

Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université SAAD DAHLAB de BLIDA

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Département de **Biologie**



Mémoire

De fin d'Etudes en Vue de l'Obtention de Master en Biologie

Option : **Microbiologie et Toxicologie Alimentaire**

Thème

Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte à l'égard de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans le fromage fondu

Présenté par :

M^{elle} MAIRI Saadia

Soutenue le : 18/12/2013

Devant le jury composé de :

M ^{me} CHAALAL.	MAB	Président	USDB
M ^{me} BOULKOUR .S	MAA	Examinatrice	USDB
M ^{elle} MEKLAT. A	MCB	Examinatrice	USDB
M ^{elle} BOUHAMED. R	MAB	Promotrice	UNV Elharach
M ^{elle} KOUADRI	Responsable de la qualité	Co- promotrice	GIG Blida

Promotion 2012-2013

Remerciements

Je remercie dieu tout puissant qui ma aidé.

*J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements à
M^{me} CHAALAL, qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.
J'exprime également mes vifs remerciements à Mes dames
MEKLAT et BOULKOUR d'avoir accepté d'évaluer ce
travail.*

*Nombreux sont ceux qui ont contribué d'une façon ou
d'une autre à l'aboutissement*

Ce travail.

*Je remercie tout d'abord toute l'équipe du Groupe
Industriel Goumidi*

*pour m'avoir accepté dans leurs entreprise ; plus
précisément au responsable qualité*

Kouadri.I

*Ainsi qua tout le personnel en particulier
Mourad, Sarah, Khaled,*

*Ma promotrice, M^{elle} Bouhamed, pour m'avoir confiées ce
travail, ces*

*Orientations et ces précieux conseils dans la réalisation de ce
projet.*

Je remercie en particulier a M^{elle} Berhim Hadjer

*Enfin, je remercie tous ceux qui me ont encouragés tout au
long de mon*

Parcours et que je n'avais pas pu citer nominativement.

Dédicace

Ce travail est dédié tout d'abord aux deux personnes les plus chères à mon cœur, en qui j'ai crue et je croirais :

Mes parents

Lui m'ont donné tout leur amour et soutennes tout au long de mon parcours en étant patients et compréhensifs

A mes sœurs, f.zohra son marie et sa fille Hind

Rachda son marie et son fils

Hichem

Karima a qui je souhaite beaucoup de succès et de réussite dans leur parcours.

A mes frères, Roudouan et Abou Bakr

Et une dédicace spéciale pour Hadjer et sa famille

Mes amies Souhila, Amina, Nawal, Saliha, kawther, Asmaa, et Imene

Tous les étudiants et étudiantes de l'option microbiologie et toxicologie alimentaire 2013

*A la fin je dédié et je remercié infiniment
mon marie Billel*

Saadia

Résumé

Le fromage est l'un des produits laitiers les plus consommés après le lait. Sa composition favorable au développement microbien fait de lui un produit extrêmement sensible. Ainsi, la maîtrise des facteurs ayant un impact sur la technologie de fabrication et/ou sur la qualité microbiologique doivent être la préoccupation majeure des producteurs.

Notre travail porte sur l'étude de l'effet bactériostatique des sels de fonte PZ6, S9 et C_{spécial} à l'égard de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans la fabrication de fromage fondu.

Les résultats obtenus ont montré l'absence de l'effet bactériostatique des sels de fonte S9 et C_{spécial} à l'égard de *Salmonella typhi* de 0 à 3,5%. Quant aux sels de fonte PZ6, l'inhibition du développement de *Salmonella typhi* prend effet à une concentration de 3%.

Pour *Escherichia coli*, les sels de fonte PZ6, S9 et C_{spécial} combinés inhibent très nettement le développement de *Escherichia coli* et prend effet à une concentration de 3,5%.

L'absence d'effet bactériostatique des sels de fonte PZ6 et C_{spécial} à l'égard de *Staphylococcus aureus* a été notée pour les concentrations allant de 0 à 3,5%. Quant aux sels de fonte S9, l'inhibition du développement de *Staphylococcus aureus* prend effet à une concentration de 3,5%.

Mots clés : Fromage fondu, sels de fonte, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Cheese is one of the most consumed type dairy after milk. Its composition favorable to the microbial development made it extremely sensitive product. Moreover the master of the factors that have an impact on the technology of production and the microbiological quality must be the major interest of the producers.

Our work (project work) is concerned with the study of the bacteriostatic effect of emulsifying salts: PZ6, S9 and C_{spezial} in accordance with *Salmonella typhi*, *Escherchia coli* and *Staphylococcus aureus* of cheese production.

The results obtained have shown the absence of the antimicrobial effect of the emulsifying salts S9 and C_{spezial} in accordance of 0 to 3,5% concentration. In contrast to emulsifying salts PZ6, the development inhibition of *Salmonella typhi* take an effect of 3,5%.

For *Escherchia coli*, the combined salts of PZ6, S9 and C_{spezial} inhibit clearly the development of *Escherchia coli* and take effect to a concentration of 3,5%.

The absence of antimicrobial effect of the emulsifying salts PZ6 and C_{spezial} in accordance with *Staphylococcus aureus* has been noted from the concentration from 0 to 3,5%.

In contrast to the emulsifying salts S9 the development inhibition of *Staphylococcus aureus* take effect to the concentration of 3,5%.

Key words: Cheese spread, emulsifying salt, *Salmonella typhi*, *Escherchia coli* and *Staphylococcus aureus*.

ملخص

الجبن الطري للتدهين هو واحد من منتجات الالبان الاكثر استهلاكاً بعد الحليب تكوينه المواتي للنمو الجراثيم يجعله حساس للغاية و بالتالي ينبغي التحكم في العوامل التي تؤثر على تكنولوجيا التصنيع و على الجودة الميكروبيولوجية ان تكون القلق الرئيسي لدى المنتجين النهائيين .

تم التركيز في دراستنا على مفعول كايح للجراثيم لأملح التذويب PZ6 ، S9 و C spécial على *Escherichia coli* و *Salmonella typhi* ، *Staphylococcus aureus*

في صناعة الجبن الطري لتدهين .

- بالنسبة لأملح التذويب PZ6 إعاقه تكاثر *Salmonella typhi* تأخذ مفعوله في تركيز 03% .
- و بالنسبة إلى *Escherichia coli* أملاح التذويب PZ6، S9 و C spécial مركبة تعيق بوضوح تكاثر *Escherichia coli* و تأخذ مفعول في تركيز 3,5 % .
- عدم وجود مفعول كبح للجراثيم لأملح التذويب PZ6 و C spécial على *Staphylococcus aureus* و لوحظ للتركيزات من 0 الى 3,5 % . و بالنسبة لملاح التذويب S9 اعاقه تطوير *Staphylococcus aureus* يأخذ مفعول في تركيز 3,5 % .

كلمات مفتاحية: جبن طريح للتدهين ، أملاح التذويب ، *Staphylococcus aureus* ،

Escherichia coli و *Salmonella typhi*

Table des matières

Avant-propos	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Abstract	
ملخص	

Introduction.....	1
CHAPITRE I	
REVUS BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Fromage Fondu.....	2
I.1.Définition	2
I.2.Classification	2
I.3.La composition biochimique du fromage fondu	3
I.4.La composition minérale	3
II. Sels de fonte.....	4
II.1.Généralités sur les sels de fonte ou sels émulsifiants	4
II.2 Classification	5
II.3. Les propriétés des sels de fonte	7
II.4. Le choix des sels de fonte	8
II.5. Dosage et mode d'emploi des sels de fonte	9
III. Quelques contaminants du fromage fondu	9
III.1.Les salmonelles	9
III.2.Les staphylocoques	11
III.3. <i>Escherichia coli (E. coli)</i>	12
Chapitre II	
MATERIEL ET METHODES	
Objectif du travail	14
I. Présentation du lieu de travail	14
II. Présentation de la démarche expérimentale	15
II.1.Echantillonnage	15
II.2.Analyse microbiologique	16
II.3.Etude de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	17

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSIONS

I.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur milieux de culture (Méthode N°1)	29
I.1.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur <i>Salmonella typhi</i>	29
I.2.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur <i>Escherichia coli</i>	30
I.3.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur <i>Staphylococcus aureus</i>	32
II. Résultats et interprétations des analyses microbiologiques des matières premières et du produit fini (Les échantillons utilisé dans la méthode N°2)	33
II.1. Eau de Process	33
II.2. Poudre de lait	34
II.3. Beurre	35
II.4. Cheddar.....	36
II.5. Produit fini	37
III. Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur des échantillons de fromage fondu (Méthode N°2)	37
III.1.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur <i>S.typhi</i> , <i>E. coli</i> et <i>S.aureus</i> appliquée aux échantillons de fromage fondu fabriqués au niveau de l'unité O'KID'S	37
III.2.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur <i>S.typhi</i> , dans unéchantillon de fromage fondu	38
III.3.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur <i>E. coli</i> , dans unéchantillon de fromage fondu	39
III.4.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur <i>S.aureus</i> , dans un échantillon de fromage fondu	40

Conclusion
Référence bibliographiques
Annexe

LISTE DES ABREVIATIONS

Abs : absence
AFNOR : Association Française de Normalisation
A_w: Activité de l'eau
BHIB : Bouillon coeur-cervelle
BP : Baird Parker
BPH : Bonnes Pratiques d'Hygiènes
C° : degré Celsius
Ca : Calcium
DJA : Dose journalière admissible
Ech : Echantillon
FMAR : Flore mésophile aérobie revivifiable
GAMT : Germes Aérobies Mésophiles Totaux
G/S : matière grasse / extrait sec
HACCP : *HazardAnalysis Control Critical Point* (analyse des risques et point critiques pour leur maîtrise)
ID : Indéterminé
ISO : *International Standard Organization*(organisation international de normalisation)
JORA : Journal Officiel de la République Algérienne
Kg : Kilogramme
Kj : kilojoule
Kcal : kilocalorie
L : Local
Max : Maximum
Mg : Magnésium
MGES : pourcentage de la matière grasse dans l'extrait sec
MG : Matière grasse
MGLA : Matière grasse laitière anhydre
Min : Minimum
mL : millilitre
mn : minute
MP : Matière première
Na : Sodium
Na Cl : Chlorure de sodium
NA : Norme Algérienne
N.C : Nombre de colonies
ND : non déterminer
NF : Norme française
NEP : Nettoyage en place
NPP : Nombre le plus probable
P : Personnel
Pa : Pascal
PCA : Plate Count Agar
pH : potentiel d'hydrogène
RCM : *Reinforcedclostridial medium*
SAG : Sporulé anaérobie gazogène
SD : Staphylocoque D

SR : Sulfito- réducteur

T : Température

TSE : Tryptone Sel Eau

UFC : Unité formant colonie

UHT : Ultra haute température

VF : Viande Foie

VRBL : Gélose lactosé biliée au cristal violet

Listes des figures

Figure N°1 : Colonie de <i>Salmonella typhi</i> sur milieu Hektoen (ORIGINALE).	17
Figure N°2 : Colonie d'Escherichia coli sur milieu Hektoen (ORIGINALE).....	17
Figure N°3 : Une galerie API 20E (ORIGINALE).....	18
Figure N°4 : Colonie de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Baird Parker (ORIGINALE)...	19
Figure N°5 Résultat du test de catalase (ORIGINALE).....	20
Figure N°6: Résultat du test de coagulase (ORIGINALE).....	20
Figure N°7: Résultat du test de mannitol mobilité (ORIGINALE).....	20
Figure N°8 : Processus de fabrication du fromage fondu.....	25

Liste des tableaux

Tableau N°1: La composition moyenne des éléments constitutifs pour 100 g du fromage fondu.....	4
Tableau N° 2 : Propriétés de quelques sels de fonte	9
Tableau N°3: les germes recherchés dans les produits analysés au niveau de Groupe Industriel Goumidi selon la norme interne de l'entreprise.....	16
Tableau N°4 : Quantité en gramme des concentrations des sels de fonte.....	21
Tableau N°5: Quantité en gramme des concentrations des sels de fonte.....	23
Tableau N°6 : Présentation de matière première et formulation d'un 1 kg de fromage fondu.....	24
Tableau N°7: Résultats du dénombrement de <i>Salmonella typhi</i> suite à l'utilisation de différentes concentrations des sels de fonte (Méthode N°1).....	29
Tableau N°8: Résultats du dénombrement d' <i>Escherichia coli</i> à différentes concentration des sels de fonte (Méthode N°1).....	30
Tableau N°9: Résultats du dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> à différentes concentration des sels de fonte (Méthode N°1).....	32
Tableau N°10: Résultat des analyses microbiologiques de l'eau de process.....	33
Tableau N°11 : Résultat des analyses microbiologiques de la poudre de lait.....	34
Tableau N°12 : Résultat des analyses microbiologiques du beurre.....	35
Tableau N° 13 : Résultat des analyses microbiologiques du cheddar.....	36
Tableau N° 14 : Résultat et interprétation des analyses microbiologiques du produit fini.....	37
Tableau N°15: Résultats du dénombrement de (Méthode N°2) <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> et <i>S.aureus</i>	38
Tableau N°16: Résultats du dénombrement de <i>Salmonella typhi</i> (Méthode N°2).....	38
Tableau N°17: Résultats du dénombrement d' <i>Escherichia coli</i> (Méthode N°2).....	39
Tableau N°18: Résultats du dénombrement de <i>Stapylococcus aureus</i> (Méthode N°2).....	40

INTRODUCTION

Le fromage a toujours été une valeur sûre de l'alimentation humaine. C'est le résultat d'une transformation du lait très ancienne puisque des écrits témoignent de sa fabrication quelques trois mille ans avant notre ère en basse Mésopotamie. Source précieuse de protéines, le fromage a été l'un des premiers moyens de conservation du lait, matière première rapidement périssable. Cependant, la coagulation du lait et l'égouttage du caillé qui en résulte n'offrent qu'une stabilité relative et variable selon les fromages qui sont des produits laitiers vivants.

Ainsi, la protéolyse est un phénomène fondamental lors de l'affinage, cette activité enzymatique se poursuit même à basse température et conduit au-delà d'un certain stade une altération du fromage. Ainsi, plusieurs procédés ont été développés afin de prolonger la durée de vie du fromage (***CHEMACHE, 2011***).

Le fromage fondu est une préparation beaucoup plus récente, qui a permis une stabilisation bien plus poussée des protéines laitières, tout en conservant plus ou moins au produit fini l'aspect d'un fromage.

Ces sels de fonte ont permis de fondre efficacement les fromages à pâte pressée cuite ; ce qui a été à l'origine du développement important du fromage fondu. En 2006, plus de 10 millions de portions de ce fromage fondu sont dégustées chaque jour sur la planète, soit 2500 portions toutes les 20 secondes (***CHAMBRE et DAURELLES, 2006***).

Malgré l'immense diversification des types de fromage dans le marché, les fromages en portions ressortent avec une meilleure prédilection du consommateur algérien au dépend des autres types de fromage qui sont considérés comme des produits de luxe (***CHEMACHE, 2011***).

Notre travail est divisé en deux parties : une partie bibliographique et une partie expérimentale dont les principaux objectifs visent à une meilleure connaissance des propriétés des sels de fonte intervenants pendant le procédé de fabrication du fromage fondu sur les microorganismes. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet bactériostatique de quelques sels de fonte (PZ6, S9 et C_{spécial}) sur certains microorganismes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaire qui sont : *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

I. Fromage Fondu :**I.1.Définition :**

La dénomination "fromage fondu" est réservée au produit obtenu par la fonte et l'émulsification, à l'aide de la chaleur (à une température d'au moins 70°C pendant 30 secondes ou toute autre combinaison équivalente), d'un fromage ou d'un mélange de fromages, additionné éventuellement d'autres produits laitiers, présentant une teneur minimale en matière sèche de 40 grammes pour 100 grammes de produit fini et une teneur minimale en matière grasse de 40 grammes pour 100 grammes de produit après complète dessiccation (*JORF, 2007*).

I.2.Classification :

A l'heure actuelle, il existe plusieurs types de fromages fondus partout dans le monde. La commission du Codex Alimentarius a classé le fromage fondu en deux catégories selon les caractéristiques physique du produit :

Fromage fondu et fromage fondu à tartiner qui diffèrent par leurs taux d'humidité, le fromage fondu à tartiner étant plus doux (*SMITH, 1990*).

Cependant, BOUTONNIER (2000), regroupe le fromage fondu en cinq familles classées par ordre d'apparition sur le marché mondial :

Fromage fondu type « bloc » : Le traitement thermique subi est modéré de manière à conserver au produit fini une élasticité marquée et une bonne traçabilité, comparable à celle d'un fromage classique.

Fromage fondu type « coupe » : Moins ferme que le bloc, il n'est pas pour autant tartinable. Il contient trois à quatre points de moins de matière sèche que le précédent ce qui le rend plus agréable à la dégustation.

Fromage fondu tartinable: C'est le processus de crémage qui permet en partie de régler la consistance du produit fini et de lui conférer une tartinabilité.

Fromage fondu toastable (pour refonte) : Originaire d'Amérique du Nord, il se présente généralement sous forme de tranches adaptées à une utilisation dans les cheeseburgers, les croquemonsieurs.

Fromage fondu thermostable : Issu d'une demande extrême-orientale, à l'inverse du précédent, c'est un fromage fondu qui ne doit pas fondre lorsqu'on le soumet à une nouvelle source de chaleur (*BOUTONNIER, 2000*).

I.3.La composition biochimique du fromage fondu :

Selon ECK et GILLIS (1997), les fromages fondus sont de vrais bâtisseurs de l'organisme. Ils sont composés de protéines, de glucides et de lipides.

Les protéines :

Les fromages fondus sont des éléments très riches en protéines qui proviennent de la caséine modifiée dont une grande partie se trouve dégradée et solubilisée en oligopeptides et en acides aminés sous l'influence d'une série d'enzymes. La teneur en acides aminés du fromage lui confère une valeur biologique extrêmement élevée.

Les Glucide :

Les fromages affinés sont pratiquement dépourvus de glucides car la faible quantité de lactose restant dans le caillé après égouttage est transformée en acide lactique au cours de l'affinage.

Les lipides :

Les lipides conditionnent l'onctuosité de la pâte du fromage. Les lipides de lait « triglycides, phosphoglycerides-sphingoside » se trouvent dans le fromage sous forme émulsionnée ce qui les rend plus digestifs.

I.4.La composition minérale :

Les composants minéraux importants dans la fabrication du fromage sont le sodium, le calcium, le phosphore ainsi que d'autres éléments minéraux.

Sodium :

Il est apporté au fromage sous forme de chlorure de sodium. Ce dernier intervient pour relever la saveur du fromage. On l'utilise aussi pour limiter la prolifération de certaines moisissures indésirables et pour régler l'humidité, un phosphate de sodium.

Calcium, Phosphore :

Les fromages fondus constituent une excellente source de calcium et de phosphore qui sont bien assimilés par l'organisme.

D'autres éléments minéraux :

Les fromages fondus sont aussi une source intéressante de potassium, de zinc, d'iode et de sélénium. En revanche, ils sont pauvres en fer et en magnésium (*ECK et GILLIS, 1997*).

Tableau N°1: La composition moyenne des éléments constitutifs pour 100 g du fromage fondu d'après (LUQUET, 1985).

Constituants	Moyenne
Eau(g)	45
Energie (kcal)	280
Glucide (g)	2,5
Lipide (g)	22
Protéines (g)	18
Calcium (mg)	680
Phosphore (mg)	900
Magnésium (mg)	25
Potassium (mg)	95
Sodium (mg)	1650
Zinc (mg)	9

II. Sels de fonte:**II.1.Généralités sur les sels de fonte ou sels émulsifiants :**

Ce sont des additifs alimentaires majeurs utilisés en technologie de fonte. Ces agents technologiques sont indispensables à la fabrication du fromage fondu, ils sont d'ailleurs à l'origine de l'industrie de la fonte.

Les sels de fonte sont des stabilisants utilisés pour éviter la séparation de la phase protéique de la phase liquide. Ils servent au maillage des protéines et rendent le produit plus homogène.

Les principaux sels utilisés pour la fabrication du fromage fondu sont les sels de l'acide phosphorique (les phosphates) et de l'acide citrique (les citrates) (**BOUTONNIER, 2000**).

II.2 Classification :

II.2.1. Les sels de l'acide phosphorique (les phosphates) :

Au sein des phosphates (sels de l'acide phosphorique), on distingue deux classes : les monophosphates qui sont également connus sous le nom d'orthophosphates et les phosphates polymères ou polyphosphates. Parmi ces derniers, on rencontre trois groupes :

- Les polyphosphates en chaîne (chaîne courte et chaîne longue) ;
- Les métaphosphates cycliques ;
- Les ultraphosphates réticulés.

Sur le plan de la fonte du fromage, les phosphates les plus importants sont les groupes des polyphosphates à chaîne courte qui sont caractérisés par leur pouvoir de crémage considérable et les polyphosphates à chaîne longue ou supérieure, qui ont un faible pouvoir de crémage mais sont d'excellents séquestrants du calcium (**BOUTONNIER, 2000**).

Dans le groupe des polyphosphates à chaîne courte, on retrouve les diphosphates et les triphosphates qui présentent un intérêt sur le plan technique (**BERGER, KLOSTERMEYER et al., 1989**).

En ce qui concerne le groupe des polyphosphates à chaîne longue, il s'agit généralement de liaisons vitreuses non cristallines. On les appelle phosphates de fusion d'après le procédé de fabrication utilisé dans le processus de fonte.

Les phosphates de fusion sont des mélanges de phosphates présentant différentes longueurs de chaîne, qui se produisent dès la fabrication.

Il faut aussi insister sur une notion trop souvent ignorée : les polyphosphates qui agissent au cours du processus de fonte et après la fonte, ne sont pas ceux que l'on a introduits. En effet, en présence de matières premières laitières, ils s'hydrolysent en devenant de moins en moins condensés.

Les sels de fonte agissent donc, si on les introduit sous forme hautement ou moyennement condensée, tout d'abord en séquestrant le calcium, puis par hydrolyse, les diphosphates obtenus favorisent le crémage qui se poursuit après la fonte si le refroidissement est lent, et même pendant le stockage.

Cette lente hydrolyse crée de nouvelles fonction acides ; elle provoque un raffermissement de la pâte et bloque une élévation éventuelle du pH.

L'action efficace des sels de fonte n'est obtenue, que s'ils sont entièrement disponibles. Ils doivent donc être bien dissouts au contact du fromage brassé et chauffé, ou apportés en solution concentré où ils vont agir le plus vigoureusement.

Pour un produit à tartiner exigeant un bon crémage, on opère souvent en commençant par l'introduction d'une sauce ou solution concentrée de sels de fonte (*GILLIS et ECKA, 1997*).

II.2.2. Les sels de l'acide citrique (Les citrates) :

Ce sont de bons séquestrant du calcium mais ils n'ont aucune action structurante au cours du crémage, ce qui ne permet pas l'obtention de la pâte fondue courte recherchée dans les fromages fondus à tartiner.

Ils sont souvent à l'origine de défauts de marbrure dus, en général, à des cristallisations avec le calcium (*ECK et GILLIS, 1997*).

II.2.3. Autres sels de fonte :

La littérature spécialisée décrit d'autres sels de fonte comme les tartrates (sels de l'acide tartrique – acide dihydroxysuccinique) et les lactates (sels de l'acide lactique – acide 2 –hydroxypropionique). Toutefois, le tartrate et le lactate donnent des fromages fondus dont la qualité n'est pas acceptable, ce qui explique que leur emploi a été abandonné (*BERGER, KLOSTERMEYER et al., 1989*).

II.3. Les propriétés des sels de fonte :

Les sels de fonte présentent des propriétés utilisées en fonte qui sont les suivantes :

II.3.1. Le pouvoir complexant ou chélatant :

Il peut être défini comme l'aptitude à fixer des cations métalliques pour former des complexes solubles. Cette propriété de séquestration qu'ont les polyphosphates permet de retirer un composant métallique qui est le calcium du système protéique (*ECK et GILLIS, 1997 cité par CHEMACHE, 2011*).

Une autre propriété des polyphosphates est celle de rester en solution après complexation des cations métalliques.

Dans le cas du fromage fondu, les sels de fonte vont extraire le calcium du réseau protéique et permettre son déverrouillage sous une forme favorable à son hydratation.

Les protéines ainsi déboulinées vont jouer le rôle d'émulsifiant à l'interface du globule gras par leurs propriétés amphiphiles et permettre la formation de l'émulsion (*ECK et GILLIS, 1997*).

II.3.2. Le pouvoir tampon :

L'ajustement du pH d'une formule de fromage fondu constitue une étape importante du procédé de fabrication. La plage de pH tolérée se situe entre 5,2 et 6,2. Le pouvoir tampon des sels de fonte affecte la conformation des protéines, l'hydratation et la séquestration du calcium (*GUINEE et al., 2004 cité par CHEMACHE, 2011*).

Son effet sur la texture a été clairement démontré par KARAHADIAN et al, (1984).

Les différents sels de fonte permettent, par leur pouvoir tampon, d'ajuster le pH du produit à la bonne valeur (*CHAMBRE et al., 1997*). Cependant, SWIATEK (1964) a rapporté que l'augmentation de la concentration de polyphosphate a un effet moindre sur le pH (*CHEMACHE, 2011*).

II.3.3. L'effet bactériostatique :

Certains sels possèdent un effet bactériostatique. C'est le cas surtout des polyphosphates et des orthophosphates qui peuvent inhiber très nettement la multiplication de plusieurs espèces de *Salmonella*, des bactéries à Gram-positif telles que : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes* et

Clostridium botulinum en prolongeant la durée de conservation du produit fini (TANAKA *et al.*, 1979; LOESSNER *et al.*, 1997).

Cet effet s'explique par le fait que les parois et les membranes cellulaires de nombreux micro-organismes sont stabilisées par des ions Ca^{2+} . De ce fait, la liaison avec des anions qui ne peuvent traverser la membrane, comme c'est le cas avec les orthophosphates et les citrates, déstabilise l'enveloppe des micro-organismes (BOUTONNIER, 2002).

II.4. Le choix des sels de fonte :

Le choix du sel de fonte le plus adapté dépend en général de trois facteurs :

- La quantité de calcium lié aux protéines à échanger contre du sodium.
- Le pH.
- Le degré de crémage du produit à atteindre.

Au même titre que le crémage, la capacité d'échanger des ions est en réalité impossible à quantifier.

La pratique a toutefois permis d'élaborer un système d'évaluation selon le classement suivant :

0 = absent

x = faible, limité

xx = moyen

xxx = très fort

Ce classement est à l'évidence un schéma très approximatif mais il offre toutefois aux professionnels des points de repère pour le choix du sel de fonte le plus adapté. La sélection finale devrait être confirmée par des essais internes. (BOUTONNIER, 2000).

Les propriétés de quelques sels de fonte sont définies dans le tableau N°02

Tableau N° 2 : Propriétés de quelques sels de fonte (*BOUTONNIER, 2000*).

Propriétés Sels de fonte	Pouvoir tampon	Echange ion/capacité Séquestration.	Caractère crémant
Citrate	xx	0 / x	0
Monophosphate	xxx	0 / x	0
Diphosphate	xxx	0 / xx	xxx
Triphosphate	xx	0 / xx	xx
Polyphosphate	0 / x	xxx	0 / x

II.5. Dosage et mode d'emploi des sels de fonte :

La quantité de sels de fonte à mettre en œuvre se calcule exclusivement par rapport à la matière première à fondre et plus précisément par rapport à sa teneur en caséine intacte. Ainsi, avec l'utilisation des fromages jeunes à moyennement affinés renfermant une teneur en caséine relative de 80 à 90 %, une quantité de 3 % en masse de sels semble convenable. Par contre, avec une matière première plus affinée ou à base de fromages à pâte molle, une quantité de 2,0 à 2,5 % apparaît suffisante (*BOUTONNIER, 2000*).

III. Quelques contaminants du fromage fondu :

III.1. Les salmonelles :

La Salmonelle est une bactérie pathogène de forme allongée, flagellée, à Gram-négatif, connue comme une cause importante de maladies d'origine alimentaire dans le monde entier. Ce sont des bactéries qui peuvent vivre plusieurs semaines dans un endroit sec et plusieurs mois dans l'eau. Donc, la Salmonella est une bactérie très dangereuse qui cause plusieurs maladies (*GUIRAUD et GALZY, 1980*).

III.1.1. Caractères bactériologiques :

Les Salmonelles sont présentes sous forme de bacilles de 0,4 μ de long sur 0,1 μ de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature péritriche à l'exception des serovars d'origine aviaire, à savoir : *Salmonella avium* et *Salmonella gallinarum pullorum* qui sont immobiles (**BOURGEOIS, MESCLE et ZUCCA, 1996**).

En milieu liquide et après 18 à 24h d'incubation, les Salmonelles donnent un trouble homogène. Sur milieux solides et sélectifs de type gélose Hektoen, les Salmonelles donnent des colonies de 2 à 4 mm de diamètre, de couleur verte (couleur du milieu) avec ou sans centre noir. Sur milieu S-S (*Salmonella - Shigella*), les Salmonelles donnent des colonies de 0,2 à 0,4 mm de diamètre.

Les colonies ont généralement un aspect lisse mais parfois elles ont un aspect rugueux. Parfois, on retrouve des colonies de 1 mm de diamètre (**GUIRAUD et GALZY, 1980**).

Toutes les Salmonelles fermentent le glucose avec production de gaz à l'exception de *Salmonella typhi*. Elles ne fermentent pas le saccharose ni le lactose et ne possèdent pas la β .galactosidase, donc elles sont ONPG négatif à l'exception des sous-espèces *S. arizonae* et *S. diarizonae*, qui elles possèdent cette enzyme et sont donc ONPG (+).

Les Salmonelles produisent de l' H_2S à l'exception de *S. paratyphi*. Elles possèdent une Lysine Décarboxylase (LDC) et ne produisent pas d'indole, uréase et de tryptophane désaminase (TDA) (**MICHEL FEDERIG, 2005**).

III.1.2. Aspect des toxi-infections alimentaires dues aux salmonelles :

L'homme se contamine principalement par voie orale faisant suite à un contact direct avec un homme ou un animal infecté, ou bien à l'ingestion d'aliments contaminés.

Le tableau typique est celui d'une gastro-entérite aiguë fébrile avec diarrhée, douleurs abdominales, nausées, vomissements, céphalées et malaise général. Tout rentre dans l'ordre en 2 à 3 jours, ou au maximum en une semaine. Cependant, chez les jeunes enfants ou les personnes âgées, le tableau clinique peut être beaucoup plus sévère et

peut évoluer, parfois, vers la mort. Le taux de létalité attribué aux salmonelles est de l'ordre de 2%.

On déplore donc régulièrement, tous les ans, un, voire deux décès consécutifs aux cas de TIAC à *Salmonella* (hôpital, université ...) (**MICHEL FEDERIG, 2005**).

III.2. Les staphylocoques :

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires présentes sur la sphère rhinopharyngée aussi bien chez animaux à sang chaud (mammifères, oiseaux) que chez l'homme.

Les staphylocoques sont également isolés à partir de denrées alimentaires de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière et air), de l'environnement domestique de l'homme (cuisine et réfrigérateur), de l'environnement hospitalier et des ateliers de préparation alimentaire.

La peau et les muqueuses de l'homme constituent l'habitat de *S.aureus* vu que cette bactérie constitue un agent de contamination par manipulation (**AFSAA, 2009**).

III.2.1. Caractères bactériologiques :

Selon GUIRAUD (1998), le staphylocoque est une coque à Gram-positif de 0,5 à 1 µm de diamètre, non sporulé, immobile, aéro-anaérobie facultatif, halophile, possédant une catalase et une coagulase. Leurs colonies sont lisses et fréquemment pigmentées.

La recherche et le dénombrement des staphylocoques pathogènes peuvent être réalisés sur des milieux très salés liquides ou solides tels que le milieu Chapman ou le milieu de Baird Parker après 24 heures d'incubation à 37°C.

Il faut caractériser obligatoirement le pouvoir pathogène des souches de staphylocoque par la recherche de la phosphatase et de la coagulase. La fermentation positive du mannitol est souvent considérée comme un test présomptif de pathogénicité (**GUIRAUD, 1998**).

S.aureus est l'espèce type du genre *Staphylococcus*, parfois appelée Staphylocoque doré, produit une dizaine de toxines (3 hémolysines, 2 autres toxines antileucocytes,

une exfoliatine, 2 toxines pyrogènes (A et B), une toxine du syndrome du choc toxique et une entérotoxine staphylococcique libérée dans les aliments pendant la croissance (**BOURGEOIS, MESCLE et ZUCCA, 1996**).

III.2.2. Aspect des toxi-infections alimentaires dues à *Staphylococcus aureus* :

L'intoxication due à *Staphylococcus aureus* est caractérisée par une période d'incubation de courte durée (1 à 6 heures, en moyenne 3h) puis par des symptômes variés : nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées, crampes, hypothermie, céphalée, chute de la tension artérielle, hyper mobilité intestinale et par de la fièvre quelquefois. Les troubles sont de courte durée (1 à 2 jours) et la maladie est rarement mortelle. Le nombre de germes nécessaires pour qu'il y ait danger d'intoxications est de l'ordre de 10^5 à 10^6 germes par gramme. La quantité de toxines dangereuses pour l'homme varie de 0,1 à $10 \mu\text{g/kg}$. Les entérotoxines ne sont pas hydrolysées par les protéases digestives (pepsine et trypsine) et sont très résistantes aux traitements thermiques. Elles sont particulièrement thermostables pour des exotoxines.

Par ailleurs, un traitement thermique du type pasteurisation (60°C , 30 seconds) permettant de détruire les micro-organismes, ne détruira pas les toxines staphylococciques qui peuvent résister plusieurs heures à cette température (elles résistent 30 seconds à 100°C) (**GUIRAUD, 1998**).

III.3. *Escherichia coli* (*E. coli*):

Escherichia coli est l'espèce type du genre *Escherichia*. Les *Escherichia* possèdent les caractères bactériologiques classiques des entérobactéries. Les *E. coli* font partie de la flore microbienne du côlon de l'homme (espèce dominante 10^7 à 10^8 bactéries par gramme de matière fécale chez l'adulte) et de l'appareil digestif des animaux à sang chaud (**MICHEL FEDERIG, 2005**).

III.3.1. Caractères bactériologiques :

E. coli est un bacille à Gram négatif, anaérobie facultatif.

Sur gélose EMB (EosinMethylene Blue Agar), les colonies ont souvent un reflet vert métallique alors que sur le milieu de MacConkey, les colonies sont de couleur rose ou rouge (**GUIRAUD, 1998**).

Les *E. coli* fermentent le glucose en voie fermentative et produisent de l'indole à partir du tryptophane. Cependant, ces bactéries ne produisent pas d' H_2S et d'uréase, elles sont incapables d'assimiler le citrate comme seule source de carbone en aérobiose et ne produisent pas d'acétoïne (**BOURGEOIS, MESCLE et ZUCCA, 1996**).

III.3.3. Aspect des toxi-infections alimentaires dues aux *Escherichia coli* :

Escherichia coli est une bactérie qui survie dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. La majorité des souches d'*E. Coli* sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes. C'est le cas des souches d'*E. Coli* dites entérohémorragiques (ECEH). Ces dernières provoquent des diarrhées sanglantes et produisent une puissante toxine à l'origine du syndrome hémolytique et urémique (SHU). Régulièrement, des souches d'ECEH sont la cause d'intoxications alimentaires via la consommation de produits animaux mal cuits ou consommés crus. Les fruits, les légumes frais et les produits laitiers, ayant été en contact avec ces souches peuvent être également à risque. Les signes cliniques se manifestent par des douleurs abdominales et des diarrhées, les quelles peuvent évoluer vers des formes sanglantes (colites hémorragiques). Des vomissements et de la fièvre peuvent également survenir (**MICHEL FEDERIG, 2005**).

Objectif du travail :

L'objectif de notre travail consiste à étudier l'effet bactériostatique de quelques sels de fonte (PZ6, S9 et C_{spécial}) (Voir annexe n°5) à différentes concentrations sur *Salmonella typhi* (*S.typhi*), *Escherichia coli* (*E.coli*) et *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) dans des échantillons de fromage fondu au niveau du laboratoire de l'entreprise. Et ce, après avoir effectué une analyse microbiologique du fromage fondu à tester.

Pour ce faire, nous avons procédé par deux méthodes :

- **Méthode N°1** : Ensemencement de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sur leurs milieux de culture à différentes concentrations de sels de fonte.
- **Méthode N°2** : Contamination appliquée aux échantillons de fromage fondu par *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Pour cela, nous avons suivi les étapes suivantes :
 - Réalisation des échantillons de fromage fondu contenant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des sels de fonte : Cette CMI a été obtenue grâce à la méthode N°1.
 - Analyse microbiologique: Dans cette analyse, nous avons recherché tous les germes responsables de contamination et d'altération de notre produit ; de la matière premières jusqu'au produit fini.

I. Présentation de la démarche expérimentale :**I.1.Echantillonnage :****Méthode de prélèvement des échantillons :**

- Les prélèvements ont été effectués sur les matières premières (cheddar, poudre de lait, beurre, eau) et le produit fini (fromage fondu).

Les échantillons destinés aux différentes analyses microbiologiques sont prélevés aseptiquement à l'aide d'un matériel stérile.

*** Cheddar :**

- On effectue le prélèvement à partir d'un bloc de 25 kg de la manière suivante :
- Désinfecter l'enveloppe du cheddar avec l'alcool ;
- Couper un morceau du produit à plusieurs niveaux du bloc à l'aide d'un couteau stérile ;
- Introduire aseptiquement le prélèvement dans un récipient stérile et bien fermer le sac de prélèvement.

*** Poudre de lait :**

- Le prélèvement a été effectué à partir d'un sac de 25 kg.
- Nettoyer la surface du sac avec de l'alcool ;
- Prélever aseptiquement une quantité (100g) de la poudre de lait à l'aide d'une cuillère stérile, après homogénéisation.
- Introduire l'échantillon rapidement dans des récipients stériles bien fermés.

*** Beurre :**

- Le prélèvement a été effectué à partir d'un sac de 25 kg ;
- Nettoyer la surface du sac avec de l'alcool ;
- Prélever aseptiquement (100g) avec une cuillère stérile, après homogénéisation ;
- Introduire l'échantillon rapidement dans des récipients stériles bien fermés.

*** Eau :**

- Désinfecter à l'alcool et flamber le robinet ;
- Laisser l'eau couler quelques minutes ;
- Prélever aseptiquement 250 ml dans des flacons stériles.

*** Produit fini :**

- A partir de l'échantillon de fromage fondu, prélever 25g à l'aide d'une cuillère stérile dans un flacon stérile. Il est à noter que cet échantillon de fromage a été fabriqué au niveau du laboratoire en utilisant un pétrin de contenance de 1 kg.

I.2. Analyse microbiologique :

Cette analyse a été effectuée afin de s'assurer que le produit testé est de bonne qualité microbiologique conformément au Journal Officiel de la République Algérienne N° 35(J.O.R.A N° 35) (Voir annexe n°2).

Le tableau suivant représente les différents microorganismes recherchés dans les produits analysés.

Tableau N°3: les germes recherchés dans les produits analysés au niveau de Groupe Industriel Goumidi selon la norme interne de l'entreprise.

produit à contrôler \ germes recherchés	Eau	La poudre de lait	Le cheddar	Le beurre	Produit fini
Germes aérobies s totaux	+	+	+	+	+
Coliformes totaux à 37°C	+	+	+	+	+
Coliformes fécaux à 44°C	-	+	+	+	+
Staphylococcus aureus à 37°C	+	-	+	+	+
Streptocoques fécaux à 37°C	-	-	-	-	-
Salmonella à 37°C	-	-	-	-	+
Clostridium sulfito réducteur à 46°C	+	+	+	-	+
levures et moisissures à 25°C	-	-	+	+	+
E. coli	-	-	-	-	+

(+) : analyses effectuées, (-) : analyses non effectuées.

II.3. Etude de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* :

II.3.1. Caractérisation et identification des souches de *Salmonella typhi* et *Escherichia coli* :

- **Provenance des souches :**

La souche de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et le milieu hektoen nous ont été mis à notre disposition par le service de bactériologie de l'hôpital de Boufarik.

- **Caractérisation des souches :**

Mode opératoire :

- A partir d'une culture pure sur gélose nutritive, prélever un inoculum de souche et le mettre dans un tube de Triptone Sel Eau (TSE) ;
- A l'aide d'une micropipette, on dépose 1ml de la dilution à la surface d'une boîte de pétri contenant le milieu hektoen.

- Puis, on ensemence la surface avec une pipette pasteur, et on incube les boîtes pendant 24 à 48 heures à 37°C.

Lecture :

Après 24 heures ou 48 heures d'incubation à 37°C, les colonies de *Salmonella typhi* sont bleues, grises à centre noir :



Figure N°1 : Colonie de *Salmonella typhi* sur milieu Hektoen (ORIGINALE).

Les colonies d'*Escherichia coli* sont bombées, lisses et de couleur orange.

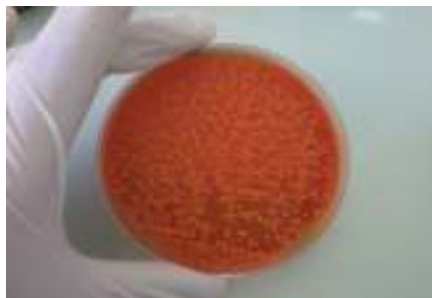


Figure N°2 : Colonie d'*Escherichia coli* sur milieu Hektoen (ORIGINALE).

- **Identification des souches :**

Utilisation d'une galerie API 20E :

La galerie API E20 comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au dessus de chaque tube, un signe indique la nature du test. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique (milieu Suspension Medium). Les réactions produites au cours de la période de l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Mode opératoire :

- Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide ;
- Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte ;
- Prélever à l'aide d'une pipette boutonnée une colonie parfaitement isolée. Dissocier soigneusement la colonie dans une ampoule de suspension Medium ;
- A l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir les microtubes de la galerie. Au sein des microtubes, le fabricant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube et la cupule.
- Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas pour les tests CIT, VP, et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule ;
- Lorsque que le sigle du test souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H2S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine ;
- Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, IND, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube .



Figure N°3 : Une galerie API 20E (ORIGINALE).

II.3.2. Caractérisation et identification des souches de *Staphylococcus aureus*

- **Provenance des souches :**

La souche de *S.aureus* ainsi que le milieu Baird Parker ont été mis à notre disposition par le laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

- **Caractérisation de souche :**

Mode opératoire :

- Prélever un inoculum de la souche conservée dans de la gélose nutritive et le mettre dans un tube de 9ml de TSE ;
- A l'aide d'une micropipette, on dépose deux goutte, 1ml de la dilution à la surface d'une boîte de pétri contenant le milieu de Baird Parker, on l'étale avec un râteau fait à partir d'une pipette Pasteur, puis on incube le milieu pendant 24 à 48heures à 37°C.

Lecture :**Observation macroscopique :**

Après 48heures d'incubation à 37°C, l'observation macroscopique révèle que les colonies de *Staphylococcus aureus* sont :

De forme circulaire bombées, lisses, convexes, de couleur noir, brillante, entourées d'une auréole d'éclaircissement.

La figure suivante montre l'aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu Baird Parker :



Figure N°4 : Colonie de *Staphylococcus aureus* sur milieu Baird Parker (ORIGINALE).

- **Identification de souche :**

La confirmation biochimique des colonies de *S. aureus* est basée sur un test de la catalase, test de la coagulase et un test du Mannitol mobilité.

a) Test de la catalase:

On met sur une lame un inoculum de la souche, on ajoute ensuite une goutte d'eau oxygénée.

Le résultat est immédiat : il est exprimé par une ébullition due à un dégagement de gaz.

- Test positif (+) : effervescence
- Test négatif (-) : non effervescence



Figure N°5 Résultat du test de catalase (*ORIGINALE*).

b) Test de la coagulase :

Ce test met en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma. C'est le principal test biochimique qui permet de caractériser *S. aureus*. Il consiste à incuber un mélange de plasma et la souche à tester pendant 4 heures à 37°C.

- Si le test est positif (+), l'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube.
- Si le test est négatif (-), aucun caillot n'est observé.



Figure N°6: Résultat du test de coagulase (*ORIGINALE*).

c) Test du Mannitol mobilité :

Ce test consiste à ensemencer par piqure centrale le milieu de mannitol mobilité, une anse chargée d'une suspension bactérienne. Le milieu est ensuite incubé à 37 °C pendant 24 h (*GUIRAUD, 2003*).

- Si le test est positif : le milieu devient jaune.
- Si le test est négatif : le milieu reste rouge.



Figure N°7: Résultat du test de mannitol mobilité (*ORIGINALE*).

II.3.3. Ensemencement de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sur les milieux de culture avec différentes concentrations de sels de fonte (Méthode N°1) :

II.3.3.1. Ensemencement de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* sur le milieu hektoen avec différentes concentrations des sels de fonte (Méthode N°1) :

Principe :

Cette méthode consiste à ajouter une quantité précise de sels de fonte au milieu de culture afin d'avoir la concentration voulue pour une étude directe de l'effet bactériostatique du sel de fonte sur *Salmonella typhi* et *Escherichia coli*.

Mode opératoire :

Nous avons calculé la quantité des sels de fonte à ajouter au milieu de Hecktoen afin d'obtenir les concentrations de sels de fonte voulues.

Les calculs ont été effectués comme suite :

Pour préparer 1000ml de milieu Hecktoen → 70 g Hecktoen déshydraté
 C'est-à-dire : 180ml de milieu Hecktoen → 12,60g Hecktoen déshydraté
 40ml de milieu Hecktoen → 2,8g Hecktoen déshydraté

Alors pour préparer 40ml Hecktoen avec des concentrations de sel de fonte à ajouter

Comme suite : 2,8g Hecktoen déshydraté → 100% Hecktoen
 X g sel de fonte → 0,5% sel de fonte

Ces quantités sont citées dans le tableau suivant :

Tableau N°4 : Quantité en gramme des concentrations des sels de fonte.

Concentration en Sel de fonte	Quantité de milieu de culture à préparer	Quantité en gramme de Sel de fonte
0%	40ml	0g
0,5%	40ml	0,014g
1%	40ml	0,029g
1,5%	40ml	0,044g
2%	40ml	0,059g
2,5%	40ml	0,074g
3%	40ml	0,089g
3,5%	40ml	0,092g

Après avoir calculé les quantités des sels de fonte pour les huit concentrations à ajouter dans le milieu hektoen, les étapes suivantes ont été réalisées :

1 / Peser les quantités de sels de fonte, grâce à une balance de précision, dans des pots stériles, puis ajouter 40ml du milieu de culture hektoen préalablement fondu.

2 / Pour chaque concentration, couler le contenu des pots stériles dans des boîtes de pétri

3 / Laisser se solidifier.

4 / Préparer la souche de *Salmonella typhi* et *Escherichia coli* en mettons un inoculum dans un tube de TSE.

5/ Pour toutes les concentrations préparées, ensemercer 0.1ml de la suspension sur milieu culture du densité 0.5Mc Farlon.

6 / Incuber les boîtes de pétri à 37°C pendant 24 à 48h.

Cette méthode est effectuée pour les trois sels de fonte (PZ6, S9, C spécial) et pour les deux souches *Salmonella typhi* et *Escherichia coli* séparément.

II.3.3.2. Ensemencement de *S.aureus* sur Baird Parker avec différentes concentrations des sels de fonte (Méthode N°1) :

Principe :

Cette méthode consiste à ajouter une quantité précise des sels de fonte au milieu de culture afin d'observer l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *S.aureus*.

Mode opératoire :

Nous avons calculé la quantité des sels de fonte à ajouter au milieu de Chapman afin d'obtenir les concentrations de sels de fonte voulues.

Les calculs ont été effectués comme suite :

Pour préparer 1000ml de milieu Chapman	→ 61,05g Chapman déshydraté
C'est-à-dire : 180ml de milieu Chapman	→ 10,98g Chapman déshydraté
40ml de milieu Chapman	→ 2,44g Chapman déshydraté

Alors pour préparer 40ml Baird Parker avec des concentrations de sel de fonte à ajouter

Comme suite : 2,44g Chapman déshydraté	→ 100% Chapman
X g sel de fonte	→ 0,5% sel de fonte

Ces quantités sont citées dans le tableau suivant

Tableau N°5: Quantité en gramme des concentrations des sels de fonte

Concentration en Sel de fonte	Quantité de milieu de culture à préparer	Quantité en gramme de Sels de fonte
0%	40ml	0g
0,5%	40ml	0,0122g
1%	40ml	0,0244g
1,5%	40ml	0,0366g
2%	40ml	0,0488g
2,5%	40ml	0,061g
3%	40ml	0,0732g
3,5%	40ml	0,0854g

Après avoir calculé les quantités de sels de fonte pour les huit concentrations à ajouter dans le milieu Baird Parker, les étapes suivantes ont été réalisées :

1 / Peser les quantités de sels de fonte, grâce à une balance de précision, dans des pots stériles, puis ajouter 40ml du milieu de culture Baird Parker préalablement fondu.

2 / Pour chaque concentration, couler le contenu des pots stériles dans des boîtes de pétri

3 / Laisser se solidifier.

4 / Préparer la souche de *Staphylococcus aureus* en mettons un inoculum dans un tube de TSE.

5/ Pour toutes les concentrations préparées, ensemercer 0.1ml de la suspension par étalement.

6 / Incuber les boîtes de pétri à 37°C pendant 24 à 48h.

Cette méthode est effectuée pour les trois sels de fonte (PZ6, S9, C_{spécial}).

II.3.4.Contamination appliquée aux échantillons par *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Méthode N°2) :

II.3.4.1.Processus de fabrication d'échantillons :

La fabrication du fromage fondu au niveau de laboratoire à été faite sur l'échelle pilote en utilisant un pétrin de contenance de 1 kg.

La fabrication est effectuée en 5 étapes :

1ère étape : Formulation pour 1kg de fromage fondu :

Le tableau suivant représente la formulation pour 1kg de fromage fondu :

Tableau N°6 : Présentation de matière première et formulation d'un 1 kg de fromage fondu

Matière première	Formule E.coli	Formule S.typhi	Formule S.aureus
Cheddar	120g	120g	120g
Beurre	100g	100g	100g
Poudre de lait	160g	160g	160g
Sel de fonte PZ6	1,03g	0 ,88g	/
Sel de fonte S9	1,03g	/	0,85g
Sel de fonte C_{Spécial}	1 ,03g	/	/
Sel de table	03g	03g	03g
MPC	30g	30g	30g
Acide citrique	03g	03g	03g
Préfonte	20,91g	23,12g	23,12g
Eau	560g	560g	560g

2ème étape : Préparation des matières premières : Cette étape consiste à peser les matières premières utilisées pour fabriquer 1 kg de fromage fondu.

3ème étape : Mélange, cuisson et crémage : Cette étape consiste à mélanger l'ensemble des ingrédients avec une cuisson réglée à une température de 100°C pendant 12 minutes. A la fin, on maintient la température à 90°C pour réaliser le crémage avec une spatule.

4ème étape : Conditionnement : Cette étape consiste à verser le fromage fondu dans des moules de 400g dotés d'un emballage primaire, puis on procède à la fermeture de ce dernier et on met l'étiquetage.

5ème étape : Refroidissement : Cette étape consiste à ramener la préparation à une température ambiante pour arrêter le crémage.

Le diagramme suivant représente le processus de fabrication du fromage fondu :

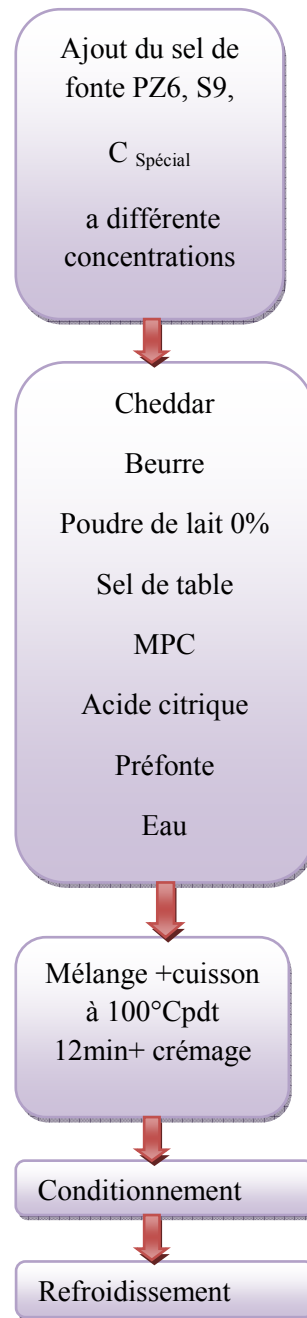


Figure N°8 : Processus de fabrication du fromage fondu.

I.3.4.2. Contamination appliquée aux échantillons par *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *S.aureus* :

A) Contamination appliquée aux échantillons de fromage fondu (fabriqués au niveau de l'unité O'KID'S) par *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *S.aureus* :

Principe :

Nous avons procédé à une contamination volontaire par *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *S.aureus* sur un échantillon de fromage fondu (fabriqué par l'entreprise) qui contient des concentrations des sels de fonte inconnu, pour pouvoir suivre leur développement sur les fromages fondus .

Mode opératoire :

- Peser 25g de l'échantillon et l'introduire dans un sac stomacher stérile.
- Diluer l'échantillon au TSE à ½ ;
- Broyer le contenu du sac au Stomacher : Obtention d'une suspension qu'on l'introduit dans un tube à essai ce qui nous représente la solution mère.
- Prélever un inoculum de *salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *S.aureus*, et on l'introduire dans la solution mère.
- Préparer les dilutions à partir de la solution mère jusqu'à la dilution 10^{-7} .
- Ensemencer 0.1 ml de chaque dilution à la surface des milieux (hektoen pour *S. typhi*, *E.coli*, et Baird Parker pour *S.aureus*) .
- Incuber les milieux ensemencés à 37°C pendant 24 heures

B) Contamination appliquée aux échantillons de fromage fondu(fabriqués au niveau du laboratoire) par *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *S.aureus* :**Principe :**

Nous avons procédé à une contamination volontaire par *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* *S.aureus* et sur nos échantillons qui contenant les concentrations des sels de fonte que nous avant obtenir dans les résultats de la 1^{ère} méthode, pour pouvoir suivre leur développement sur les fromages fondus à différente concentration de sel de fonte.

Mode opératoire :

- Peser 25g de l'échantillon et l'introduire dans un sac stomacher stérile.
- Diluer l'échantillon au TSE à ½ ;
- Broyer le contenu du sac au Stomacher : Obtention d'une suspension qu'on l'introduit dans un tube à essai ce qui nous représente la solution mère.
- Prélever un inoculum de *salmonella typhi* e, *Escherichia coli* ou *S.aureus* et on l'introduire dans la solution mère.
- Préparer les dilutions à partir de la solution mère jusqu'à la dilution 10^{-7} .

-Ensemencer 0.1 ml de chaque dilution à la surface du milieu de cultures.

-Incuber les milieuxensemencés à 37°C pendant 24 heures

Lecture : dénombrement par comptage des colonies sur les différents milieux de culture utilisés.

I .Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur milieux de culture (Méthode N°1) :

I.1.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *Salmonella typhi* :

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau n° 7:

Tableau N°7: Résultats du dénombrement de *Salmonella typhi* suite à l'utilisation de différentes concentrations des sels de fonte (Méthode N°1).

Concentration des sels de fonte	Nombre de colonies (hektoen+PZ6)	Nombre de colonies (hektoen+S9)	Nombre de colonies (hektoen+C _{spécial})
De 0% a 1%	Indénombrable	Indénombrable	Indénombrable
1.5%	98	Indénombrable	Indénombrable
2%	5		
2.5%	2		
De 3% a 3.5%	0	Indénombrable	Indénombrable

I.1.1.Effet bactériostatique de PZ6 sur *Salmonella typhi* :

Le dénombrement de *Salmonella typhi* a révélé que les concentrations utilisées ont donné différents résultats :

- Pour les concentrations 0%, 0,5%, et 1% : nous remarquons que la charge de *Salmonella typhi* est très élevée et dépasse le seuil d'acceptabilité ; donc nous n'avons pas pu dénombrer les colonies.
 - Pour la concentration 1,5% : nous remarquons que la charge de *Salmonella typhi* reste élevée et le dénombrement a atteint 98 colonies par boîtes.
- Ceci fait ressortir que *Salmonella typhi* dépasse le seuil d'acceptabilité et que le sel de fonte à cette concentration n'a toujours pas joué son rôle de pouvoir bactériostatique apparent à cause de sa faible teneur dans le milieu de culture.
- Pour les concentrations 2% et 2,5% : nous remarquons une diminution importante de *Salmonella typhi* par rapport aux autres concentrations.
 - Pour les concentration 3% et 3,5%: nous remarquons une absence totale de *Salmonella typhi*.

Ces résultats nous permettent de constater que le sel de fonte PZ6 à la concentration de 3% inhibe le développement de *salmonella typhi*.

I.1.2.Effet bactériostatique de S9 et C_{spécial} sur *Salmonella typhi* :

Nous remarquons que la charge de *Salmonella typhi* est très élevée donc nous n'avons pas pu dénombrer les colonies.

Ceci fait ressortir que ces sels de fonte à ces concentrations n'ont pas joué un rôle de pouvoir bactériostatique sur *Salmonella typhi*. Ceci est probablement due à une concentration inefficace des sels de fonte étudiés.

Il est également possible que le choix des sels de fonte soit à remettre en cause.

Il est important de noter qu'il est difficile de cerner la concentration idéale pour une inhibition car les concentrations sont des valeurs limites liées à des paramètres physico-chimiques tout aussi importants.

I.2.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *Escherichia coli* :

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau n°8 :

Tableau N°8: Résultats du dénombrement d'*Escherichia coli* à différentes concentration des sels de fonte (Méthode N°1).

Concentration des sels de fonte	Nombre de colonies (hektoen+PZ6)	Nombre de colonies (hektoen+S9)	Nombre de colonies (hektoen+C _{spécial})
0% à 1%	Indénombrable	Indénombrable	Indénombrable
1.5%	Indénombrable	Indénombrable	286
2%	181	Indénombrable	203
2.5%	127	150	107
3%	107	92	75
3.5%	62	47	52

I.2.1.Effet bactériostatique de PZ6 sur *Escherichia coli* :

Le dénombrement d'*Escherichia coli* a révélé que les concentrations utilisées ont donné différents résultats :

- Pour les concentrations 0%, 0,5%, 1% et 1,5%: nous remarquons que la charge d'*Escherichia coli* est très élevée et dépasse la seuil d'acceptabilité ; donc nous n'avons pas pu dénombrer les colonies.

- Pour les concentrations 2%, 2,5% et 3% : nous remarquons que la charge d'*Escherichia coli* reste élevée et le dénombrement a atteint 181,127 et 107 colonies respectivement.

Ceci fait ressortir que le sel de fonte à cette concentration n'a toujours pas joué son rôle de pouvoir bactériostatique apparent à cause de sa faible teneur dans le milieu de culture.

- Pour la concentration 3,5% : nous remarquons une diminution importante d'*Escherichia coli* par rapport aux autres concentrations. .

Ces résultats nous permettent de constater que le sel de fonte PZ6 à la concentration de 3,5% inhibe le développement d'*Escherichia coli*

1.2.2.Effet bactériostatique de S9 sur *Escherichia coli* :

Le dénombrement d'*Escherichia coli* a révélé que les concentrations utilisées ont donné différents résultats :

- Pour les concentrations 0%, 0,5%,1%, 1,5% et 2%: nous remarquons que la charge d'*Escherichia coli* est très élevée et dépasse le seuil d'acceptabilité ; donc nous n'avons pas pu dénombrer les colonies.

- Pour les concentrations 2,5% et 3% : nous remarquons que la charge d'*Escherichia coli* reste élevée et le dénombrement a atteint 150 et 92 colonies respectivement.

Ceci fait ressortir que le sel de fonte à cette concentration n'a toujours pas joué son rôle de pouvoir bactériostatique apparent à cause de sa faible teneur dans le milieu de culture.

- Pour la concentration 3,5% : nous remarquons une diminution importante d'*Escherichia coli* par rapport aux autres concentrations qui atteint 47 colonies.

Ces résultats nous permettent de constater que le sel de fonte S9 à la concentration de 3,5% inhibe le développement d'*Escherichia coli*.

1.2.3.Effet bactériostatique de C_{spécial} sur *Escherichia coli* :

Le dénombrement d'*Escherichia coli* a révélé que les concentrations utilisées ont donné différents résultats :

- Pour les concentrations 0%, 0,5% et 1%: nous remarquons que la charge d'*Escherichia coli* est très élevée et dépasse le seuil d'acceptabilité ; donc nous n'avons pas pu dénombrer les colonies.

- Pour les concentrations 1,5%, 2%, 2,5%, et 3% : nous remarquons que la charge d'*Escherichia coli* reste élevée et le dénombrement a atteint 286, 203, 107 et 75 colonies respectivement.

Ceci fait ressortir que le sel de fonte à cette concentration n'a toujours pas joué son rôle de pouvoir bactériostatique apparent à cause de sa faible teneur dans le milieu de culture.

- Pour la concentration 3,5% : nous remarquons une diminution importante d'*Escherichia coli* par rapport aux autres concentrations qui atteint 52 colonies.

Ces résultats nous permettent de constater que le sel de fonte C_{spécial} à la concentration de 3,5% inhibe partiellement le développement d'*Escherichia coli*

I.3.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *Staphylococcus aureus* :

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau n° 9:

Tableau N°9: Résultats du dénombrement de *Staphylococcus aureus* à différentes concentration des sels de fonte (Méthode N°1).

Echantillon	Nombre de colonies (hektoen+PZ6)	Nombre de colonies (hektoen+S9)	Nombre de colonies (hektoen+C _{spécial})
0% à 3%	Indénombrable	Indénombrable	Indénombrable
3,5%	Indénombrable	0	Indénombrable

I.3.1.Effet bactériostatique de S9 sur *Staphylococcus aureus*:

Le dénombrement de *Staphylococcus aureus* a révélé que les concentrations utilisées ont donné différents résultats :

- Pour les concentrations 0%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% et 3%: nous remarquons que la charge de *Staphylococcus aureus* est très élevée et dépasse le seuil d'acceptabilité ; donc nous n'avons pas pu dénombrer les colonies.

Ceci fait ressortir que le sel de fonte à ces concentrations n'a toujours pas joué un rôle de pouvoir bactériostatique apparent à cause de sa faible teneur dans le milieu culture.

- Pour la concentration 3,5%: nous remarquons une absence totale de *Staphylococcus aureus*.

Ces résultats nous permettent de constater que le sel de fonte S9 à la concentration de 3,5% inhibe le développement de *Staphylococcus aureus*.

I.3.2.Effet bactériostatique de PZ6 et C_{spécial} sur *Staphylococcus aureus* :

- A différentes concentrations, nous remarquons que la charge de *Staphylococcus aureus* est très élevée donc nous n'avons pas pu dénombrer les colonies.

Ceci fait ressortir que ces sels de fonte à ces concentrations n'a pas joué un rôle de pouvoir bactériostatique sur *Staphylococcus aureus*.

II. Résultats des analyses microbiologiques des matières premières et produit fini (Les échantillons utilisés dans la méthode N°2):

II.1. Eau de Process :

Les résultats des analyses microbiologiques de l'eau sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°10: Résultat des analyses microbiologiques de l'eau de process.

Echantillons	1	2	3	4	5	Norme du JORA 27-05-1998
Germes recherchés						
Germe aérobie à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<20 UFC
Germe aérobie à 22°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<102 UFC
Coliforme Totaux à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<10
Coliformes fécaux à 44°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Streptocoques fécaux à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
C.S.R à 37°C /lml	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
C.S.R à 37°C/20ml	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs

Abs : Absence

UFC : unité formant colonies

Les résultats du tableau N° révèlent l'absence totale de tous les germes recherchés ; ce qui est conforme aux normes établies par le J.O.RA (1998). Donc, l'eau utilisée dans la fabrication du fromage fondu est de bonne qualité microbiologique, ce qui nous permet de constater que :

- L'eau de process a subi des traitements efficaces ;
- La présence d'une station de traitement des eaux qui répond aux critères d'hygiène.

II.2. Poudre de lait :

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°11 : Résultat des analyses microbiologiques de la poudre de lait.

Echantillon	1	2	3	4	5	Norme du JORA 27-05-1998
Germes recherchés						
Germe aérobies totaux à 30°C	Abs	3	Abs	Abs	Abs	2x10 ⁵ UFC
Coliforme Totaux à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<01 UFC
Coliformes fécaux à 44°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<05 UFC
C.S.R à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs UFC

Abs : Absence

UFC : unité formant colonies

D'après les résultats illustrés dans le tableau ci-dessus, on remarque l'absence totale de tous les germes recherchés. Donc, on conclue que la qualité microbiologique de la poudre de lait utilisée par l'unité « Groupe Industrielle Goumidi » est satisfaisante et cela est due à la maîtrise des conditions de stockage par un personnel compétent, ce qui a conduit à une bonne conservation des matières premières.

II.3. Beurre :

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°12 : Résultat des analyses microbiologiques du beurre.

Echantillons	1	2	3	4	5	Norme du JORA 27-05-1998
Germes recherchés						
Germe aérobies totaux à 30°C	Abs	1	Abs	Abs	Abs	10 ² UFC
Coliforme Totaux à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	10 UFC
Coliformes fécaux à 44°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
S. aureus à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	10 UFC
Levure et moisissures à 22°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs

Abs : Absence

UFC : unité forment colonies

Les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus, dénotent une absence totale de tous les germes recherchés ; ce qui reflète une bonne qualité microbiologique du beurre utilisé dans la fabrication de notre fromage. Ceci nous montre que cette matière première est bien conservée au niveau de l'unité.

II.4. Cheddar :

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N° 13 : Résultat des analyses microbiologiques du cheddar.

Echantillon	1	2	3	4	5	Norme du JORA 27-05-1998
Germes recherchés						
Germe aérobies totaux à 30°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	< 3000 UFC
Coliforme Totaux à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<10 ³ UFC
Coliformes fécaux à 44°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	10 UFC
S. aureus à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	10 ² UFC
C.S.R à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	01 UFC
Levure et moisissures à 22°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	10 ³ UFC

Abs : Absence

UFC : unité formant colonies

D'après les résultats obtenus, nous constatons l'absence de tous les germes responsable d'altération et de la contamination du cheddar.

Nous pouvons conclure que le cheddar est de bonne qualité microbiologique, ce qui indique que cette matière première a été bien stockée et conservée au niveau de l'entreprise

II.5. Produit fini :

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N° 14 : Résultat et interprétation des analyses microbiologiques du produit fini.

Echantillons	1	2	3	Norme du JORA 27-05-1998
Germe recherché				
Germe aérobies totaux à 30°C	Abs	Abs	Abs	< 3000 UFC
Coliforme Totaux à 37°C	Abs	Abs	Abs	10 ² UFC
Coliformes fécaux à 44°C	Abs	Abs	Abs	10 UFC
S. aureus à 37°C	Abs	Abs	Abs	10 UFC
C.S.R à 37°C	Abs	Abs	Abs	01 UFC
Levure et moisissures à 22°C	Abs	Abs	Abs	10 ³ UFC
Salmonelle à 37°C	Abs	Abs	Abs	Abs

Abs : Absence

UFC : unité forment colonies

Les résultats de l'analyse microbiologique du produit fini notés dans le tableau N°14 ont révélé une absence totale des germes recherchés dans les 03 échantillons testés. Donc, le produit fini (fromage fondu) est de bonne qualité microbiologique, ce qui indique que nous avons respecté toutes les règles et les conditions de fabrication.

III. Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur des échantillons de fromage fondu (Méthode N°2) :

III. 1.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *S. typhi*, *E. coli* et *S.aureus* appliquée à un échantillon de fromage fondu (fabriqué par l'entreprise) :

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°15: Résultats du dénombrement de (Méthode N°2) *S. typhi*, *E. coli* et *S.aureus*

Dilution	<i>S. typhi</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	N.C	Ind	N.C	Ind	N.C	Ind
Solution mère 10^{-1}						
10^{-2} à 10^{-7}						

Ind : Indénombrable

N.C : Nombre de colonies

Nous remarquons que la charge de *S. typhi*, *E. coli* et *S.aureus* est très élevée donc nous n'avons pas pu dénombrer les colonies.

Ceci fait ressortir que les sels de fonte à des concentrations utilisées dans la fabrication de fromage fondu chez (Groupe Industriel Goumidi) n'ont pas joué un rôle de pouvoir bactériostatique sur *S. typhi*, *E. coli* et *S.aureus*. Ceci est probablement due à une concentration inefficace des sels de fonte étudiés.

Il est également possible que le choix des sels de fonte soit à remettre en cause.

III.2.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *Salmonella typhi* dans un échantillon de fromage fondu

L'évaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur milieux de culture nous a permis de constater que le sel de fonte PZ6 devait être testé à la concentration de 3% et à différentes dilutions.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°16: Résultats du dénombrement de *Salmonella typhi* (Méthode N°2)

Dilution	<i>Salmonella typhi</i>	
Solution mère 10^{-1}	N.C	Ind
10^{-2}	N.C	Ind
10^{-3} à 10^{-7}	N.C	0

Ind : Indénombrable

N.C : Nombre de colonies

- Nous remarquons que la charge de *Salmonella typhi* aux dilutions 10^{-1} et 10^{-2} est tellement élevée que nous n'arrivons pas à les dénombrer.

- Par contre, dans les dilutions 10^{-3} jusqu'à 10^{-7} nous remarquons une absence totale de *Salmonella typhi*.

Ceci nous permet de dire que le sel de fonte PZ6 à la concentration de 3% inhibe nettement le développement de *Salmonella typhi*.

III.3.Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *Escherichia coli* dans un échantillon de fromage fondu :

L'évaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur milieux de culture nous a permis de constater que les sels de fonte PZ6, S9 C_{spécial}, devait être testé à la concentration 3.5% et à différentes dilutions.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°17: Résultats du dénombrement d'*Escherichia coli* (Méthode N°2)

Dilution	<i>Escherichia coli</i>	
Solution mère 10^{-1}	N.C	Ind
10^{-2}		
10^{-3}		
10^{-4}		29
10^{-5}		4
10^{-6}		2
10^{-7}		0

N.C : Nombre de colonies

Ind : Indénombrable

- Nous remarquons que la charge d'*Escherichia coli* aux dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} est tellement élevée que nous n'arrivons pas à les dénombrer.

- Pour les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} : nous remarquons une diminution importante d'*Escherichia coli* qui atteint les 2 colonies.

- Pour la dilution 10^{-7} : nous remarquons une absence totale d'*Escherichia coli*.

Ce qui nous permet de dire que la combinaison des 3 sels de fonte (PZ6, S9 et C_{spécial}) à des concentrations de 3,5% inhibe très nettement le développement d'*Escherichia coli*.

III.4. Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *Stapylococcus aureus* dans un échantillon de fromage fondu :

L'évaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur milieux de culture nous a permis de constater que le sel de fonte S9 devait être testé à la concentration de 3.5% et à différentes dilutions.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°18: Résultats du dénombrement de *Stapylococcus aureus* (Méthode N°2)

Dilution	<i>Stapylococcus aureus</i>	
Solution mère 10^{-1}	N.C	198
10^{-2}		174
10^{-3}		4
10^{-4}		1
10^{-5}		1
10^{-6}		2
10^{-7}		0

N.C : Nombre de colonies

Ind : Indénombrable

- Nous remarquons que le dénombrement de *Stapylococcus aureus* aux dilutions 10^{-1} et 10^{-2} atteint 198 colonné et 174 colonné respectivement.

- Par contre à la dilution 10^{-3} jusqu'à la dilution 10^{-6} nous remarquons que la charge de *Stapylococcus aureus* à beaucoup diminué et atteint 2 colonie.

- Pour la concentration 10^{-7} : nous remarquons une absence totale de *Stapylococcus aureus*.

Ce qui nous permet de dire que le sel de fonte S9 à la concentration 3,5% inhibe très nettement le développement de *Stapylococcus aureus*.

D'après les résultats ci-dessus, il semblerait que plus la concentration en sels de fonte augmente plus le développement des trois souches diminue, du moins dans l'intervalle de concentrations étudié.

l'effet bactériostatique des sels de fonte (PZ6 , S9et C_{spécial}) à l'égard de *Salmonella typhi* , *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans la fabrication du fromage fondu , a été testé sur quatre échantions de fromage fondu et sur trois milieu de culture préparée, ces sels de fonte sont des polyphosphate ,ne détruisent pas les microorganismes mais plutôt qu'ils possèdent des facultés bactériostatiques qui peuvent ralentir très nettement la multiplication des microorganismes (Lee et al., 1979). (berger et al., 1989).

les résultats des analyses microbiologiques des matières premières montre que pour ; l'eau de reconstitution est conforme aux normes donc de bonne qualité microbienne démontrée par l'absence des germes pathogènes et les germes totaux qui selon (Bourgeois et al., 1996). renseignent sur la qualité globale du produit et les coliformes totaux et fécaux ainsi que les streptocoques fécaux qui selon(Joffin & Joffin ,1999). sont des indices de contamination fécale ,ainsi que l'absence des C.S.R don leur recherche permet d'apprécier l'efficacité des traitements (filtrat, chloration) et l'état de propreté des réseaux de distribution . De plus, leur présence est indésirable dans les eaux en raison des problèmes sanitaires et organoleptiques qui peuvent résulter de leur introduction (Bourgeois et Leveau , 1991)

La poudre de lait : Les résultats montre l'absence totale des germes d'indicateur de contamination fécale ainsi que l'absence des germes pathogènes. En l'occurrence : C.S.R et *s .aureus* qui selon (Légral & Vierling en, 2007),leur ingestions provoquent des toxi-infection alimentaire . en outre on note l'absence des levures et moisissure bien que tolérées par les normes nous amènent à dire que les conditions de stockage sont bonnes. donc la poudre de lait utilisé comme matière premiere est de bonne qualité microbiologique qui selon (Fine et Gervais ,2007),la faible activité de l'eau

caractérisant la poudre de lait réduit voire le développement microbienne ainsi le produit microbiologiquement stable tant qu'il est devenu à l'état sec .

Cheddar : Les résultats des analyses microbiologiques du cheddar indiquent l'absence totale des germes pathogènes : C.S.R, *S. aureus* ce qui donne une conformité parfaite aux normes fixé par (JORN N° 35). On outre, du point de vue fromager le(Jaouen , 1977) montre que la mauvaise qualité bactériologique du lait a une incidence directe et néfaste sur le rendement fromager et se traduit par des modifications variées d'odeur, de saveur ou d'aspect ayant des incidences directes sur la qualité de fromage. On conclut que la matière première cheddar utilisé dans la fabrication de fromage fondu est de bon qualité bactériologique.

Pour nos 3 échantillons de produit fini de fromage fondu qui contiennent les concentrations des sels de fonte suivantes :

- 3% de PZ6 pour *Salmonella typhi*
- 3,5% de PZ6, S9 et C_{spécial} pour *Escherichia coli*
- 3,5% de S9 pour *Staphylococcus aureus*.

D'après les résultats obtenus dans la fabrication de fromage fondu on constate, une absence totale des germes totaux et fécaux ,une absence des germes pathogènes ; *S. aureus* , C.S.R ,une absence des levures et des moisissures.les résultats donnent une conformité parfaite aux normes. Cela indique le bon traitement thermique qui selon (bourgeois et larpent ,1996).il détruit les micro-organismes pathogènes ou simplement indésirables pour la conservation du produit. Ce qui nous permet de les contaminer et d'être sûr de l'unique présence de nos souches à tester.

Pour l'évaluation de l'effet bactériostatique des souches testées sur le fromage fondu, Plusieurs travaux rapportent l'effet bactériostatique (Mouafak, 2012; moustafa, 2012; Chemache, 2011). L'analyse comparative de leurs résultats nous permet de considérer

Discussion

nos résultats comme très appréciables. nous avons choisi une méthode qui consiste à distinguer le comportement de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans les milieu de culture contenant uniquement les sels de fonte (Martin loessner, 1999). à différentes concentrations où nous avons remarqué une diminution nette à partir : D'une concentration de 3% de sel de fonte PZ6 sur *Salmonella typhi*, et 3,5% des sels de fonte (PZ6, S9 et C_{spécial}) sur *Escherichia coli*; que selon (Loessner, maier et al., 1999) la concentration minimale inhibitrice des polyphosphates est de 1%. Et une concentration de 3,5% de sel de fonte S9 sur *Staphylococcus aureus* alors que (Elisabeth Borch et Lena Lycken, 1999) trouve des concentrations inhibitrices minimales des polyphosphates ont été relevées pour différentes bactéries, la prolifération de bactérie gram positif peut être enrayée totalement par 0,05% à 0,3% de polyphosphate. En ce qui concerne la deuxième méthode de l'évaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte, qui consiste à percevoir le comportement de nos souches dans des échantillons de fromage fondu en présence de 3% de sel de fonte PZ6 pour *Salmonella typhi*, 3,5% des sels de fonte (PZ6, S9 et C_{spécia}) sur *Escherichia coli* et 3,5% de sel de fonte S9 pour *Staphylococcus aureus* et sur un l'échantillon de fromage fondu fabriqué par l'unité O'KID'S. l'effet bactériostatique de sel de fonte a montré des résultats appréciables dans les recherches effectuées par plusieurs chercheurs (Jauner M.J, 1996; Martin.J.Lassner 1999; Mouafak, 2012; Moustapha, 2012). Nous remarquons une diminution progressive à cause de la présence d'une concentration élevée de sels de fonte dans les échantillons fabriqués dans le laboratoire (Jauner M. et al., 1999), l'effet inhibiteur peut être supprimé par la chaleur et aussi par des bases bivalentes (Elisabeth Borch et Lena Lycken, 1999). ce qui explique la charge très élevée de nos souches dans les échantillons de fromage fondu fabriqué par l'unité O'KID'S. Ceci fait ressortir

Discussion

que les concentrations de sels de fonte qui sont présentes dans le fromage fondu qui a été fabriqué au niveau du laboratoire après avoir testé et choisi différents sels de fonte à différentes concentrations seraient plus efficaces que celles utilisées dans le fromage fondu qui a été fabriqué au niveau de l'unité O'KID'S.

En se basant sur les deux méthodes élaborées, nous avons pu conclure que l'effet bactériostatique des sels de fonte utilisés à l'égard de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* prend effet à une concentration de 3%.

CONCLUSION

Notre travail a porté sur l'étude de l'effet bactériostatique des sels de fonte (PZ6, S9 et C_{spécial}) à l'égard de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans la fabrication du fromage fondu.

Nous avons noté une absence totale de germes de contamination ainsi qu'une absence des Clostridium sulfite-réducteurs dans les différentes matières premières (poudre de lait, beurre, cheddar et eau) utilisées lors de la fabrication du fromage fondu. Il semblerait que toutes ces matières utilisées dans l'opération de fonte soient de très bonnes qualités bactériologiques et conformes aux normes en vigueur.

Pour nos 3 échantillons de produit fini de fromage fondu qui contiennent les concentrations des sels de fonte suivantes :

- 3% de PZ6 pour *Salmonella typhi* ;
- 3,5% de PZ6, S9 et C_{spécial} pour *Escherichia coli* ;
- 3,5% de S9 pour *Staphylococcus aureus*.

Et l'échantillon de fromage fondu fabriqué par l'unité O'KID'S :

Sont de très bonne qualité bactériologique, ce qui nous permet de les contaminer et d'être sûr de l'unique présence de nos souches à tester.

Pour l'évaluation de l'effet bactériostatique des souches testées sur le fromage fondu, nous avons choisi une méthode qui consiste à distinguer le comportement de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans les milieux de culture contenant uniquement les sels de fonte à différentes concentrations où nous avons remarqué une diminution nette à partir :

- D'une concentration de 3% de sel de fonte PZ6 sur *Salmonella typhi* ;
- D'une concentration de 3,5% des sels de fonte (PZ6, S9 et C_{spécial}) sur *Escherichia coli* ;
- D'une concentration de 3,5% de sel de fonte S9 sur *Staphylococcus aureus*.

En ce qui concerne la deuxième méthode de l'évaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte, qui consiste à percevoir le comportement de nos souches dans des échantillons de fromage fondu en présence de 3% de sel de fonte PZ6 pour *Salmonella typhi*, 3,5% des sels de fonte (PZ6, S9 et C_{spécial}) sur *Escherichia coli* et 3,5% de sel de fonte S9 pour *Staphylococcus aureus* et sur un échantillon de fromage fondu fabriqué par l'unité O'KID'S .

Nous remarquons une diminution progressive à cause de la présence d'une concentration élevée de sels de fonte dans les échantillons fabriqués dans le laboratoire, par contre dans les échantillons de fromage fondu fabriqué par l'unité O'KID'S nous remarquons une charge très élevée de nos souches.

Ceci fait ressortir que les concentrations de sels de fonte qui sont présentes dans le fromage fondu qui a été fabriqué au niveau du laboratoire après avoir testé et choisi différents sels de fonte à différentes concentrations seraient plus efficaces que celles utilisées dans le fromage fondu qui a été fabriqué au niveau de l'unité O'KID'S.

En se basant sur les deux méthodes élaborées, nous avons pu conclure que l'effet bactériostatique des sels de fonte utilisés à l'égard de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* prend effet à une concentration de 3%.

Ce travail demeure une ébauche et une série de perspectives sont envisageables telles que:

- La détermination avec une plus grande précision de la concentration minimale inhibitrice de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ;
- L'étude de l'effet bactériostatique de différents sels de fonte relatif à *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ;
- L'étude de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur d'autres germes pathogènes avec différents sels de fonte (polyphosphates à longues et/ou à courtes chaînes) à différentes concentrations et voir aussi les combinaisons possibles efficaces à cet effet.

Références bibliographiques

AFNOR,(1986); controle de la qualité des produit laitier, 3^{ème} edition

AFSSA (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des Aliments), (2009) : Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique.

ANDRE ECK ET JEAN-CLAUDE GILLIS., (1997) : le fromage de la science à l'assurance qualité 3ème, Technique et documentation.

BERGER W, KLOSTERMEYER H, MERKENICH K, UHLMANN G., (1989) : La fabrication du fromage fondu.

BOURGEOIS C.M ET LEVEAU J.Y., (1980) : Le contrôle microbiologique, Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires.

Bourgeois CM et Leveau JY, .(1991);technique d'analyse et de controle dans les industries agroalimentaire,edition tec et doc,lavoisier2^{ème} edition.tome 2

Bourgeois CMet Iarpent JP., (1996); microbiologie alimentaire. Aliment fermentés et fermentation alimentaire.édition Tec et Doc,Lavoisier 2^{ème} edition Tome 2

BOUTONNIER J.L., (2000) : Fabrication du fromage fondu. Techniques de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire.

BOUTONNIER J.L., (2002) : Fabrication du fromage fondu. Techniques de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire.

CHAMBRE M., DAURELLES J., (1997) : Le fromage fondu. Edition Technique de l'ingénieur .

CHAMBRE M., DAURELLES J., (2006) : Le fromage fondu. Edition Technique de l'ingénieur.

CHEMACHE loucif., (2011) : qualité de deux spécialités fromagère fabriqué et commercialisé .Thèse de l'ingénieur. Université d'algie.

COMMISSION CODEX ALIMENTARIUS., (2004) : Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires comité du codex sur le lait et les produits laitiers.

ECK A. ET GILLIS., (1997) : Le fromage de la science à l'assurance qualité, Ed. Lavoisier.

Elisabeth Borch and Lena Lycken (1997) ; Journal of food protection

Fin F et Gervais P, (2007); Techniques de l'ingénieur , décontamination des produits déshydratés

GUINEE T.P., CARIÆ M., and KALAB M., (2004): Pasteurized Processed Cheese and Substitute/Imitation Cheese Products.

GUIRAUD J.P ET GALZY., (1980) : L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Les éditions de l'usine nouvelle. Paris.

GUIRAUD J.P., (1998) : Microbiologie alimentaire.

GUIRAUD J.P.,(2003) : Microbiologie alimentaire. 2ème édition Dunod .Paris.

Jaunes M.Jry , Martin J.Lossner , David,A ,Glden(1999) ; Modern food microbiology 7^{em} edition

Joffin C et Joffin JN, 1999; microbiologie alimentaire, edition centre regional de documentation

JORA (JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE ALGERIENNE), (1998) .

JORF (JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE), (2007) :Décret n. 2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères.

Lee,R .M,P .A.Hartman ,H.M et al.,(1994) ;antibacterial mecanism of long –chain polyphosphates in staphylococcus aureus

Leyral Guy et Vieling Elisabeth,(2007); microbiologie et toxicologie des aliments;hygiene et sécurité alimentaire,4^{ème} édition.édition DOIN,Paris

Loessner ,M.J .,S .K.Maier ,P et al.,(1997) ;long chain polyphosphatesinhibit growth of clostridium in processed cheese.

Loessner et al.,(1998) ; Reprinted with permission from J.Food protect held by the International Association Food Protect.

LUQUET F.M., (1985) : Lait et produits laitiers, Vache, Brebis, Chèvre, Tome 1 : les laits, de la mamelle à la laiterie.

Maier,S.K.,S.Scherer and M.J.Loessner,(1999) ; long chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits bacillus cereus septum for medium ,which is dependent on bivalent cation .

Mouafak yasmine, (2012) ; Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *Bacillus cereus* : cas d'une spécialité Fromagere ; these d'ingénieur, faculté des sciences agrovétérinaires, département des sciences agronomiques université saad dahlab de blida.

Moustapha amine, (2012) ; Evaluation de l'effet bactériostatique des sels de fonte sur *s.aureus* et *Bacillus cereus* : cas d'une spécialité Fromagere ; these d'ingénieur, faculté des sciences agrovétérinaires , département des sciences agronomiques université saad dahlab de blida.

NORME INTERNE DE LABORATOIRE O'KID'S.

SMITH, B.L., (1990): Abridged Version, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

TANAKA N, GOEPFERT JM, TRAISMAN E, HOFFBECK WM., (1979): A challenge of pasteurized process cheese spread with *Clostridium Botulinum* spores. J Food Prot.

Annexe

Annexe 01 :

1. Matériels et milieux de cultures :

1.1. Matériel :

Verreries :

Pipettes pasteurs.

Boîte de pétris.

Tubes à essais stériles en verre 25 ml.

Flacons stériles de 250 ml.

Appareillage :

Bec Bunsen.

Bain Marie.

Autoclave.

Etuve d'incubation (22°C, 30°C, 37°C, 44°C).

Réfrigérateur.

Balance analytique.

Autres matériels :

Portoirs.

Couteau stérile.

Spatule.

1.2. Milieux de cultures liquides et solides additifs :

• Milieu Liquide :

Bouillon Trypton, Sel Eau (TSE) : utilisé pour le pré-enrichissement de *Salmonella* et la préparation de la solution mère et les dilutions.

Bouillon Giolitti Cantoni : utilisé pour pré-enrichissement de staphylocoque

Eau physiologique : pour la préparation de la solution mère et les dilutions.

Bouillons lactose au pourpre de Bromocrésol (BCPL) simple et double concentration : utilisé pour la recherche des coliformes fécaux et totaux dans l'eau.

Milieu Roth (simple et double concentration) : ce milieu sert au test présomptif pour les *streptocoques fécaux*. Et totaux dans l'eau.

Milieu Roth (simple et double concentration) : ce milieu sert au test présomptif pour les *Stréptocoques fécaux*.

• Milieu Solide :

Gélose Chapman : Utilisé pour la recherche et dénombrement des *Staphylocoques*.

Gélose viandes foie (VF) : Utilisé pour la recherche et dénombrement des *clostridium sulfitoréducteurs*.

Gélose Hektoen : utilisé pour l'isolement des *Salmonelles*.

DCLA : gélose désoxycholate : utilisé pour dénombrement de *coliforme total et fécal*.

PCA : plat count agar : utilisé pour dénombrement *des germes mésophiles totaux*.

- Gélose Schubert :

- Gélose Eva Litsky: Utiliser pour la recherche et dénombrement des streptocoques totaux et fécaux dans l'eau.

Additifs:

Additifs Hektoen: en utilise une ampoule de 5 ml par flacon de 250 ml (milieu sélectif aux salmonellas)

Additifs sulfite de sodium : on additionne la gélose de VF comme indicateur aux C.SR qui par ailleurs réduits les sulfites en sulfure, une dose de 5 ml par flacon de 250 ml de gélose utilisé.

Additifs Alum de fer : à été utilisé pour permettre un complexe noire entre le fer et les sulfites réduits par C.S.R, une dose de 1 ml par flacon de 250 ml de gélose utilisé.

Annexe

• Tellurite de potassium : pour indique la présence des staphylocoque par l'apparition d'un dépôt noir au niveau de l'étape d'enrichissement, une dose d'une ampoule de 15 ml et 1/2 ampoule par flacon de 500 ml

1.3. Appareillage et verrerie :

Appareillage :

- Balance analytique.
- Etuve.
- Thermomix : pour la réalisation des échantillons
- Bain Marie.

Verrerie :

- Flacon en verre.
- Pipette graduée.
- Tube à essai

2. Les milieux de culture :

2.1. Milieu de Chapman :

Milieu sélectif pour l'isolement des staphylocoques pathogène. La plupart des autres bactéries sont inhibée, sauf quelques espèces halophiles.

Composition :

Extrait de viande de boeuf.....	01g
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol.....	10 g
Agar	15 g
Rouge de phénol	0.025 g
Eau distillée	1000 ml

pH= 7,5.

2.2. Gélose Hektoen :

Elle est utilisée pour l'isolement des entérobactéries, elle permet la différenciation des Entérobactéries pathogènes :

Composition :

Protéase péptoné.....	12g
Extrait de levure	03 g
Chlorure de sodium.....	05 g
Thiosulfate de sodium.....	05 g
Sels biliaries	09 g
Citrate de fer ammoniacal	1.5 g
Salicine.....	02 g
Lactose	02 g
Saccharose.....	12 g
Fushine acide.....	0,1 g
Bleu de bromothymol.....	0,065 g
Agar	14 g
Eau distillée	1000 ml

pH= 7,50

2.3. Milieu de Giolitti et Contoni :

Composition :

Tryptone.....	10 g
Extrait de viande.....	05 g
Extrait de levure	05 g
Chlorure de lithium	05 g

Annexe

Mannitol	20 g
Chlorure de sodium	05g
Glycine	1,2 g
Pyruvate de sodium	03 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 6,9

2.4. Milieu de Rothe :

Ce milieu sert au test présomptif pour les streptocoques fécaux :

Composition :

Peptone.....	20 g
Glucose.....	05 g
Chlorure de sodium	05 g
Phosphate bipotassique.....	2,7 g
Phosphate monopotassique.....	2,7 g
Azide de sodium.....	0,2 g
Eau distillée	1000 ml

pH=6,9

2.5. Milieu de Evalitsky (éthyle-violet-azide) :

C'est un milieu sélectif de confirmation, il est utilisé pour la recherche de streptocoques fécaux dans les eaux et les denrées alimentaires.

Composition ;

Peptone	20g
Glucose.....	05 g
Chlorure de sodium.....	05 g
Phosphate bipotassique.....	2,7 g
Phosphate monopotassique.....	2,7 g
Azide de sodium	0,3 g
Ethyl viol.....	0,0005 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 6,8-7,0

2.6. Gélose viande foie (VF) :

L'étude du type respiratoire d'une bactérie (c'est-à-dire ses rapports avec FO₂) nécessite un milieu de culture riche contenant un gradient de pression partielle en di-oxygène.

Le principal milieu utilisé à cette fin est la gélose viande-foie (gélose VF).

Ce milieu est utilisé pour recherche et le dénombrement des spores de Clostridium sulfitoréducteurs dans les produits alimentaires.

Composition :

Glucose.....	02 g
Sulfite de sodium.....	07g
Citrate de sodium	0,5 g
Alun de fer et d'ammonium.....	02 g
Gélose	08 g
Bouillon VF	1000 ml

pH=7,4

Annexe

2.7. Tryptone - Sel -Eau (TSE) :

Milieu de pré-enrichissement utilisé avant l'enrichissement sélectif lors de la recherche des *Salmonelle* dans les aliments.

Composition :

Tryptone	01 g
Chlorure de sodium	25 g
Phosphate disodique anhydre.....	3,5 g
Eau distillée	1000 ml

pH= 7,2

2.8. Bouillon à la sélénite cystéine (SFB) :

C'est un milieu d'enrichissement recommandé pour la recherche des salmonelles dans les produits alimentaires. Le sélénite présent dans le milieu, inhibe la croissance des bactéries Coliformes et Entérocoques dans les 12 h suivant le début de l'incubation, ensuite l'action inhibitrice diminue lentement.

Composition :

Peptone tryptique de caséine.....	08 g	16 g
Lactose	08 g	16 g
Phosphate dissodique.....	20 g	40 g
Sélénite acide de sodium.....	10 g	20 g
Cystéine	0,02 g	0,04 g
Eau distillé.....	1000 ml	1000 ml

pH=7

2.9. Sabouraud;

Extrait de levure.....	05 g
Glucose.....	20 g
Gélose.....	16 g

pH=7.

2.10. Bouillon Lactose au Pourpre de Bromocrésol (BCPL) ;

Milieu pour recherche des coliformes dans l'eau.

Composition :

Peptone	10 g
Extrait de viande.....	05 g
Extrait de levure.....	05 g
Chlorure de lithium	05 g
Mannitol	20 g
Chlorure de sodium.....	05g
Glycine	1,2 g
Pyrovate de sodium.....	3,8 g

pH = 6,9

2.11. BHIB (Bouillon cœur-cervelle) :

Pour 1 litre de milieu :

Extrait cœur-cervelle	17,5 g
Peptone pancréatique de gélatine	10,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
Glucose.....	2,0 g

pH = 7,4 ± 0,2.

Annexe

2.12 Baird Parker :

Dissoudre par chauffage, stériliser par autoclavage à 120°C pendant 20minutes

Pour 1 litre de milieu :

Tryptone.....	10g
Pyruvate de sodium.....	10g
Glycine.....	12g
Chloride de lithium.....	5g
Extrait de levure.....	1g
Extrait de viande.....	5g
Agar.....	20g

2 additifs : Tellurite de potassium et le jaune d'œuf

Préparation du jaune d'œuf :

Le protocole de préparation normalisée est le suivant :

Choisir des œufs de poulet frais propre et non fêlés

Nettoyer à la brosse à l'aide d'un détergent liquide

Rincer

Plonger dans l'éthanol à 70% pendant 30s

Sécher à l'aide d'un papier absorbant stérile

Casser les œufs en séparant les blancs des jaunes, sans mettre les doigts

Placer les jaunes dans une éprouvette stérile.

Ajouter quatre volumes d'eau stérile

Réchauffer dans un bain d'eau thermostaté à 47°C durant 2heures

Placer au réfrigérateur 18 à 24heures pour réaliser la précipitation.

Recueillir, stérilement le surnageant.

pH= 7 ± 0,2 à 25°C

2.13. PCA (Milieu Plate Count Agar) :

Dissoudre par chauffage, stériliser par 5minutes d'ébullition (ne pas autoclaver)

Extrait de levure déshydratée

Tryptone

Glucose

Agar

Eau

Annexe

Annexe n°2

Prise d'essai :

Chaque fois qu'il est nécessaire il faut procéder à une homogénéisation des produits à l'aide de techniques et d'appareils appropriés (Broyeur).

Puis on prélève deux fois 25g dans un flacon contenant de 225 ml de diluant TSE.

- Homogénéiser.
- Cette suspension constituant alors la dilution mère (DM) qui correspond donc à la dilution 1/10.
- Les premières (25g) serviront à analysé bactériologique courante.
- Les secondes (25g) servirons à la recherche de salmonella.

Suspension mère et dilutions décimales :

Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques.

- Le but de cette dilution est pour faciliter la lecture en diminuant la charge microbienne dans une boîte contenant un milieu de culture.
- Entre le moment de la préparation de la suspension, ses dilutions et leurs mises en culture, il ne doit pas s'écouler plus de 45 minutes.

A) Cas de produit liquide (eau) :

L'eau étant liquide, il constitue la solution mère (SM)= 10^{-1} .

B) Cas de produit solide :

Pour le cas de cheddar, beurre ; poudre de lait, produit semi fin et produit fini.

- Introduire 25g de produit dans un flacon stérile contenant de 225 ml d'eau physiologique, après homogénéisation on obtient la dilution 10^{-1} considérée comme la dilution mère.
- A partir de la dilution 10^{-1} on prélève 1 ml (20 gouttes) à l'aide d'une pipette pasteur stérile qu'on introduit dans un autre tube stérile contenant 9 ml de l'eau physiologique. C'est la dilution 10^{-2} .

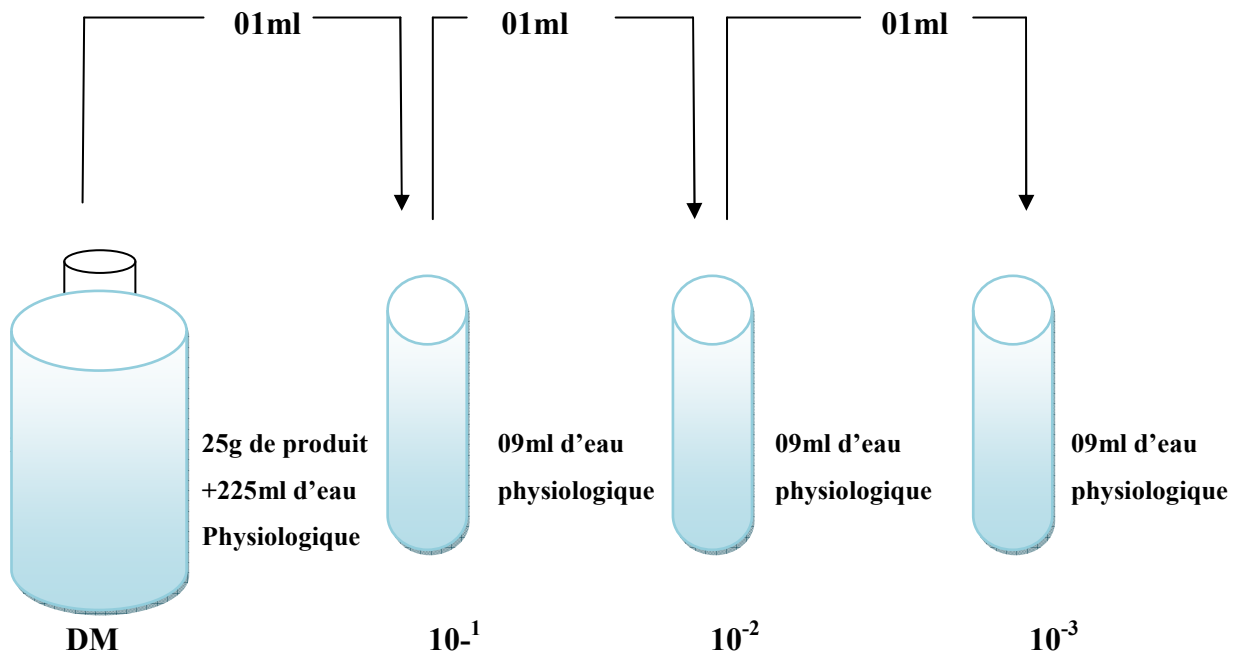
De la même façon on procède pour obtenir la dilution 10^{-3} .

Remarque :

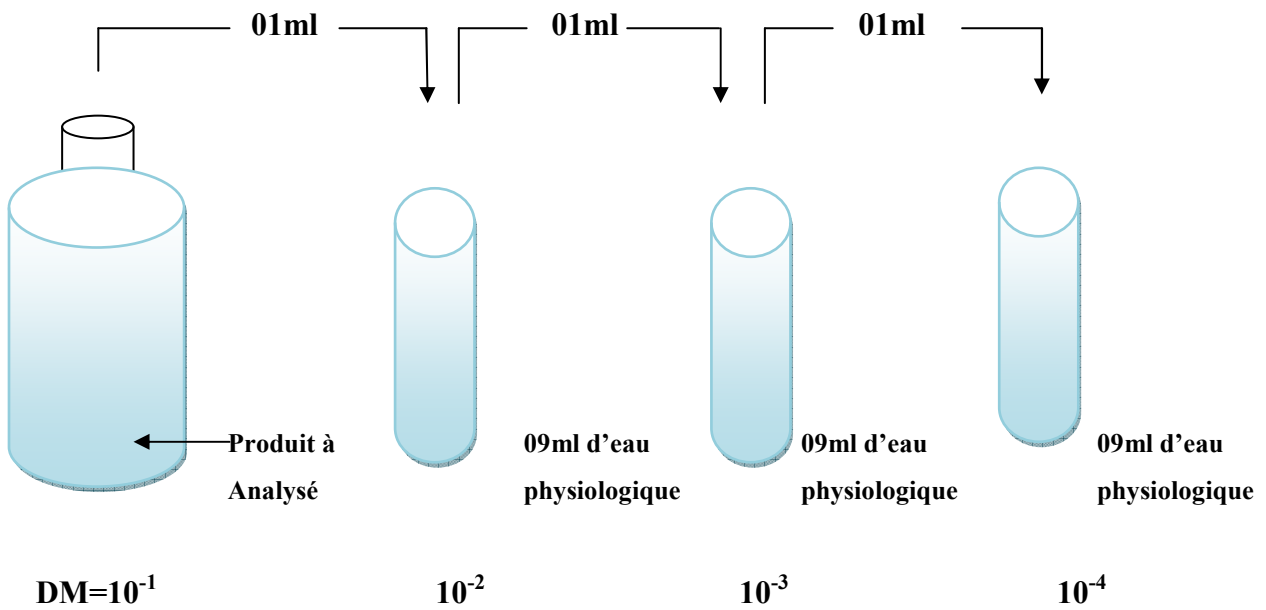
Entre chaque dilution décimale, il est impérativement recommandé de changer les pipettes pasteur et les pipettes graduées.

Contrairement à cela, alors de l'ensemencement il est recommandé de commencer par la plus haute dilution à savoir 10^{-3} dans le but justement de ne pas changer les pipettes.

Annexe



Cas de produit solide



Cas de produits liquides

Préparation des dilutions

Annexe

Recherche et dénombrement des germes dans l'eau:

Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (Institut Pasteur) :

But:

Le tube de dénombrement des \mathcal{B} aérobies mésophiles totaux présent dans l'eau de procès à 22° et à 37°C, c'est l'estimation du nombre total des germes présente dans cette eau.

- A température 37°C, pour le développement des germes provenant de l'homme ou des animaux à usage chaude.
- A température 22°C, pour le développement des germes Saprophytes de l'eau. **(BONTOUX, 1993).**

Principe :

La recherche et le dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux se réalisent 2°T différents afin de cibler à la fois les microorganismes (M.O) à tendance psychrophiles soit à 22°C et ceux franchement mésophiles soit 37°C.

Mode opératoire :

A partir de l'eau à analyser porter aseptiquement 2 fois 1 ml dans 2 boîtes de pétri vides préparées à cet usage et numérotées comme l'indique le schéma.

Compléter ensuite chacune des boîtes avec environ 20 ml de gélose PCA fondue puis refroidie à 45+ 1°C, faire en suite des mouvements circulaires et de va et vient en forme de 8 pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose. Laisser solidifier sur la paille, puis rajouter une 2ème couche d'environ 5 ml de la même gélose (cette double couche à un rôle protecteur contre les contaminations diverses).

Incubation :

- La première boîte sera incubée à 22 °C.
- La seconde boîte sera incubée à 37°C.

Pendant 72 heures :

Lecture :

Les germes se présentent dans les deux cas sous forme des colonies lenticulaires poussant en masse de couleur transparente.

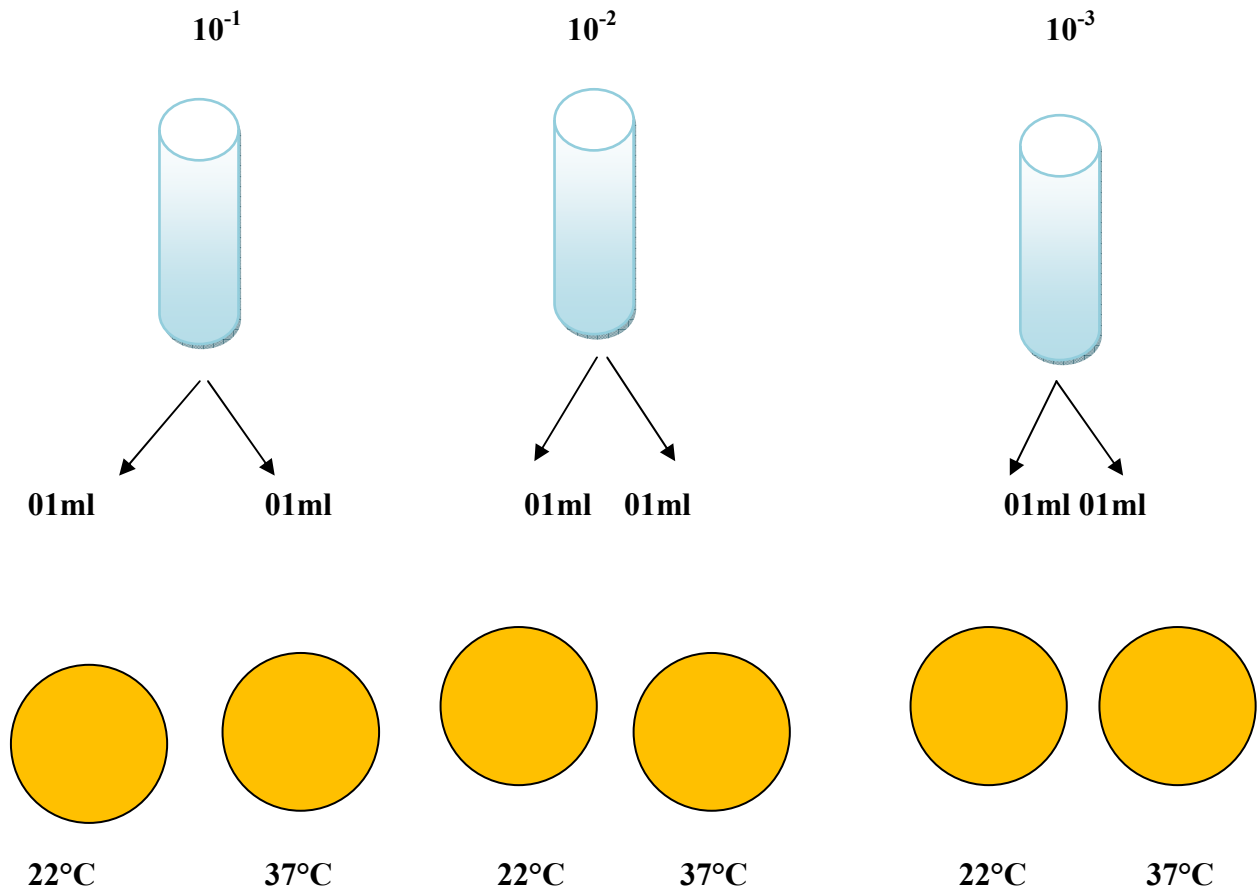
Dénombrement :

Il s'agit de dénombrement toutes les colonies, en tenant compte deux remarque suivantes :

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies.
- Le résultat sera exprimé en germe (ml d'eau ou germe/g)

Annexe

Dilution décimale



- Couler le PCA
- Incubation à 22°C et 37°C



Recherche et dénombrement des germes totaux dans l'eau

Annexe

Recherche et dénombrement des conformes totaux et fécaux (sur milieu liquide) (A F N O R N V P 08-OSO)

Définition :

Les coliformes sont des bactéries qui appartiennent à la famille des *Entérobactéries* en forme de bâtonnets, Gram (-), aéro-anaérobies facultatifs.

Principes :

Cette recherche fait appelle à deux testes consécutifs à savoir :

- Les testes présomption : réservé à la recherche des coliforme totaux.
- Les testes de confirmation : appelé encore test de Mac Kenzie et réservé à la recherche des coliformes fécaux à partir des tubes positifs du teste de présomption.

Mode opératoire :

Teste de présomption :

- Introduire 50 ml d'eau à analyser dans un flacon contenant 50 ml de BCPL (Bouillons lactose au propre de bromocrésole) double concentration (D/C) et une cloche de Durham.
- Mettre 10 ml d'eau dans 5 tubes contenant le BCPL (D/C).
- Mettre 1 ml d'eau dans 5 tubes contenant le BCPL simple concentration (S/C).
- Bien mélanger en agitant le flacon et les tubes et incuber l'ensemble à 37°C pendant 24 à 48h.

Lecture :

Le flacon et les tubes considérés comme positifs sont ceux qui sont présent :

- Un trouble du milieu accompagné d'un virage au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).
- Dégagement de gaz (1/10 de volume de la cloche).

L'expression des résultats s'effectue par la méthode NPP (nombre le plus probable) par l'utilisation de la table de MAC GRADY (annexe II) pour obtenir le nombre de coliformes totaux présent dans 100 ml d'eau.

Test confirmatif :

A partir des tubes et des flacons (+) de BCPL, on repique 2 à 3 gouttes de tube (+) dans un tube contenant le milieu Schubert + cloche Durham.

Incubation :

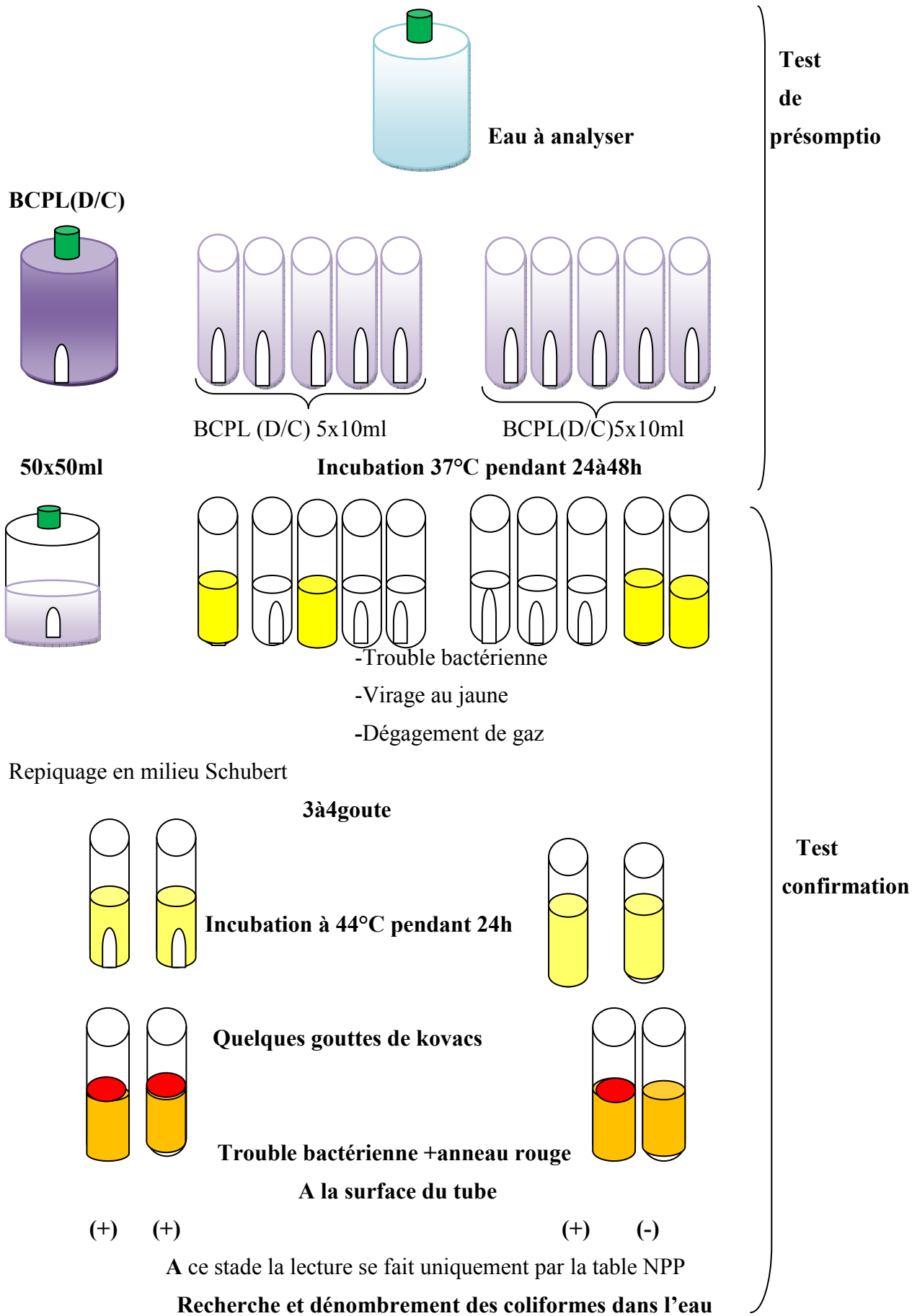
Incubation à 44°C pendant 24h.

Lecture :

Après incubation on sélectionne les tubes présentant un trouble du milieu et dégagement de gaz qu'on additionne de 3-4 gouttes de réactif de Kovacs.

- Lorsqu'un anneau rouge apparaît, le test est considéré comme (+), traduisant l'existence de coliformes fécaux, précisément *E.Coli*.
- Le dénombrement se fait selon la table de NPP qui correspond au nombre des germes dans 100ml.

Annexe



Annexe

Recherche des Streptocoques fécaux : (AFNOR NF V08-050).

Définition :

Les Streptocoques fécaux sont des bactéries appartenant à la famille des *lactobactéries*, ce sont des bactéries grames (+), aéro-anaérobie facultatifs, elles ont une forme cocci et ferment le glucose.

Leur présence dans les produits et considérée comme indice décontamination fécale.

But :

Recherche et dénombrement des *Streptocoques fécaux* dans l'eau à pour but d'estimer une contamination fécale de l'eau.

Principe :

La recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux fait appel à deux testes consécutifs à savoir :

Mode opératoire :

Test présomptifs :

- Dans un flacon contenant 50 ml de bouillon de Roth (D/C) on introduit 50 ml d'eau à analyser.
- Dans 5 tubes de bouillon de Roth (D/C), on verse 10 ml d'eau à analyser dans chaque tube.
- Dans 5 tubes de bouillons de Roth (S/C), on verse 1 ml d'eau à analyser dans chaque tube.

Incubation :

Se fait à 37°C pendant 48h.

Le flacon et les tubes considérés comme positifs sont ceux qui présentent un trouble et donc on procède au test Mac-Kenzie.

Test confirmation :

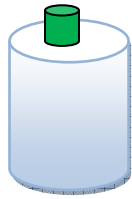
Réservé à la confirmation réelle des Streptocoques fécaux à partir des tubes (+) du teste de présomption.

Lecture :

- Les tubes présentant un trouble du milieu et une pastille blanchâtre ou violette du fond du tube sont considérés comme (+).
- La lecture finale se fait selon la table des NPP.

Annexe

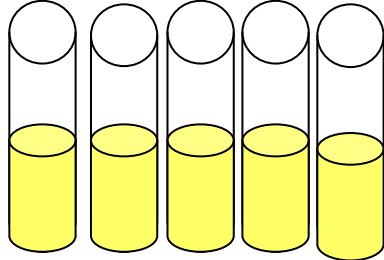
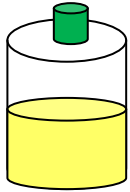
Rothe (D/C) 50X50 ml



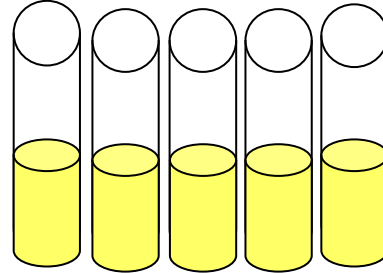
Eau à analyser

Test de
Présomption

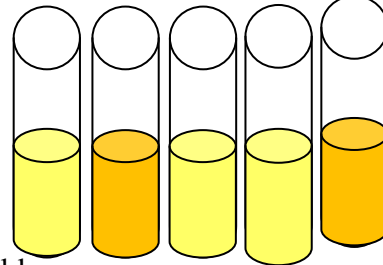
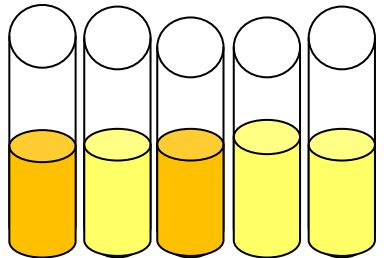
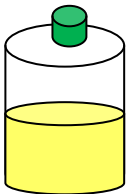
Rothe (D/C) 5X 10ml



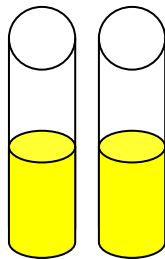
Rothe (S/C) 5X



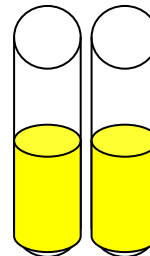
Incubation 37°C pendant 24-48h



Test confirmation on trouble

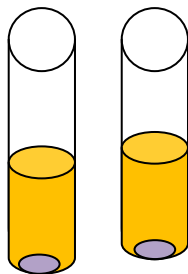


Repiquage en milieu
Evalitsky 3 à 4 gouttes



Test de
Confirm
ation

Incubation



(+) (+)

Trouble ~~B~~ienne+ pastille
Violette au fond de tube



(+) (-)

A ce stade la lecture se fait uniquement par la table

Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux dans l'eau

Annexe

Recherche et dénombrement des spores de *Clostridium sulfitoréducteurs*:

« NPT-904 »

Définition :

Sont des bacilles gram (+) anaérobies stricts, capables de sporuler, immobiles ou mobiles par ciliatures péritriche, réduisant les sulfites en sulfure. Leur présence dans les produits laitiers est l'origine d'intoxication alimentaire.

But :

Déterminer la qualité microbiologique d'une eau de process, les C.S.R sont souvent considérés comme témoins d'une pollution fécale, la forme spore beaucoup plus résistante que les formes végétatives des coliformes fécaux et les streptocoques fécaux permettraient ainsi, de détecter une pollution fécale ancienne. (**RODIER, 1996**)

Principes :

Il s'agit des bactéries telluriques, rencontrées dans le sol, les eaux d'égouts et l'intestin, elles peuvent contaminer et dégrader le sulfite en sulfure dans les produits alimentaires. (**GUIRAUD, 1998**).

Mode opératoire :

Préparation du milieu :

- Faire fondre un flacon de gélose viande - foie (VF).
- Le refroidir à 45°C.
- Ajouter aseptiquement une ampoule de fer et une ampoule de sulfite de Sodium dans les mêmes conditions.
- Mélanger bien.
- Puis maintenir le flacon dans une étuve 45°C jusqu'au moment d'utilisation.

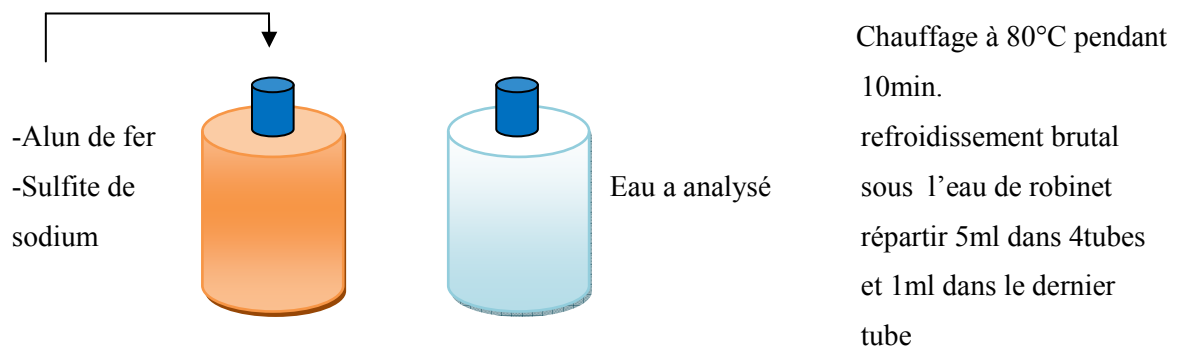
Ensemencement :

- Introduire un flacon de 180 ml d'eau (stériles)
- Chauffer à 80°C pendant 10 mn.
- Refroidir brutalement sous l'eau de robinet.
- Répartir dans 04 tubes à raison de 5 ml par tube et dans un tube 1 ml.
- Ajouter environ 15 ml de gélose VF liquéfiée et refroidie à 45°C.
- Laisser solidifier.
- Puis incuber à 37°C pendant 24-48 h.

Lecture :

Sont considérés comme (+), les tubes qui renferment des colonies noires de spores de C.S.R, on compte des colonies dans chaque tube et la somme des colonies présente le nombre finale de spore de CSR/20 ml et CSR/1 ml.

Annexe

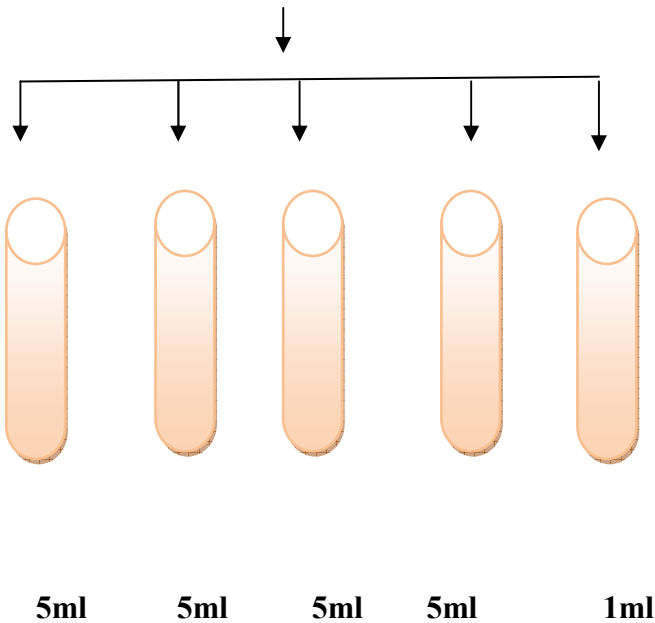


Gélose viande foie

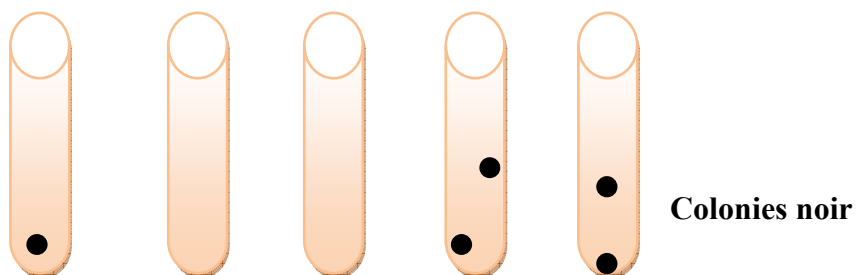
(VF)



15ml dans chaque tube



Incubation à 37°C pendant 24-48-72h



Recherche et dénombrement des clostridium sulfito réducteur dans l'eau

Annexe

Recherche et dénombrement des germes dans autres produits :

Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux:

(Beurre, cheddar, poudre de lait, produit semi fini et fini) même méthode.

But :

Il s'agit de compter les M.O aptes multiplié à l'air, dont la température optimale de croissance est entre 25 à 40°C.

- cet ensemble englobe les M.O pathogènes d'une part, divers organismes d'altération d'autre part, le dénombrement permet d'apprécier la pollution microbienne du produit (***BOURGOIS ET LEVEAU, 1980***).

Principe :

Ce sont des G.A.M (germes aérobies mésophiles) qui peuvent dégrader l'alimentation et causer par la suite des troubles digestifs ou allergies aux consommateurs, la présence de ces dernières peut également poser question à propos des germes pathogènes qui peuvent avoir lien.

Mode opératoire :

- A partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , porter aseptiquement 1 ml dans une boîte de pétri vide préparée a cet usage et numérotée.

- Couler ensuite environ 15ml de gélose PCA et homogénéiser le mélange par des mouvements circulaires et en formes de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose, sur une surface fraîche et horizontale puis ajouter la 2ème couche de 5 ml de la même gélose pour éviter la contamination.

- Laisser solidifier sur pailasse, puis incubées les boites couvercle en bas à 30°C pendant 24-48h.

Lecture :

Les colonies se présentent sous forme lenticulaire en masse et pour les compter en tient compte de :

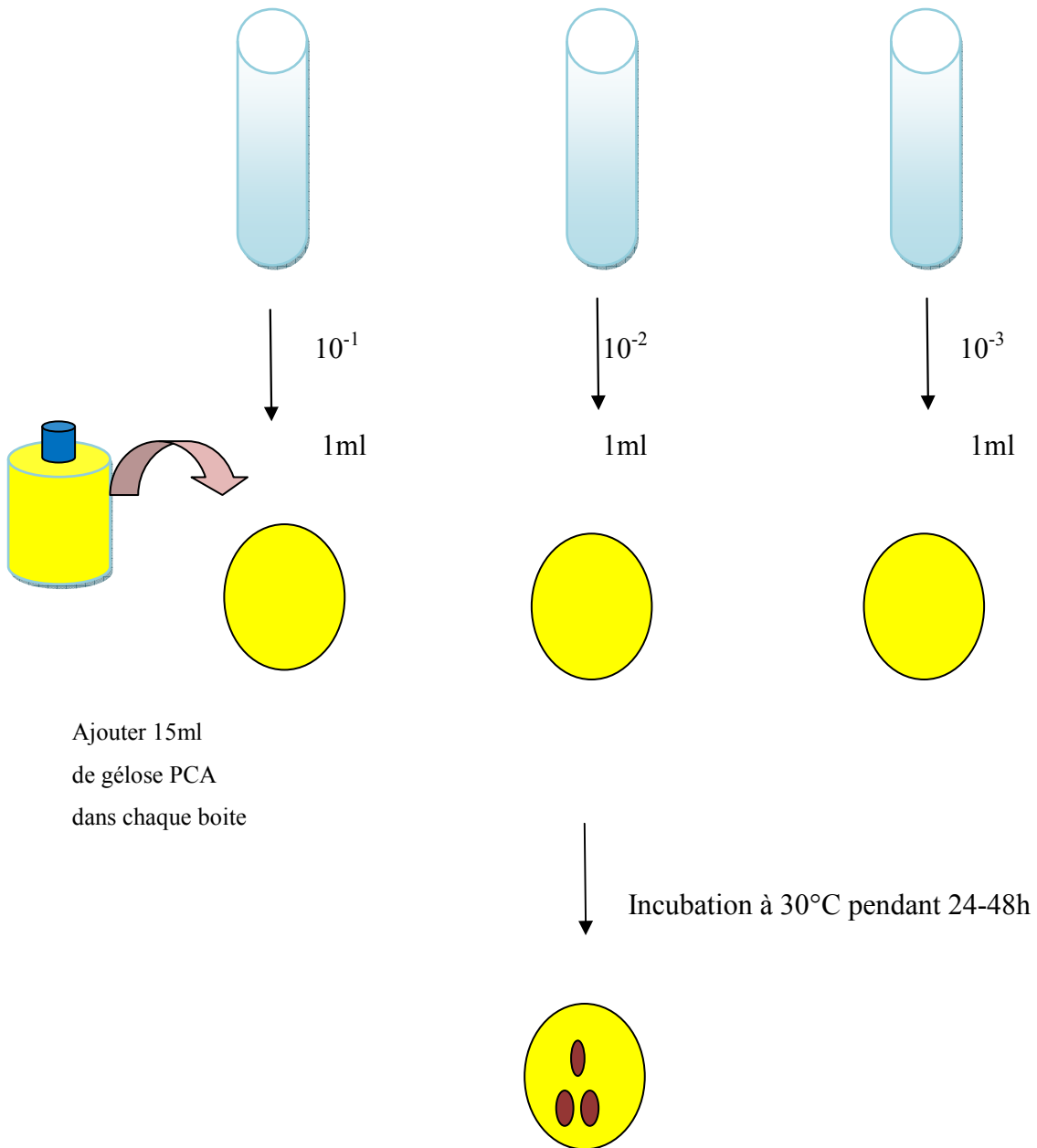
- Ne dénombrer que les boites contenant entre 15 et 300 colonies.

- Multiplier le nombre de germes trouvés par l'inverse de dilution.

- Faire la moyenne des colonies entre les différentes dilutions

Annexe

Dilution décimale



Recherche et dénombrement des GMT dans autres produit

Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus* : (NF ISO 6888).

Annexe

Recherche des germes dans le cheddar. Beurre, produit fini :

Définition :

Les Staphylocoques appartiennent à la famille des micrococcaceae, ce sont des germes cocci à Gram (+). Ils sont aérobies et anaérobies facultatifs, ils sont plus virulents.

But :

La recherche et le dénombrement de *Staphylococcus aureus* les seules à produire éventuellement une enterotoxine protéique cause d'intoxications alimentaires, permet donc de savoir si le produit à analyser présente des risques pour le consommateur. (GUIRAUD, 1998).

Principe :

L'enrichissement sur Guilliti Cantoni, additionné de téllurite de potassium est basé sur le principe de l'inhibition par téllurite de potassium est le chlorure de lithium (le téllurite de potassium qui est un agent sélectif et un indicateur de réduction noircissement des colonies)...

Le milieu d'isolement (milieu Chapman) grâce à son taux élevé en Na cl (7.5%) permet aux staphylocoques de s'y développer.

Mode opératoire :

1ère étape : Enrichissement.

On mélange 15 ml d'une solution de téllurite de potassium au flacon contenant le milieu de Giolliti Cantoni pour l'emploi. A partir de la solution mère et des dilutions décimales, on doit prélever 1 ml et la porter dans des tubes contenant le bouillon de Giolliti Cantoni (15 ml par tube préparés préalablement) pour chaque dilution un tube après incubé les tubes à 37°C pendant 24-48h.

Lecture 1 : Les tubes qui virent du jaune à la noire sont considérés comme positifs.

2ème étape : Isolement.

On fait couler le milieu gélose Chapman préalablement fondu, dans des boites de pétri vides stériles, une fois solidifié sur la pailleasse, on procède à l'ensemencement par étalement rapide de quelque gouttes de chaque tube (+). Incuber à 37°C pendant 24-48h. Les colonies suspectes apparaissent de couleur jaune doré.

Lecture 2 : Les colonies suspectes apparaissent de couleur jaune doré.

3ème étape : Cette opération est effectuée pour déduire la confirmation de *S.aureus*.

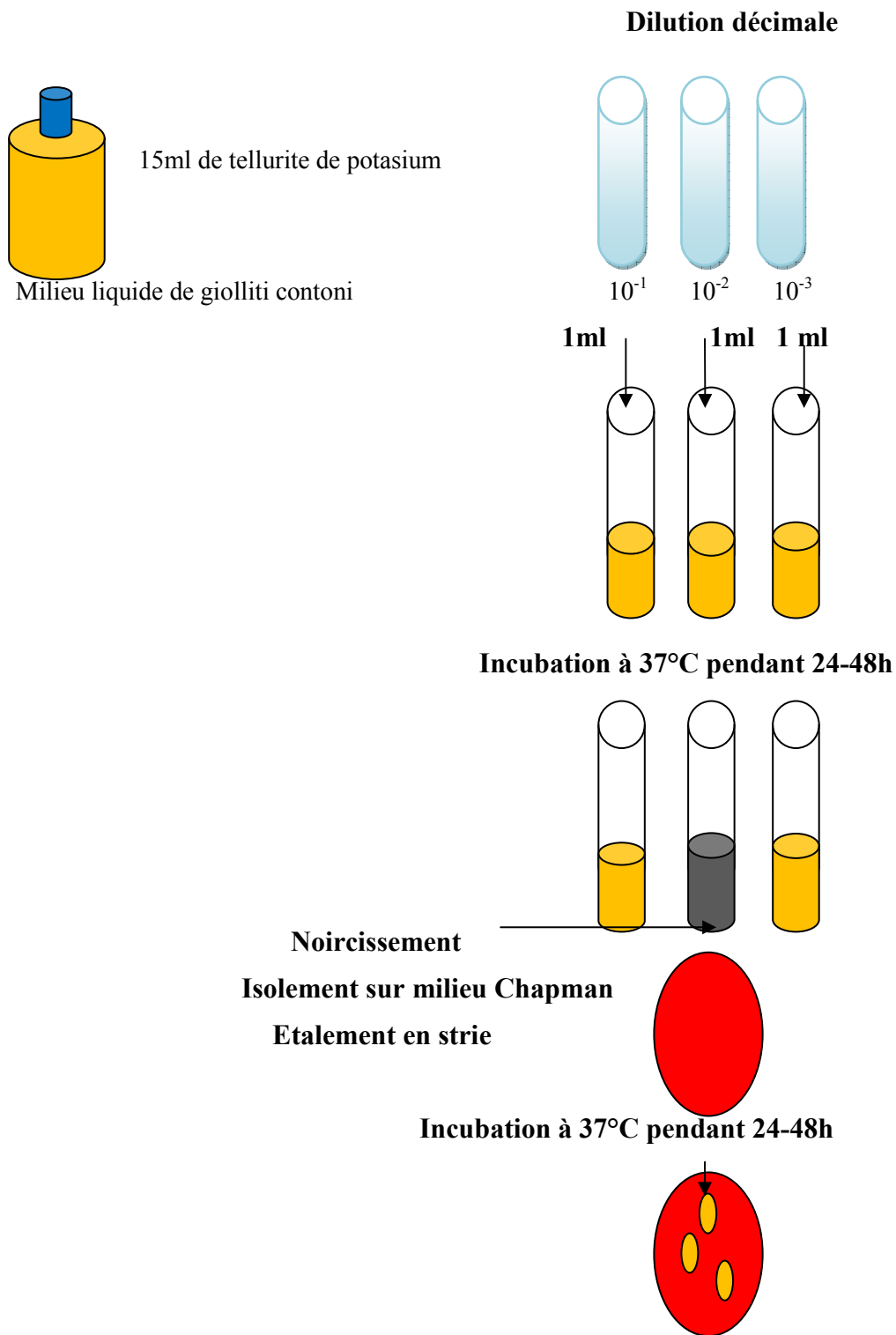
Catalase : On prend une colonie typique sur une lame puis on ajoute quelques gouttes de H₂O₂, s'il y'a dégagement d'O₂ avec bouillonnement de la réaction, donc catalase (+).

Coagulase : On prend une colonie qu'on verse dans un tube de BHIB ou il sera mis dans un bain Marie pendant 1 à 2 heures jusqu'à obtention d'une réaction trouble, on prend une quantité identique à celle du plasma de lapin ou humain, qui sera incubé par la suite à 37°C pendant 24h, la réaction (+) si le contenu se coagule (au moins 1/3 tube).

Remarque:

Si les 2 réactions sont positives donc c'est une *S.aureus*

Annexe



Après incubation : colonies lisses légèrement

Bombées, jaunâtres

Recherche et dénombrement des staphylocoques dans les autres produits Analyser

Annexe

Recherche et dénombrement des levures et moisissures pour les autres produits (Cheddar, beurre, produit fin) « NFV08- 059»

Définition :

Les levures et moisissures sont des champignons inférieurs qui se développent sur les produits acides et provoquent la dégradation du goût, le gonflement ainsi que la mauvaise présentation. Leur dénombrement permet l'évaluation de l'efficacité du traitement et de la capacité de conservation du produit.

But :

La recherche et le dénombrement des levures et moisissures sont réalisés pour 2 causes :

- leur aptitude à provoquer des altérations d'ordre organoleptique importantes au niveau de l'aliment.
- la propriété qu'ont certaines moisissures à produire des mycotoxines, notamment les altérations pouvant nuire à la santé du consommateur. (GUIRAUD, 2003).

Principes :

Le dénombrement est réalisé sur gélose Sabouraut, ce milieu permettant la croissance des levures et moisissures en inhibant le développement des bactéries.

Mode opératoire :

- A partir des dilutions décimales retenues (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), transférés aseptiquement 04 gouttes de chaque dilution aux boîtes de pétri contenant le milieu Sabouraut préalablement fondu et solidifié.

Etaler sur toute la surface du milieu à l'aide d'un râteau stérile.

Incubation :

- L'incubation de ces boîtes se fait à 22°C couvercle en haut pendant 05 jours en surveillant quotidiennement les boîtes pour éviter l'envahissement des moisissures sur le milieu.

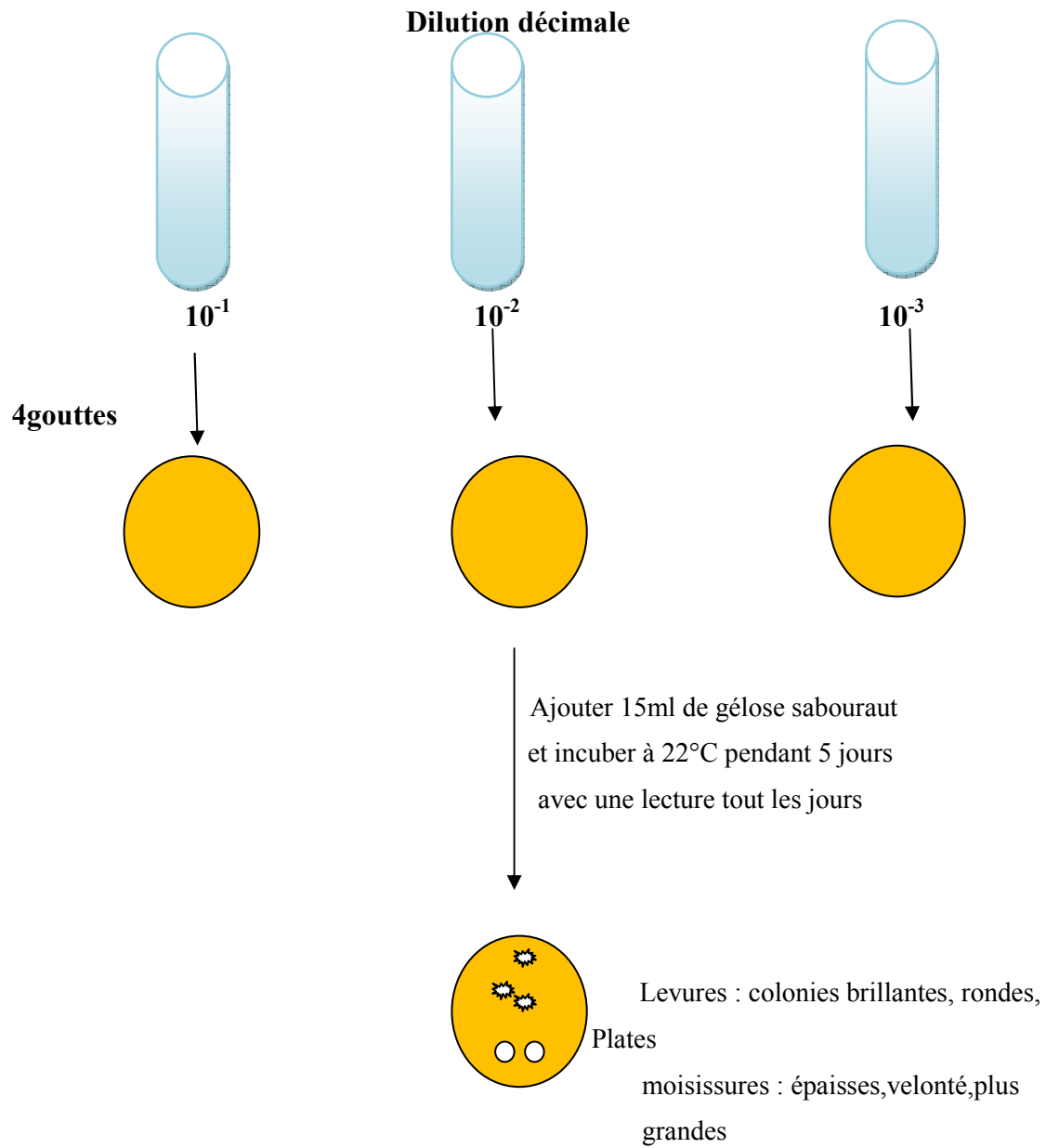
Lecture :

- Les colonies des levures sont brillantes, rondes et bondées, de couleurs différentes, de formes convexes ou plates et souvent opaques.
- Les colonies de moisissures sont épaisses, filamenteuses, pigmentées ou non, à aspect velouté et sont plus grandes

Expression des résultats :

- Le dénombrement s'agit de compter toutes les colonies ayant poussés sur les boîtes en tenant compte les facteurs suivant :
- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15-300 colonies.
- Multiplier le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution.
- Faire la moyenne arithmétique des colonies entres les différentes dilutions

Annexe



Recherche et dénombrement des levures et moisissures

Annexe

Recherche et dénombrement des salmonelles : « NFV 08-052 » (Cheddar, Beurre, produit fini).

Définition :

Salmonelle sont des entérobactéries qui présentent sous formes de bacilles gram (-), mobile par ciliature péritriche ou immobile, non sporulé, aéro-anaérobie facultatif, ferment le glucose avec production du gaz et de H₂S, réduire le nitrate au nitrite.

But :

La recherche des salmonella s'effectue dans le but de montrer le produit est dangereux à consommer ou non, car les Salmonelles sont des bactéries pathogènes. (*JOFFIN ET JOFFIN, 1985*)

Principe :

- Etant donné que le nombre de salmonella est généralement absent dans des produits alimentaires.
- Faire un pré-enrichissement qui est suivi d'un enrichissement sur milieu sélectif et d'un isolement sur milieu Hektoen pour pouvoir passer la lecture. (*GUYLEYRAL, 2002*)

Mode opératoire :

Cette recherche nécessite la réalisation des étapes suivantes :

1er jour : Pré-enrichissement.

- Introduire 25g d'échantillon à analyser dans un flacon stérile contenant 225 ml de TSE ou l'eau physiologique, homogénéiser bien et incubé à 37°C pendant 18h.

2ème jour : Enrichissement

- Porter 10 ml du pré-enrichissement sur SFB (Bouillon sélénite, cystéine) simple concentration (S/C) et 100 ml dans un flacon SFB (D/C) double concentration et incubé à 37°C pendant 18 à 24h.

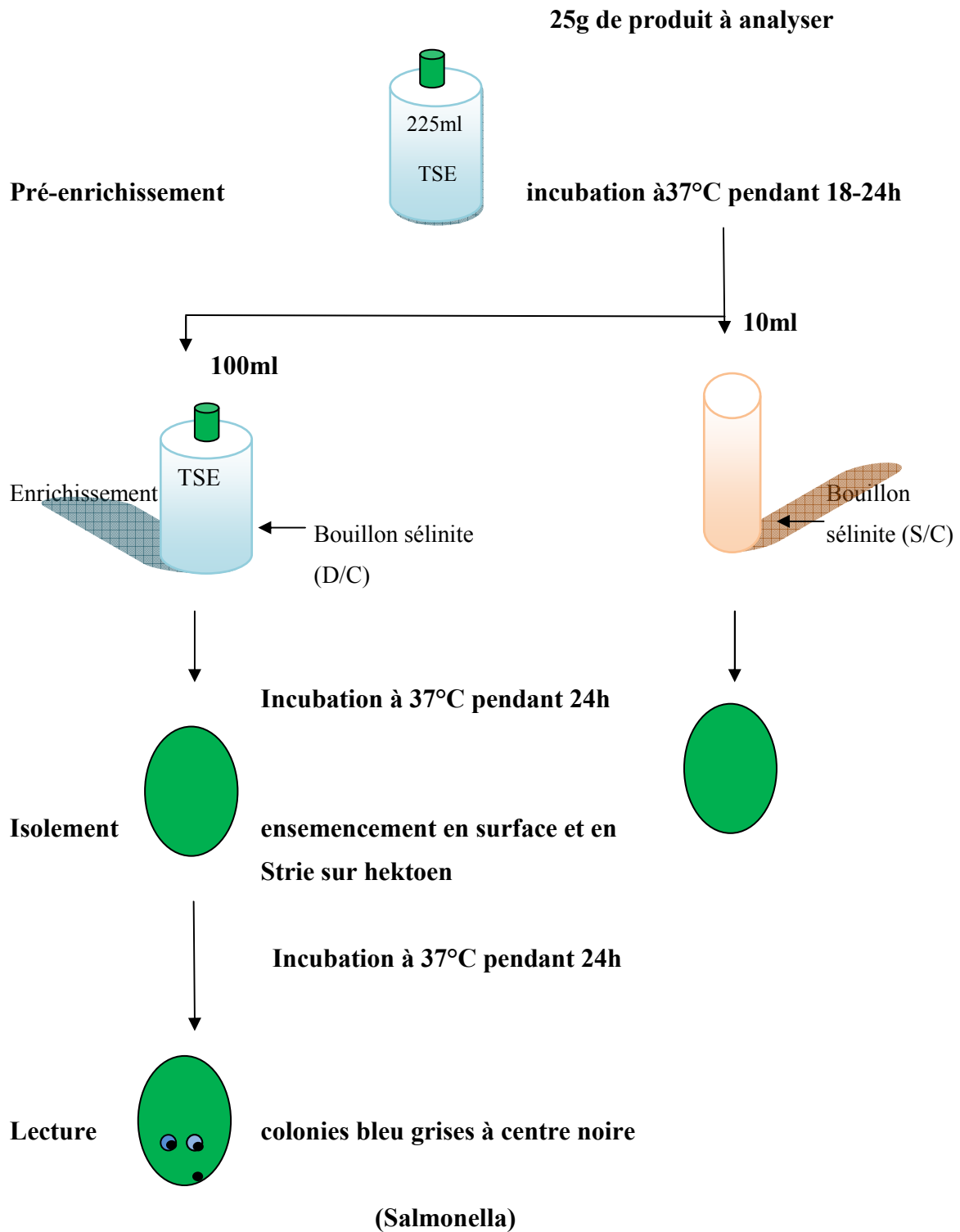
3ème jour : L'isolement.

- Un ensemencement en surface et en strie pour l'isolement sur gélose Hektoen + additifs Hektoen, coulé en boîte (avant l'ensemencement) et incubé à 37°C pendant 24h.

Lecture :

Les colonies sur l'Hektoen sont des colonies grises bleues à centre noir indiquant la présence de salmonelles.

Annexe



Recherche de salmonella dans les denrées

Annexe

Recherche et dénombrement des coliformes fécaux et totaux (dans la poudre de lait, cheddar, beurre, produit fini) « NFV08-052 ».

But :

Recherche et dénombrement des coliformes fécaux et totaux pour le produit testé une contamination fécale. Notons qu'*E.Coli* représente un indice de contamination fécale récente. (JOFFIN ET JOFFM, 1985)

Principe :

Le principe est basé sur :

- La propriété des coliformes totaux et fécaux (la fermentation de lactose avec production de gaz).
 - L'ensemencement par un milieu solide par la technique en boîtes sur géloses DCLA ou sur milieu liquide par la technique du NPP sur VRBL (Bouillant lactose biliée au Vert Brillant).
- Répartir à raison de 1 ml par tube muni au préalable d'une cloche de Durkam.

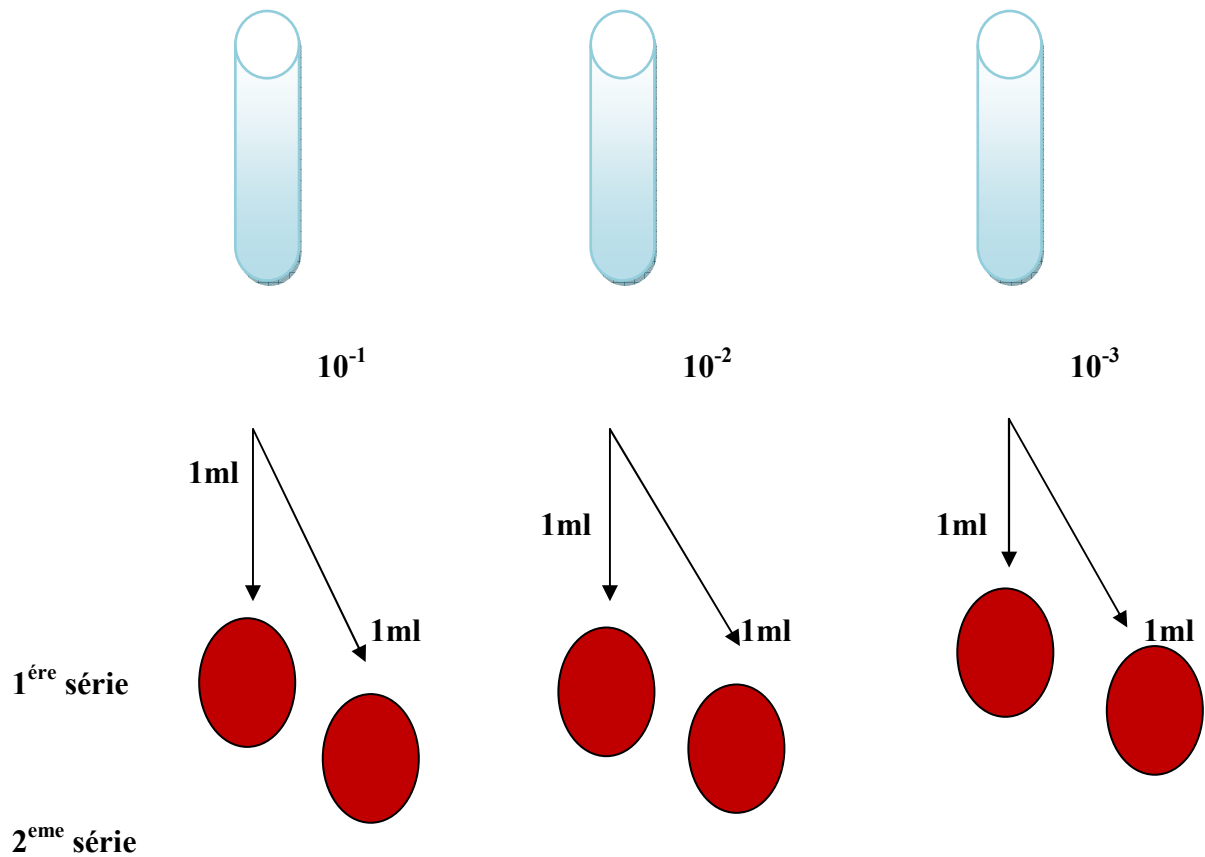
Mode opératoire :

- Préparer 2 séries de boîtes de Pétri.
 - A partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} porter aseptiquement 2 fois 1 ml dans 2 séries de boîtes de Pétri vides.
 - Couler ensuite avec environ 15 ml de gélose DCLA et homogénéiser bien par des mouvements circulaires et en forme de « 8 ».
 - Laisser solidifier sur paillasse puis ajouter une 2e^e couche d'environ 5 ml de la même gélose (pour éviter la contamination).
 - **La série 1** : à 37°C pendant 24-48h pour rechercher des coliformes totaux.
 - **La série 2** : à 44°C pendant 24-48h pour rechercher des coliformes fécaux.
- Lecture :**

Pour le dénombrement que les boîtes contenant entre 15-300 colonies de couleur rouge foncée, brillantes de 0.5 mm de diamètre.

Annexe

Dilution décimale

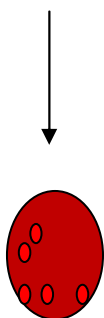


Ajouter 15ml de DCLA

Laisser solidifier

Incuber : 1^{ère} série à 37°C pendant 24-48h

2^{ème} série à 44°C pendant 24-48h



Colonies rouges foncées, brillante

Recherche et dénombrement des *coliformes fécaux et totaux* dans les denrées alimentaires

Recherche et dénombrement des *clostridium sulfito-réducteur* (Poudre de lait, Cheddar. produit fini « NFT90-415 »).

Annexe

But :

Il s'agit des bactéries telluriques, rencontrées dans le sol, les eaux d'égouts et l'intestin. Elles peuvent contaminer et dégrader les produits alimentaires (**GUIRAUD, 1998**).

Principe :

Les B sporulées anaérobies sont cultivées sur des milieux très réducteurs comme VF.

Mode opératoire :

- Préparation du milieu :
- Refroidir la gélose VF à 45 °C.
- Ajouter une ampoule d'alun de fer et une ampoule de sulfure de sodium dans les mêmes conditions.
- Bien mélanger.

Ensemencement :

- Introduire un flacon de 20 ml d'aliment à analyser.
- Chauffer à 80°C pendant 10 mn.
- Refroidir sous l'eau du robinet.
- Répartir dans 4 tubes à raison de 5 ml par tube.
- Ajouter 15 ml de VF par chaque tube et laisser refroidir à 45°C.
- Laisser refroidir.
- Incuber à 37°C pendant 24-48-72h.

Lecture :

- Les tubes positifs sont des tubes qui renferment des colonies noires (spores de C.S.R.).
- On compte les colonies dans chaque tube et la somme des colonies représente le nombre final des spores de C.S.R. /20 ml.

Annexe

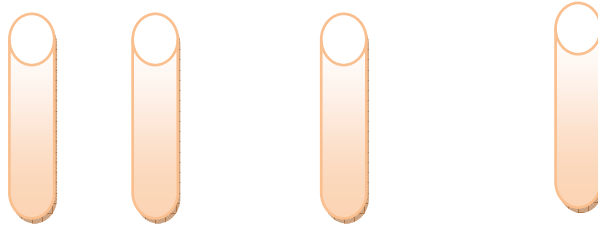
25g de produit
à analyser



Alun de fer
sulfite de sodium

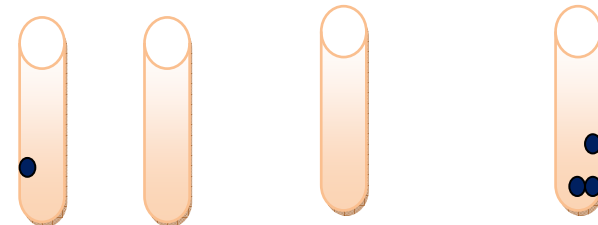
viande foie(VF)

- chauffer à 80°C pendant 10min
- refroidissement sous l'eau de robinet
- répartir les 5ml à raison de 5ml par tube



Ajouter 15ml de VF

Laisser solidifier, puis incuber à 46°C pendant 24 à 72h



Spoires noires

Recherche et dénombrement des clostridium sulfite réducteurs dans les denrées
alimentaires

Annexe

Annexe n°3:
TABLE DE MAC - GRADY
Nombre Caractéristique Nombre de Micro-organismes

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

Table NPP

1 X 50 ml	5 X 10 ml	5 X 1 ml	Nombre caractéristique	Limites de confiance	
				Inférieure	Supérieure
0	0	0	<1		
0	0	1	1	<0,5	4
0	0	2	2	<0,5	6
0	1	0	1	<0,5	4
0	1	1	2	<0,5	6
0	1	2	3	<0,5	8
0	2	0	2	<0,5	6
0	2	1	3	<0,5	8
0	2	2	4	<0,5	11
0	3	0	3	<0,5	8
0	3	1	5	<0,5	13
0	4	0	5	<0,5	13
1	0	0	1	<0,5	4
1	0	1	3	<0,5	8
1	0	2	4	<0,5	11
1	0	3	6	<0,5	15
1	1	0	3	<0,5	8
1	1	1	5	<0,5	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	<0,5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	59
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	100
1	4	5	43	15	120
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	100
1	5	2	54	18	140
1	5	3	92	27	220
1	5	4	160	39	450
1	5	5	>240		

Annexe

Annexe n°4

Spécification matière première : Beurre

Origine	Irlande, France
Méthode de production	pasteurisation du lait
Emballage	bloc de 25kg sous film plastique alimentaire+carton
Transport	bateau, camion frigorifique
Conditions de stockage	6° à10°C
DLC	18 mois à 2 ans
Manutention avant l'utilisation ou la transformation	Conserver dans des chambres frigorifiques vérification visuelle

Spécification matière première : Poudre de lait

Origine	France, Belgique, Irlande
Méthode de production	Pasteurisation du lait, Séchage par atomisation
Emballage	Sacs de 25 kg ou big-bags de 1000 kg Big-Bagde polyéthylène et sac en papier triple couche
Transport	Bateau, camions
Conditions de stockage	local frais sec, aéré à l'abri de la lumière
DLC	18 mois à 2 ans
Manutention avant l'utilisation ou la transformation	Ouvrir juste avant utilisation et vérification visuelle d'absence: grumeaux, particules noirs, corps étranger

Spécification matière première : Cheddar

Origine	Océanie (Irlande et Nouvelle Zélande)
Méthode de production	Cheddarisation
Emballage	Bloc plus ou moins 25Kg, film plastique sous vide, carton
Transport	bateau, camion
Conditions de stockage	6° à10°C
DLC	2 ans à 3 ans
Manutention avant l'utilisation ou la transformation	Laisser à température ambiante pour faciliter la découpe et le broyage, contrôle visuel et Elimination de toute trace de moisie (lavage de matière première)

Annexe

Spécification matière première: Sel de fonte

Origine	France
Emballage	sac en papier, sac en plastique ou PPO
Transport	Bateau, camion
Conditions de stockage	Stocker dans un endroit frais et sec (0 -20 °C) et conserver dans son emballage d'origine
DLC	2 ans
Manutention avant l'utilisation ou la transformation	Ouvrir juste avant utilisation susceptible de motter

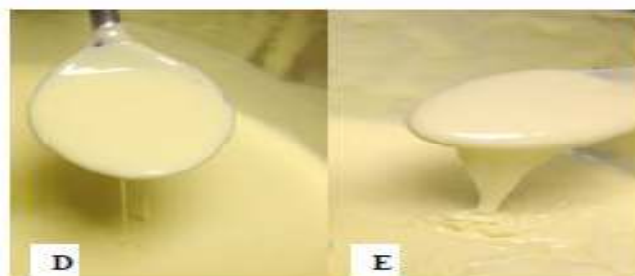
Annexe n°5

Fonctionnement des sels de fonte
(A) avant l'ajout des sels de fonte,
(B) l'ajout des sels de fonte,
(C) après l'ajout des sels de fonte



Annexe n°6

Effet de l'écémage sur la consistance de la pâte fromagère
(D) avant écémage,
(E) après écémage



Annexe

I. Présentation du lieu de travail :

Notre étude s'est déroulée au sein de l'unité **O'KID'S** du Groupe Industriel Goumidi (**GIG**) situé dans la zone industrielle d'Ouled Yaich de Blida.

Depuis sa création en **1998**, le champ d'activité de cette unité est passé du conditionnement et de la commercialisation des fromages types **GOUDA**, **EDAM** et **EMMENTAL**, à la production et à la commercialisation du fromage fondu à tartiner UHT en portions et en barres sous sa propre marque **O'KID'S** en **2000** et **2006** respectivement.

Le groupe compte à l'heure actuelle **200** salariés et est doté d'un laboratoire central assurant le contrôle qualité (physicochimique et microbiologique) de ses produits en s'appuyant sur des méthodes de référence.

En **2004**, des actions de mise à niveau et d'amélioration en collaboration avec l'**ONUDI** (Organisation des Nations Unies pour le développement Industriel) et Eurodéveloppement ont été effectuées.

En **2008**, le groupe a inscrit, dans son plan d'action par l'élaboration et la mise en place du système de management de la qualité **ISO 9001** version **2008** afin d'instaurer une organisation visant une meilleure gestion de la qualité.

En **2009**, le **GIG** a été certifiée selon la norme **ISO 9001** version **2008** par l'organisme **MOODY International**.

La sécurité du consommateur étant une priorité visée par la politique qualité du groupe, la mise en place des principes **HACCP** selon l'**ISO 22000** a été réalisée en **2011** et la certification est prévue début janvier 2013.

CHAPITRE I
REVUE
BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE II
MATERIELS
ET
METHODES

CHAPITRE III
RESULTATS
ET
DISCUSSION

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

INTRODUCTION