méthodes normalisées pour l'isolement, l'identification et le profil de résistance des microorganismes (psychrotrophe) aux antibiotiques.

Globalement le profil bactériologique des isolats est marqué par une prédominance de *Pseudomonas fluorescens* **68%** (17 souches) par rapport à **28%** (07 souches) de *Pseudomonas putida* et **4%** de *Pseudomonas aeruginosa*. (01 souche)

Ces résultats témoignent d'une négligence des bonnes pratiques de production au niveau de la traite, de la collecte et du transport du lait cru.

Les résultats de l'antibiogramme montrent que le taux de résistance le plus élevé est celui des Aminosides, principalement la résistance à la gentamycine et la colistine (**12 %**) suivit de celles des β lactamines, la ticarcilline, la ticarciline + l'acide clavulanique, piperacilline et céftazidim (**8 %**). Le même taux de résistance (**8 %**) pour la ciprofloxacine appartenant à la famille des Fluoroquinolones. Le taux de résistance à l'Amikacine, l'Impénème et la Lévofloxacine est nul.

Mots clés : Lait cru, analyse microbiologique, psychrotrophe, Altération, *Pseudomonas*, multirésistantes

Occurrence and antimicrobial resistance profile of *Pseudomonas* isolated from raw cow's milk

Abstract

Raw cow milk is a food consumed without any treatment in most African countries. In order to assess the microbiological risks associated with the consumption of this food, we carried out a study on the *Pseudomonas* flora of *Pseudomonas* of raw cow's milk. The site chosen for this study is a small traditional farm of the wilaya of Khenchela.

We conducted this microbiological study during the month of March using standardized methods for the isolation, identification and resistance profile of microorganisms (psychrotrophe) to antibiotics.

Overall, the bacteriological profile of the isolates is marked by a predominance of 68% *Pseudomonas fluorescens* (17 strains) compared to 28% (07 strains) of *Pseudomonas putida* and 4% of *Pseudomonas aeruginosa*. (01 strain)

These results show neglect of good production practices in the trafficking, collection and transport of raw milk.

The results of the antibiogram show that the highest resistance is that of Aminocyclitol, mainly resistance to gentamycin and colistin (12%) followed by those of β lactams, ticarcillin, ticarcilone + clavulanic acid, Piperacillin and ceftazidim (8%). The same resistance rate (8%) for ciprofloxacin belonging to the family Fluoroquinolones. The resistance rate to Amikacin, Imipenem and Levofloxacin is zero.

Key words: Raw milk, microbiological analysis, psychrotrophe, Alteration, *Pseudomonas*, multirésistant

اظهار المقاومة للمضادات الحيوية من طرف البكتيريا بسودوموناس المعزولة من حليب البقر الخام

ملخص

الحليب الخام هو الغذاء المستهلك من دون أي علاج في معظم البلدان الأفريقية. من أجل تقييم المخاطر الميكروبيولوجية المرتبطة باستهلاك هذه المادة الغذائية، أجرينا دراسة على ميكروبات محبة للبرودة متلفة لحليب البقر الخام و الموقع الذي تم اختياره لهذه الدراسة هو المزارع التقليدية الصغيرة في محافظة خنشلة.

أجرينا هذه الدراسة الميكروبيولوجية خلال شهر مارس باستخدام أساليب موحدة لعزل وتحديد ومقاومة الميكروبات المتلفة للحليب (المحبة للبرودة) للمضادات الحيوية.

توضح البيانات البكتريولوجية العامة لهذه البكتيريا الغالبة للبيكتيريا الزائفة المتألقة 68% (17 سلالات) مقارنة ب 28% (07 سلالات) من الزائفة الكريهة والزائفة الزنجارية 4%. (01 سلالة). وتعكس هذه النتائج إهمال الإنتاج للتقنيات في حلب، وجمع ونقل الحليب الخام

أظهرت نتائج استعمال المضادات الحيوية أن أعلى معدل للمقاومة هو ضد أمينوغليكوزيدات، وكذلك أساسا لمقاومة الجنتاميسين وكوليسيتين (12%) يليهم من اكتام بيتا، تيكارسيلين، clavulanic ticarciline حمض + ، بيبيراسيلين والسيفنازيديم (8%). نفس المعدل للمقاومة (8%) للسيبروفلوكساسين ينتمون إلى عائلة الفلوروكينولونات. معدل المقاومة لأميكاسين، الإيميبينيم والليفوفلوكساسين هو صفر.

كلمات المفتاحية : الحليب الخام، التحليل الميكروبيولوجي، المحبة للبرودة، التعديلات، الزائفة، متعددة المقاومة للمضادات الحيوية

Nom : HOUHA Prénom : Manel

Date de soutenance : 29/06/2017

MASTER
FILIERE : sciences biologiques
OPTION: Microbiologie générale

Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Pseudomonas* isolés du lait de vache cru

Résumé

Le lait cru de vache est un aliment consommé sans aucun traitement dans la plupart des pays africains. En vue d'apprécier les risques microbiologiques liés à la consommation de cet aliment, nous avons mené une étude sur la flore d'altération psychrophile du genre *Pseudomonas* du lait de vache cru. Le site choisit pour cette étude est une petite ferme traditionnelle de la wilaya de Khenchela.

Nous avons mené cette étude microbiologique durant le mois de Mars en utilisant des Méthodes normalisées pour l'isolement, l'identification et le profil de résistance des microorganismes (psychrotrophe) aux antibiotiques.

Globalement le profil bactériologique des isolats est marqué par une prédominance de *Pseudomonas fluorescens* **68%** (17 souches) par rapport à **28%** (07 souches) de *Pseudomonas putida* et **4%** de *Pseudomonas aeruginosa*. (01 souche)

Ces résultats témoignent d'une négligence des bonnes pratiques de production au niveau de la traite, de la collecte et du transport du lait cru.

Les résultats de l'antibiogramme montrent que le taux de résistance le plus élevé est celui des Aminosides, principalement la résistance à la gentamycine et la colistine (**12 %**) suivit de celles des β lactamines, la ticarcilline, la ticarcilline + l'acide clavulanique, piperacilline et céftazidim (**8 %**). Le même taux de résistance (**8 %**) pour la ciprofloxacine appartenant à la famille des Fluoroquinolones. Le taux de résistance à l'Amikacine, l'Imipénème et la Lévofloxacine est nul.

Mots clés : Lait cru, analyse microbiologique, psychrotrophe, Altération, *Pseudomonas*, multirésistantes

Devant le jury

Président : Mr ABAIDIA A. (M.A.A)

Université Abbès Laghrour – Khenchela

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

Université Abbès Laghrour – Khenchela

Examineur : Mr BOUSSAA A. (M.A.A)

Université Abbès Laghrour – Khenchela