

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BELADJAL HICHEM

DERKAOUI HAYET

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

**Spécialité : MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET
APPLIQUÉE**

THÈME

**PHYSICOCHIMIE ET MICROBIOTE DU LAIT CRU
DE VACHE DANS LA RÉGION DE L'OUEST
ALGÉRIEN**

Soutenu publiquement le **08/06/2016**

DEVANT LE JURY

Président	M. MEKHALDI A.	Professeur UMAB
Encadreur	M. MEDJAHED M.	MAA UMAB
Examineur	M. DJIBAOUI R.	MCA UMAB

Travail réalisé au Laboratoire de Microbiologie de la FSNV.

Dédicace

Nous dédions ce mémoire, fruits de nos efforts

*A nos chers parents pour leur patience, leur amour, leur soutien
et leur encouragement*

A nos sœurs et frères

*A nos proches amis et nos collègues de la promotion 2016 du
Master « Microbiologie Fondamentale et Appliquée »
spécialement*

A tous nos enseignants

*A toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la
réalisation de ce travail*

Merci

Remerciements

Au terme de notre formation en Microbiologie Fondamentale et Appliquée couronnée par ce modeste mémoire de fin d'études, nous tenons tout d'abord à rendre grâce à Allah le tout puissant de nous avoir donné une lumière de science qui nous a éclairés dans nos enseignements et travaux.

Nos remerciements vont par la suite à nos chers parents, qui nous ont élevés, éduqués, aidés, soutenus orientés, bien conseillés et transmis la volonté de réussir.

Nous tenons aussi à remercier tous les enseignants qui ont contribué à la construction du savoir qui nous a permis de produire ce document, synthèse de notre fin d'études.

Nos remerciements les plus sincères vont à M. MEKHALDI A., Professeur à l'Université Abd el Hamid Ibn Badis de Mostaganem, pour l'honneur qu'il nous fait de présider le jury d'examen et d'animer la discussion de notre mémoire de fin d'études.

M. DJIBAOUI R., Maître de Conférences à l'Université Abd el Hamid Ibn Badis de Mostaganem, nous fait l'honneur de faire partie du jury d'examen de notre travail et accepte d'enrichir le débat à son sujet, qu'il trouve ici, l'expression de nos remerciements les plus sincères.

M. MEDJAHED M., Maître-Assistant à l'Université Abd el Hamid Ibn Badis de Mostaganem, et Chef du Département de Biologie, nous a donné l'occasion de travailler sur un sujet qui nous a toujours intéressé, sa confiance, ses conseils, ses orientations sont pour beaucoup dans ce travail.

Nous tenons vivement à remercier Melle. Bennama R, Maître de Conférences à l'Université Abd el Hamid Ibn Badis de Mostaganem, de nous avoir mis sur le bon chemin de la Microbiologie, ses enseignements, ses conseils, son aide, son soutien sans relâche et son implication matérielle dans la réalisation de ce travail nous marque pour toujours.

Nous tenons à remercier nos amies et collègues Imène, Nawel et Hayet... La liste risque d'être longue, mais sans être exhaustive, nous tenons à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réussite de notre travail.

Résumé

Le lait cru de vache est un aliment de large consommation en Algérie, et une matière première essentielle pour la fabrication de certains fromages, notamment les fromages à pâte molle du type Camembert. Dans l'ouest algérien, presque 150000 litres servent à produire ce type de fromage quotidiennement. En vue d'étudier la composition du microbiote naturel du lait cru, ainsi que ses paramètres physicochimiques (acidité et pH), suivant la législation nationale en application, trente-cinq (35) échantillons de lait cru ont été prélevés à trois niveaux du circuit laitier (éleveur, collecteur, réception) dans cinq wilayas de l'ouest algérien ; Mascara, Mostaganem, Oran, Relizane et Sidi Bel Abbes, durant la période de mars à mai 2016. L'analyse microbiologique a porté sur les germes indicateurs d'hygiène et d'altération (flore totale aérobie mésophile, coliformes totaux, coliformes fécaux et Streptocoques fécaux), les germes potentiellement pathogènes (*Staphylococcus aureus* et les *Clostridium* sulfito-réducteurs) et la flore technologique. Le lait cru présente une charge élevée en flore totale aérobie mésophile variant de $1,1 \times 10^6$ à $0,2 \times 10^8$ UFC/ml. Les coliformes étaient présents dans la plupart des échantillons, avec des seuils inacceptables dans certains. *Staphylococcus aureus* était présent dans 85,7% des prélèvements avec des valeurs variant de $3,16 \times 10^2$ à 2×10^3 UFC/ml ; les streptocoques fécaux sont détectés dans 68,58% des échantillons et une absence totale dans 31,42% des échantillons analysés. Seulement 5,71% des échantillons renferment des *clostridium*s sulfito-réducteurs. Une richesse en flore lactique atteignant les $1,46 \times 10^6$ UFC/ml a été enregistrée. Les différents tests d'identification des bactéries lactiques ont permis de relever une diversité microbienne représentée par six genres lactiques différents avec en ordre décroissant de présence les *Enterococcus* (27,69%), les *Lactobacillus* (21,54%) ; les *Streptococcus* (18,46%) ; les *Lactococcus* (18,46%) ; les *Leuconostoc* (12,31%) et les *Pediococcus* (1,54%).

Mots clé : Lait cru - Microbiote – Diversité - Physicochimie

Liste des abréviations

<p>°C : Degré Celsius</p> <p>°D : Degré Dornic</p> <p>µl : Microlitre</p> <p>AA : Acide aminée</p> <p>ADH : Arginine dihydrolase</p> <p>ADNr : L'acide désoxyribonucléique ribosomique</p> <p>ADP : Adénosine diphosphate</p> <p>ARN : L'acide ribonucléique</p> <p>ATP : Adénosine triphosphate</p> <p>a_w : Activité water</p> <p>CO₂ : Dioxyde de carbone</p> <p>FIL : fédération international du lait</p> <p>g/l : Gramme par litre</p> <p>h : Heure</p> <p>Kg : Kilo gramme</p> <p>Lb : <i>Lactobacillus</i></p> <p>Lc : <i>Lactococcus</i></p> <p>M17 : Terzaghi et Sandine</p> <p>m : Mètre</p> <p>m³/h : Mètre cube par heure</p> <p>MG : Matière grasse</p>	<p>ml : Millilitre</p> <p>mm : Millimètre</p> <p>MRS : De Mans, Rogosa et Sharpe</p> <p>MS : Matière sèche</p> <p>N : Normalité</p> <p>NAD⁺/ NADH, H⁺ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide</p> <p>nm : Nanomètre</p> <p>NPP : Nombre plus probable</p> <p>O₂ : L'oxygène</p> <p>Pi : Phosphate inorganique</p> <p>TP : Le taux protéique</p> <p>TSE : Tryptone Sel Eau</p> <p>UFC : Unité Formant Colonie</p> <p>UHT : Ultra Haute Température</p> <p>V : Volume</p>
---	--

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Evolution de la production du lait et des teneurs en matière grasse et protéines au cours de lactation.	9
Figure 2	Schéma d'attaque du bactériophage sur une cellule bactérienne.	12
Figure 3	Représentation schématique des principales voies de fermentation du glucose chez les bactéries lactiques	19
Figure 4	Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible taux G+C et les genres Gram positifs non reliés <i>Bifidobacterium</i> et	23
Figure 5	Zones d'échantillonnage	24
Figure 6	Les moyennes des résultats de pH des différents échantillons	31
Figure 7	Les moyennes des résultats d'acidité titrable des différents échantillons	32
Figure 8	La charge microbienne moyenne de la Flore totale aérobie mésophile	32
Figure 9	La charge microbienne moyenne des coliformes totaux	33
Figure 10	La charge microbienne moyenne des coliformes fécaux	33
Figure 11	La charge microbienne moyenne des Streptocoques fécaux	34

Figure 12	La charge microbienne moyenne des <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Figure 13	La charge microbienne moyenne de <i>Clostridium</i> sulfitoréducteurs	35
Figure 14	Estimation du nombre total (UFC) des colonies développées sur la gélose MRS et M17	38
Figure 15	Aspect macroscopique des bactéries lactique après purification sur gélose	38
Figure 16	Observation microscopique a l'état frais (Grossissement X40)	39
Figure 17	Aspect microscopique après coloration Gram (Grossissement X100)	39
Figure 18	Résultat du test de croissance dans milieu MRS à pH = 9.6	40
Figure 19	Résultat du test de croissance à 6.5% de NaCl	41
Figure 20	Résultat du test d'activité citratase	41
Figure 21	Résultat du test de production d'acétoïne.	41
Figure 22	Résultat du test de de croissance dans le lait de Sherman	42
Figure 23	Résultat du test d'hydrolyse d'arginine	42
Figure 24	Distribution des genres des isolats lactiques (%)	45

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau I	Les sources des odeurs absorbées du lait	6
Tableau II	Les origines des odeurs développées du lait	7
Tableau III	Composition moyenne du lait selon les espèces	8
Tableau IV	Les bactéries technologiques dans le lait	12
Tableau V	Les bactéries pathogènes dans le lait	13
Tableau VI	Les bactéries d'altération dans le lait	14
Tableau VII	Les sources de contamination du lait	15
Tableau VIII	Principales activités des bactéries lactiques dans les produits laitiers	20
Tableau IX	Taux de contamination moyens des échantillons de lait de mélange pour les cinq indicateurs bactériens (UFC/ml)	36
Tableau X	Taux de contamination moyens des échantillons de lait d'un collecteur pour les cinq indicateurs bactériens (UFC/ml)	37
Tableau XI	Taux de contamination moyens des échantillons de lait d'un seul éleveur pour les cinq indicateurs bactériens (UFC/ml)	37
Tableau XII	Résultats des tests d'identification réalisés sur les souches isolées	43
Tableau XIII	Taux moyens des bactéries lactiques présentes dans les échantillons	68
Tableau XIV	Résumer de l'observation macroscopique et microscopique des souches isolées	69
Tableau XV	Les résultats obtenus du pH et de l'acidité des différents échantillons.	73

Table des matières

Dédicace	i
Remerciements	ii
Résumé	iii
Liste des abréviations	iv
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vii
Introduction	1
1- Définition	2
2- La composition du lait	2
2.1- Les différents composants du lait	2
2.1.1- L'eau	2
2.1.2- Les glucides	2
2.1.3- Les lipides	3
2.1.4- Les matières azotées	3
2.1.4.1- La fraction protéique	3
2.1.4.2- La fraction non protéique	3
2.1.4- Les matières grasses (MG)	4
2.1.5- Les éléments minéraux	4
2.1.6- Les vitamines	4
2.1.7- Les enzymes	4
2.1.8- La microflore du lait (Bactéries, Levures, Moisissures)	4
3- Les propriétés du lait	5
3.1- Les propriétés physicochimiques du lait	5
3.1.1- Masse volumique et densité du lait	5
3.1.2- Point de congélation	5
3.1.3- Point d'ébullition	5
3.1.4- Acidité du lait	5
3.1.4.1- L'acidité titrable	5
3.1.4.2- Le pH	6
3.2- Les propriétés organoleptiques du lait	6
3.2.1- La couleur	6
3.2.2- L'odeur	6
3.2.3- La saveur	7

4-Facteurs de variation de la composition du lait :	7
4.1-Les écarts liés aux caractéristiques des animaux	8
4.1.1-Influence des espèces et des races	8
4.1.2-Niveau génétique des individus	8
4.1.3-Stade de lactation	8
4.1.4-Age	9
4.1.5- Etat sanitaire	9
4.2-Facteurs environnementaux	9
4.3-Facteurs liés à la conduite de troupeau	9
4.3.1-Traite	9
4.3.2- La période de vêlage	10
4.3.3-Influence de l'alimentation	10
1-Groupes des microorganismes du lait cru	11
1.1-Les virus	11
1.2-Les bactéries	12
1.2.1-Les bactéries technologiques	12
1.2.2-Les bactéries pathogènes	13
1.2.3-Les bactéries d'altération	13
1.3-Les levures	14
1.4-Les moisissures	14
2-Réservoirs de flores dans le lait cru	15
2.1-Les flores microbiennes des trayons	16
2.1.1-La surface des trayons	16
2.1.2-Le canal du trayon	16
2.2-Air, ambiance et litière réservoir de flores des laits crus	16
2.3-La machine à traire	16
3-Les bactéries lactiques	17
3.1-Généralités	17
3.2-Origine et habitat	17
3.3-Principales activités des bactéries lactiques dans le lait	17
3.3.1-Acidification	17
3.3.2-Production de polysaccharides ou de polypeptides	18
3.3.3-Protéolyse	18
3.3.4-Lipolyse	18
3.3.5-Production de gaz	18

4-Classification et identification des bactéries lactiques.....	20
4.1-Classification.....	20
4.2-Identification	21
4.2.1-Techniques phénotypiques.....	21
4.2.2-Techniques génotypiques.....	22
4.2.2.1-Le ribotypage	22
4.2.2.2-Séquençage d'ARNr 16S	22
4.2.2.3-Le profil plasmidique	23
4.2.2.4-Méthodes des empreintes digitales (fingerprinting).....	23
1-Echantillonnage.....	24
2-Analyses physicochimiques	25
2.1- Mesure de pH	25
2.2- Mesure de l'acidité Dornic	25
3-Analyses microbiologiques	25
3.1-Les dilutions	25
3.2-Recherche et dénombrement des germes de contamination.....	25
3.2.1-Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FTAM)	25
3.2.2-Dénombrement des coliformes	26
3.2.3-Recherche et dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.2.4-Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux	26
3.2.5-Recherche et dénombrement des <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs.....	26
4-Recherche et dénombrement de la flore technologique	27
4.1-Isolement des bactéries lactiques	27
4.2-Orientation de l'identification des souches	27
4.2.1-Etude des caractères morphologiques.....	27
4.2.1.1-Examen macroscopique	27
4.2.1.2- Examen microscopique	27
4.2.2- Test de la catalase	28
4.2.3- Recherche du nitrate réductase	28
4.3-Purification des isolats	28
4.4-Conservation des isolats	28
4.4.1-Conservation à courte terme	28
4.4.2-Conservation à long terme	28
4.5-Identification des isolats.....	29
4.5.1-Type fermentaire.....	29

4.5.2-Croissance à différentes températures	29
4.5.3-Croissance au pH alcalin ou pH acide	29
4.5.4-Croissance sur lait de Sherman.....	29
4.5.5-Croissance sur milieu Naylor et Sharpe à 6.5% de NaCl	29
4.5.6-Production des composés aromatiques	29
4.5.7-Test de thermorésistance.....	30
4.5.8-Activité Citratase	30
4.5.9-Arginine hydrolase	30
1-Les analyses physico-chimiques	31
1.1-Le pH.....	31
1.2-L'acidité titrable	31
2- Analyses microbiologiques :.....	32
2.1-La flore d'altération.....	32
2.1.1-La flore totale aérobie mésophile (FTAM) :	32
2.1.2- Coliformes totaux et coliforme fécaux	33
2.1.3-Streptocoques fécaux	34
2.2- La flore pathogène	34
2.2.1- <i>Staphylococcus aureus</i>	34
2.2.2- <i>Clostridium</i> sulfito- réducteur	35
3-La flore technologique	38
3.1-Dénombrement de la flore lactique	38
3.2-Purification des bactéries.....	38
3.3-L'identification des bactéries lactiques	39
3.3.1-Identification préliminaire	39
3.3.1.1-Aspect macroscopique	39
3.3.1.2-Aspect microscopiques	39
3.3.1.3-Activité catalase	40
3.3.1.4-Test de nitrate réductase.....	40
3.3.2-Identification du genre.....	40
3.4- Distribution des genres	45
Discussion	46
Conclusion.....	49
Références Bibliographiques.....	50
Annexes	62

Introduction

Introduction

L'Algérie, deuxième importateur de poudre de lait à l'échelle mondiale (**FIL, 2013**), s'investit avec rigueur dans la production du lait de vache pour satisfaire aux besoins de consommation quotidienne de ses habitants en continuelle augmentation, car cette denrée alimentaire de grande consommation, est aussi une matière première très importante dans l'industrie de transformation en fromage à pâtes molles. Cette industrie est en nette développement tenant compte du nombre d'unités qui ne cessent d'investir le marché local. Dans l'ouest algérien, au moins 110.000 litres de lait cru sont quotidiennement transformés en Camembert (Chiffres de Sidi Saada et Tessala). A côté de cette exigence quantitative, s'installe une exigence qualitative inhérente essentiellement à la composition physicochimique du lait cru mais aussi à sa qualité microbiologique (**Desmaures et al., 1997; Oliver et al., 2009 ; Elmoslemany et al., 2010**).

Cette dernière, est au centre du développement du produit fini, en relation avec sa qualité organoleptique, notamment les arômes et la texture. Un débat mondial s'est installé sur les fromages faits à partir de lait cru ou pasteurisé mettant en avant la diminution de la qualité organoleptiques des fromages au lait pasteurisés (**Mallet et al., 2012 Claves et al., 2013**).

Connaitre le microbiote naturel d'un lait cru en amont permettrait de maîtriser le processus technologique en aval pour l'obtention d'un fromage de bonne qualité, mais aussi de développer des souches technologiques d'un grand intérêt à partir des flores naturelles du lait (**Copola et al., 2008 ; Ercolini et al., 2009**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail intitulé « Physicochimie et Microbiote de lait cru de vache dans la région de l'ouest algérien » et qui se veut une contribution à l'étude de la flore naturelle des laits crus de vache produits localement.

Revue
Bibliographique

Chapitre I

Généralités sur le lait cru

1- Définition

Le lait a été défini pour la première fois en 1908, au Congrès international de la Répression des Fraudes de Paris comme : « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (Noblet, 2012).

D'après le *Codex Alimentarius* (CODEX STAN 206-1999), le lait est la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur. Le lait est un aliment très nutritif qui peut être obtenu à partir d'une variété de sources animales telles que les vaches, les chèvres, les brebis et les bufflesses, ainsi que les humains, destiné à la consommation humaine (Quigley *et al.*, 2013).

En terme de microbiologie, le lait est un véritable support pour la croissance microbienne, la flore microbienne du lait est divisée en deux types : des microorganismes existent initialement dans le lait tandis que autres sont des contaminants de ce produit et peuvent être pathogènes (Afif *et al.*, 2008 ; Vacheyrou *et al.*, 2011 ; Quigley *et al.*, 2013).

Du point de vue physicochimique, le lait représente une émulsion de matières grasses dispersées dans l'eau, comprenant en suspension des protéines et à l'état dissous des glucides, des minéraux et d'autres constituants en quantités minimales telles les vitamines (Mathieu, 1998; Perreau, 2014).

2- La composition du lait

Le lait est un liquide opaque, de saveur légèrement sucrée et sans odeur accentuée. Son pH moyen varie entre 6,6 et 6,8. Sa densité se situe entre 1,028 et 1,034. De ce fait, l'expression des taux (de matières azotées et de matières grasses), toujours légèrement plus faible en poids par rapport au volume (Perreau, 2014).

2.1- Les différents composants du lait

2.1.1- L'eau

C'est, en termes de quantité, l'élément principal. Les autres éléments constituent la matière sèche du lait (Perreau, 2014).

2.1.2- Les glucides

Ce sont les constituants les plus importants quantitativement après l'eau. Ils représentent environ 38% de la MS. Le lactose constitue l'essentiel des glucides du lait (50g/l). Il n'existe que dans le lait et est formé à partir de deux molécules de sucres simples : une de glucose et une de galactose (Perreau, 2014).

2.1.3- Les lipides

Les lipides sont constitués d'un mélange d'acides gras en suspension dans le lait sous forme de gouttelettes, ils forment une émulsion. Ils constituent la partie la plus variable du lait ; la concentration varie de 35 à 40 g/l. Ils sont constitués à 99 % de triglycérides (**Vilain, 2010**).

2.1.4- Les matières azotées

Elles représentent environ 27% de la matière sèche du lait, soit une teneur de 32 à 36 g/l. On distingue, à l'intérieur de cette catégorie, la fraction protéique de la fraction non protéique.

2.1.4.1- La fraction protéique

Elle représente environ 95% des matières azotées. Son importance dans le lait est chiffrée par le TP (ce taux protéique correspondant au rapport entre la quantité de matières protéiques produites rapportée à la quantité de lait). Dans cette quantité, constituant la partie intéressante des matières azotées, on trouve différents types de protéines à haute valeur nutritionnelle (bonne digestibilité, teneurs intéressantes en acides aminés indispensables). Les plus importantes quantitativement sont les caséines, elles présentent un intérêt notable (**Perreau, 2014**).

2.1.4.1.1- Les caséines

Les caséines représentent 82 % des protéines du lait de vache (**Vilain, 2010**) à une teneur de l'ordre de 26 à 30 g/l. Les caséines se présentent dans le lait sous forme d'un complexe organique et minéral (**Eigel et al, 1984**). Ce sont ces protéines qui coagulent sous l'effet des ferments lactiques-naturellement présents dans le lait – sous l'action de la présure ajoutée lors de la transformation fromagère (**Perreau, 2014**).

2.1.4.1.2- Les protéines non caséiques

Ces protéines sont dites « sériques », car elles proviennent du sérum sanguin, à la différence des caséines, qui sont fabriquées par les cellules mammaires. Ne coagulant pas lors de la transformation fromagère, elles sont « évacuées » dans le lactosérum lors de l'égouttage suivant la phase de caillage (**Perreau, 2014**). Par rapport aux caséines ; elles constituent un groupe plus hétérogène par leur composition chimique, car constituées de : lactoglobulines, lactalbumines, sérumalbumine, immunoglobulines et lactoferrine bovine (**Vilain, 2010**).

2.1.4.2-La fraction non protéique

Elle représente 1 à 1,5 g/l de lait, environ 5% des matières azotées totales du lait, et est directement perdue lors de la fabrication fromagère. Ses principaux composants sont : l'urée, les

acides aminés libres, l'ammoniac, des enzymes sécrétées par les cellules sanguines et mammaires ou par bactéries (**Perreau, 2014**).

2.1.4-Les matières grasses (MG)

Les MG se trouvent dispersées dans le lait sous forme de globules sphériques : « les globules gras » (**Perreau, 2014**), visible au microscope optique en émulsion dans la phase aqueuse du lait (**Pointurier et Adda, 1969**). Leur densité est de 0,94 et rend l'émulsion instable. Ainsi, ils ont tendance à remonter en surface pour former la crème lorsque le lait est au repos. Leur importance dans le lait est chiffrée par le TB, c'est-à-dire le taux butyreux correspondant au rapport entre la quantité de MG produite rapportée à la quantité de lait (**Perreau, 2014**).

2.1.5-Les éléments minéraux

La matière minérale du lait, répartie de manière complexe, est fondamentale d'un point de vue nutritionnel et technologique (**Gueguen, 1979**). La teneur globale du lait en ces éléments est de 1%. Le lait est bien pourvu en calcium, phosphore « ce qui traduit sa bonne adaptation aux besoins de croissance des jeunes », potassium, chlore, sodium, et magnésium. En revanche, le lait a une très faible teneur en fer (**Perreau, 2014**).

2.1.6-Les vitamines

Le lait a d'assez fortes teneurs en vitamines (**Perreau, 2014**) qui sont des molécules complexes mais de taille beaucoup plus faible que les protéines. On classe les vitamines en deux grandes catégories :

- Les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupes B et vitamine C très faible teneur)
- Les vitamines liposolubles (A, D, E, K) associées à la matière grasse (**Pougeon, Goursaud, 2001**).

Certains traitements industriels et un stockage prolongé peuvent faire diminuer ses valeurs vitaminiques (**Perreau, 2014**).

2.1.7-Les enzymes

Le lait contient principalement trois groupes d'enzymes : les hydrolases, déshydrogénase, (ou oxydase) et oxygénases les deux principaux facteurs qui influent sur l'activité enzymatique sont le pH et la température. En effet, chaque enzyme possède un pH et une température optimums de traduisant par une activité maximale (**Vignola C.L, 2002**).

2.1.8-La microflore du lait (Bactéries, Levures, Moisissures)

La population microbienne dans le lait est variée, mais la majorité des souches bactériennes est banale donc non gênante et même parfois utile (**Perreau, 2014**). En général, le lait de vache contient une population importante des bactéries lactiques qui comprend

Lactococcus, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus spp.* Un certain nombre d'autres microorganismes peuvent être présents dans le lait en proportions importantes. Ceux-ci comprennent les bactéries psychrotrophes, tels que *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Aeromonas spp.*, Qui fleurissent pendant le stockage à froid du lait (Quigley et al., 2013).

3-Les propriétés du lait

3.1-Les propriétés physicochimiques du lait

Les principales propriétés physicochimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la masse volumique et la densité, le point de congélation, le point d'ébullition et l'acidité (Vignola, 2002).

3.1.1-Masse volumique et densité du lait

La masse volumique du lait (ρ_L , kg.m^{-3}) est le rapport de sa masse (m_L , kg) sur son volume (V_L , m^3) :

$$\rho_L = m_L / V_L$$

La masse volumique du lait à 20°C est environ 1030 kg.m^{-3} . Elle varie en fonction de la composition du lait, notamment de sa teneur en matière grasse qui a un effet prépondérant en raison de sa variabilité suivant la race et l'alimentation (Croguennec et al, 2008).

3.1.2-Point de congélation

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau puisque la présence de solides solubilisés abaisse le point de congélation. Il peut varier de -0,53°C à -0,57°C avec une moyenne de -0,55°C. Un point de congélation supérieur à -0,530 permet de soupçonner une addition d'eau au lait. On vérifie le point de congélation du lait à l'aide d'un cryoscope (Vignola, 2002).

3.1.3-Point d'ébullition

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de la vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée. Ainsi, comme le point de congélation, le point d'ébullition subit l'influence de la présence des solides solubilisés. Il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100,5°C. Cette propriété physique diminuant avec la pression, on applique ce principe dans les procédés de concentration du lait (Vignola, 2002).

3.1.4-Acidité du lait

3.1.4.1-L'acidité titrable

L'acidité titrable mesure la quantité d'acide lactique présente dans un échantillon de lait. On l'exprime en pourcentage d'acide lactique. Cette acidité peut varier de 0,10 à 0,30 %. Les laits ont normalement une acidité de 0,13 à 0,17 % à la traite. L'acidité naturelle du lait est attribuable à la présence de caséine, des substances naturelles, de traces acides organiques et de

réactions secondaire dues aux phosphates. L'acidité développée du lait est causée par l'acide lactique et d'autres acides provenant de la dégradation microbienne du lactose dans les laits altérés (Amiot *et al*, 2002).

3.1.4.2-Le pH

Le pH d'un lait frais à 20°C se situe entre 6,6 et 6,8. Plutôt proche de 6,6 immédiatement après la traite (Croguennec *et al*, 2008). Contrairement à l'acidité titrable, le pH ne mesure pas la concentration des composés acides mais plutôt la concentration des ions H⁺ en solution. Les valeurs de pH représentent l'état de fraîcheur du lait, plus particulièrement en ce qui concerne sa stabilité, du fait que c'est le pH qui influence la solubilité des protéines c'est-à-dire l'atteinte du point isoélectrique (Vignola, 2002).

3.2- Les propriétés organoleptiques du lait

3.2.1- La couleur

Le lait est un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté peut dénoter l'écémage du lait ou son mouillage. Un lait rosé laisse présager la présence de sang provenant de vaches malades (Pougheon, Goursaud 2001 ; Amiot *et al*, 2002).

3.2.2-L'odeur

L'odeur du lait est un indice important de sa qualité. La présence d'une mauvaise odeur dans le lait reflète un problème dans la manipulation et la conservation du lait. On classe les odeurs selon qu'elles sont absorbées ou développées. Les odeurs absorbées peuvent provenir de l'alimentation ou d'autres sources (Tab. I). Tandis que les odeurs développées peuvent être d'origine microbiologique ou chimique (Tab. II) (Amiot *et al*, 2002).

Tableau I : Sources des odeurs absorbées (Amiot *et al*, 2002).

Type	Caractéristiques	Provence
Alimentation	<ul style="list-style-type: none"> Odeur transmise au lait par le système sanguin de la vache 	<ul style="list-style-type: none"> Alimentation au gout fort (chou...), Changement dans l'alimentation, Mauvaise herbes.
Etable	<ul style="list-style-type: none"> Odeur caractéristique d'une étable mal ventilée 	<ul style="list-style-type: none"> Vaches et équipements malpropres, Mauvaise préparation pour la traite
Vache	<ul style="list-style-type: none"> Légère odeur sucrée 	<ul style="list-style-type: none"> Vaches en chaleur, Maladie physiologique.

Tableau II : Origines des odeurs développées (Amiot et al, 2002).

Type	Caractéristiques	Provence
Odeurs développées d'origine microbiologique		
Acide	<ul style="list-style-type: none"> • Odeur du yaourt, • La dégradation du lactose par les bactéries lactiques. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bactéries en grand nombre dans le lait, • Mauvais refroidissement, • Température de conservation trop élevée
Maltée	<ul style="list-style-type: none"> • Odeur de céréales dans du lait, • Présence des <i>streptococcus lactis</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Equipements mal lavés, • Refroidissement inadéquat, • Pièces de caoutchouc fendillées.
Fruitée	<ul style="list-style-type: none"> • Odeur des différents fruits, • Odeur légèrement sucrée, • Souches psychrotrophes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Méthodes de traite inadéquates, • Trayons mal nettoyés et asséchés.
Odeurs développées d'origine chimique		
Rance	<ul style="list-style-type: none"> • Odeur du fromage parmesan, • Odeur du vieux beurre, • Dégradation de la matière grasse par la lipase. 	<ul style="list-style-type: none"> • Incorporation d'air dans le lait, • Fuites d'airs, moussage, • Agitation excessive, • Vache en fin de lactation.
Oxydée	<ul style="list-style-type: none"> • Odeur de papier, de carton, • Odeur de métal, • Odeur de suif, • Couleur du lait plus blanche, 	<ul style="list-style-type: none"> • Incorporation d'air dans le lait, • Fuites d'airs, moussage, • Exposition à la lumière, • Présence de cuivre ou de fer

3.2.3-La saveur

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

4-Facteurs de variation de la composition du lait :

Les caractéristiques et la composition de chacune des phases constituantes le lait sont très variables car elles dépendent de nombreux facteurs inhérents au mammifère (espèce et race), à son état physiologique (stade de lactation, gestation), à son état sanitaire et à la conduite du troupeau (Croguennec et al, 2008).

4.1-Les écarts liés aux caractéristiques des animaux

4.1.1-Influence des espèces et des races

La composition moyenne du lait de différentes espèces est présentée dans le tableau III.

Tableau III : Composition moyenne du lait selon les espèces (Vilain, 2010)

	Eau	Lipides	protéines			Glucide (lactose)	Matières minérales
			totales	caséine	albumine		
Lait maternel	905	35	12-14	10-12	4-6	65-70	3
Vache	900	35-40	30-35	27-30	3-4	45-50	8-10
Chèvre	900	40-45	35-40	30-35	6-8	40-45	8-10
Brebis	860	70-75	55-60	45-50	8-10	45-50	10-12
Jument	925	10-15	20-22	10-12	7-10	60-65	3-5
Bufflonne	850	70-75	45-50	35-40	8-10	45-50	8-10
Anesse	925	10-15	20-22	10-12	9-10	60-65	4-5
Renne	675	160-200	100-105	80-85	18-20	25-50	15-20

4.1.2-Niveau génétique des individus

De nombreuses études ont été réalisées pour évaluer l'effet des caractéristiques génétiques des vaches sur la quantité et la qualité de la production laitière. Il est établi que les vaches de race Normande, Montbéliarde ou Brune produisent moins de lait mais plus riche en protéines que celui de vaches Holstein qui en produisent une grande quantité mais de moins bonne qualité dans les mêmes conditions. L'essentiel de cet effet est lié d'une part aux différences de teneurs en caséines des laits d'une race à l'autre et d'autre part aux variations du polymorphisme génétique des lactoprotéines et en particulier à la fréquence du variant B de la caséine (Coulon *et al.*, 2005).

4.1.3-Stade de lactation

L'influence de ce facteur sur la composition du lait a souvent été décrite. Les teneurs en protéines et matières grasses évoluent de façon inverse à la quantité de lait produit. Elles diminuent en début de lactation (durant les premières semaines qui suivent le vêlage) pour atteindre un minimum au bout d'environ 6 semaines, puis remontent progressivement jusqu'en fins de lactation. (Mathieu, 1998 ; Croguennec *et al.*, 2008).

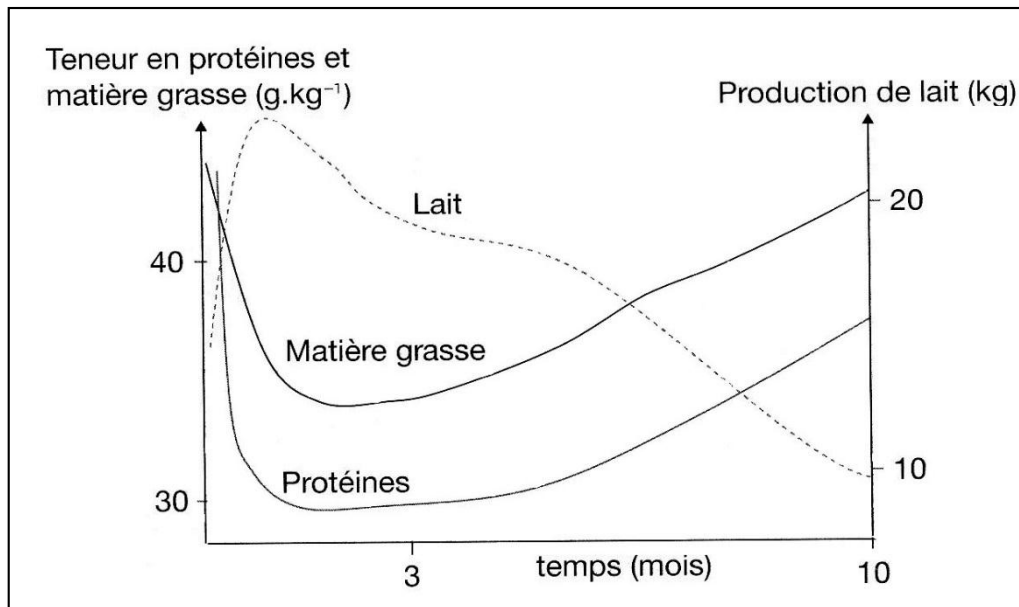


Figure 1 : Evolution de la production du lait et des teneurs en matière grasse et protéines au cours de lactation (**Remond, 1987**)

4.1.4-Age

Le niveau de production augmente avec l'âge jusqu'à la quatrième lactation ; cette progression est surtout notable pour le début de lactation. En revanche, la persistance devient moins bonne quand les vaches vieillissent (**Perreau, 2014**).

4.1.5- Etat sanitaire

L'infection mammaire perturbe le fonctionnement de la glande et modifie la composition du lait. (**Croguennec et al, 2008**).

4.2-Facteurs environnementaux

L'influence de la saison est étroitement associée aux effets de l'alimentation qui évoluent simultanément. Les taux protéique et butyreux les plus bas du lait de vache s'enregistrent entre juin et juillet et les taux les plus élevés en février et octobre (**Croguennec et al., 2008**). Cette influence est étroitement liée aux variations de la longueur des journées et des températures.

4.3-Facteurs liés à la conduite de troupeau

4.3.1-Traite

La traite influe sur la composition du lait recueilli : les premiers jets sont pauvres en MG, alors que les derniers en sont plus pourvus. Lorsque la fréquence de la traite augmente, les taux ont tendance à diminuer ; elle a également des impacts sur la quantité du lait ; trois traite par jours augment les quantités produites par l'animal ; à l'inverse, la suppression d'une traite par semaine, même bien gérée, a un léger impact négatif à ce niveau (**Perreau, 2014**).

4.3.2- La période de vêlage

Elle est normalement conditionnée par les objectifs de l'éleveur en matière d'organisation du travail ou par les moments les plus favorables pour la vente de lait au meilleur prix. Le choix d'une période au cours de laquelle les vêlages seront regroupés aura des impacts sur la quantité produite par vache et la composition du lait (**Perreau, 2014**).

4.3.3-Influence de l'alimentation

L'alimentation semble généralement représenter la clé de voute de l'ensemble et le premier facteur limitant (**Wolter et Ponter, 2012**). Les facteurs alimentaires sont multiples, ils concernent les teneurs en glucides, lipides et protéines de la ration alimentaire mais aussi la nature de chacun de ces constituants (**Croguennec et al, 2008**). L'influence de l'alimentation n'est sensible que si le niveau énergétique de la ration est insuffisant. Les animaux sous-alimentés donnent un lait moins riche que les vaches ayant des rations équilibrées (**Mathieu, 1998**).

Chapitre III

Microbiologie du lait cru

Introduction

Actuellement, les laits crus de vache ont, en moyenne, des niveaux de flores totales très bas par rapport aux laits des années 70-80 (10 000 germes totaux /ml en moyenne vs. 50 000 germes/ml) (**Tormo et al., 2006**).

La qualité du lait peut être affectée par de nombreux facteurs tels que l'adultération, les contaminations au cours et après la traite et la présence d'infections mammaires (**Aggad et al., 2009**). Les flores utiles ou flores d'intérêts technologiques des laits crus jouent un rôle dans l'acidification des fromages (bactéries lactiques comprenant les lactocoques, leuconostocs, entérocoques et lactobacilles) et dans l'affinage des fromages (entérocoques, lactobacilles, flores halophiles : microcoques et bactéries corynéformes, levures et moisissures) (**Tormo et al., 2006**).

1-Groupes des microorganismes du lait cru

Le lait cru est un écosystème pouvant abriter une importante diversité microbienne. Cinquante-trois genres et 112 espèces de bactéries ont pu être détectés dans des laits crus de Basse Normandie (**Mallet et al., 2012**). La teneur élevée en nutriments du lait, qui comprend des protéines, lipides, glucides, vitamine, minéraux et acides aminés essentiels, le tout ajouté à un pH proche de la neutralité et à une activité de l'eau élevée, fournit un environnement idéal pour la croissance de nombreux micro-organismes (**Quigley et al., 2013**).

Le développement des microorganismes dépend de plusieurs facteurs qu'il faudra également s'efforcer de maîtriser : le pH, la température (l'acidification du lait par abaissement du pH ou l'abaissement rapide de sa température limite la croissance des microorganismes), la teneur en oxygène, l'humidité et la teneur en sel (**Magali, 2012**). Les microorganismes principalement présents dans le lait sont les bactéries, mais on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire des virus (**Lamontagne et al., 2002**).

1.1-Les virus

Le virus peut parasiter un humain, animal, une plante, ou une bactérie. Les virus ne se développent donc pas dans les aliments. La présence des virus dans un produit laitier signifie qu'un manipulateur, un animal, l'eau ou une des composantes utilisées dans la formulation du produit alimentaire a servi de vecteur d'incorporation. Les principaux virus associés au secteur laitier sont ceux de l'hépatite A et les bactériophages. Ces bactériophages attaqueront de jeunes bactéries ou les ferments en pleine phase de multiplication dite phase logarithmique. Le processus de reproduction à l'intérieur de la bactérie peut entraîner la production de 10 à 200 nouveaux phages. La figure 2 montre les différentes étapes d'attaque d'une cellule bactérienne par un bactériophage (**Lamontagne et al., 2002**).

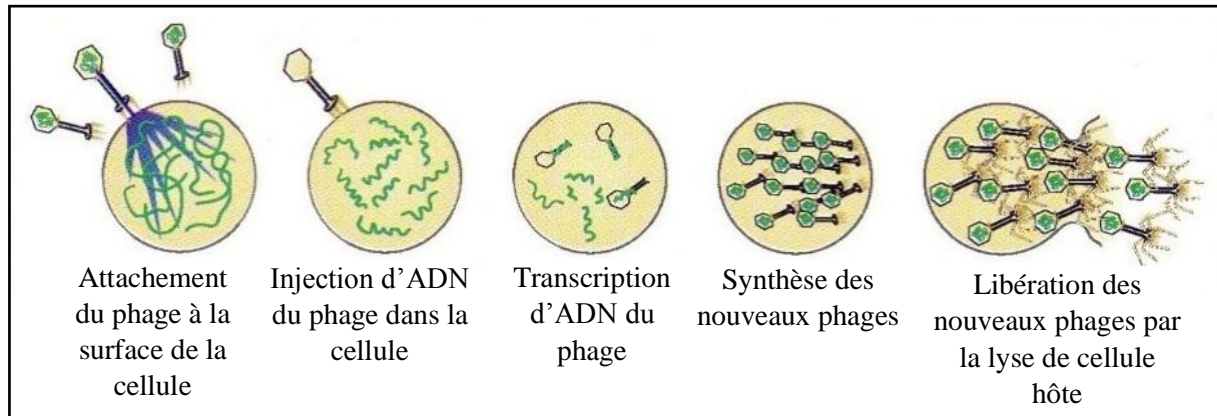


Figure 2 : Schéma d'attaque du bactériophage sur une cellule bactérienne. (Lamontagne et al, 2002).

1.2-Les bactéries

Elles agissent par l'intermédiaire des enzymes qu'elles sécrètent. Certaines sont utiles et nécessaires (bactéries lactiques) alors que d'autres sont nuisibles et dangereuses (Magali, 2012). Les bactéries présentes dans le lait peuvent être subdivisées en trois groupes : les agents pathogènes, les agents d'altération et les bactéries utilisées dans la fabrication de produits fermentés (Frank and Hassan, 2002).

1.2.1-Les bactéries technologiques

Sont principalement les bactéries qui sont impliquées dans la fermentation du lactose qui conduit à l'acidification du lait. Elles sont en principe, considérées comme des bactéries utiles du lait, parfois recherchées en tant que ferments naturels pour la fabrication de produits laitiers fermentés. Elles ne se développent pas en dessous de 8 °C, la réfrigération bloque donc leur multiplication et elles sont détruites par pasteurisation (Lamontagne et al., 2002)

Tableau IV: les bactéries technologiques dans le lait (Frank and Hassan, 2002)

Catégorie	Espèces
Bactéries technologiques	Lactocoques : <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	Lactobacilles : <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus kefirii</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
	Propionibactéries : <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Propionibacterium thoenii</i> , <i>Propionibacterium acidipropionici</i>

Coryneformes: *Brevibacterium spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Microbacterium spp.*, *Aureobacterium spp.*, *Brachybacterium spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*

Bifidobactéries : *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*

Microcoques : *Micrococcus spp*, *Kocuria spp*, *Dermaococcus spp*, *Kytococcus spp*, *Nesterenkonia spp.*

Autres : *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecalis*

1.2.2-Les bactéries pathogènes

Le lait cru peut contenir des agents pathogènes dont la multiplication dépend principalement de la température et de la microflore du lait (**Lamontagne et al., 2002**). Ils sont représentés par les flores de contaminations fécales et les bactéries responsables de toxico-infection (**Raiffaud, 2011**).

Tableau V: les bactéries pathogènes dans le lait (Frank and Hassan, 2002)

Catégorie	Espèces
Bactéries pathogènes	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus hyicus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia coli O157:H7</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Brucella abortus</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Actinomyces pyogenes</i> , <i>Leptospira interrogans</i>

1.2.3-Les bactéries d'altération

Les germes indésirables ou les germes d'altération, sont ceux qui sont responsables de défaut de fabrication, d'aspect, de goût et de durée de conservation des laits. (**Lévesque, 2007**). Quatre groupes de bactéries d'altération sont généralement présents dans le lait cru : les producteurs d'acide lactique, d'acide propionique, d'acide butyrique et les producteurs d'enzymes de dégradation principalement les protéases et les lipases (**Frank and Hassan, 2002**). L'évolution de la flore d'altération va dépendre d'un grand nombre de facteurs, dont les principaux sont : les traitements thermiques, les caractères physico-chimiques du lait (pH,

a_w ...), l'hygiène des locaux de transformation et les méthodes de conservation (**Monique et Souad, 2013**).

Tableau VI : Les bactéries d'altération dans le lait (Frank and Hassan, 2002)

Catégorie	Espèces
Bactéries d'altération	Psychrotrophes : <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Acinetobacter spp</i> , <i>Moraxella spp</i> , <i>Psychrobacter spp</i> , <i>Flavobacterium maloloris</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i>
	Coliformes : <i>Escherichia spp</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus spp</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Citrobacter spp</i> .
	Bactéries sporulantes : <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium tyrobutyricum</i>
	Bactéries lactiques : <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Micrococcus spp</i> .

1.3-Les levures

Elles transforment les sucres en alcools ce qui peut provoquer des problèmes de goût (**Magali, 2012**). Le nombre des espèces des levures dans le lait cru est relativement réduit, mais on peut trouver un niveau plus au moins élevé (**Lagneau et al., 1996**). Les espèces qui ont été détectées dans le lait cru comprennent : *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum catenulate*, *Pichia fermentans*, *Candida sake*, *Candida parapsilosis*, *Candida inconspicua*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon lactis*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus victoriae* (**Delavenne et al., 2011**).

1.4-Les moisissures

Elles ont besoin d'air et se rencontrent surtout en phase d'acidification du lait. Elles sécrètent essentiellement des lipases et des protéases qui dégradent les constituants du lait (**Magali, 2012**). La composition fongique du lait cru peut être influencée par l'état physiologique de l'animal, ainsi que le temps, l'alimentation et la saison (**Callon et al., 2007**). Comme les bactéries, certaines moisissures (*Aspergillus flavus*, certains *Penicillium*) possèdent un effet pathogène, *Mucor spp*, *Rhizopus spp*, *Penicillium* sont responsables de certaines altérations tandis que autres moisissures telles que *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei* sont utilisés principalement dans l'affinage des fromages (**Frank and Hassan, 2002**).

2-Réservoirs de flores dans le lait cru

Le lait est stérile lors de la sécrétion et se contamine dès la sortie des mamelles (Mallet et al., 2013). Les sources de contamination du lait peuvent être de nature diverse ainsi que le nombre et les types de microorganismes trouvés dans le lait cru reflètent les conditions hygiéniques lors du traitement du lait (Frank and Hassan, 2002). Certains microorganismes remontent dans le canal du trayon et contaminent le lait pendant la traite (Verdier-Metz et al., 2012). Les bactéries présentes dans les mamelles sont composées principalement de bactéries lactiques et leur nombre est limité par le système immunitaire de l'animal et les agents antimicrobiens sécrétés dans le lait (Tormo et al., 2006). L'homme contamine le lait pendant la traite, la manipulation, le traitement et l'entreposage du lait (Vacheyrou et al., 2011). La grande majorité des microorganismes dans le lait cru proviennent des surfaces, des aliments, de l'air, de l'eau, du sol, des ustensiles et des équipements utilisés pour la traite et l'entreposage. (Mallet et al., 2013; Tormo et al., 2006).

Tableau VII : les sources de contamination du lait (Frank and Hassan, 2002)

Sources	Genres
Personnel	Coliformes, <i>Salmonella</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>
Air	<i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Bacillus</i> , levures et moisissures
Intérieur du pis	<i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Corynebacterium</i>
Extérieure du pis	<i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Bacillus</i>
Fèces	<i>Escherichia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Salmonella</i>
Appareil de traite	<i>Micrococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i> , coliformes
Litière	<i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Klebsiella</i>
Sol	<i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i> , levures et moisissures
Alimentation	<i>Clostridium</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , bactéries lactiques
Eau	Coliformes, <i>Pseudomonas</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Alcaligenes</i>

2.1-Les flores microbiennes des trayons

2.1.1-La surface des trayons

Selon Michel et al. (2005) c'est à la surface des trayons de vache que l'on trouve la plus grande diversité de groupes microbiens en comparaison avec ce que peut apporter l'ambiance ou la machine à traire. Les trayons sains et propres sont constitués majoritairement de flores d'intérêts technologiques : flores acidifiantes mésophiles, flores halophiles (Michel et al., 2005). Les lactocoques et en particulier *Lactococcus lactis* se retrouvent fréquemment sur la surface des trayons de vache (Desmaures et al., 1997).

2.1.2-Le canal du trayon

Gill et al. (2006) suggèrent que les microorganismes présents dans le canal du trayon provenant de vaches saines sont plus diversifiés : 45 espèces ont été répertoriées avec une dominance des classes des clostridies, *bacilliaceae* et *staphylococcaceae* et plus ponctuellement des entérocoques. Les lactocoques et lactobacilles n'ont jamais été retrouvés.

2.2-Air, ambiance et litière réservoir de flores des laits crus

Les aérosols du bâtiment d'élevage proviennent en grande partie des litières et des fèces. L'air peut donc être un vecteur potentiel des flores des litières et peut ensemer le lait pendant la traite (Mallet et al., 2013).

Albenzio et al. (2005) ont montré qu'une augmentation du taux de renouvellement d'air de l'aire de couchage des animaux diminuerait significativement le niveau de flores d'altérations des laits : le passage d'un taux de renouvellement de 30 m³/h à 70 m³/h permet d'obtenir des niveaux de flores d'altérations (coliformes et psychrotrophes) 10 à 100 fois inférieurs. Selon Michel et al. (2005) l'air du lieu de traite d'exploitations bovines peut être considéré comme un réservoir secondaire en importance et diversité des flores présentes.

2.3-La machine à traire

La diversité des groupes microbiens mobilisés par rinçage du matériel de traite à l'eau stérile est faible : seuls quatre groupes microbiens sur 12 au total sont isolés dans 80 % des cas. Les niveaux des groupes d'altération (*Pseudomonas spp* et les coliformes) étant fréquemment voisins de ceux présentant un intérêt sur le plan technologique. Des températures de nettoyage trop élevées (70 - 75°C et plus), diminuent significativement la charge totale des laits (Michel et al., 2005).

3-Les bactéries lactiques

3.1-Généralités

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chemoorganotrophes, elles sont des bacilles, des coques ou coccobacilles, Gram positive, immobiles, asporulées, de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase catalase négative (certaines souches possèdent une pseudo-catalase ont été détectées en présence d'une concentration faible en sucre). Les bactéries lactiques possèdent une composition de base d'ADN de moins de 50% de G+C contenu (**Holzappel et al., 2001; Gevers, 2002; Burgain et al., 2014**) et présentent une épaisse couche variant entre 30 et 100 nm et du peptidoglycane. Elles nécessitent des molécules organiques complexes en tant que source d'énergie et sont capables de produire de l'acide lactique au cours du métabolisme homofermentaire ou hétérofermentaire (**Pot, 2008**). Parmi les genres bactériens considérés comme des bactéries lactiques, sont cités les genres : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (**Daniel et al., 2011**) et *Oenococcus* (**Pot, 2008**).

3.2-Origine et habitat

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (**Quiberoni et al., 2001**). La source originale des bactéries lactiques est constituée par les plantes vertes, et suite à des processus d'évolution et d'adaptation, ces bactéries sont présentes à l'état libre dans l'environnement et peuvent coloniser et vivre en association avec un hôte (**Carr et al., 2002**) tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*) ou génital des mammifères (*Lactobacillus*) (**Klein et al., 1998; Ruiz et al., 2009**). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, de *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) et/ ou *Lc. garvieae*, sont les plus rencontrées dans le lait et le fromage (**Gálvez et al., 2011**).

3.3-Principales activités des bactéries lactiques dans le lait

Les activités métaboliques des microorganismes présents dans le lait peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur l'apparence, l'odeur, la consistance ou la texture et le goût des produits laitiers. Il y a six principales catégories d'activités métaboliques pouvant survenir dans le lait :

3.3.1-Acidification

Lors de leur croissance, certains microorganismes (des mésophiles appartenant à la flore originelle), grâce à la β -galactosidase, hydrolysent le lactose du lait pour produire deux

nouveaux sucres : le glucose et le galactose. Le glucose sera fermenté pour produire des composés acides, du CO₂ dans certains cas ou de l'alcool. Cette production de composés acides va amener un abaissement de pH du produit se caractérisant par des odeurs et des goûts acides, pouvant aller jusqu'à la coagulation si on atteint le point isoélectrique de 4,6. L'acidification du lait est un bon indice pour évaluer la qualité microbiologique et le respect de la chaîne de froid de lait cru (**Ramet, 1993**).

3.3.2-Production de polysaccharides ou de polypeptides

Certaines bactéries lactiques (*Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*) utilisent les sucres ou les protéines du lait pour construire des molécules plus grosses et plus longues appelées respectivement des polysaccharides ou polypeptides. On dira de ces microbes qu'ils sont filants, limoneux, texturants ou épaississants. On utilise la production des polysaccharides ou polypeptides de façon contrôlée pour améliorer la texture de certains yaourts en augmentant leur viscosité afin d'éliminer ou de diminuer l'addition d'agents gélifiants (**Lamontagne, 2002**)

3.3.3-Protéolyse

Grace à l'action de leur protéases, les bactéries lactiques utilisent les protéines du lait. Ce phénomène produit la libération de sous produits très variés, dont des péptides à longue chaîne ou courte chaîne, des acides aminés et des dérivés d'acides aminés (**Lamontagne, 2002**).

3.3.4-Lipolyse

Grace à leurs lipases, les bactéries lactiques peuvent décomposer les matières grasses et les acides gras libres du lait. Les produits laitiers à haute teneur en matière grasse sont plus sensibles à la dégradation. On exploite cette activité de façon contrôlée dans la production du brie, du Saint-Paulin et de nombreuses pâtes molles (**Lamontagne, 2002**).

3.3.5-Production de gaz

Certaines bactéries lactiques ne produisent que l'acide lactique lors de la fermentation du lactose. On dit qu'elles sont homofermentaire (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas), d'autres bactéries lactiques produisent du CO₂ et d'autres sous-produits en addition à l'acide lactique. Elles sont qualifiées d'hétérofermentaires ou gazogènes (voie du 6-phosphogluconate / phosphokétolase) (**Lansing et al., 2010**).

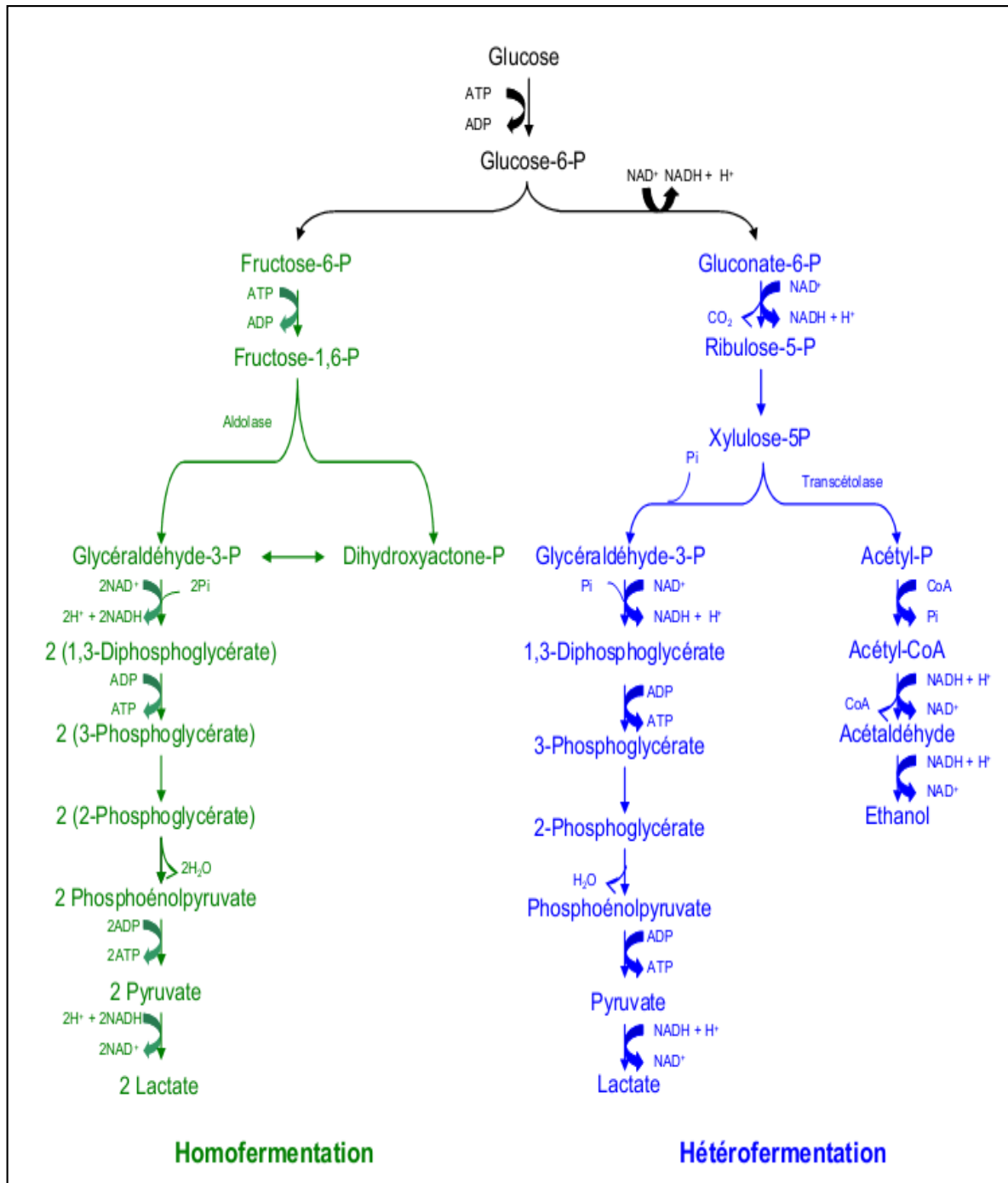


Figure 3 : Représentation schématique des principales voies de fermentation de glucose chez les bactéries lactiques (De Roissart et Luquet, 1994).

**Tableau VIII : Principales activités des bactéries lactiques dans les produits laitiers
(Lamontagne, 2002)**

Action microbienne	Répercussions	Groupe et genres microbiens
• Acidification	<ul style="list-style-type: none"> • Baisse de pH et caillage du lait • Synérèse du yaourt • Déstabilisation micellaire du lait UHT 	Bactéries lactiques (mésophiles) <i>lactobacillus</i> , <i>leuconostoc</i> , <i>lactococcus</i> et <i>streptococcus</i>
• Production de gaz	<ul style="list-style-type: none"> • Effervescence ou moussage du lait • Bombage de la conserve • Effritement, gonflement ou éclatement des fromages 	Bactéries lactiques (mésophiles) <i>lactobacillus</i> et <i>leuconostoc</i>
• Poissage	<ul style="list-style-type: none"> • Longs filaments ou viscosité inhabituelle du lait • Limon sur le fromage • Cottage gélatineux 	Bactéries lactiques (mésophiles et thermophiles) <i>leuconostoc</i> , <i>lactobacillus</i> , et <i>streptococcus</i>
• Protéolyse	<ul style="list-style-type: none"> • Amertume, goût de fruits, de vanille ou de malt dans le lait • Amertume, saveurs inhabituelles et perte de rendement dans les fromages 	<i>Lactobacilles</i> , <i>lactobacillus bulgaricus</i>
• Lipolyse	<ul style="list-style-type: none"> • Rancidité des produits laitiers • Odeurs butyriques 	Bactéries lactiques

4-Classification et identification des bactéries lactiques

4.1-Classification

Les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (De Roissart et Luquet, 1994; Holzapfel et al., 2001). Cependant, les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (Gevers, 2002).

Par conséquent, les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR), ainsi que les Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (**Holzappel et al., 2001**).

4.2-Identification

L'approche classique de la taxonomie des bactéries lactiques a été toujours basée sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques. Cette identification a été élargie pour inclure des marqueurs chimiotaxonomiques (acides gras cellulaires), analyse des protéines totales de la cellule et autres caractéristiques de la cellule (**Holzappel et al., 2001; Pot, 2008**). Les méthodes génotypiques tels que le séquençage de l'ADNr, ribotypage, Random Amplified polymorphic DNA (RAPD), rep-PCR fingerprinting, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de l'ensemble de l'ADN chromosomique digéré constituent aujourd'hui une partie importante de la taxonomie moderne des bactéries lactiques (**Gevers, 2002; Pot, 2008**).

4.2.1-Techniques phénotypiques

Les méthodes d'identification phénotypiques sont toujours utilisées dans différents laboratoires. Des tests clefs sont largement adoptés de nos jours, les caractérisations morphologiques ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques, biochimiques et chimiotaxonomiques sont pratiquées. Des tests physiologiques simples, tels que la croissance à différentes températures, la tolérance aux acides et aux sels ainsi que la production de gaz sont utiles pour la différenciation des genres (**Gevers, 2002; Temmerman et al., 2004**).

Parmi les méthodes biochimiques utilisées, les microméthodes ont connu un développement important, avec la commercialisation de systèmes d'identification associant, pour un groupe bactérien donné, une galerie miniaturisée de tests biochimiques, et des documents ou des programmes informatiques permettant d'interpréter les résultats obtenus (**De Roissart et Luquet, 1994**). La première galerie biochimique miniaturisée destinée à l'identification des bactéries lactiques a été la galerie API (Analytic Programme Index), commercialisée en 1970 pour l'étude des souches du genre *Lactobacillus*, puis rapidement étendue à d'autres genres (*Leuconostoc* et *Lactococcus*). Cette technique nécessite une durée d'incubation plus ou moins longue (12 heures à 48 heures) mais exige l'emploi d'un inoculum de faible charge bactérienne (**Vandamme et al., 1996**).

La comparaison des profils des protéines totales de la cellule obtenus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), s'est révélée être extrêmement fiable pour l'identification au niveau de l'espèce voir même de la sous-espèce, à condition d'avoir une base de données des profils protéiques numérisés et normalisés de toutes les espèces connues de bactéries lactiques (Pot et al., 1994 ; Vandamme et al., 1996). Pour certaines espèces, le pouvoir discriminatoire de cette technique est limité, c'est le cas du complexe *Lactobacillus acidophilus* (Gancheva et al., 1999), et les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* et *Lactobacillus paraplantarum* (Torriani et al., 2001).

4.2.2-Techniques génotypiques

Les méthodes de typage des souches deviennent de plus en plus importantes dans l'étude des bactéries lactiques. Les méthodes génotypiques utilisées pour le typage comprennent :

4.2.2.1-Le ribotypage

Il associe l'analyse de l'ADN chromosomique par des enzymes de restriction avec l'utilisation de sondes ADN recombiné ; ce qui permet de différencier entre les différentes espèces (Zhong et al., 1998; Lyhs et al., 1999). Le pouvoir discriminatoire de la méthode dépend du nombre et du type de sondes d'oligonucléotides et enzymes de restriction utilisées. Le ribotypage a été particulièrement utilisé pour révéler les hétérogénéités entre des souches à faible homologie (Roussel et al., 1993).

4.2.2.2-Séquençage d'ARNr 16S

Est l'une des méthodes les plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue. Sur la base des données de séquençage de 16S de l'ARNr, les bactéries Gram positives forment deux embranchements :

- ✓ Un embranchement composé de bactéries Gram positives avec un pourcentage G + C inférieur à 50% (*Clostridium*),
- ✓ et un autre formé de bactéries ayant une teneur en G + C supérieure à 50% (Actinomycètes) (Holzapfel et al., 2001; Gevers, 2002).

Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G + C inférieure à 50% alors que le genre *Bifidobacterium* qui, d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, appartient à la branche des Actinomycètes qui comprend aussi *Propionibacterium* et *Brevibacterium* (Vandamme et al., 1996).

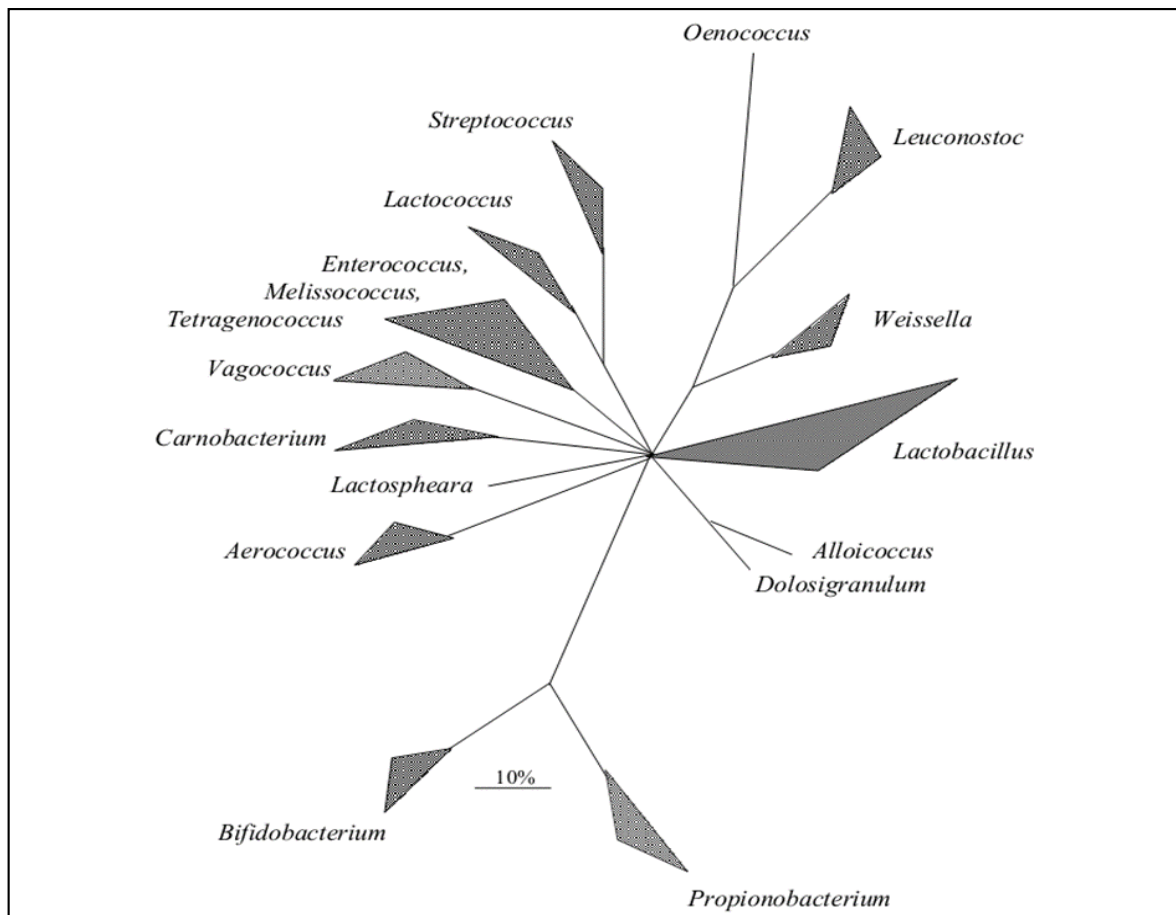


Figure 4 : Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible pourcentage G+C et les genres Gram positifs non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium*. La barre indique une divergence de séquence à 10%. (Holzapfel et al., 2001).

4.2.2.3-Le profil plasmidique

La variation du nombre et de la taille des plasmides hébergés par des souches de la même espèce, est utile pour typer les bactéries lactiques car la plupart des souches de ce groupe semblent contenir plusieurs plasmides. Cependant, cette méthode de typage est affectée par la capacité des souches à perdre ou à gagner des plasmides (Holzapfel et al., 2001 ; Pot, 2008).

4.2.2.4-Méthodes des empreintes digitales (fingerprinting)

L'électrophorèse en champs pulsé de l'ADN chromosomique digéré, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) et Repetitive extragenic palindromic- Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) sont les meilleures méthodes de typage moléculaire. Elles servent à l'identification des souches et permettent aussi étudier la diversité des souches.

Partie Pratique

Matériel
et
Méthodes

Objectif de l'étude

Notre travail s'est fixé l'objectif de l'étude de la diversité microbienne du lait cru de vache produit dans l'ouest algérien. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Mostaganem.

1-Echantillonnage

A cet effet, trois niveaux d'investigation ont été établis pour le lait collecté. Le lait à la sortie du pis (niveau éleveur), le lait collecté (niveau collecteur) et le lait réceptionné (cuve de grand mélange). Un échantillonnage aléatoire a été réalisé autour des grands pôles de production et de transformation laitière. C'est ainsi que les zones de prélèvement concernent les wilayas de : Mascara, Mostaganem, Oran, Relizane et Sidi Belabbès (Fig.5). Trente-cinq échantillons de lait cru ont été prélevés autour de grandes centrales laitières de l'ouest algérien, en l'occurrence la laiterie de Benchakour (Oran), El Amir (Mascara), le Littoral (Mostaganem), Sidi Saada (Relizane) et Tessala (Sidi Bel Abbès).

Les prélèvements ont été réalisés d'une manière aseptique. Les échantillons sont récupérés dans des flacons stériles conservés à 4°C pendant leur transport au laboratoire. Une fois au laboratoire, des analyses physicochimiques et microbiologiques de lait cru ont été réalisées.

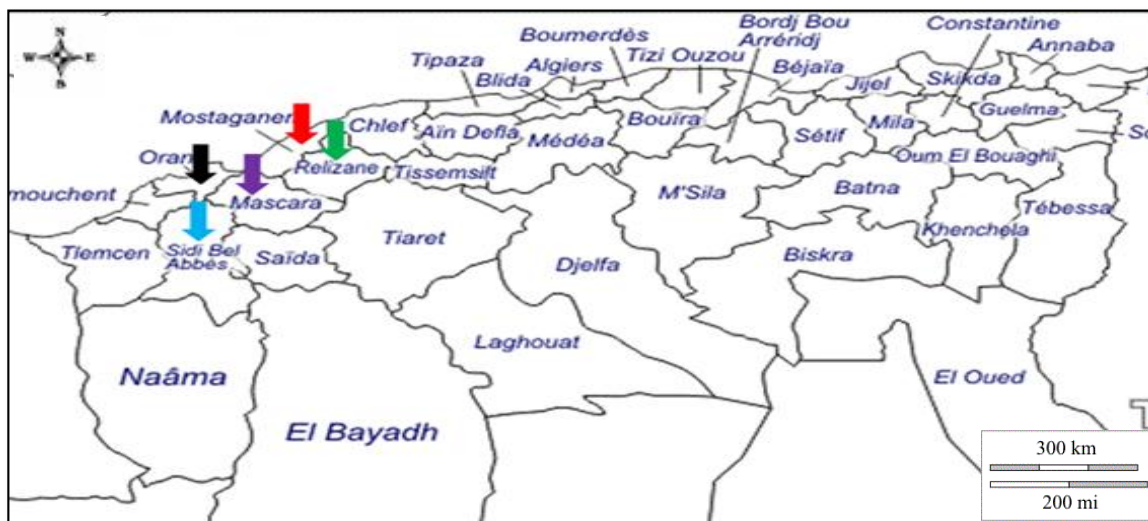


Figure 5 : Zones d'échantillonnage.

↓ Mascara, ↓ Mostaganem, ↓ Oran, ↓ Relizane, ↓ Sidi Bel Abbès

2-Analyses physicochimiques

2.1- Mesure de pH

Le pH du lait a été mesuré par un pH-mètre digital de type InoLab® pH 7110. Le bout de l'électrode du pH- mètre est immergé dans un bécher contenant 10 ml de lait cru. (Aggad et al., 2009).

2.2- Mesure de l'acidité Dornic

L'acidité Dornic a été déterminée en titrant 10 ml de l'échantillon par une solution d'hydroxyde de sodium d'un neuvième de normalité (N/9), la phénolphtaléine (à 1%) a été utilisée comme indicateur coloré virant au rose pâle vers pH = 8,4. Après le virage de la couleur, le volume d'hydroxyde de sodium versé est relevé. L'acidité Dornic est exprimée en degré Dornic (°D) selon la formule suivante : Acidité (°D) = V NaOH × 10 (Aggad et al., 2009).

3-Analyses microbiologiques

3.1-Les dilutions

L'isolement des bactéries a été effectué à partir de 1 ml de chaque échantillon mélangé dans 9 ml de peptone saline (annexe I) dans un tube à essai stérile pour préparer la dilution initiale (1/10). Après avoir tourbillonné fortement la dilution précédente à l'aide d'un vortex, des dilutions décimales appropriées (allant jusqu'à 10⁻⁵) ont été effectuées en transférant 1 ml de la dilution initiale dans 9 ml d'eau péptonée (Bereda et al., 2012; Gargouri et al., 2014; Ventimiglia et al., 2015)

3.2-Recherche et dénombrement des germes de contamination

Pour chaque échantillon, six groupes de bactéries ont été étudiés selon l'arrêté N°35 publié le 27-05-1998 du journal officiel de la république algérienne, (annexe IV) : la flore mésophile aérobie totale à 30°C, les streptocoques fécaux, les coliformes totaux (37°C) et fécaux (44°C), *Staphylococcus aureus* à 37°C et *Clostridium* sulfito-réducteurs à 46 °C.

3.2.1-Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FTAM)

Le nombre total de la flore aérobie mésophile a été déterminé par étalement de 1 ml de la dilution appropriée (de 10⁻¹ jusqu'à 10⁻⁵) sur la gélose tryptone soja avec 6g d'extrait de levure et 20g de glucose (annexe I). Les boîtes ont été incubées en aérobiose à 30°C pendant 48h (Mallet et al., 2012).

Le nombre de colonies obtenues est multiplié par l'inverse de la dilution pour avoir le nombre de germes dans l'échantillon (Bereda et al., 2012). Les résultats ont été exprimés en unités formant colonie par ml de lait (UFC / ml) (Gargouri et al., 2014).

3.2.2-Dénombrement des coliformes

Le dénombrement des coliformes se réalise sur la gélose MacConkey (annexe I), un *inoculum* de chaque dilution a été strié sur ce support par la méthode des cadrans (annexe II). Les boîtes ont été incubées à 37°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux pendant 24 à 48h (Afif et al., 2008).

Des colonies roses avec un halo opaque de la même couleur du à la fermentation du lactose et précipitation des sels biliaries sont considérées comme des coliformes.

3.2.3-Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*

La détection de *Staphylococcus aureus* dans le lait a été effectuée par l'étalement de 1ml des dilutions (jusqu'à 10^{-5}) sur la gélose Chapman (annexe I) et mis à l'incubation à 37°C pendant 24-36h (Desmaures et al., 1997; Al-Zenki et al., 2007; Gargouri et al., 2014).

Des colonies typiques jaunes, de 0.5 à 1mm de taille avec un virage de la couleur du milieu au jaune grâce à l'utilisation de mannitol ont été identifiées comme des *Staphylococcus aureus* (Yves and Michel, 2009)

3.2.4-Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux

La recherche des Streptocoques fécaux nécessite le passage par deux tests consécutifs, un est présomptif et l'autre est confirmatif. Le dénombrement a été réalisé sur le milieu Rothe (annexe I) par l'utilisation de la méthode du nombre le plus probable (annexe II) en utilisant trois tubes pour chaque dilution, l'incubation à 37°C pendant 24 h. Des tubes du milieu Eva-Litsky (annexe I) ont étéensemencés par le contenu de chaque tube positif (solution trouble) et incubés à 37°C pendant 24 h pour confirmer la présence des Streptocoques fécaux (Afif et al., 2008; Hamiroune et al., 2014) .

3.2.5-Recherche et dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs

Des tubes à essai stériles contenant chacun 5ml de dilution appropriée (de 10^{-1} à 10^{-5}) des différents échantillons sont portés à 80°C pendant 10 mn, suivi par refroidissement brutale dans l'eau glacée pour éliminer toutes les formes végétatives et activer les spores de *Clostridium* (Afif et al., 2008; Aggad et al., 2009; Hamiroune et al., 2014).

Deux à trois gouttes d'Alun de fer et 0,5 ml de Sulfite de sodium sont additionnées au milieu viande foie. Après refroidissement du tube, 7 ml de la gélose viande foie obtenue (annexe I) sont ajoutés dans le tube contenant la suspension. Après solidification, quelques gouttes d'huile de paraffine sont ajoutées et les tubes sont incubés à 46°C pendant 24 à 48 h.

Seules les grosses colonies noires ont été considérées comme des *Clostridium* sulfito-réducteurs et ont été comptés (Aggad et al., 2009).

4-Recherche et dénombrement de la flore technologique

4.1-Isolement des bactéries lactiques

L'ensemencement a été effectué à partir des différentes dilutions (10^{-1} à 10^{-5}) par l'étalement de 100 μ L sur la gélose MRS (**De Man, Rogosa et Sharpe., 1960**) et la gélose M17 (**Terzaghi et Sandine., 1975**) (annexe I). Les cultures ainsi réalisées sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24h jusqu'à 72 heures (**Stulova et al., 2010; Ventimiglia et al., 2015; Pacheco Da Silva et al., 2016**). La flore totale est exprimée en UFC/ml.

4.2-Orientation de l'identification des souches

Sur chacune des boîtes servant aux dénombrements, nous classons les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée être représentative parmi celles-ci.

Il a été judicieux de réaliser le test de la catalase, suivi de la coloration de Gram et d'une observation microscopique à l'état frais pour déterminer la mobilité afin de détecter les bactéries lactiques parmi les isolats développés sur les milieux d'isolement. Les critères pris en considération sont les formes macroscopiques des colonies (couleur, bordure, surface et élévation) et aussi les caractéristiques microscopiques (**Mamhoud et al., 2016**).

4.2.1-Etude des caractères morphologiques

Cette étude est focalisée sur des observations macroscopiques et microscopiques permettant de différencier le type de Gram, la forme (coques ou bacilles), le mode d'association cellulaire ainsi que la mobilité (**Henríquez-Aedo et al., 2016**).

4.2.1.1-Examen macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification, les éléments d'identification macroscopiques sont : la forme, la taille, la pigmentation, l'élévation, l'opacité et la surface.

4.2.1.2- Examen microscopique

4.2.1.2.1- Observation à l'état frais

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Une colonie a été prélevée au contact d'une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle et observée sous microscope photonique à 40X (**Denis et Ploy., 2007**).

4.2.1.2.2-Coloration Gram (annexe II)

C'est une coloration double qui permet de déterminer la forme, la pureté et l'arrangement cellulaire. Elle permet aussi de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le

violet de Gentiane en bactéries à Gram positif ou à Gram négatif. L'observation se fait à l'immersion en utilisant l'objectif (x100) (Astier-Théfenne et al., 2014).

4.2.2- Test de la catalase

Ce test consiste à mettre une fraction de la colonie prélevée à l'aide d'une Pipette pasteur en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O₂). Les bactéries lactiques sont en effet dépourvues de cette activité (Lairini et al., 2015).

4.2.3- Recherche du nitrate réductase

Le milieu bouillon nitraté (annexe I) permet d'étudier la capacité des bactéries à réduire le nitrate en nitrite. L'ajout de trois gouttes du réactif de (Griess A) et cinq gouttes du (Griess B) à une culture fraîche incubée à 37°C réalisée sur bouillon nitraté, donne au milieu une coloration rouge si la souche possède le nitrate réductase, si non le milieu reste incolore.

Dans ce cas on ajoute la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase vis à vis des nitrates, le milieu devient rouge si la bactérie ne possède pas cette enzyme, et reste incolore si les nitrates ont été transformés par la bactérie au-delà des nitrites, donc la bactérie possède cette enzyme (Kapil et al., 2013).

4.3-Purification des isolats

Chaque isolat ayant une forme cocci ou bacille, Gram positif, catalase négatif, non mobile est suspecté d'être une bactérie lactique et est purifié par isolement sur le milieu MRS ou M17 gélosé (incubation 48h à 37°C). Des cultures pures issues de ces isolements sont réalisées pour les conserver (Pacheco Da Silva et al., 2016).

4.4-Conservation des isolats

4.4.1-Conservation à courte terme

Des tubes contenant 5 ml de bouillon MRS ou M17 ont étéensemencés par des souches isolées pures puis incubés à 37°C pendant 16 à 18h (over night). Les cultures sont conservées à 4°C et repiquées toutes les deux semaines (Saidi et al., 2002).

4.4.2-Conservation à long terme

Les cellules sont récupérées à partir des cultures jeunes par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min dans des tubes Eppendorf. Au culot, on ajoute 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05 % d'extrait de levure et 0.05 % de glucose) et 30% de glycérol. Les tubes sont conservés à -20°C (Badis et al., 2005; Garabal et al., 2008; Tormo et al., 2015).

4.5-Identification des isolats

4.5.1-Type fermentaire

Ce test différencie les bactéries hétérofermentaires productrices de gaz des homofermentaires qui ne le produisent pas. Des tubes contenant des bouillons MRS ou M17 munis d'une cloche de Durham ont été ensemencés par des suspensions pures et incubés à température ambiante pendant 24 à 48h. Les résultats positifs se traduiraient par le dégagement du gaz à l'intérieur de la cloche (Lairini et al., 2015).

4.5.2-Croissance à différentes températures

Ce test permet de distinguer entre les bactéries thermophiles et les mésophiles. Les bouillons MRS ou M17 ensemencés par les isolats sont incubés à différentes températures : 10°C, 37°C et 45°C. Tout tube présentant un trouble et parfois accompagné d'un précipitât au fond du tube est considéré comme un tube positif (Shehata et al., 2016).

4.5.3-Croissance au pH alcalin ou pH acide

Les bouillons MRS à pH 9.6 et pH 4.6 sont utilisés pour tester la capacité des bactéries à croître, ce qui permet de différencier entre les genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (Okcu et al., 2016).

4.5.4-Croissance sur lait de Sherman

Le bleu de méthylène est décoloré par les germes possédant une activité réductase, cette activité est utilisée pour caractériser les espèces isolées. Les souches testées sont ensemencées dans du lait de Sherman (annexe I) à une concentration de 0.1% et 0.3% de bleu de méthylène puis incubées à 30°C pendant 24 à 48h. Les résultats positifs se traduiraient par une coagulation du lait et une réduction de la couleur (Moulay et al., 2013).

4.5.5-Croissance sur milieu Naylor et Sharpe à 6.5% de NaCl

L'utilisation de ce milieu (annexe I) permet de mettre en évidence la capacité de certaines bactéries de résister à une concentration 6,5% de NaCl, la résistance se caractérise par la formation d'un trouble après 24h d'incubation à 37°C indiquant la croissance de la souche testée (Asurmendi et al., 2015).

4.5.6-Production des composés aromatiques

La production d'acétoïne (acétylméthylcarbinol) est testée sur milieu Clark et Lubs (annexe I). Les souches sont cultivées sur ce milieu à 37°C pendant 24h et après incubation, un test par la réaction de Voges-Proskauer est réalisé (VP1 et VP2). Dans un tube à hémolyse, 2 ml de cette culture sont transvasés, en y ajoutant 0,5 ml d'une solution de soude (NaOH) à 16% dans l'eau distillée (VP1) et 0,5 ml de réactif α -naphtol à 6% dans l'alcool absolu (VP2). La

production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau ou la diffusion de la couleur rose à la surface du milieu (**Guetouache and Guessas, 2015**).

4.5.7-Test de thermorésistance

Ce test permet d'étudier la capacité des souches bactériennes à résister à une température de 63°C pendant 30 min. Le bouillon MRS ensemencé par des souches est soumis à un traitement thermique pendant 30 min puis incubé à 30°C pendant 24 à 48h. La résistance se manifeste par la présence d'un trouble bactérien dans le bouillon (**Badis et al., 2004**).

4.5.8-Activité Citratase

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons (annexe I), qui ne contient que le citrate comme seule source de carbone. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront alors capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu est ensemencée d'une suspension bactérienne, par des stries longitudinales au moyen d'une anse. Seules les bactéries qui bleuissent le milieu après l'incubation possèdent le citrate perméase, et sont dites citrate positif, les autres bactéries sont dites citrate négatif (**Ventimiglia et al., 2015**).

4.5.9-Arginine hydrolase

Le milieu utilisé pour ce test est le M16 BCP (annexe I) (milieu M16 avec un indicateur de pH qui est le pourpre de bromocrésol). Les bactéries qui possèdent l'ADH (Arginine dihydrolase) vont acidifier le milieu en fermentant le lactose (le BCP va virer au jaune), puis en déshydratant l'arginine, elles vont réalcaliniser le milieu et de ce fait la couleur du BCP redeviendra violette. Les bactéries qui ne possèdent pas cette enzyme vont seulement acidifier le milieu (**Okcu et al., 2016**).

Résultats
et
Discussion

1-Les analyses physico-chimiques

1.1-Le pH

Les moyennes des résultats obtenus de pH des différents échantillons sont illustrées dans la figure ci-dessus.

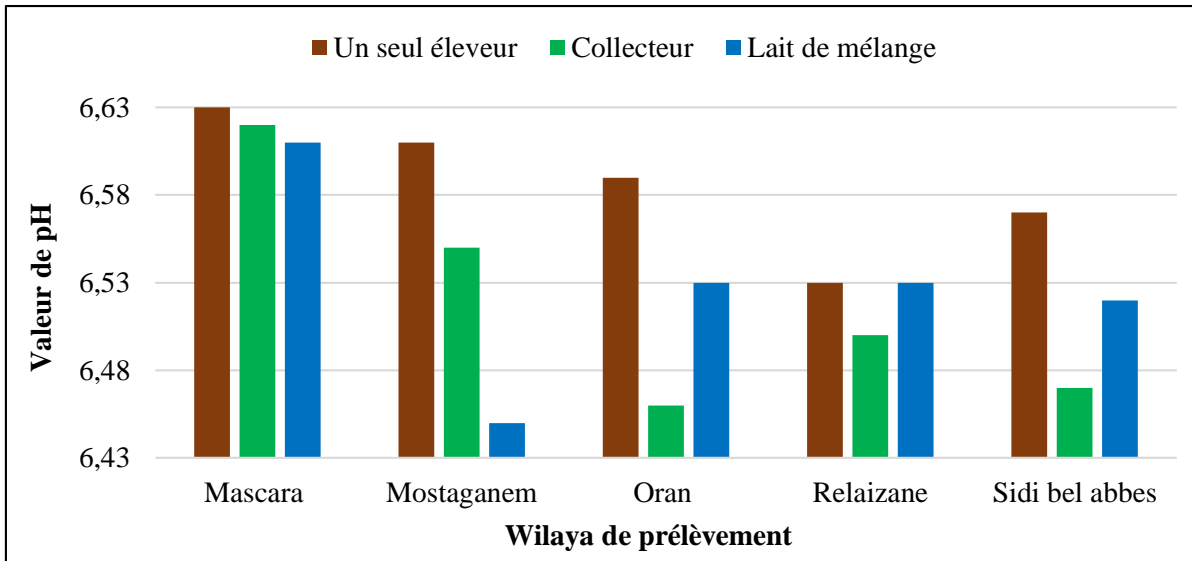


Figure 06 : Les moyennes des résultats de pH des différents échantillons

La gamme de pH pour les échantillons de lait cru de vache était de 6,24 à 6,69 (Tab. XV, annexe III) avec une moyenne de 6,58 ; 6,52 et 6,54 pour le lait d'un éleveur, lait d'un collecteur et le lait de mélange respectivement.

1.2-L'acidité titrable

L'acidité titrable des échantillons variait dans un intervalle allant de 15 à 24°D. La valeur moyenne de l'acidité titrable du lait d'un seul éleveur était de 17.62 ° D, 18 ° D pour le lait de collecteur et pour le lait de mélange, elle est un peu acide par rapport aux deux premières avec une acidité avoisinant les 19° D. La moyenne d'acidité titrable des échantillons (18.2) était élevée par rapport à l'intervalle de l'acidité de lait cru (15-17.5). Ces résultats sont mentionnés dans la figure 7.

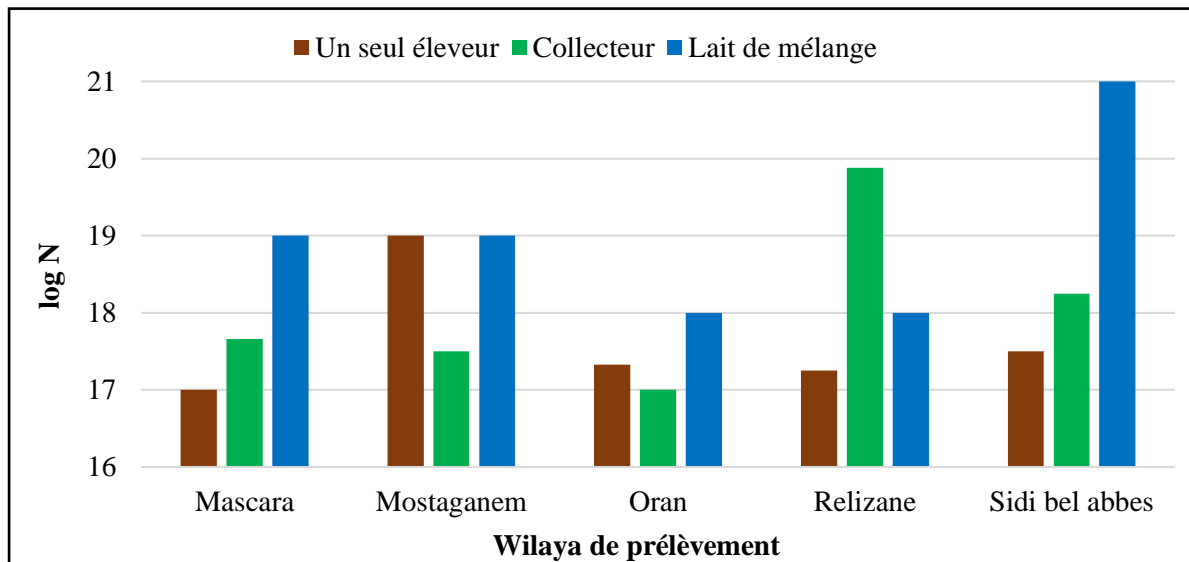


Figure 7 : Les moyennes des résultats d'acidité titrable des différents échantillons

2- Analyses microbiologiques :

Les tableaux IX, X et XI rapportent les dénombrements moyens en UFC/ml des différentes flores investiguées au niveau des échantillons prélevés.

2.1-La flore d'altération

2.1.1-La flore totale aérobie mésophile (FTAM) :

La charge contaminante moyenne de la flore mésophile aérobie totale (FTAM) variait de $1,1 \times 10^6$ à $2,13 \times 10^7$ UFC/ml. Certains échantillons présentaient une charge très élevée (10^8 UFC/ml), notamment ceux de Relizane, et d'autres contiennent une charge inférieure au seuil toléré ($3,2 \times 10^4$) à l'instar de ceux prélevés à Mascara (Fig.8).

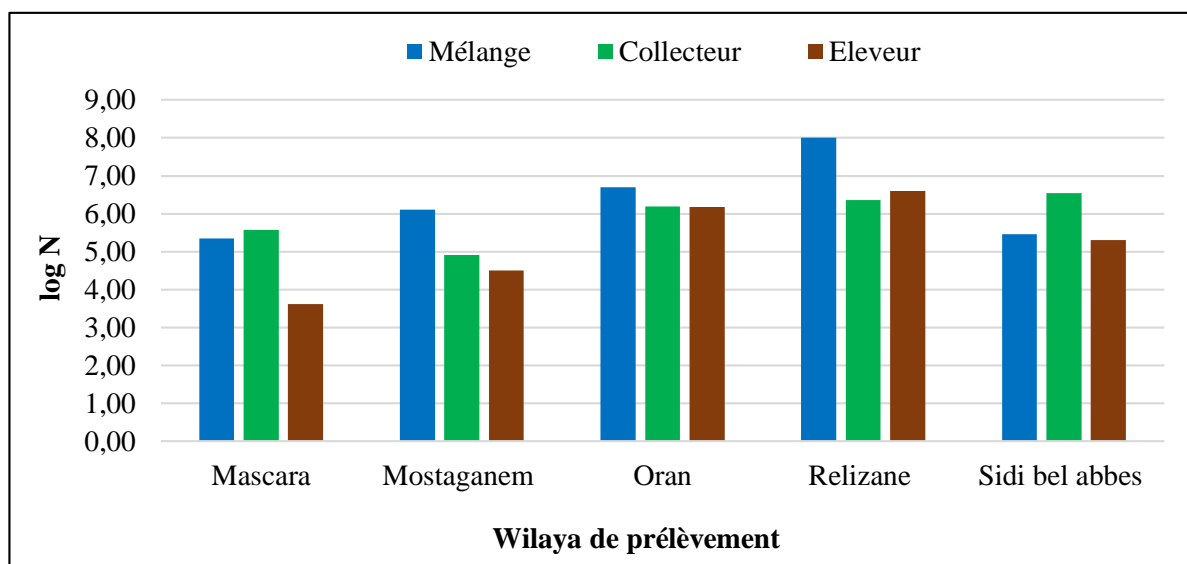


Figure 8 : La charge moyenne de la FTAM

2.1.2- Coliformes totaux et coliforme fécaux

Les coliformes totaux présentent une charge importante dans tous les prélèvements étudiés (Fig.9). La flore fécale était présente dans environ 70% des échantillons étudiés. Leur charge était importante et dépassait de loin les seuils acceptés par la réglementation nationale en vigueur, avec des valeurs variant de $5,88 \times 10^4$ à $2,82 \times 10^5$ (Fig.10). Parmi les échantillons étudiés, 42 % étaient de qualité satisfaisante tenant compte de la charge contaminante constituée par ces germes.

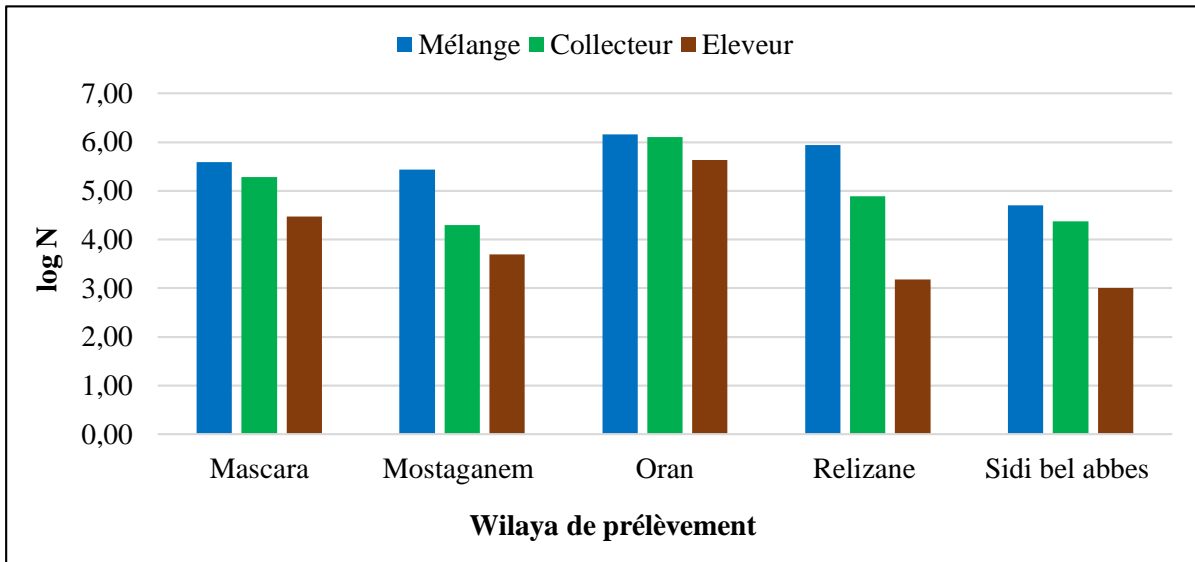


Figure 9 : La charge microbienne moyenne des coliformes totaux

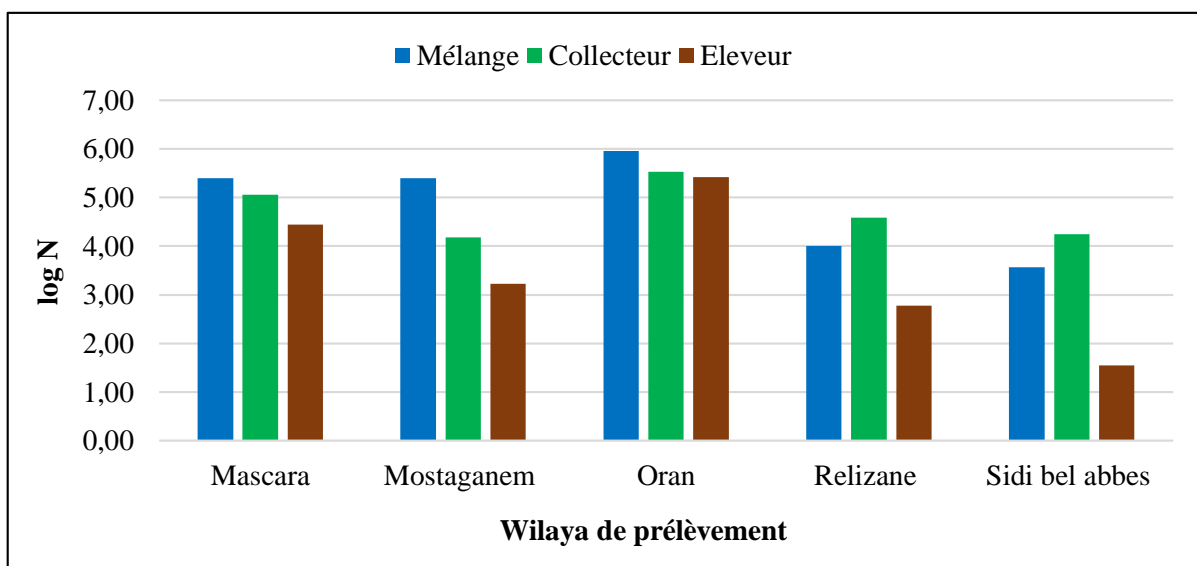


Figure 10 : La charge microbienne moyenne des coliformes fécaux

2.1.3-Streptocoques fécaux

Ces germes présentent une variation importante dans les échantillons étudiés. Totalement absent dans les prélèvements émanants de Sidi Belabbès, ils sont aussi absents dans les échantillons des éleveurs de Mostaganem et Mascara et du mélange de Mascara. Par ailleurs ; ils présentent un dénombrement quasi similaire pour tous les autres échantillons.

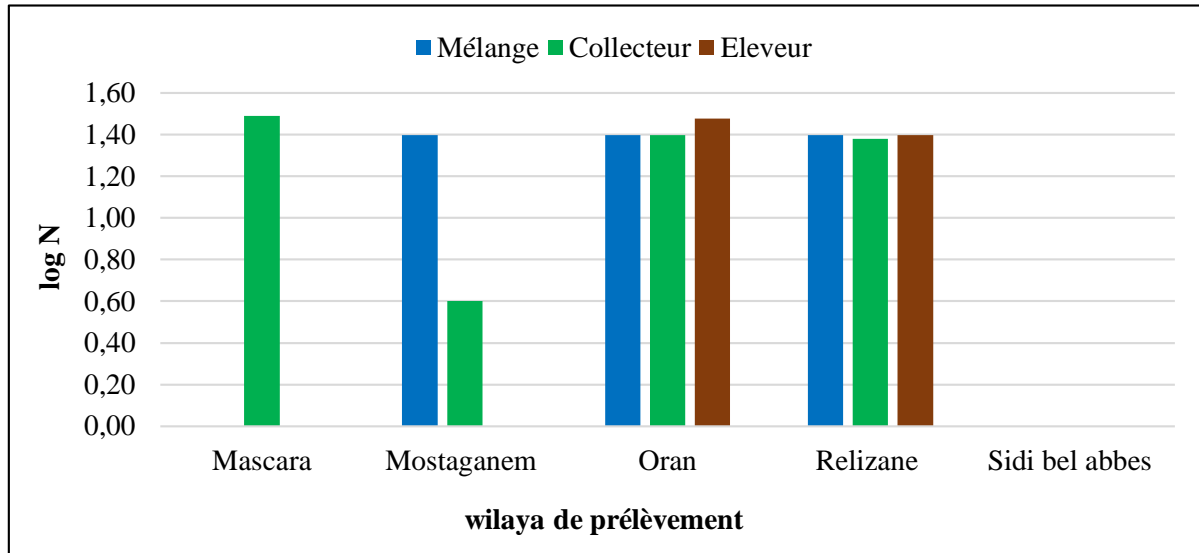


Figure 11 : La charge microbienne moyenne des Streptocoques fécaux

2.2- La flore pathogène

2.2.1- *Staphylococcus aureus*

Les résultats de l'étude de cette espèce pathogène laissent voir que 85,71% des échantillons en étaient contaminés avec une charge variant de $3,16 \times 10^2$ à 2×10^3 . Le lait cru de mélange en était le plus chargé. Les échantillons prélevés au niveau des éleveurs étaient les moins chargés (Fig.12).

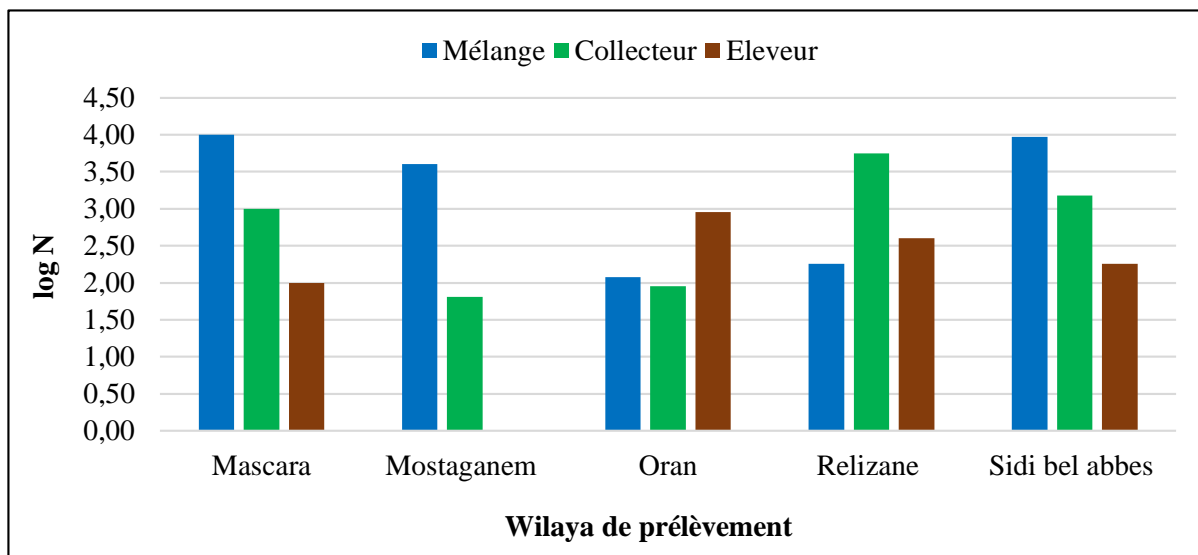


Figure 12 : La charge microbienne moyenne des *Staphylococcus aureus*

2.2.2-*Clostridium* sulfito- réducteur

Les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont présents dans 5,71 % des prélèvements en charge supérieure aux normes, ils ont été décelés dans deux échantillons de mélange. Au niveau de deux échantillons prélevés chez des collecteurs, leur charge était acceptable. Ils ont été par ailleurs absents dans tous les autres prélèvements (Fig13).

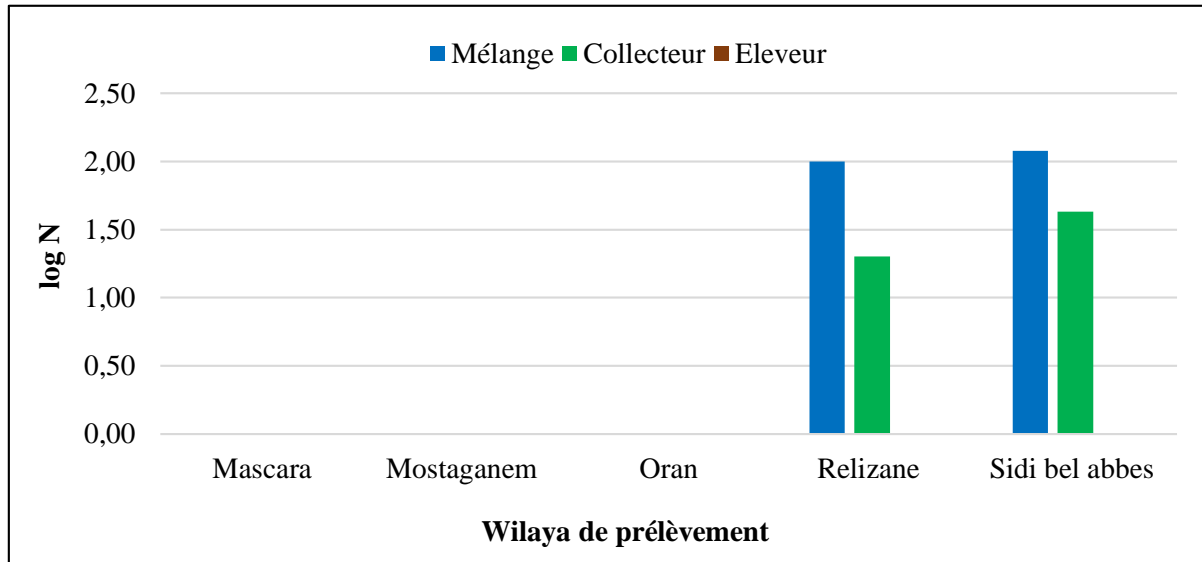


Figure 13 : La charge microbienne moyenne des *Clostridium* sulfito-réducteurs

Tableau IX : Taux de contamination moyens des échantillons de lait de mélange pour les cinq indicateurs bactériens (UFC/ml)

Région	Nombre d'échantillon	Flore mésophile aérobie totale	Coliformes		<i>Staphylococcus aureus</i>	Streptocoques fécaux	<i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs
			Totaux	Fécaux			
Mascara	01	$2.2 \cdot 10^5$	$3.9 \cdot 10^5$	$2.5 \cdot 10^5$	10^4	0	0
Mostaganem	02	$1.3 \cdot 10^6$	$2.75 \cdot 10^5$	$2.5 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^3$	25	0
Oran	01	$4.92 \cdot 10^6$	$1.44 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^5$	$1.2 \cdot 10^2$	25	0
Relizane	01	10^8	$8.8 \cdot 10^5$	10^4	$1.81 \cdot 10^2$	25	100
Sidi bel abbes	01	$2.93 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$3.7 \cdot 10^3$	$9.38 \cdot 10^3$	0	120
Moyenne		$2.13 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^5$	$2.82 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^3$	15	44
NE < CR		0 (0%)	/	0(0%)	0 (0%)	3 (50%)	4 (66.66%)
NE > CR		6 (100%)	/	6 (100%)	6 (100%)	3 (50%)	2 (33.33%)

(NE < CR) : nombre des échantillons qui présentent une charge inférieure au critère légal, (NE > CR) : nombre d'échantillons qui présentent une charge supérieure au critère légal

Tableau X : Taux de contamination moyens des échantillons de lait d'un collecteur pour les cinq indicateurs bactériens (UFC/ml)

Région	Nombre d'échantillon	flore mésophile aérobie totale	Coliformes		<i>Staphylococcus aureus</i>	Streptocoques fécaux	<i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs
			Totaux	Fécaux			
Mascara	03	3.79 10 ⁵	1.9 10 ⁵	1.13 10 ⁵	10 ³	31	0
Mostaganem	02	0.83 10 ⁵	2 10 ⁴	1.5 10 ⁴	65	4	0
Oran	01	1.58 10 ⁶	1.29 10 ⁶	3.4 10 ⁵	90	25	0
Relizane	09	2.32 10 ⁶	7.7 10 ⁴	3.8 10 ⁴	5.6 10 ³	24.5	20
Sidi bel abbes	04	3.55 10 ⁶	2.35 10 ⁴	1.75 10 ⁴	1.5 0 ³	0	43
Moyenne		1.58 10 ⁶	3.2 10 ⁵	10 ⁵	1.6 10 ³	16.9	12.6
NE < CR		3 (15.78%)	/	10 (52.63%)	2 (10.52%)	8 (42.1%)	19 (100%)
NE > CR		16 (84.22%)	/	8 (47.37%)	17 (89.48%)	11 (57.9%)	0

Tableau XI : Taux de contamination moyens des échantillons de lait d'un seul éleveur pour les cinq indicateurs bactériens (UFC/ml)

Région	Nombre d'échantillon	flore mésophile aérobie totale	Coliformes		<i>Staphylococcus aureus</i>	Streptocoques fécaux	<i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs
			Totaux	fécaux			
Mascara	01	4.1 10 ⁴	3 10 ⁴	2.8 10 ⁴	10 ²	0	0
Mostaganem	02	0.32 10 ⁵	5 10 ³	1.7 10 ³	1	0	0
Oran	03	1.5 10 ⁶	4.3 10 ⁵	2.64 10 ⁵	9 10 ²	30	0
Relizane	02	3.93 10 ⁶	1.5 10 ³	0.6 10 ³	4 10 ²	25	0
Sidi bel abbes	02	2 10 ⁵	10 ³	35	1.8 10 ²	0	0
Moyenne		1.1 10 ⁶	9.35 10 ⁴	5.88 10 ⁴	3.16 10 ²	11	0
NE < CR		4 (40%)	/	4 (40%)	3 (30%)	5 (50%)	10 (100%)
NE > CR		6 (60%)	/	6 (60%)	7 (70%)	5 (50%)	0%

3-La flore technologique

3.1-Dénombrement de la flore lactique

Le dénombrement de la flore lactique sur gélose MRS et M17 est effectué selon de **Joffin et leyral (2006)**. Les résultats de dénombrement sont résumés dans le tableau XIII (annexe III) et traduit en histogramme dans la figure 14. Une charge très importante en bactéries lactiques a été enregistrée avec une moyenne de $1,46 \times 10^6$, on note qu'elle était supérieure sur la gélose M17 ($2,39 \times 10^6$) par rapport au milieu MRS ($0,54 \times 10^6$), et généralement plus importante sur le lait de mélange par rapport au lait des collecteurs et des éleveurs.

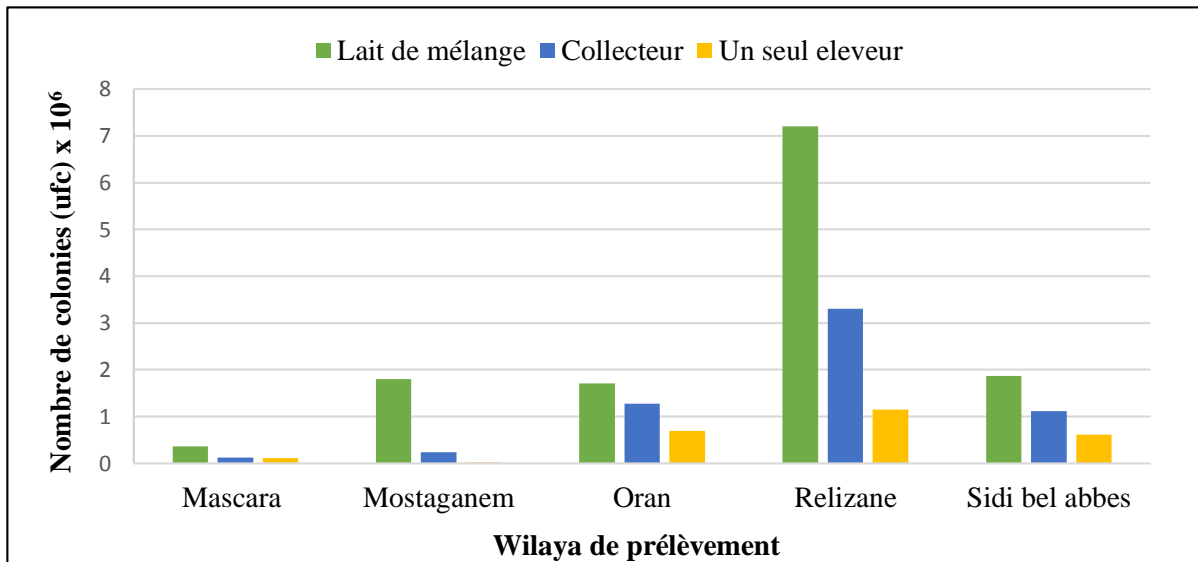


Figure 14 : Estimation du nombre total (UFC) des bactéries lactiques

3.2-Purification des bactéries

A partir des différentes colonies isolées sur le milieu MRS et M17, depuis les trente-cinq échantillons, 65 isolats répondant aux caractères macroscopiques (couleur, formes et aspect) et microscopiques des bactéries lactiques ont été identifiés autant que tel. Ils présentent un Gram positif (annexe III), ils sont immobiles sous forme de coques ou de bacilles et sont catalase négatifs. Ces isolats ont été purifiés et conservés pour l'identification biochimique.



Figure 15 : Aspect macroscopique des bactéries lactique après purification sur gélose

A : M17

B : MRS

3.3-L'identification des bactéries lactiques

La première identification est complétée par d'autres tests sur l'aptitude des souches de se développer dans différentes conditions de culture, telles que la croissance à pH alcalin et acide ; en concentration 6,5 % de NaCl ; la croissance à différentes températures ; dans le bleu de méthylène en plus de la capacité de la production d'acétone, de CO₂ et la recherche d'arginine dihydrolase (ADH).

3.3.1-Identification préliminaire

3.3.1.1-Aspect macroscopique

Les isolats obtenus après la purification présentaient des colonies avec différents aspects macroscopiques (annexe III) en termes de la forme, la taille et la pigmentation.

3.3.1.2-Aspect microscopiques

65 isolats avec différents aspects microscopiques ont été déterminés ; il s'agit de bactéries Gram positives, immobiles, des coques, bacilles ou coccobacilles. Les résultats de cette observation sont présentés dans le tableau XIV (annexe III). (Fig.16 et 17)

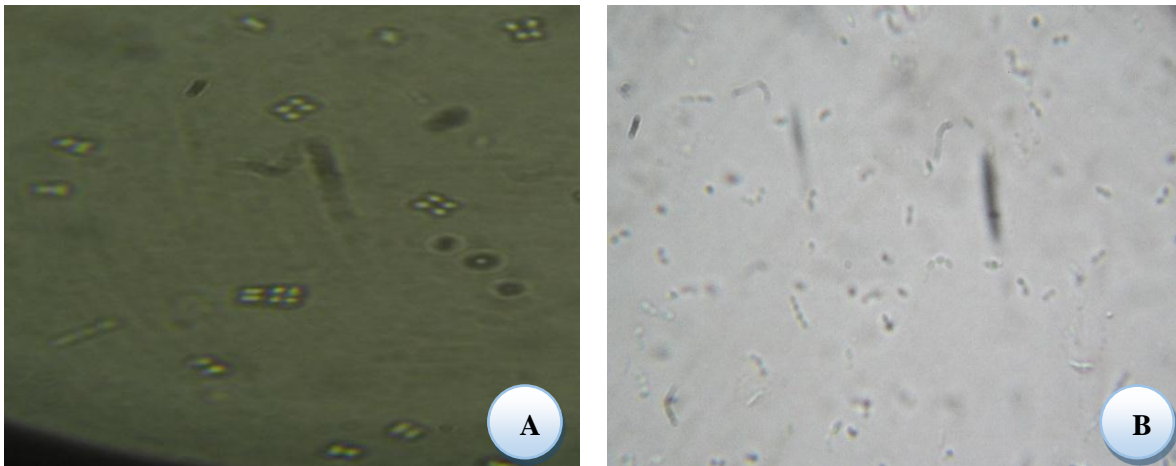


Figure 16 : Observation microscopique à l'état frais (Grossissement 40 X)

A : Souche BL B23

B : Souche BL B22

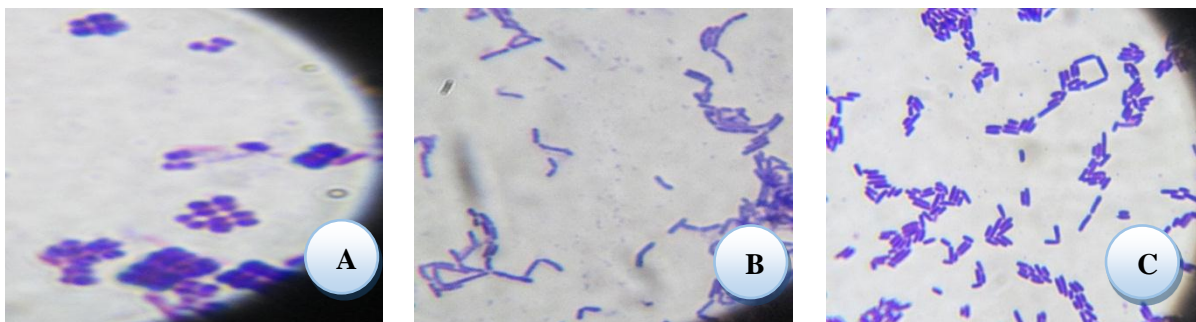


Figure 17 : Aspect microscopique après coloration Gram (Grossissement 100 X)

A : Souche BL B60

B : Souche BL B59

C : Souche BL R23

3.3.1.3-Activité catalase

Tous les souches isolées sont incapables de dégrader l'eau oxygénée (H₂O₂), donc ne possédant pas l'enzyme catalase. Ces résultats laissent supposer que les bactéries isolées sont des bactéries lactiques.

3.3.1.4-Test de nitrate réductase

L'absence de virage de la couleur du milieu au rouge sauf après l'addition de la poudre du zinc indique que le nitrate a réagi avec ce réactif. Parmi les soixante-cinq isolats, aucun résultat positif n'a été enregistré, donc ces souches ne sont pas capables de réduire le nitrate.

3.3.2-Identification du genre

Lors de la purification, quatre-vingt-dix isolats issus de trente-cinq échantillons de laits crus des vaches ont été retenus. A partir de ces isolats, soixante-cinq sont considérés comme des bactéries lactiques, tous sont Gram positif, catalase négatifs et immobiles. Cinquante-un isolats (78.46 %) ont une forme de coque (diplocoques ou chaînes) représentés éventuellement par *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. Les isolats du genre *Lactobacillus* qui ont une forme bacille représentent 21,54 % (quatorze isolats) de l'effectif total (Tab. XII)

La croissance à pH 9,6 (Fig.18) et en présence de 6,5 % de NaCl (Fig.19) nous a permis de différencier les lactocoques des entérocoques. Ces derniers sont homofermentaires et sont capables de pousser à 45 °C, à pH 9,6 et en présence de 6,5 % de NaCl, ils représentent 27,69% des souches (18 souches parmi 65).

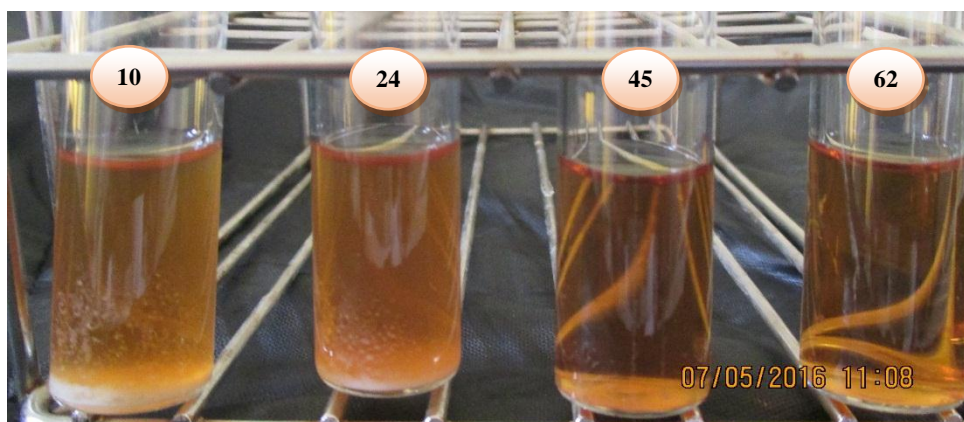


Figure 18 : Résultat du test de croissance dans milieu MRS à pH = 9.6

Tubes 10 et 24 : résultat positif

Tubes 45 et 62 : résultat négatif

Tandis que douze isolats ne peuvent pas de se développer dans ces conditions et sont de ce fait considérés comme des lactocoques.

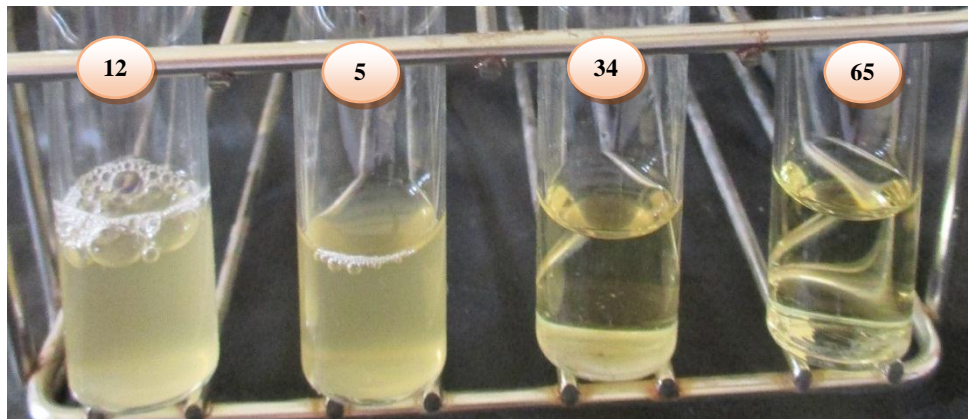


Figure 19 : Résultat du test de croissance à 6.5% de NaCl

Tubes 12 et 58 : résultat positif

Tubes 34 et : résultat négatif

L'hydrolyse de l'arginine permet d'identifier *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* qui est ADH⁺ (10 souches) de *Lactococcus lactis* subsp. *Crémoris* qui est ADH⁻ (02 souches).

L'utilisation du citrate comme une seule source de carbone (Fig.20) et la production d'acétoïne (Fig.21) caractérisent *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetylactis* (une seule souche) (Tube n°35)

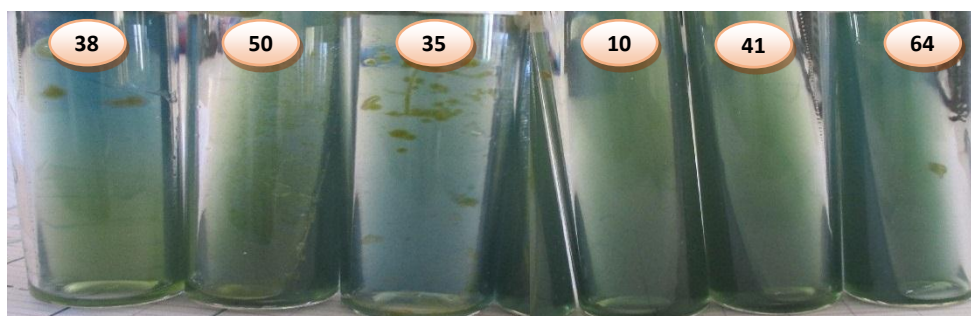


Figure 20 : Résultat du test d'activité citratase.

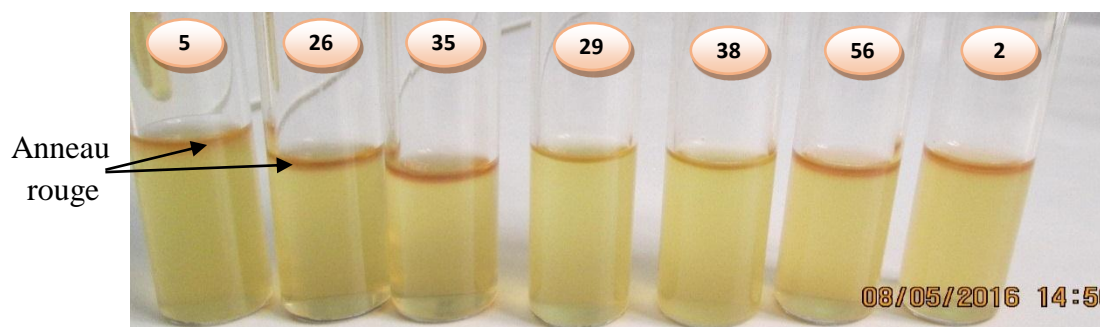


Figure 21 : Résultat du test de production d'acétoïne.

La production de gaz (CO₂) et l'incapacité d'hydrolyser l'arginine ainsi que la croissance à 10°C et 45°C permettent d'identifier *Leuconostoc* (08 souches).

Douze souches sont considérées comme des Streptocoques, elles se caractérisent par l'incapacité de se développer en milieu Sherman (Fig.22) et à pH 9.6 mais elles supportent la température 45°C.

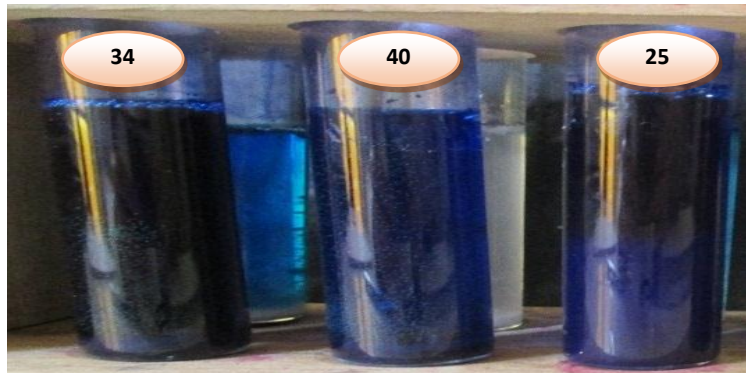


Figure 22 : Résultat du test de de croissance dans le lait de Sherman.

La forme des cellules et les résultats des tests de la croissance à différentes températures, la recherche du type fermentaire et l'hydrolyse de l'arginine (Fig.23) permettent de classer les isolats appartenant au genre *Lactobacillus* en trois groupes : bâtonnets homofermentaires mésophiles (02 souches), bâtonnets homofermentaires thermophiles (11 souches) et des bâtonnets hétérofermentaires mésophiles (une seule souche).

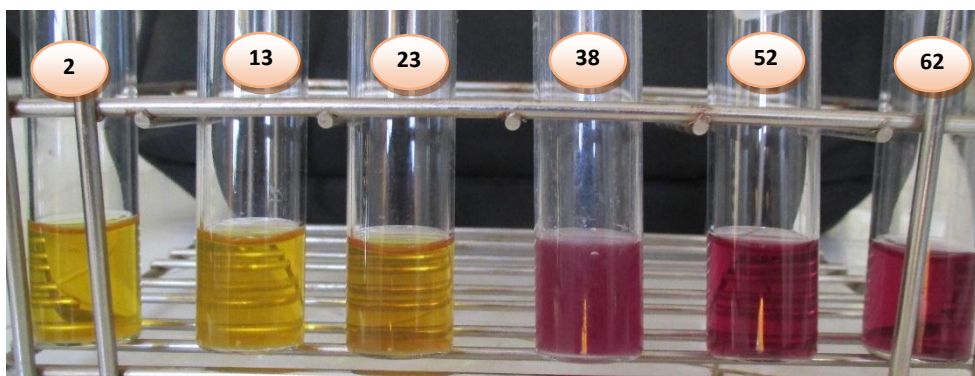


Figure 23 : Résultat du test d'hydrolyse d'arginine

Tableau XII : Résultats des tests d'identification des souches isolées

Souche	Type fermentaire	Croissance à 6.5% de NaCl	Nitrate réductase	pH=4,6	pH=9,6	Production d'acétone	Lait de Sherman à 1%	Lait de Sherman à 3%	Citrate	Thermorésistante	T=10°C	T=30°C	T=45°C	ADH	Genre présumé
BL M1	Homo	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>Enterococcus</i>
BL M3	Homo	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Enterococcus</i>
BL M7	Homo	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Enterococcus</i>
BL O10	Homo	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL M16	Homo	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
BL M19	Homo	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL M20	Homo	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL M21	Homo	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL M24	Homo	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL M26	Homo	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL M28	Homo	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Enterococcus</i>
BL M30	Homo	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL M31	Homo	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL M32	Homo	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL M33	Homo	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL R40	Homo	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i>
BL R47	Homo	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
BL R57	Homo	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	<i>Enterococcus</i>
BL M2	Homo	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	<i>Streptococcus</i>
BL M8	Homo	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
BL M17	Homo	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	<i>Streptococcus</i>
BL M18	Homo	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Streptococcus</i>
BL M22	Homo	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Streptococcus</i>
BL M25	Homo	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	<i>Streptococcus</i>

BL M27	Homo	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	<i>Streptococcus</i>
BL R42	Homo	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Streptococcus</i>
BL R43	Homo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
BL R44	Homo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Streptococcus</i>
BL R62	Homo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Streptococcus</i>
BL R64	Homo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>Streptococcus</i>
BL M4	Homo	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
BL M5	Homo	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL M6	Homo	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL O12	Homo	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL O15	Hétéro	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
BL R37	Homo	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL R38	Hétéro	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i>
BL R39	Homo	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL R45	Homo	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL R46	Homo	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL R56	Homo	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL R58	Homo	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL R59	Homo	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
BL R60	Homo	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
BL O9	Homo	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Lactococcus</i>
BL O11	Homo	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus</i>
BL O14	Homo	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
BL M29	Homo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	<i>Lactococcus</i>
BL M34	Homo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	<i>Lactococcus</i>
BL R35	Homo	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>Lactococcus</i>
BL R41	Homo	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus</i>
BL R51	Homo	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Lactococcus</i>
BL R52	Homo	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus</i>
BL R53	Homo	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	<i>Lactococcus</i>
BL R61	Homo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	<i>Lactococcus</i>
BL R63	Homo	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	<i>Lactococcus</i>
BL O13	Hétéro	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>

BL R36	Hétéro	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
BL R48	Hétéro	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
BL R49	Hétéro	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
BL R50	Hétéro	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
BL R54	Hétéro	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
BL R55	Hétéro	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
BL R65	Hétéro	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Leuconostoc</i>
BL M23	Homo	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>Pediococcus</i>

3.4- Distribution des genres

D'après les résultats d'isolement des bactéries lactiques à partir des laits crus, il apparaît que la majorité des souches sont des cocci (78,46 %). Elles sont dispersées selon un ordre décroissant en cinq genres : *Enterococcus* (27,69 %), *Streptococcus* (18,46 %), *Lactococcus* 18,46 %), *Leuconostoc* (12,3 %) et *Pediococcus* (1,53 %). Les *Lactobacillus* représentent 21,54% des souches isolées (Fig.27).

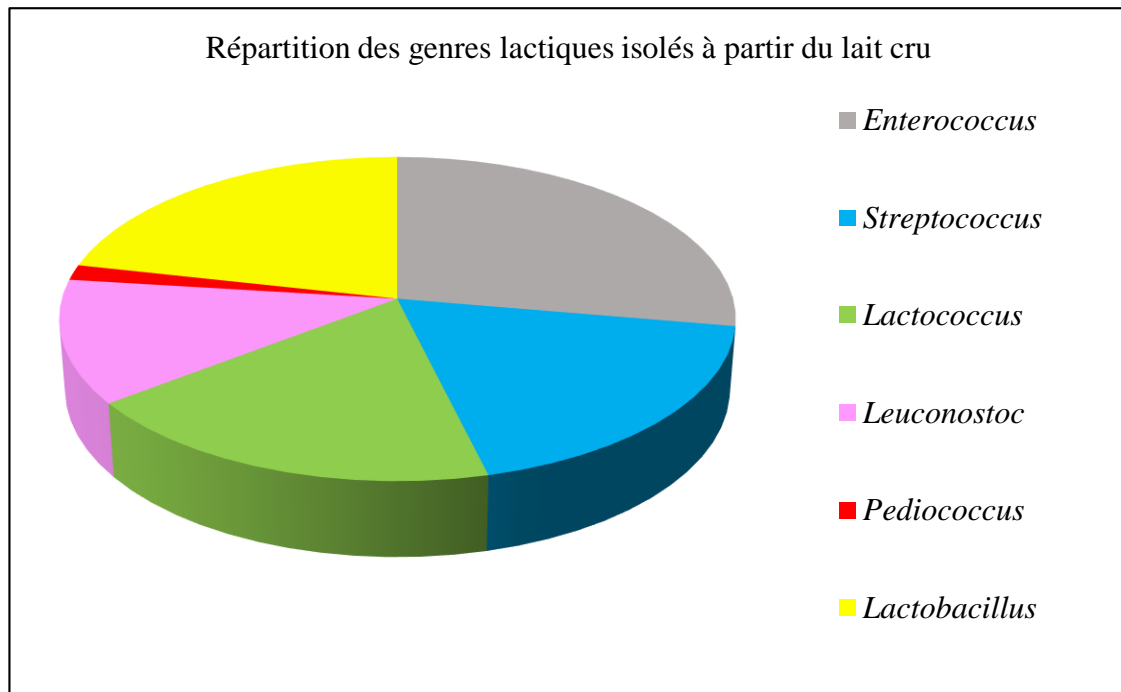


Figure 24 : Distribution des genres des isolats lactiques (%)

Discussion

Les résultats des analyses physicochimiques des échantillons de lait cru prélevés dans les différentes zones d'étude montrent des valeurs de pH variant de 6,24 à 6,69. Ces résultats demeurent globalement acceptables même si les valeurs inférieures à 6,5 pourraient indiquer un début d'acidification due soit à un début d'activité fermentaire soit à la présence de certains acides organiques résultant du métabolisme bactérien (**Labioui et al., 2009**). Dans les conditions normales de traite, de collecte, de transport et de réception, ces valeurs sont acceptables et corroborent les résultats certains travaux réalisés en Algérie. (**Labioui et al., 2009 ; Sboui et al., 2010**),

Les valeurs d'acidité Dornic relevées sur les échantillons étudiés varient entre 15 et 24°D. Les valeurs élevées (dépassant 19°D) indiquent une concentration importante de l'acide lactique produit par la fermentation du lactose par les bactéries lactiques présentes dans le lait (**Quigley et al., 2013**). Le niveau d'acidité est un indice de la fraîcheur du lait et permet aussi de déterminer l'aptitude technologique de cette denrée alimentaire (**Czerniewicz et al., 2006**). Les échantillons étudiés sont globalement acceptables par rapport à ce paramètre, même si il s'avère que 7 échantillons présentent des valeurs élevées (20 et 24°D) qui peuvent s'expliquer par une activité fermentaire importante due à une charge microbienne élevée (**Labioui et al., 2009**), confirmée par les résultats des analyses microbiologiques que nous avons réalisés (Tab.XV, annexe III).

La qualité bactériologique du lait a été appréciée selon les critères algériens relatifs aux spécifications microbiologiques de lait cru (**Journal officiel de la république Algérienne**). C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à la FTAM, Coliformes Fécaux et totaux, *Staphylococcus aureus*, Streptocoques fécaux et les clostridium sulfito-réducteurs.

La flore mésophile aérobie totale est un bon indicateur de contamination globale, elle renseigne sur la qualité hygiénique du lait cru (**Hadrya et al., 2012**). Les résultats obtenus pour la FTAM indiquent que sept (07) échantillons seulement présentaient une charge inférieure au seuil acceptable de 10^5 , il s'avère que ce sont des échantillons prélevés auprès des éleveurs et de collecteurs. Ce fait pourrait s'expliquer par des pratiques hygiéniques de traite, de transport et de collecte (**Torkar and Teger, 2008**). Tous les autres échantillons étaient hautement contaminés, notamment les laits de mélange. Ceci pourrait s'expliquer par des pratiques insalubres de la part des intervenants dans la traite, la collecte et la réception du lait cru. Le fait de mélanger les laits de différentes origines pourrait accentuer ce phénomène de forte contamination microbienne (**Aggad et al., 2009**). D'autres chercheurs, **Ghazi et Niar (2011)**

et **Hamiroune et al., (2014)** ont retrouvés la même tendance de contamination au niveau des échantillons qu'ils ont étudiés.

La moyenne des dénombrements des coliformes fécaux isolés à partir des différents échantillons est de $1,44 \times 10^5$ UFC/ml, ce qui démontre un taux de contamination élevé. Parmi les échantillons étudiés seulement 14 présentent une charge inférieure au critère légal. Cette tendance est vérifiée par les travaux de **Affif et al., (2008)** mais reste supérieure aux résultats avancés par **Yabrir et al., (2013)** avec moyenne de $1,5 \times 10^4$ UFC/ml.

La présence des coliformes fécaux est un indicateur d'une contamination fécale (**Mallet et al., 2013; Sissao et al., 2015**), qui provient de l'environnement des vaches (**Elmoslemany et al., 2010**). Leur charge dépend du degrés de la pollution produite par les matières fécales (**Mallet et al., 2013; Sissao et al., 2015**), et est accentuée par des pratiques inappropriées de nettoyage des ustensiles utilisés lors de la production, le stockage et le transport du lait (**Elmoslemany et al., 2010**).

Les valeurs de la charge en *Staphylococcus aureus* enregistrées sur les prélèvements étudiés laissent voir que 5 échantillons seulement répondent à la norme d'absence de ce germe dans le lait cru soit 14%. Tous les autres échantillons, 86% présentent des charges importantes de ce germe pathogène inhérent à l'animal et le plus souvent responsable des mammites des vaches laitières (**Sissao et al., 2015**).

La présence de staphylocoques dans le lait peut avoir deux origines principales, soit elle résulte d'une contamination primaire (**Mubarack et al., 2010**), due à la présence dans un troupeau de mammites à *Staphylococcus aureus*, soit c'est une contamination humaine. Ce germe provoque des intoxications alimentaires par ingestion des toxines qu'il secrète, ces dernières ne sont détruites ni par la pasteurisation du lait, ni au cours de l'affinage du fromage (**Thieulin, et al., 1966**), même si une bonne pasteurisation suffirait à éliminer le germe en lui-même (**Sissao et al., 2015**).

Les résultats obtenus rejoignent ceux publiés par **Gargouri et al., (2014)** sur l'évaluation de la qualité du lait tunisien dans les troupeaux laitiers., et s'approchent aussi des résultats trouvés par **Hamiroune et al., (2014)** (moyenne de $0,9 \times 10^3$ UFC/ml). Ils restent toutefois, inférieurs à ceux trouvés par **Affif et al., (2008)** avec 8×10^4 UFC/ml de moyenne.

L'étude de la flore d'altération représentée par les Streptocoques fécaux, montre que 19 échantillons en sont pourvus, alors que la législation nationale stipule qu'ils ne doivent pas exister dans 0,1ml de lait. Cependant, il s'avère que les laits contaminés sont surtout ceux prélevés chez les collecteurs, ce qui pourrait s'expliquer par des manipulations non hygiéniques du lait collecté, même si l'origine de la contamination pourrait aussi se situer au niveau de la

traite (**Waes, 1973**). Toutefois, les niveaux de contaminations par ces germes dans les échantillons étudiés restent très faibles par rapport à ceux cités par **Hayes (2001)**, **Ounine et al., (2004)** et **Seme et al., (2015)**.

L'absence totale des clostridiiums sulfite réducteurs ou leur présence à un niveau inférieur au seuil toléré dans trente-trois échantillons (94,29%) indique l'absence d'une contamination extérieure due aux mauvaises pratiques de production du lait cru, sachant que ces germes peuvent se trouver dans l'ensilage et dans l'environnement immédiat des animaux et sont essentiellement abrités par leur tractus intestinal (**Dréan et al., 2015**), de plus il est considérée que cette contamination intervient essentiellement lors de la traite (**Brandle et al., 2016**). La moyenne de contamination des échantillons par ces bactéries est de 18,6 UFC/ml dans lesquels seulement deux échantillons présentent une charge supérieure au seuil toléré de 50 UFC/ml. Le recours à l'ensilage observé ces derniers temps dans la région ouest du pays pourrait expliquer la présence de ce germe à des taux élevés dans certains échantillons. Il est par ailleurs à noter, que dans la plupart des travaux de recherches, ces germes sont considérés comme des germes d'altération et non comme des germes pathogènes dans le lait (**Quigley et al., 2013**).

Les résultats obtenus présentent la même tendance que ceux trouvées par **Farougou et al., (2011)** et **Hamiroune et al., (2014)**. **Aggad et al., (2009)** ont avancé des taux de contamination plus élevés.

Selon **Frank et Hassan (2002)**, le lait dans la partie supérieure de la mamelle est toujours un liquide stérile. Il devient mature par la suite au contact de l'environnement extérieur (**Mallet et al., 2013**). L'air ambiant du lieu de la traite (**Vacheyrou et al., 2011**), les trayons de l'animal (**Verdier-Metz et al., 2012**) et la machine à traire (**Mallet et al., 2013**) présentent les principaux réservoirs potentiels en contact direct avec le lait et sont les majeurs facteurs de la qualité des laits crus.

Les valeurs de la charge de laits crus en bactéries lactiques est de 3×10^4 à $1,52 \times 10^7$ UFC/ml, avec une moyenne de $1,46 \times 10^6$ UFC/ml, cette charge est plus importante que celle trouvée par **Labioui et al., (2009)** avec une moyenne de $8,32 \times 10^5$ UFC/ml.

Conclusion

Conclusion

Le travail entrepris pour l'étude des paramètres physicochimiques et microbiologiques sur 35 échantillons de lait cru de vache prélevés à travers 5 wilayas de l'ouest algérien à trois niveaux du circuit de production, de la collecte et de la réception nous a permis de toucher au plus près à la réalité des conséquences des pratiques de production, de collecte et de réception de cette denrée alimentaire.

Même si les paramètres de pH et d'acidité sont plutôt acceptables, en relation avec le respect de la chaîne de froid, les résultats des analyses microbiologiques laissent voir des valeurs qui dans l'ensemble dépassent légèrement les normes microbiologiques nationales d'acceptabilité de cette denrée alimentaire très sensible, tenant compte tenu de la charge contaminante (FTAM, flore d'altération et flore pathogène). Cet état de fait peut se corriger technologiquement par l'application d'un bon barème de pasteurisation. L'étude de la flore utile, révèle une richesse en bactéries lactiques d'intérêt technologique représentée par 6 genres lactiques dans une diversité qui respecte la composition de la flore indigène du lait cru de vache.

Le travail entrepris, mérite d'être continué en s'intéressant à la flore fongique d'intérêt technologique, et au devenir de la charge microbienne originale du lait cru dans le produit final tout en intégrant les méthodes moléculaires d'identification des espèces microbiennes.

Références

Bibliographiques

A

Afif, A., Faid, M., Chigr, F., and Najimi, M. (2008). Survey of the microbiological quality of the raw cow milk in the Tadla area of Morocco. *International Journal of Dairy Technology* **61**, 340-346.

Albenzio, Marzia, Santillo, Antonella, Caroprese, Mariangela, Marino, Rosaria, Centoducati, Pasquale, Sevi et Agostino (2005). Effect of different ventilation regimens on ewes' milk and Canestrato Pugliese cheese quality in summer, Cambridge University Press, Cambridge, ROYAUME-UNI.

Aggad, H., Mahouz, F., Ahmed Ammar, Y., and Kihal, M. (2009). Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Rev Méd Vét* **160**, 590-595.

Al-Zenki, S. F., Al-Mazeedi, H. M., Al-Hooti, S. N., Al-Atti, T., Al-Mutawah, Q., Alomirah, H. F., and Sidhu, J. S. (2007). Quality and safety characteristics of milk sold in the state of Kuwait. *Journal of Food Processing and Preservation* **31**, 702-713.

Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P., Simpson, R. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et d'analyse du lait. In : science et technologie du lait. Vignola C.L. 2^{ème} ed. France; 1-73.

Amor, K. B., Vaughan, E. E., and de Vos, W. M. (2007). Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *The Journal of nutrition* **137**, 741S-747S.

Arrêté interministériel du 25 janvier 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées. Ministère du commerce. JORADP N°35, 1998, Algérie

Astier-Théfenne, H., Wolf, A., Darles, C., and Garnotel, É. (2014). Vérification des performances d'une méthode selon le SH FORM 44 : application à la coloration de Gram. *Revue Francophone des Laboratoires* **2014**, 37-46.

Asurmendi, P., García, M. J., Pascual, L., and Barberis, L. (2015). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* by lactic acid bacteria isolated from brewer's grains used as feedstuff in Argentina. *Journal of Stored Products Research* **61**, 27-31.

B

Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemâa, B., Henni, D. E., Tornadijo, M. E., and Kihal, M. (2004). Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology* **21**, 343-349.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., and Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabes et kabyles". *Sciences & Technologie C*, 30-37.

Bereda, A., Yilma, Z., and Nurfeta, A. (2012). Hygienic and microbial quality of raw whole cow's milk produced in Ezha district of the Gurage zone, Southern Ethiopia. *Wudpecker Journal of Agricultural Research* **1**, 459.

Berthier, F., and Ehrlich, S. D. (1999). Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **49**, 997-1007.

Brändle, J., Domig, K. J., and Kneifel, W. (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control* **67**, 96-113.

Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A. M., Cailliez-Grimal, C., and Gaiani, C. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science* **213**, 21-35.

C

Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Crémoux, R., and Montel, M.-C. (2007). Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Systematic and Applied Microbiology* **30**, 547-560.

Claeys, L.W., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y., Herman, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* **31**, 251-262

Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., 2008. Dairy products. In: Cocolin, L., Ercolini, D. (Eds.), *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer, New York, pp. 31-90.

Croguennec, T., Jeantet, R., Brulé, G. (2008). Fondements physicochimiques de la technologie laitière. TEC & DOC-Lavoisier. Paris.161p.

Czerniewicz M, Kruk A, Kietczewska K. (2006). Storage stability of raw milk subjected to vibration. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **15/56**, 65–70.

D

Daniel, C., Roussel, Y., Kleerebezem, M., and Pot, B. (2011). Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. *Trends in Biotechnology* **29**, 499-508.

Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.-L., Barbier, G., and Le Blay, G. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology* **151**, 247-251.

Denis, F., Ploy, M.C. (2007). Bactériologie médicale : *techniques* usuelles Elsevier Masson, 573 pages.

Descheemaeker, P., Lammens, C., Pot, B., Vandamme, P., and Goossens, H. (1997). Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **47**, 555-561.

Desmaures, N., Bazin, F., and Gueguen, M. (1997). Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of applied microbiology* **83**, 53-58.

Dréan, P., McAuley, C. M., Moore, S. C., Fegan, N., and Fox, E. M. (2015). Characterization of the spore-forming *Bacillus cereus* sensu lato group and *Clostridium perfringens* bacteria isolated from the Australian dairy farm environment. *BMC microbiology* **15**, 1.

E

Eigel, WN., Butler, JE., Ernstrom, CA., Farrell, HMJr., Harwalkar, VR., Jenness, R., Withney, RM. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *J dairy Sci*, **67**: 1599-1631

Elmoslemany, A. M., Keefe, G. P., Dohoo, I. R., Wichtel, J. J., Stryhn, H., and Dingwell, R. T. (2010). The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Prev Vet Med* **95**, 32-40.

Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., and Villani, F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol* **26**, 228-31.

F

Farhan M., Salik S., 2007. Evaluation of Bacteriological Contamination in Raw (unprocessd) Milk sold in different region of Lahore (Pakistan), *journal of agriculture & social science*, **3**: 104-106

Farougou S., Kpodekon T.M., Sessou P., Youssao I., Boko C., Yehouenou B., Sohounhloue D. Qualité microbiologique du lait cru de vache élevée en milieu extensif au Bénin. In : Université d'Abomey-Calavi, Acte du 3e colloque des sciences, cultures et technologies de l'UAC-Bénin, Akassato, 6-10 juin 2011, 2011, 323-336.

Fédération international du lait, 2013.

Frank, J. F., and Hassan, A. N. (2002). Microorganisms associated with milk A2 - Roginski, Hubert. In "Encyclopedia of Dairy Sciences", pp. 1786-1796. Elsevier, Oxford.

G

Gancheva, A., Pot, B., Vanhonacker, K., Hoste, B., and Kersters, K. (1999). A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *Systematic and applied microbiology* **22**, 573-585.

Garabal, J. I., Rodríguez-Alonso, P., and Centeno, J. A. (2008). Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). *LWT - Food Science and Technology* **41**, 1452-1458.

Gargouri, A., Hamed, H., Ben Ali, B., Elfeki, A., and Gdoura, R. (2014). Evaluation of Tunisian milk quality in dairy herds: Inter-relationship between chemical, physical and hygienic criteria. *Animal Science Journal* **85**, 714-721.

Gevers, D. (2002). Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages, Ghent University.

Gevers, D., Huys, G., and Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* **205**, 31-36.

Ghazi, K., and Niar, A. (2011). Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la Wilaya de Tiaret (Algérie). *Tropicultura* **29**, 193-196.

Gueguen, L. (1979). Apports minéraux par le lait et les produits laitiers. *Cah. Nutr. Diet.*, **3** : 213-217.

Guetouache, M., and Guessas, B. (2015). Characterization and identification of lactic acid bacteria isolated from traditional cheese (Klila) prepared from cows milk. *African Journal of Microbiology Research* **9**, 71-77.

H

Hadrya, F., El Ouardi, A., Hami, H., Soulaymani, A., and Senouci, S. (2012). Évaluation de la qualité microbiologique des produits laitiers commercialisés dans la région de Rabat-Salé-Zemmour-Zaer au Maroc. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **47**, 303-307.

Hamiroune, M., Berber, A., and Boubekour, S. (2014). Qualité bactériologique du lait cru de vaches locales et améliorées vendu dans les régions de Jijel et de Blida (Algérie) et impact sur la santé publique. *Ann. Méd. Vét* **158**, 137-144.

Hayes, M. C., and Boor, K. (2001). Raw milk and fluid milk products. *Food science and technology-New york-marcel dekker-*, 59-76.

Henríquez-Aedo, K., Durán, D., Garcia, A., Hengst, M. B., and Aranda, M. (2016). Identification of biogenic amines-producing lactic acid bacteria isolated from spontaneous malolactic fermentation of chilean red wines. *LWT - Food Science and Technology* **68**, 183-189.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition* **73**, 365s-373s.

J

Joffin, J.N et Milliere, JB. (1996). *Microbiologie technique*. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine bordeaux, p : 219-223

Johansson, M. L., Quednau, M., Molin, G., and Ahrné, S. (1995). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Letters in Applied Microbiology* **21**, 155-159.

K

Kapil, V., Haydar, S. M., Pearl, V., Lundberg, J. O., Weitzberg, E., and Ahluwalia, A. (2013). Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. *Free Radical Biology and Medicine* **55**, 93-100.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., and Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **41**, 103-125.

Kostinek, M., Pukall, R., Rooney, A. P., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W. H., and Franz, C. M. (2005). *Lactobacillus arizonensis* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus plantarum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**, 2485-2489.

L

Labioui, H., Elmoualdi, L., Benzakour, A., El Yachioui, M., Berny, E., and Ouhssine, M. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **148**, 7-16.

Lagneau, P. E., Lebtahi, K., and Swinne, D. (1996). Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia* **135**, 99-102.

Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamti, R., Belkhou, R., and Zerrouq, F. (2015). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie* **10**, 267-277.

Lupski, J. R., and Weinstock, G. M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of bacteriology* **174**, 4525.

Lyhs, U., Björkroth, J., and Korkeala, H. (1999). Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *International journal of food microbiology* **52**, 77-84.

M

Magali, P. (2012). La transformation fromagère caprine fermière. Lavoisier. France. 295 p

Mamhoud, A., Nionelli, L., Bouzaine, T., Hamdi, M., Gobbetti, M., and Rizzello, C. G. (2016). Selection of lactic acid bacteria isolated from Tunisian cereals and exploitation of the use as starters for sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **225**, 9-19.

Mallet, A., Delbes-paus, C., Montel, M., Kauffmann, F., Sesboue, A., and Chesneau, C. (2013). Qualité des laits crus: réservoirs susceptibles d'influencer la diversité microbienne et effets des pratiques de traite. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, 173-176.

Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A., and Desmasures, N. (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal* **27**, 13-21.

Mathieu, J. (1998). *Initiation à la physicochimie du lait*. Guides technologiques de IAA/Ed. Tec & doc-Lavoisier, Paris.220p.

McCartney, A. L. (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition* **88**, s29-s37.

Mennane Z., Ouhssine M., Khedid K., EL Yachioui M., 2007. Hyginec quality of raw cow's milk feeding from domestic waste in tow regions in Morocco. *International Journal of Agriculture and Biologie*, **9**, 46-48.

Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani, F., Coppola, S., and Parente, E. (2001). Comparison of Statistical Methods for Identification of *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* from Randomly Amplified Polymorphic DNA Patterns. *Applied and environmental microbiology* **67**, 2156-2166.

Moulay, M., Benlahcen, K., Aggad, H., and Kihal, M. (2013). Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk. *Advances in Environmental Biology*, 999-1008.

Mubarack, H. M., Doss, A., Dhanabalan, R., and Balachander, S. (2010). Microbial quality of raw milk samples collected from different villages of Coimbatore District, Tamilnadu, South India. *Indian Journal of Science and Technology* **3**, 61-63.

N

Nigatu, A., Ahrne, S., Gashe, B., and Molin, G. (1998). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Ped. acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. *Letters in applied microbiology* **26**, 412-416.

Nigatu, A., Ahrné, S., and Molin, G. (2001). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles for the distinction of *Lactobacillus* species. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**, 1-6.

Noblet, B. (2012). Le lait : produits, composition et consommation en France. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **47**, 242-249.

O

Okcu, G., Ayhan, K., Gunes Altuntas, E., Vural, N., and Poyrazoglu, E. S. (2016). Determination of phenolic acid decarboxylase produced by lactic acid bacteria isolated from shalgam (şalgam) juice using green analytical chemistry method. *LWT - Food Science and Technology* **66**, 615-621.

Oliver, S. P., Boor, K. J., Murphy, S. C., and Murinda, S. E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog Dis* **6**, 793-806.

Ounine, K., Rhoutaise, A., and El Haloui, N. (2004). Caractérisation bactériologique du lait cru produit dans les étables de la région du Gharb. *Al awamia* 109, 110.

P

Pacheco Da Silva, F. F., Biscola, V., LeBlanc, J. G., and Gombossy de Melo Franco, B. D. (2016). Effect of indigenous lactic acid bacteria isolated from goat milk and cheeses on folate and riboflavin content of fermented goat milk. *LWT - Food Science and Technology* **71**, 155-161.

Perreau, J.-M. (2014). Conduire son troupeau de vaches laitières. 2^{ème} ed. Agriproduction France Agricole. , france. 405p.

Pointurier, H., Adda, J., (1969). Beurrerie industrielle. La Maison Rustique, Paris.

Pougheon, S., Goursaud, J. (2001). Le lait : caractéristiques physicochimiques. In : Lait, nutrition et santé. Debry G. TEC & DOC Ed, France, 1-42 p.

Prescott, L.M.; Harley, J.P., Donald, A. (2003). Microbiologie. De boeck université. 2^{ème} édition française. 128 : 28-29

Q

Quiberoni, A., Rezaïki, L., Karoui, M. E., Biswas, I., Tailliez, P., and Gruss, A. (2001). Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Research in Microbiology* **152**, 131-139.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 664-698.

R

Remond, B. (1987). L'influence du stade de lactation sur la composition du lait. In : le lait matière première de l'industrie laitière. INRA publications, 151-157.

Rosselló-Mora, R., and Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews* **25**, 39-67.

Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J., and Decaris, B. (1993). Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Møcquot). *The Journal of applied bacteriology* **74**, 549-556.

Ruiz, F. O., Gerbaldo, G., Asurmendi, P., Pascual, L. M., Giordano, W., and Barberis, I. L. (2009). Antimicrobial Activity, Inhibition of Urogenital Pathogens, and Synergistic Interactions Between *Lactobacillus* Strains. *Current Microbiology* **59**, 497-501.

S

Saidi, N., Guessas, B., Bensalah, F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D.E., Prevost, H., Kihal, M. (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées de lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides* **01**, 01-14

Sboui, A., Khorchani, T., Djegham, M., and Belhadj, O. (2010). Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie* **5**.

Seme, K., Pitala, W., and Osseyi, G. (2015). Qualité Nutritionnelle Et Hygiénique De Laits Crus De Vaches Allaitantes Dans La Région Maritime Au Sud-Togo. *European Scientific Journal* **11**.

Shehata, M. G., El Sohaimy, S. A., El-Sahn, M. A., and Youssef, M. M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*.

Siousarran V., 2003. Hygiène du lait cru en zone urbaine et périurbaine de Niamey, Niger Rapport de stage pour l'obtention du DESS, université de Mont pellier II, 65p.

Sissao, M., Millogo, V., and Ouedraogo, G. A. (2015). Composition chimique et qualité bactériologique des laits crus et pasteurisés au Burkina Faso. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie* **11**, 142-154.

Stulova, I., Adamberg, S., Krisciunaite, T., Kampura, M., Blank, L., and Laht, T. M. (2010). Microbiological quality of raw milk produced in Estonia. *Lett Appl Microbiol* **51**, 683-90.

S'vec, P., Vancanneyt, M., Devriese, L. A., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., and Swings, J. (2005). *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**, 2183-2187.

T

Temmerman, R., Huys, G., and Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 348-359.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., and Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology* **33**, 2233.

Thieulin, G., Basille, D., Morre, J., and Cumont, G. (1966). Effets chimiques des rayonnements du cobalt 60 sur les éléments constitutifs des aliments—action sur les glucides Food irradiation. In "Proc. Symp. Karlsruhe, IAEA, Vienna", pp. 187-196.

Thomas, TD.(1973). Aggar for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the bacterial. NZJ. Dairy. Sci.technol.8:70-71.

Torkar, K. G., and Teger, S. G. (2008). The Microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta Agri. Slovenica* **92**, 61-74.

Tormo, H., LEKHAL, D. A. H., and LAITHIER, C. (2006). Les microflores utiles des laits crus de vache et de chèvre: principaux réservoirs et impact de certaines pratiques d'élevage. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, 305-308.

Tormo, H., Ali Haimoud Lekhal, D., and Roques, C. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **210**, 9-15.

Torriani, S., Clementi, F., Vancanneyt, M., Hoste, B., Dellaglio, F., and Kersters, K. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 554-560.

V

Vacheyrou, M., Normand, A.-C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., and Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology* **146**, 253-262.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews* **60**, 407-438.

Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C., and Montel, M.-C. (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and environmental microbiology* **78**, 326-333.

Vilain, A. C. (2010). Qu'est-ce que le lait ?. *Revue Française d'Allergologie* **50**, 124-127.

Vignola, C L. (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. 2^{ème} ed. Presses Internationales Polytechniques. Canada. 600p.

Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Galluzzo, P., Corona, O., Francesca, N., Caracappa, S., Moschetti, G., and Settanni, L. (2015). Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food Microbiology* **51**, 57-68.

W

WAES, G. (1973). Les streptocoques D dans le lait cru réfrigéré. II.-La détermination des streptocoques D dans le système actuel et futur de détermination de la qualité. *Le Lait* **53**, 636-644.

Wolter, R & Ponter, A. (2012). Alimentation de la vache laitière. 4^{ème} ed. Agriproduction. France Agricole. France. 273 p.

Y

Yabrir, B., Hakem, A., Mostefaoui, A., Laoun, A., Titouche, Y., Labiad, M., Magtouf, L., and Mati, A. (2013). Qualité microbiologique du lait cru ovin collecté dans la steppe centrale de l'Algérie. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie* **9**, 86-92.

Yost, C. K., and Nattress, F. M. (2002). Molecular typing techniques to characterize the development of a lactic acid bacteria community on vacuum-packaged beef. *International journal of food microbiology* **72**, 97-105.

Yves, L. E. L., and Michel, G. (2009). *Staphylococcus aureus*. Lavoisier. Paris 300p.

Z

Zhong, W., Millsap, K., Bialkowska-Hobrzanska, H., and Reid, G. (1998). Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2418-2423.

Annexes

Annexe 1

Gélose Chapman

Composition en g/l (Marchal et al .1982)

Peptone	11g
Extrait de viande.....	1 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol	10 g
Rouge de phénol	25 mg
Agar.....	15 g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le pH de ce dernier est ajusté à 7.4 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Citrate de Simmons

Composition chimique en g/l (Ronald. 2004)

Citrate de Sodium.....	0.5g
NaCl	2.5g
Sulfate de magnésium	0.1g
Di-ammonium citrate	0.25g
Hydrogénophosphate de potassium	0.5g
Bleu de bromothymol	0.04g
Agar.....	10g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le pH de ce dernier est ajusté à 7.1 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Milieu d'Eva Litsky :

Composition en g/l (n.marchal et al .1987)

Peptone.....	20g
Glucose.....	5g
NaCl.....	5g
Monohydrogenophosphate de potassium.....	2,7g
Dihydrogenophospahte de potassium.....	2,7g
Acide de sodium	0, 2g

Ethyl violet0,0005g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le ph de ce dernier est ajusté à 6,8-7 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Le lait écrémé

Composition en g/l (**n.marchal et al .1987**)

Le lait écrémé en poudre10g

Extrait de levure0.5g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le ph de ce dernier est ajusté à 7 puis le milieu stérilisé à 110C° pendant 10 min.

Mac Conkey

Composition en g/l (**n.marchal et al .1987**)

Peptone20 g

Seles béliers1.5 g

Chlorure de sodium5 g

Lactose10 g

Rouge natural30 mg

Crystal violet1 mg

Agar15 g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le ph de ce dernier est ajusté à 7.1 puis le milieu stérilisé à 110C° pendant 10 min.

Gélose/ Bouillon MRS (De Mans, Rogosa et Sharpe)

Composition en g/l (**n.marchal et al .1987**)

Peptone trypasique de caséine.....15g

Macération de viande.....500g

Extrait de levure5g

Tween 80.....1ml

Acétate de sodium..... 5g

Citrate bi-ammonique	2g
Phosphate bi potassique.....	2, 4g
Glucose	20g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0, 2g
MnSO ₄ , 7H ₂ O	0, 05g
Agar (uniquement gélose).....	15g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le ph de ce dernier est ajusté à 6,2 (4.6 et 9.6 pour les tests d'identification) puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Gélose/ Bouillon M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

Extrait de levure	5g
Extrait de viande.....	1 g
Tryptone	5g
Peptone papainique	2.5 g
Peptone pepsique de viande	5g
Acide ascorbique.....	0.5g
Lactose	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
MgSo ₄	0.25g
Agar(uniquement gélose).....	15g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le ph de ce dernier est ajusté à 7.1 (4.6 et 9.6 pour les tests d'identification) puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

M16 BCP (thomas, 1973)

Extrait de levure	5g
Extrait de viande.....	5 g
Peptone papainique de soja	5g
Bi-polytone.....	5g
Acide ascorbique	0,5g
Lactose.....	5g
L-arginine	4g
Pourpe de bromocrésole.....	0,05g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le ph de ce dernier est ajusté à 6,8 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Milieu Naylor et Sharpe :

Composition en g/l (GUIRAUD. 1998)

Peptone	5g
Extrait de viande.....	5g
Na Cl	32.5g
Glucose	2.5g

QSP pour 500ml

Après la préparation du milieu le pH de ce dernier est ajusté à 7.1 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Bouillon nitraté

Composition en g/l (n.marchal et al .1987)

- Infusion cœur-cervelle.....	25,0 g
- Nitrate de sodium.....	10,0 g

QSP pour 500ml

Après la préparation du milieu le pH de ce dernier est ajusté à 7.2 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Peptone saline :

Composition en g/l (Marchal et al .1982)

Peptone	1g
Na Cl	8.5g

QSP pour 1l

Après la préparation du milieu le pH de ce dernier est ajusté à 7 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Milieu de Rothe :

Composition en g/l (n.marchal et al .1987)

Peptone.....	20g
Glucose.....	5g

NaCl.....	5g
Monohydrogenophosphate de potassium.....	2,7g
Dihydrogenophosphate de potassium.....	2,7g
Acide de sodium.....	0, 2g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le ph de ce dernier est ajusté à 6,8-7 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

TSE (Tryptone Soja Eau)

Peptone de caséine	17g
Peptone de farine de soja	3g
Extrait de levure	6g
D(+)- glucose	22, 5g
Chlorure de sodium	5g
Hydrogénophosphate de potassium	2,5g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le ph de ce dernier est ajusté à 7 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Viande foie :

Composition en g/l (**n.marchal et al .1987**)

Base viande- foie.....	30g
Glucose	2g
Agar.....	6g

QSP pour 1litre

Après la préparation du milieu le ph de ce dernier est ajusté à 7.4 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Annexe II

Les méthodes

Coloration Gram

Une colonie a été prélevée à partir d'une culture sur boîte et étalée sur une lame de verre. La lame a ensuite été séchée à l'air libre, passée à la flamme afin de fixer l'échantillon puis laissée refroidir à l'air libre. Après fixation, la lame a été posée sur un porte-objet et colorée avec le violet cristallisé pendant 1 min avant d'être rincée au lugol. Recouverte avec du lugol pendant 1 min, la préparation a ensuite été rincée à l'eau distillée pendant environ 5 s. La lame ainsi rincée, a été soumise à une décoloration à l'éthanol pendant environ 15 s jusqu'à ce que l'étalement ait pris une couleur gris-bleu puis rincée à l'eau distillée pendant environ 5 s avant d'être colorée à la safranine pendant 1 min, rincée à nouveau à l'eau distillée puis séchée. Les lames ont été observées au microscope (objectif 100/ grossissement $\times 1000$).

Méthodes des cadrans

Le principe de ce type d'ensemencement est d'épuiser un dépôt initial en faisant des étalements successifs dans différentes directions, il faut qu'après chaque étalement on flambe l'anse de platine.

- ✓ Diviser la boîte de pétri en 4 quadrants,
- ✓ soulever le couvercle de la boîte de Pétri et déposer l'inoculum (à l'aide de l'anse) sur une petite surface au point initial,
- ✓ stériliser l'anse et laisser refroidir, faire des stries serrées sur toute la surface des quadrants 1 et 2,
- ✓ stériliser de nouveau l'anse et faire des stries serrées sur les quadrants 2 et 3,
- ✓ stériliser encore une fois l'anse et faire des stries serrées sur les quadrants 3 et 4,
- ✓ stériliser l'anse et placer les boîtes (correctement identifiée) à l'envers (couvercle vers le bas) dans l'étuve.

Méthode du nombre plus probable (NPP)

Cette technique consiste à utiliser plusieurs tubes par dilution (2, 3, 4 ou 5 tubes) et on compare les résultats à une table statistique « Table Mac Grady » Elle permet de connaître le nombre des bactéries dans 1 ml de dilution.

- ✓ Réaliser une gamme de dilution du produit à analyser,
- ✓ Ensemencer 1 ml de chaque dilution dans plusieurs tubes du milieu Rothe et Eva litsky,
- ✓ Incuber les tubes à température adaptée,

- ✓ Noter si les résultats sont positifs ou négatifs,
- ✓ Grouper le nombre des résultats positifs,
- ✓ Regrouper en nombre de 3 chiffres la suite de chiffres obtenus en commençant par le chiffre obtenu par la plus faible dilution,
- ✓ Choisir la dilution qui possède le regroupement le plus grand tout étant inférieur à :
220 pour la méthode à 2 tubes/dilution
330 pour la méthode à 3 tubes/dilution
440 pour la méthode à 4 tubes/dilution etc.
- ✓ Calculer le nombre des bactéries (N) selon l'équation suivante : $N = \frac{NPP}{V_{ensemencé}} Fd$
(Fd est l'inverse de dilution)

Annexe III

Tableau XIII : Taux moyens des bactéries lactiques présentes dans les échantillons

Région	SE	Sur gélose MRS	Sur gélose M17	Moyenne
Mascara	LM	0.23 10 ⁶	0.5 10 ⁶	0.2 10 ⁶
	LC	0.11 10 ⁶	0.13 10 ⁶	
	LE	0.07 10 ⁶	0.16 10 ⁶	
Mostaganem	LM	2.2 10 ⁶	1.5 10 ⁶	0.7 10 ⁶
	LC	0.03 10 ⁶	0.45 10 ⁶	
	LE	0.037 10 ⁶	0.03 10 ⁶	
Oran	LM	0.73 10 ⁶	2.7 10 ⁶	1.23 10 ⁶
	LC	0.46 10 ⁶	2.1 10 ⁶	
	LE	0.7 10 ⁶	0.7 10 ⁶	
Relizane	LM	0.26 10 ⁶	1.52 10 ⁷	4 10 ⁶
	LC	0.46 10 ⁶	6.13 10 ⁶	
	LE	0.69 10 ⁶	1.64 10 ⁶	
Sidi bel abbes	LM	1.97 10 ⁶	1.78 10 ⁶	1.2 10 ⁶
	LC	0.15 10 ⁶	2.1 10 ⁶	
	LE	0.45 10 ⁶	0.79 10 ⁶	
Moyenne		0.54 10 ⁶	2.39 10 ⁶	1.46 10 ⁶

SE : Nature de source d'échantillon, LM : lait de mélange, LC : lait de collecteur, LE : lait d'un seul éleveur.

Tableau XIV : Résumer de l'observation macroscopique et microscopique des souches isolées

Souche	Milieu d'isolement	Aspect macroscopique	Morphologie	Mobilité	Gram
BL M1	MRS	Colonie blanche arrondie, plate (1mm)	Coque, en paire et en chaîne courte	–	+
BL M2	M17	Colonie blanche arrondie, (1mm)	coque, en paire et en chaîne	–	+
BL M3	M17	Colonie crème arrondie, (< 1mm)	coque, en paire et en chaîne	–	+
BL M4	MRS	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Bacille avec extrémité arrondie, en deux, en chaîne longue	–	+
BL M5	MRS	Colonie crème arrondie, (< 1mm)	Bacille au bout rond, isolée et en deux	–	+
BL M6	MRS	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Bacille (bout rond) isolé et diplobacille	–	+
BL M7	MRS	Colonie blanche arrondie, (1mm)	coque ovale (ovoïde), isolée et en deux	–	+
BL M8	MRS	Colonie blanche arrondie, (1mm)	coccobacille, en paire	–	+
BL O9	M17	Colonie crème arrondie, plats (1mm)	Coque, diplocoque	–	+
BL O10	M17	Colonie crème arrondie, (< 1mm)	Coque ovoïde, en paire	–	+
BL O11	M17	Colonie blanche arrondie, (< 1mm)	Coque, en paire	–	+
BL O12	MRS	Colonie blanche arrondie (0.5mm)	Bacille, isolée et diplobacille	–	+
BL O13	MRS	Colonie crème arrondie, (1mm)	Coccobacille, en paire	–	+
BL O14	MRS	Colonie crème (1mm)	Coccobacille, isolée et en paire	–	+

BL O15	MRS	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Bacilles aux bouts ronds, diplobacille et en chaine	_	+
BL M16	M17	Colonie crème arrondie, (1mm)	Coque, isolée et en paire	_	+
BL M17	MRS	Colonie crème arrondie, punctiforme	Coccobacille, en paire et en chaine	_	+
BL M18	MRS	Colonie crème arrondie, punctiforme	Coccobacilles, en paire et en chaine court	_	+
BL M19	M17	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Coque ovale, en paire	_	+
BL M20	M17	Colonie blanche arrondie, bombé, (1mm)	Coque, en paire	_	+
BL M21	M17	Colonie crème arrondie, plate, (0.5 mm)	Coque, isolée et en paire	_	+
BL M22	M17	Colonie crème arrondie, plate, (0.5 mm)	Coque, en paire et en chaine court	_	+
BL B23	MRS	Colonie crème arrondie, (1mm)	Coque, en tétrade	_	+
BL B24	M17	Colonie crème arrondie, plate, (1 mm)	Coque, en paire	_	+
BL B25	M17	Colonie blanche arrondie (0.5mm)	Coque ovoïde, en paire et en chaine	_	+
BL B26	M17	Colonie crème arrondie, (1mm)	Coque, en paire et en chaine	_	+
BL B27	M17	Colonie blanche arrondie (0.5mm)	Coque, en paire et en chaine	_	+
BL B28	M17	Colonie blanche arrondie (0.5mm)	Coque, en paire	_	+
BL B29	M17	Colonie crème arrondie, (1mm)	Coque ovoïde, en paire	_	+

BL B30	MRS	Colonie blanche arrondie (0.5mm)	Coque, en paire et en chaine longue	_	
BL B31	MRS	Colonie blanche arrondie (0.5mm)	Coque, en paire et en chaine	_	+
BL B32	MRS	Colonie blanche arrondie (1 mm)	Coque, en paire et en chaine	_	+
BL B33	MRS	Colonie blanche arrondie (1 mm)	Coccobacille, en paire et en chaine court	_	+
BL B34	MRS	Colonie crème arrondie, punctiforme	Coque, en paire et en chaine court	_	+
BL R35	MRS	Colonie crème arrondie, (1mm)	Coccobacilles, en pair et en chaine	_	+
BL R36	M17	Colonie crème arrondie, punctiforme	Coque ovale, en paire	_	+
BL R37	MRS	Colonie transparente arrondie, punctiforme	Bacille aux bouts ronds, diplobacille et en chaine	_	+
BL R38	MRS	Colonie crème arrondie, punctiforme	Bacille aux bouts ronds, diplobacille et en chaine longue	_	+
BL R39	MRS	Colonie crème arrondie, punctiforme	Bacille aux bouts ronds, diplobacille	_	+
BL R40	MRS	Colonie blanche arrondie, (0.5mm)	Coque ovoïde, en paire	_	+
BL R41	MRS	Colonie crème arrondie, (0.5mm)	Coccobacille, en paire et en chaine court	_	+
BL R42	MRS	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Coque, en chaine	_	+
BL R43	MRS	Colonies blanche arrondies, (1mm)	Coque, en paire	_	+
BL R44	MRS	Colonie transparente, arrondie, (0.5mm)	Coque, en paire	_	+
BL R45	MRS	Colonie blanche arrondie, (0.5mm)	Bacille aux bouts ronds, diplobacille	_	+

BL R46	MRS	Colonie blanchâtre arrondie, (1mm)	Bacille, diplobacille	–	+
BL R47	M17	Colonie crème arrondie, punctiforme	Coque, diplocoque	–	+
BL R48	M17	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Coque, en paire et en chaîne court	–	+
BL R49	M17	Colonie blanche arrondie, (0.5mm)	Coques ovoïde, isolé, en paire et en chaîne courte	–	+
BL R50	M17	Colonie crème arrondie, (1mm)	Coque, diplocoque	–	+
BL R51	M17	Colonie blanche arrondie, punctiforme	Coque ovoïde, en paire et en chaîne courte	–	+
BL R52	M17	Colonie blanche arrondie, (0.5mm)	Coque, isolé, en paire	–	+
BL R53	M17	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Coque, en paire	–	+
BL R54	M17	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Coque, en paire	–	+
BL R55	M17	Colonie blanche arrondie, punctiforme	Coque ovale, en paire et en longue chaîne	–	+
BL R56	MRS	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Bacille aux bouts ronds, en paire et en chaîne longue	–	+
BL R57	MRS	Colonie blanche arrondie, punctiforme	Coccobacille, en paire	–	+
BL R58	MRS	Colonie blanchâtre arrondie, (0.5mm)	Bacille aux bouts ronds, diplobacille et en chaîne	–	+
BL R59	MRS	Colonie blanche arrondie, punctiforme	Bacille aux bouts ronds, isolée et diplobacille	–	+
BL R60	MRS	Colonie blanchâtre arrondie, (1mm)	Bacille aux bouts ronds, diplobacille et en chaîne court	–	+

BL R61	M17	Colonie blanche arrondie, punctiforme	Coque ovale, en paire	-	+
BL R62	M17	Colonie blanche arrondie, (0.5mm)	Coque ovale, en paire et en chaine longue	-	+
BL R63	M17	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Coques ovale, en paire et en chaine court	-	+
BL R64	M17	Colonie blanche arrondie, (0.5mm)	Coque ovale, en paire	-	+
BL R65	M17	Colonie blanche arrondie, (1mm)	Coque ovale, en paire	-	+

Tableau XV : Les résultats obtenus du pH et de l'acidité des différents échantillons

Wilaya	Les échantillons	Le pH	L'acidité dornic
Mostaganem le 22/03/2016	Le lait de ferme d'une seule vache	6.55	18
	Le lait de collecte de 7 éleveurs	6.55	16
	Le lait de grande collecte (El sahal)	6.52	19
	Le lait d'une seule vache	6.660	20
	Le lait de 3 vaches	6.560	19
	Le lait de 26 vaches	6.406	19
Sidi belabas le 06/04/2016	Grande cuve	6.52	21
	18 vaches (5 éleveurs)	6.393	20
	15 vaches	6.513	18
	13vaches	6.602	17
	10vaches	6.534	18
	6éleveurs	6.440	19
	3éleveurs	6.551	16
M0ASKAR le 07/04/2016	Grande cuve (5125)	6.608	19
	7éleveurs	6.692	19
	8éleveurs	6.568	18
	14éleveurs	6.6	18
	2éleveurs	6.63	17

Oran le 09/04/2016	Lait de mélange	6.525	18
	Collecteur	6.46	17
	Eleveur 1	6.64	15
	Eleveur 2	6.518	18
	Eleveur 3	6.6	19
Relizane le 10/04/2016	Lait de mélange	6.534	18
	20eleveurs Mazouna	6.57	18
	20eleveurs	6.575	20
	16 éleveurs	6.361	23
	10 éleveurs	6.574	22
	8 éleveurs	6.5	18
	5 éleveurs	6.574	17
	4 eleveurs	6.51	18.5
	4 éleveurs	6.247	24
	3 eleveurs	6.6	18.5
	Un eleveur	6.647	16.5
	un eleveur	6.41	18

Annexe IV

Arrêté Interministériel n° 35 du 27 mai 1998

8	JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 35	Aouel Safar 1419 27 mai 1998	
ANNEXE I			
CRITERES MICROBIOLOGIQUES RELATIFS A CERTAINES DENREES ALIMENTAIRES			
TABLEAU I			
CRITERES MICROBIOLOGIQUES DES LAITS ET DES PRODUITS LAITIERS			
PRODUITS	n	c	m
1. Lait cru :			
— germes aérobies à 30° C	1	—	10 ⁵
— coliformes fécaux	1	—	10 ³
— streptocoques fécaux	1	—	abs/0,1ml
— <i>Staphylococcus aureus</i>	1	—	absence
— clostridium sulfito-réducteurs à 46° C	1	—	50
— antibiotiques	1	—	absence
2. Lait pasteurisé conditionné :			
— germes aérobies à 30° C	1	—	3.10 ⁴
— coliformes :			
* sortie usine	1	—	1
* à la vente	1	—	10
— coliformes fécaux			
* sortie usine	1	—	absence
* à la vente	1	—	absence
— <i>Staphylococcus aureus</i>	1	—	1
— phosphatase	1	—	négatif
3. Lait stérilisé et lait stérilisé UHT (nature et aromatisé) :			
— germes aérobies à 30° C	5	2	< 10/0,1 ml
— test de stabilité	5	0	négatif
— test alcool	5	0	négatif
— test chaleur	5	0	négatif
4. Lait concentré non sucré :			
— test de stabilité	5	0	négatif
— test alcool	5	0	négatif
— test chaleur	5	0	négatif
5. Lait concentré sucré :			
— germes aérobies à 30° C	5	2	10 ⁴
— coliformes	5	0	absence
— <i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	absence
— clostridium sulfito-réducteurs à 46° C	5	0	absence
— levures et moisissures	5	0	absence
— <i>Salmonella</i>	5	0	absence
6. Lait déshydraté conditionné (1) :			
— germes aérobies à 30° C	5	2	5.10 ⁴
— coliformes	5	2	5
— <i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	absence
— clostridium sulfito-réducteurs à 46° C	5	0	absence
— levures et moisissures	5	2	50
— <i>Salmonella</i>	5	0	absence
— antibiotiques	1	0	absence

