

et populaire  
République algérienne démocratique

وَصَلَّى عَلَى الْمُرْتَدِّينَ وَالْمُنَافِقِينَ وَالْمُنَافِقَاتِ وَالْمُشْرِكِينَ وَالْمُشْرِكَاتِ وَالْكَاذِبِينَ وَالْكَاذِبَاتِ

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جَمْعِيَّةُ عِلْمِ بَدْرِيَّةِ بَدْرِيَّةِ بَدْرِيَّةِ بَدْرِيَّةِ بَدْرِيَّةِ

Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib

Faculté des Sciences et de Technologie

Département Sciences de la Nature et de la Vie



Projet de Fin d'Etudes

Pour l'obtention du diplôme de Master en : Microbiologie Appliquée

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Isolement, Identification morphologique et Caractérisation de croissance de moisissures isolée à partir de de la poudre du lait de Yaourt fabriqué dans la région d'Ain Temouchent**

**Présenté Par :**

- 1) Melle. BOUTRIK Hanane
- 2) Melle. FEKROUNE Fatima Zohra
- 3) Melle. KADA-BENCHIHA Hanaâ

**Devant le jury composé de :**

Dr. BELLAHCENE M.	Pr	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Président
Dr. LAACHACHI M.	MCB	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examineur
Dr. ZIANE M	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

*Année Universitaire 2020/2021*

## **REMERCIEMENTS**

*Avant tout nous remercions Dieu tout-puissant de nous avoir guidés durant toutes ces années et de donner le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous tenons aussi à exprimer nos vifs remerciements et notre sincère gratitude à notre encadreur : M.ZIANE Mohammed, MCA, maître de conférences A, Université de Ain Témouchent, pour avoir accepté de nous encadrer, pour ses précieux conseils et son aide durant toute la période du travail. Merci pour votre disponibilité et de la confiance que vous nous avez accordé en nous laissant une impressionnante liberté de travail et de décision. Ça fait plaisir de travailler avec vous ;*

*Nous exprimons toute notre gratitude aux membres de jury : Pr. BELLEHCENE M, Professeur des universités, Université de Ain Témouchent pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire, et de vous remercier pour tout ce que vous avez apporté tout au long de nos études.*

&

*Dr LACHACHI M, Maître de conférences B, université de Ain Témouchent, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos plus vifs remerciements s'adressent au personnel du laboratoire microbiologique de Département de Biologie ; Université B.B.A.T. pour leur patience et leurs précieuses aides, pendant la réalisation de ce travail. En particulier à Mr « TIRES NourEddine » responsable de laboratoire Microbiologie.*

*Nous vous remercions d'avoir enrichis nos connaissances et de nous avoir guidés durant toute la période du stage et nous avons grandement apprécié votre soutien, votre implication et votre expérience.*

*Nous remercions très sincèrement le Directeur d'usine de production de yaourt et fromage sucré « DANIO »*

**Mr. GUEROUED Bou medien.**

*Aussi le directeur d'usine de production de yaourt « EL WALID » Mr. TABTI Baroudi.*

*Enfin, nous remercions aussi toutes les personnes qu'ils nous ont aidées de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici toutes notre sympathie et notre profonde gratitude.*

*Hanane, Hanaä & Fatima Zohra*

# Dédicace

*Grace Allah...Je dédie ce modeste travail ...*

*A celle qui attend mon retour à chaque jour*

*A ma mère « Habiba »...Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence. La source de tendresse, aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner ;*

*A mon père « Abdel karim »...Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être et qui m'a toujours encouragée et donné envie d'aller plus loin ;*

*A mon cher frère « Abde -allah »....Je le souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de succès. Que Dieu le garde pour moi ;*

*A ma très chère grande mère et mon cher grand père.*

*A mon adorable sœur Malek ...Je lui souhaite une vie pleine de bonheur, de santé, d'amour et de réussite ;*

*A mes adorables cousines et sœurs Kawter et Doha...En témoignage de toute l'affection et des profonds sentiments fraternels que je vous porte et de l'attachement qui nous unit. Je vous souhaite de l'amour, du bonheur et du succès dans toute votre vie ;*

*A mes oncles surtout « Omar » et mes tantes. Spécialement « Fouzia »et « Assia »;cousines et cousins.*

*A tout la famille KADA BENCHIHA&BOUSKHOURI.*

*Une spéciale dédicace à mes amies sur tout « Sabine » et « Hanane » ainsi que les collègues de section microbiologie appliquée promo 2020/2021.*

*Sans oublié mes enseignants pendant les Cinq années d'étude. A tous ceux que je porte dans mon cœur*

***Hanaâ***

# Dédicace

*Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah prometteur, où le travail, la persévérance et la quête du savoir seront ma devise.*

*Je dédie ce mémoire de fin d'étude :*

*Ama très cher mère « Zajia »*

*Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*A mon très cher père « Abdelkader »*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et du respect que j'ai toujours eu pour toi, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*A mes grands-parents*

*Le défunt, que dieu vous fasse miséricordes, quant aux vivant, que dieu prolonge ta vie.*

*Ama sœur Sihem*

*Et son marie Mourad et sa fille mon ange HibatArahmane, Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.*

*A mon petit frère Mohamed El Amine*

*Mon ange gardien, je dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*A mes tantes :*

*Rahmouna, Khaira, Fatiha, Djamila, Fouzia*

*A bourgeons d'enfance*

*Fatima Zohra, Abdelillah, Yahia, Aya, Kenza, Anes, Mama, Sara.*

*A mes chères amies :*

*Hanaâ, Hanane, Allouai Hanane, LabdiHadjer, Ben Zargua Saadia, Rouan SerikKhadijja merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble.*

***Fatma zoha***

# Dédicace

*Avec l'aide de Dieu , j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie exceptionnellement à mes très chères  
parents :*

*Mon père « Baghedadi»&Ma mère « Souad »*

*Sources d'amour &bonheurs qui m'ont beaucoup donné pour être ce que je suis, Qui ont toujours été là pour  
moi , et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance . J'espère qu'ils trouveront dans  
ce travail toute ma reconnaissance.*

*A mes frères Mohamed , Ibrahim , Yasine , Iyed*

*A mes adorables sœurs Imane , Nadia , Zahra , Hanaâ , Sabrina , Ahlem et Roumaïssa pour leur  
encouragement et leurs conseils précieux ;*

*A mon bras droit Mohamed Amine qui m'a encouragé beaucoup et m'a donné la volonté et la force de faire  
ces efforts durant 5ans de mmes études universitaires.*

*Et a toutes les personnes que j'aime !*

***Hanane***

## Liste des abréviations

A	Aspergillus
AA	Acide aminé
AFB	Aflatoxine B
Aw	Activité d'eau
AF	Aflatoxine
B	Bactérie
CF	Coliforme fécaux
CT	Coliforme totaux
CYA	CzapekYeastExtract Agar
CCM	Chromatographie sur couche mince
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
C°	Degré celcius
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
g	Gramme
g/L	Gramme par litre
J.O.R.A	Journal officiel de la République Algérienne
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potassium dihydrogène phosphate
L	Litre
Mg SO <sub>4</sub>	Magnesium sulfate heptahydrate
M.G	Matièregrasse
M.O	Microorganisme
O <sub>2</sub>	Oxygène

OMS	Organisation mondiale de la santé
OTA	Ochratoxine A
P	Penicillium
PH	Potentiel d'hydrogène
PDA	Potato Dextrose Agar
T <sub>2</sub>	Toxine T <sub>2</sub>
SP	Espèce
UFC	Unité format colonie
μL	Microlitre
μm	Micromètre
UV	Ultra violet
V	Vitamine
Y	Yeast Extract

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>I. 1. Généralités sur le Yaourt</b>	<b>2</b>
<b>I. 1. 1. Définition et données sur le yaourt</b>	<b>2</b>
<b>I. 1. 2. Historique</b>	<b>2</b>
<b>I. 1. 3. Différents types de yaourt</b>	<b>3</b>
<b>I. 1. 3.1. Selon la technologie de fabrication</b>	<b>3</b>
<b>I. 1. 3.2. Selon la teneur en matière grasse</b>	<b>3</b>
<b>I. 1. 3.3. Selon leur gout</b>	<b>3</b>
<b>I. 1. 4. Modification et altération de du yaourt</b>	<b>3</b>
<b>5. Composition chimique de yaourt</b>	<b>5</b>
<b>I.1. 5.1. Glucides</b>	<b>5</b>
<b>I.1. 5.2. Protéines</b>	<b>5</b>
<b>I.1. 5.3. Lipides</b>	<b>5</b>
<b>I.1. 5.4. Minéraux</b>	<b>5</b>
<b>I. 1. 6. Diagramme de fabrication de yaourt</b>	<b>7</b>
<b>I. 1. 6.1. Préparation du lait</b>	<b>7</b>
<b>I. 1. 6. 2. Standardisation du lait</b>	<b>7</b>
<b>I. 1. 6.3. Homogénéisation</b>	<b>8</b>
<b>I. 1. 6.4. Traitement thermique</b>	<b>8</b>
<b>I. 1. 6.5. Fermentation lactique</b>	<b>9</b>
<b>I. 1. 6.6. Conditionnement et stockage</b>	<b>10</b>
<b>I. 1. 7. Ingrédients de production</b>	<b>10</b>
<b>I. 1. 7.1. Le lait</b>	<b>10</b>
<b>I. 1. 7.1.1. Le lait frais</b>	<b>10</b>
<b>I. 1. 7.1.2. Le lait en poudre</b>	<b>10</b>
<b>I. 1. 8. Qualité de yaourt</b>	<b>11</b>
<b>I. 1. 8. 1. Définitions</b>	<b>11</b>
<b>I. 1. 8. 2. Composants de la qualité</b>	<b>11</b>
<b>I. 1. 9. Microorganismes de Yaourt</b>	<b>12</b>
<b>I. 2. Généralités sur les moisissures</b>	<b>13</b>
<b>I. 2. 1. Définitions</b>	<b>13</b>
<b>I. 2. 2. Caractéristiques des moisissures</b>	<b>14</b>
<b>I. 2. 3. Classification de moisissures</b>	<b>14</b>
<b>I. 2. 3. 1. Principe de la classification</b>	<b>15</b>
<b>I. 2. 3. 2. Reproduction</b>	<b>15</b>
<b>I. 2. 4. Isolement et Identification de moisissures</b>	<b>17</b>
<b>I. 2. 4. 1. Isolement des moisissures et milieux de culture</b>	<b>17</b>
<b>I. 2. 4. 2. Identification des moisissures</b>	<b>17</b>
<b>I. 2. 4. 2. 1. Critères d'identification macroscopique</b>	<b>18</b>
<b>I. 2. 4. 2. 1. Critères d'identification microscopique</b>	<b>18</b>
<b>I. 2. 5. Condition de croissance des moisissures</b>	<b>18</b>
<b>I. 2. 5. 1. Macroéléments</b>	<b>18</b>
<b>I. 2. 5. 2. Sources minérales</b>	<b>18</b>
<b>I. 2. 5. 3. Température</b>	<b>19</b>
<b>I. 2. 5. 4. pH</b>	<b>19</b>
<b>I. 2. 5. 5. Aération</b>	<b>20</b>
<b>I. 2. 5. 6. Lumière</b>	<b>20</b>
<b>I. 2. 5. 7. Teneur en O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub></b>	<b>20</b>
<b>I. 2. 6. Usage des moisissures</b>	<b>21</b>



I. 2. 7. Généralité sur Les mycotoxines	21
I. 2. 7. 1. Définition	21
I. 2. 7. 2. Structure des mycotoxines	22
I. 2. 7. 3. Effets des mycotoxines	23
I. 2. 8. Genres fongiques responsables de la synthèse des mycotoxines	24
I. 2. 8. 1. Genre <i>Aspergillus spp.</i>	24
I. 2. 8. 1. 2. Genre <i>Penicillium spp.</i>	24
I. 2. 8. 1. 3. Genre <i>Alternaria spp.</i>	24
I. 2. 8. 1. 4. Genre <i>Fusarium spp.</i>	25

## II. PARTIE EXPERIMENTALE

### Matériel Et méthodes

II. 1. 1. Lieu et période d'étude	26
II. 1. 2. Echantillonnage et prélèvement	26
II. 1. 3. Caractérisation sensorielle de poudre du lait	27
II. 1. 4. Caractérisation physico-chimiques de la poudre du lait	27
II. 1. 4. 1. Mesure de pH	27
II. 1. 4. 2. Mesure de l'extrait sec (ES)	28
II. 1. 4. 3. Mesure l'humidité (H)	28
II. 1. 5. Dénombrement et isolement de moisissures	29
II. 1. 6. Caractérisation et l'identification des isolats	30
II. 1. 6. 1. Etude macroscopique de colonies	30
II. 1. 6. 2. Etude microscopique	30
II. 1. 7. Etude mycotoxinogenese	30
II. 1. 7. 1. Détection visuelle de la production de mycotoxine	30
II. 1. 7. 2. Détection de mycotoxine par CCM	31
II. 1. 7. 2. 1. Production de mycotoxines	31
II. 1. 7. 2. 2. Extraction de mycotoxine	31
II. 1. 7. 2. 3. Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)	31
II. 1. 8. Etude de la croissance de moisissures	32

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

II. 2.1. Mesures de pH et d'humidité	33
II. 2. 2. Dénombrement de moisissures	33
Détection du pouvoir producteur des mycotoxines	37
Modélisation de croissance radiale	39
CONCLUSION	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	48
WEBOGRAPHIE	53
ANNEXES	55

## Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Quelques caractères anormaux des yaourts	<b>04</b>
<b>2</b>	Composition et valeurs nutritionnelle moyenne de différents types de yaourt pour 100g de produits	<b>06</b>
<b>3</b>	Nombre de microorganismes retrouvés dans un yaourt répondent à la norme de qualité .	<b>13</b>
<b>4</b>	Catégories de champignons selon leur gamme de température de développement	<b>19</b>
<b>5</b>	Aperçu de degré de résistance de spores fongiques	<b>20</b>
<b>6</b>	Différents domaines d'activités des moisissures.	<b>21</b>
<b>7</b>	Principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines	<b>22</b>
<b>8</b>	Effets des mycotoxines.	<b>24</b>
<b>9</b>	Origine des échantillons prélevés du lait en poudre utilisé pour la fabrication de Yaourt.	<b>28</b>
<b>10</b>	Bulletin d'analyse des caractères organoleptiques d'après laboratoire d'analyse de la qualité EL-FETH, Oran	<b>29</b>
<b>11</b>	Dénombrement des souches de moisissures obtenues après incubation	<b>37</b>
<b>12</b>	Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats	<b>39</b>
<b>13</b>	Paramètres de croissances des isolats de moisissures.	<b>44</b>

## Liste des figures

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Classification général des champignons	<b>14</b>
<b>2</b>	Différents modes de sporulation et différents types de spores associées	<b>16</b>
<b>3</b>	Schéma récapitulatif des deux modes de reproduction chez les Ascomycètes	<b>17</b>
<b>4</b>	Exemples des mycotoxines et leur structure	<b>23</b>
<b>5</b>	Aspects microscopiques de certaines moisissures	<b>25</b>
<b>6</b>	Démonstration de mesure de pH de poudre du lait utilisée pour la fabrication de Yaourt.	<b>30</b>
<b>7</b>	Procédure de dilutions décimale de poudre du lait	<b>31</b>
<b>8</b>	Culture de purification des isolats.	<b>37</b>
<b>9</b>	Secteurs de répartition de différents isolats fongiques isolés à partir de l'échantillon de lait en poudre.	<b>38</b>
<b>10</b>	Caractères microscopiques et macroscopique des isolats identifiés.	<b>40</b>
<b>11</b>	Mise en évidence de la production de la mycotoxine par la fluorescence sous lumière UV (365nm) sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).	<b>41</b>
<b>12</b>	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (365nm) de la production de mycotoxines sur CCM	<b>42</b>
<b>13</b>	Cinétiques de croissances de trois isolats de poudre du lait utilisé pour la fabrication de yaourt.	<b>43</b>

## RÉSUMÉ

Le but de cette étude est d'isoler et de dénombrer les moisissures dans la poudre de lait utilisée pour la production de yaourt ainsi que de caractériser la de croissance des moisissures dans la région d'Ain Témouchent. Pour atteindre nos objectifs, 6 échantillons de deux unités de production de yaourt ont été analysés. Les résultats montrent que les paramètres physico-chimiques sont conformes à la réglementation. Par ailleurs, l'ensemble des échantillons prélevés de l'unité A sont contaminés par les moisissures avec une concentration comprise entre 10 et 500 ufc/g avec un médian de 30 ufc/g. Cependant, aucune contamination n'est révélée dans l'unité B. Les isolats obtenus ont été identifiés comme *Penicillium* spp. (41%), *Fusarium* spp. (33%), *Aspergillus* spp. (16%) et *Alternaria* spp. (10%). Seulement, les isolats de *Penicillium* spp. et *Aspergillus* spp. ont synthétisé les mycotoxines sur milieu CEM. Ces résultats ont été confirmés par la production de mycotoxines sur bouillons YES suivi de détection sur CCM. Quant à la croissance radiale de l'ensemble des isolats ont été réalisées sur milieu PDA. Les résultats montrent que les temps de latence ( $\lambda_{25^{\circ}\text{C}}$ ) et taux de croissance ( $\mu_{\text{T}^{\circ}\text{C}}$ ) sont compris entre [0 – 0.1jour] et [0.03-0.46jour<sup>-1</sup>] respectivement. Ces résultats présentent un impact socio-économiques dans la prévention et l'analyse de risque.

**Les mots clés :** Yaourt ; matière première ; moisissures ; mycotoxines ; risque.

## ABSTRACT

The aim of this study is to isolate and enumerate the molds in the milk powder used for the production of yogurt as well as to characterize the growth of molds in the region of Ain Témouchent. To achieve our objectives, 6 samples from two yoghurt production units were analyzed. The results show that the physico-chemical parameters comply with the regulations. In addition, all the samples taken from Unit A are contaminated with molds with a concentration between 10 and 500 cfu / g with a median of 30 cfu / g. However, no contamination was revealed in unit B. The isolates obtained were identified as *Penicillium* spp. (41%), *Fusarium* spp. (33%), *Aspergillus* spp. (16%) and *Alternaria* spp. (10%). Only the isolates of *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp. synthesized mycotoxins on CEM medium. These results were confirmed by the production of mycotoxins on YES broths followed by detection on TLC. As for the radial growth of all isolates were performed on PDA medium. The results show that the latency times ( $\lambda_{25^{\circ}\text{C}}$ ) and growth rate ( $\mu_{\text{T}^{\circ}\text{C}}$ ) are between [0 - 0.1day] and [0.03-0.46day<sup>-1</sup>] respectively. These results present a socio-economic impact in prevention and risk analysis.

**Keywords:** yogurt; raw material; mold; mycotoxins; risk.

## المخلص

هدف من الدراسة اى عزل وفحص الفطريات الفسجية من بيئتي التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة. تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة. تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة. تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة.

تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة. تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة. تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة. تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة.

تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة. تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة. تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة. تم عزل الفطريات الفسجية من التربة والنباتات المتواجدة في منطقة الدراسة.

الكلمات الرئيسية: صيدوي، اذنة العنكبوت، عزل، الفطريات الفسجية، بيئية.

# **INTRODUCTION**

Le yaourt est un produit laitier, a fait son apparition en nutrition humaine à partir de l'année 1542.

Ce produit avant de connaître une consommation de niveau industriel, n'était qu'un simple produit issu d'une fabrication traditionnelle par les crémeries ainsi que les producteurs de lait.

Aujourd'hui, le yaourt est considéré comme un produit de large consommation, car celui-ci est consommé par près de 90% des populations du monde.

Les processus de fabrication du yaourt, même, sont complexes, en perpétuelle évolution, car, ils intègrent, à chaque fois, des nouvelles connaissances.

En Algérie, le yaourt est fabriqué partiellement ou entièrement à base de lait en poudre.

Au contraire, tous les types de yaourt ne sont pas comestibles.

Le yaourt qui contient les moisissures ne peut pas être consommé car il peut nuire à la santé humaine.

Les moisissures sont des champignons filamenteux microscopiques ; susceptibles de coloniser des substrats très différents tel que les produits alimentaires, le bois..... etc.

Elles peuvent être utiles dans certaines industries telle que l'industrie fromagère, mais elles peuvent être néfastes en altération des propriétés physiques et chimiques du substrat.

Les moisissures peuvent produire des métabolites secondaires parmi ces métabolites secondaires, les mycotoxines sont susceptibles de représenter un danger pour la santé humaine et animale.

Ce travail explique les méthodes de l'isolement ; identification morphologique et caractérisation de croissance de moisissure isolée à partir de yaourt commercialisé, et c'est en prélevant des échantillons de lait en poudre de différentes usines et en les transférant au laboratoire pour étude, et mise à disposition de toutes les conditions favorables et les conditions de protection, afin d'obtenir des résultats clairs.

Le premier chapitre consiste en une synthèse bibliographique sur le yaourt et un rappel général de yaourt et leurs types et leur composition chimique.

En plus des étapes de sa fabrication.

Nous avons également fourni un aperçu détaillé du lait utilisé.

Quand le deuxième chapitre, nous avons fourni un détail complet concernant les moisissures liées au yaourt.

Grace à elle, nous avons découvert les mycotoxines, ou nous avons donné des informations à son sujet.

Dans le troisième chapitre est composé le large éventail des matériels et méthodes mise en œuvre dans le cadre du travail expérimental.

Les résultats sont ensuite développés dans un quatrième chapitre ou ils ont discuté par la suite, pour finir avec la conclusion générale et les perspectives.

## **I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES**



## I. 1. Généralités sur le Yaourt

### I. 1. 1. Définition et données sur le yaourt

Selon la définition établie par la FAO (Food Agricultural Organisation) et l’OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 1977, le yaourt est un lait coagulé obtenu par la fermentation lactique due à deux ferments spécifiquesensemencés simultanément : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillusbulgaricus* qui sont contenus naturellement dans le lait (Fredot, 2009).

Le yaourt est un lait fermenté moderne. Selon le *Codex Alimentarius* (norme N°A11(a) 1975) « le yaourt est un produit laitier coagulé obtenu par la fermentation à partir du lait frais, ainsi que du lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec) avec ou sans addition (de lait en poudre, poudre de lait ...etc.) (FAO, 1995).

### I. 1. 2. Historique

Le mot (yoghourt ou yogourt) origine d’Asie vient de yoghurmark ,mot turc signifiant « épaissir ». (Tamine et Deeth , 1980) .

En 1902, deux médecins français, Ris et Khoury, isolent les bactéries présentes dans un lait fermenté égyptien. Ensuite, Metchnikoff (1845-1916),a isolé la bactérie spécifique du yaourt (bacille bulgare) et suggéré une méthode de production sure et régulière (Rousseau, 2005).

En effet, c’est en 1919 qu’Isaac carasso commence à produire du yaourt à Barcelleselon des procédés industriels (Palletier et al.,2007). Selon le même auteur, le yaourt dit « nature » constituait l’essentiel des productions de lait fermentés, mais partir des années 1960-1970 sont apparus les produits sucrés puis aromatisés et aux fruits.

Aujourd’hui, les fabricants débordent d’imagination et déclinent les recettes traditionnelles en de nombreux produits originaux, en tentant d’allier naturalité, goût et équilibre nutritionnel (Jeantet et al., 2008).

### I. 1. 3. Différents types de yaourt

La consistance, le gout et l'arôme des yaourts varient d'un pays à un autre, cependant leur classification se fait selon leur teneur en matières grasses, leur gout ou leur texture (Sablonnières, 2001).

### **I. 1. 3.1. Selon la technologie de fabrication**

Mahaut et al. (2000) ont classifié le yaourt en fonction de sa technologie comme suite :

- Les yaourts fermes dont la fermentation a eu lieu en pots, se sont généralement les yaourts nature et aromatisé ;
- Le yaourt brassé dont la fermentation a eu lieu en cuve avant brassage et Conditionnement. C'est le cas de yaourt veloutés nature ou aux fruits.

### **I. 1. 3.2. Selon la teneur en matière grasse**

Selon Gosta (1995), le yaourt peut être classé en :

- Yaourt partiellement écrémé : moins de 3% et plus de 0.5% de matière grasse ;
- Yaourt écrémé : au maximum 0.5% de matière grasse.

### **I. 1. 3.3. Selon leur gout**

Quant à Frédo (2005) a reclassé les yaourts en fonction de leur goût :

- Les yaourts nature : Ils ne subissent aucune addition ;
- Les yaourts sucrés : ils sont additionnés de saccharose à un taux variable de % ;
- Les yaourts « aux fruits », au miel, à la confiture : Ils subissent une addition inférieure à 30% du produit.

### **I. 1. 4. Modification et altération de du yaourt**

Les modifications les plus importantes ont lieu durant la fermentation, au niveau industriel, une fermentation de 2 à 6 heures à températures variant entre 40°C et 46°C est généralement suffisante pour obtenir un lait coagulé (Syndifrais, 1997 et Lamoureux, 2000).

Les propriétés physiques telles que la fermenté, la consistance, la viscosité, sont d'ailleurs le sujet de plusieurs investigation (Rasic et Kurmann, 1978 ; Rash, 1990 ; Laye et al., 1993). Elles peuvent être affectées par plusieurs facteurs tels que la température de

fabrication, le contenu protéique du milieu, l'activité protéolytique des souches et l'acidité (**Rasic et Kurmann, 1978**).

Comme l'élaboration du yaourt fait intervenir plusieurs étapes clés ou la fermentation et la formation du gel doivent être minutieusement dirigés et surveillés. Il est fréquent que des altérations de goût, d'apparence et de texture apparaissent et que certaines soient préjudiciables à la qualité finale du produit. Le tableau ci-après montre quelques anomalies du yaourt et leurs causes (**Luquet, 1985**).

**Tableau 1 :** Quelques caractères anormaux des yaourts (Luquet, 1985).

ANOMALIES	CAUSES
<b>I - <u>DEFAUTS ORGANOLEPTIQUES</u></b>	
<b>1- <u>APPARENCE</u></b>	
Décantation, synérèse	- Sur ou post-acidification (par fermentation mal conduite)
	- Refroidissement trop faible
	- Excès d'agitation
	- Contamination par coliformes ou par levures
Production de gaz ou colonies en surface	-mauvaise ou absence d'homogénéisation
couche de crème	
<b>2- <u>TEXTURE</u></b>	
Manque de fermeté (pour yaourt traditionnel)	- Ensemencement faible Mauvaise incubation...
Trop liquide (yaourt brassé)	Brassage trop violent Mauvaise incubation....
Texture sableuse	Chauffage poussé au lait
<b>3-<u>GOUT</u></b>	
mertume	Protéolyse trop forte TROP longue conservation
Levure, fruité, de moisi	Contamination par levures et moisissures
Plat, manque d'acidité	Mauvaise activité des levains
<b><u>ALTERATIONS :</u></b>	
Bombage, putréfaction	Défauts d'étanchéité ⇒ contamination

Rancidité	Contamination par des germes lipolytiques et longue conservation
-----------	--

## **5. Composition chimique de yaourt**

La majorité des yaourts et des laits fermentés commercialisés est préparée à partir de lait enrichi en poudre de lait. De ce fait, ils sont plus riches en protéines, calcium et en lactose. Ces produits peuvent être plus ou moins sucrés. Leur teneur en saccharose varie alors de 7 à 12 %. La fermentation du lait va entraîner des modifications de sa composition (**Syndifrais, 1997**).

### **I.1. 5.1. Glucides :**

La teneur du yaourt en lactose résiduel est de l'ordre de 4,5 g pour 100 g. La dégradation du lactose conduit à la formation de galactose, de glucose et d'acide lactique qui passe d'un niveau pratiquement nul à un niveau de 0,8 à 1 %, dont 50 à 100 % d'acide lactique selon les ferments (**Syndifrais, 1997**).

### **I.1. 5.2. Protéines :**

Les bactéries Lactiques produisent des enzymes qui hydrolysent partiellement les protéines du lait (**syndifrais, 1997**).

### **I.1. 5.3. Lipides :**

Selon le *codexalimentarius*, la teneur en matière grasse doit être au minimum égal à 3% (m/m) dans le cas des yoghourts naturels, sucrés ou aromatisés, compris entre 0.5% et 3% dans le cas des yoghourts partiellement écrémés ou maigres et au maximum égal à 0.5% dans le cas des yoghourts écrémés.

### **I.1. 5.4. Minéraux :**

C'est surtout la richesse en calcium du yaourt et des laits fermentés qui est à noter. La poudre de lait ajoutée au lait lors de la fabrication des yaourts et autres laits fermentés augmente en effet la teneur en calcium par rapport au lait d'origine (**Syndifrais, 1997**).

**Tableau 2:** Composition et valeurs nutritionnelle moyenne de différents types de yaourt pour 100g de produits (Syndifrais, 1997).

	Teneur moyenne pour 100 g de produit				Valeur énergétique					
	Protides	Lipides	Glucides	Calcium	Sodium	Potassium	Phosphore	(KJoul/KCalories)		
Yaourt nature	4.15	1.2	5.2	0,174	0,057	0,210	0,114	201	48	
Yaourt au lait entier	3.8	3.5	5.3	0,171	0,056	0,206	0,112	284	68	
Yaourt nature 0%	4.2	traces	5.4	0,164	0,055	0,180	0,100	163	39	
Yaourt nature sucré	3.8	1.1	14.5	0,160	0,052	0,195	0,105	347	83	
Yaourt aromatisé au lait entier	3.2	3.2	12	0,140	0,050	0,190	0,106	372	89	
Yaourt brassé nature	4.3	1.8	5.2	0,165	0,040	0,205	0,115	230	55	
Yaourt brassé aux fruits	3.75	1.65	14.5	0,140	0,050	0,190	0,110	368	88	
Yaourt au lait entier aux fruits	3.1	2.7	16.5	0,140	0,045	0,180	0,100	431	103	
Yaourt maigre aux fruits	3.6	traces	17.2	0,140	0,045	0,180	0,100	351	84	

### **I. 1. 6. Diagramme de fabrication de yaourt**

La fabrication du yaourt, même si elle est connue depuis des temps très lointains, demeure un procédé assez complexe et en perpétuelle évolution car, il intègre à chaque fois les connaissances et les progrès réalisés dans des domaines variés.

Les étapes de fabrication peuvent différer selon qu'on a affaire à un yaourt « étuvé » dont la fermentation se fait après conditionnement en pots et le yaourt « brassé », dont la fermentation se fait en cuve. Le coagulum obtenu dans ce dernier cas est dilacéré et brassé pour être rendu plus ou moins visqueux, puis conditionné en pots. Globalement, nous distinguons dans le processus d'élaboration les étapes énumérées ci-dessous.

#### **I. 1. 6.1. Préparation du lait**

La matière première peut être soit du lait frais, soit du lait recombinaison (à partir de lait en poudre maigre et de matière grasse laitière anhydre), soit du lait reconstitué (à partir de lait en poudre maigre), ou encore un mélange. Dans tous les cas, elle doit être de bonne qualité microbiologique, exempte d'antibiotiques ou d'autres inhibiteurs et parfaitement homogénéisée.

La teneur en matière grasse du yaourt est variable.

Généralement, elle est ajustée de sorte que le produit entre dans l'une des catégories ci-après :

- Yaourt entier : au minimum 3 pour cent (en poids) de matière grasse ; en pratique de 3 à 4,5 pour cent ;
- Yaourt partiellement écrémé : moins de 3 pour cent (en poids) de matière grasse ; en pratique : de 1 à 2 pour cent ;
- Yaourt écrémé : au maximum 0,5 pour cent (en poids) de matière grasse ; en pratique de 0,05 à 0,1 pour cent (FAO, 1995).
- 

#### **I. 1. 6. 2. Standardisation du lait :**

La standardisation du mélange laitier permet non seulement de pallier aux variations de composition du lait mais aussi, à obtenir la composition désirée. Cette standardisation peut s'obtenir par l'ajout de concentrés et d'isolats de protéines sériques, de poudre de lait écrémé

ou entier, de lactose et de la crème en fonction de la teneur désirée en protéines, solides totaux et matières grasses (**Tamime et Robinson, 1999**).

Selon le Code des principes FAO/ OMS, la teneur minimale en matière sèche laitière non grasse est de 8,2 % (en poids) quelle que soit la teneur en matière grasse (**norme n°A-1 1 (a), 1975**) (**FAO, 1995**).

La consistance et la viscosité du yaourt sont pour une grande partie sous la dépendance de la matière sèche du lait. En effet, tous les nutriments jouent un rôle sur la qualité finale du yaourt (**FAO, 1995 ; Lucey, 2004**).

### **I. 1. 6.3. Homogénéisation**

L'homogénéisation du lait à plusieurs objectifs : elle améliore la fermeté des gels obtenues après fermentation, augmente leur capacité de rétention d'eau et réduit la synérèse, par ailleurs elle prévient le crémage au cours des opérations « statiques » de la fabrication du yaourt, en particulier lors de la période d'incubation en pots ou dans les cuves de fermentation, cela est due au fractionnement de la taille des globules gras de 4-5  $\mu\text{m}$  à 1  $\mu\text{m}$  par cisaillement (**Schorsch, 2001 ; Amiot, 2002**).

### **I. 1. 6.4. Traitement thermique :**

Le lait enrichi, éventuellement sucré, subi un traitement thermique. Le barème de traitement thermique le plus couramment utilisé est de 90- 95°C pendant 3 à 5 minutes (**Mahaut, 2000**). Cependant, une température élevée pendant un brève temps (100°C à 130°C pour 4 à 16 S) ou bien une ultra haute température (UHT) (140°C pour 4 à 16 s) sont parfois utilisés (**Sondi et al., 2004**).

Ce traitement a de multiple effet sur la flore microbienne ainsi que sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles du lait. Tout d'abord, il assure l'innocuité du produit suite à la destruction des microorganismes pathogènes et indésirables. Il crée des conditions favorables au développement des bactéries lactiques, et inactive des inhibiteurs de croissance telle que les lactopéroxydases et des enzymes telles que la lipase responsable de l'oxydation des lipides (**Walstra, 2006**).

De même, il réduit les sulfures toxiques et entraîne la production d'acide formique qui est un facteur de croissance pour *Lb. bulgaricus* (Loones, 1994).

Le traitement thermique a également un effet sur la conformation tridimensionnelle des protéines, induisant la modification de leurs propriétés fonctionnelles. Il dénature la majorité des protéines du lactosérum (85%), la résultante est l'association de la caséine  $\kappa$  et de la  $\beta$  lactoglobuline via un pont disulfure. Des liaisons entre les caséines et l' $\alpha$ -lactalbumine sont également engendrés (Mahaut, 2000 ; Sava et al., 2005).

### I. 1. 6.5. Fermentation lactique :

Le lait enrichi et traité thermiquement, est refroidi à la température de fermentation, 40-45°C. Cette température correspond à l'optimum de développement symbiotique des bactéries lactiques (Lee et Lucey, 2010).

L'ensemencement d'une culture de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus* doit se faire à un taux assez élevé pour assurer une acidification correcte (Jeantet et al., 2008).

Ces deux espèces bactériennes vivent en symbiose et en synergie, elles dégradent le lactose en acide lactique, entraînant une baisse du pH et la gélification du milieu avec des modifications structurelles irréversibles.

En outre, ces bactéries produisent des composés carbonylés volatiles (l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne, l'acétate d'éthyle) et des exopolysaccharides qui participent, respectivement, à l'élaboration de l'arôme et de la texture des yaourts (Ott et al., 2000).

La concentration en ferment dépend de la formule de yaourt. Le rapport standard à l'ensemencement entre les deux souches bactériennes dans le cas du yaourt varie selon les caractères recherchés pour le produit, sur la base de critères technologiques comme organoleptiques (Luquet et Corrieu, 2005).

### I. 1. 6.6. Conditionnement et stockage :

Que se soient fermes ou brassés, les yaourts conditionnés subissent une conservation frigorifique à des températures de 4 à 6°C. A ce stade ils sont prêts à être consommés. La caducité du produit varie, suivant les conditions de production, de 21 à 24 jours. Pendant la



conservation, les bactéries lactiques maintiennent une activité résiduelle très réduite, appelée post-acidification qui se manifeste par un léger abaissement du pH. (Loones1994 in Ghebbiet al., 1997).

## I. 1. 7. Ingrédients de production

### I. 1. 7.1. Le lait :

Le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femme et par celles des mammifères femelles pour la nutrition des jeunes (Larousse). Le *Codex Alimentarius* (CODEX STAN 206-1999) le définit comme étant « la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur ». (Aboutayeb, 2011).

#### I. 1. 7.1.1. Le lait frais

Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. C'est aussi l'un des rares à convenir à toutes les tranches d'âge (nourrissons, enfants, adolescents, adultes, personnes âgées) qui le consomment tel quel à l'état liquide (lait frais) ou sous forme de produits dérivés (fromages, yaourts, crèmes glacées...etc). (Jeantet et al., 2008).

#### I. 1. 7.1.2. Le lait en poudre

C'est un produit solide obtenu par élimination de l'eau du lait, du lait entièrement ou partiellement écrémé, de la crème ou d'un mélange de ces produits, et dont la teneur en eau n'excède pas 5% en poids du produit fini (taux d'humidité maximale).

La qualité hygiénique doit être excellente (Multon,1992). Selon la teneur en matière grasse du lait, on démontre trois catégories de poudre de lait : la poudre de lait entier, poudre de lait partiellement écrémé (26%) et poudre de lait écrémé (0%) (Anonyme, 2009).

## I. 1. 8. Qualité de yaourt

### I. 1. 8. 1. Définitions

Au sens de la norme ISO 8402 : « la qualité est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un service ou d'un produit qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés (organoleptiques) ou implicites (la sécurité). Pour un produit alimentaire, elle peut se décrire par la règle de 4S (Satisfaction, Sécurité, Service, Santé) (**Lannabi, 2015**).

- Satisfaction : capacité d'un produit à satisfaire les saveurs (aspect, goût, odeur) ;
- Sécurité : absence des microorganismes pathogènes et leurs toxines, absence d'additifs toxiques et des contaminants naturels ;
- Service : facilité d'utilisation ;
- Santé : un aliment naturel et sain enrichi en vitamine et sel minéraux.

### I. 1. 8. 2. Composants de la qualité

La qualité ne peut pas être prise comme une seule unité, elle peut contenir différentes composantes chacune répondant à une certaine exigence du consommateur (**Lannabi, 2015**). Les cinq composantes essentielles sont :

#### La qualité hygiénique

La qualité hygiénique des aliments est conditionnée par l'absence des microorganismes pathogènes et/ou de leur toxine (**Jouve, 1993**).

#### La qualité nutritionnelle

Elle correspond à l'ensemble des éléments nutritifs composant l'aliment (glucides ; lipides, protéines, éléments minéraux, vitamine). (**Jean, 1997**).

#### La qualité organoleptique

Cette qualité est déterminée en utilisant les 5 organes de sens. (**Cheftel, 1990**). Les propriétés organoleptiques peuvent se subdiviser comme suit :

- L'apparence (forme, aspect et couleur) relevant de la vision ;
- La saveur (arôme et goût) relevant du goût et de l'odorat ;

- La texture (consistance, résistance à la mastication...etc.) relevant du toucher. L'ouïe joue également un rôle important dans l'évaluation de la caractéristique organoleptique des aliments (**Cheftel, 1990**).

La qualité marchande

Elle se base sur les caractéristiques organoleptiques du produit qui provoquera ensuite l'attrait ou la répugnance des consommateurs (Subira, 2014). Elle peut aussi être déterminée par différents facteurs comme la cuisson (traitement culinaire et technologique), l'ajout d'additifs et la valeur nutritionnelle (**Joafara, 2016**).

La qualité technologique

Elle se base sur les modes de transformation du produit dès la production agricole jusqu'à la distribution.

**I. 1. 9. Microorganismes de Yaourt**

Les microorganismes de Yaourt peuvent être divisés en trois groupes : la microflore essentielle, la microflore non essentielle et la microflore contaminant. Le tableau 3 montre la qualité microbiologique de yaourt (**Tamime,1999**).

**Tableau 3:** Nombre de microorganismes retrouvés dans un yaourt répondent à la norme de qualité .

La Microflore essentiel	<i>Streptococcus thermophilus</i>	>100 ufc
	<i>Lactobacillus delbueckii</i>	>100 ufc
La Microflore non essentiel	Bactéries Lactiques	Presence
	Levures	<10 ufc
	Moisissures	Absence
La Microflore contaminant	Coliformes Fécaux	<01 ufc
	Coliformes Totaux	<10 ufc
	Salmonelles	Absence
	<i>E.Coli</i>	Absence
	<i>Clostridium</i> spp.	Absence

## I. 2. Généralités sur les moisissures

### I. 2. 1. Définitions

Le terme « moisissure » désigne tous les champignons microscopiques eucaryotes filamenteux et pluricellulaires du règne des mycètes appelés les vrais champignons ou Eumycètes (**Regnault,1990 ; Chasseur et Norland, 2003**).Ce sont des thallophytes hétérotrophes (dépourvus de chlorophylle) et immobile, certains vivent en symbiose avec les végétaux et d'autres sont des parasites des végétaux (**Leclerc et al.,1995 ; Benkakouz, 2002;Chasseur et Norland,2003**).

Les moisissures sont dotés des propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques) qui en font des alliés utiles industriels (affinage de fromage), production des molécules à activité pharmaceutique (antibiotiques) et production d'enzymes industriels (**Leclerc et al., 1995; Bouixet Leveau, 1999; Benkakouz, 2002**).

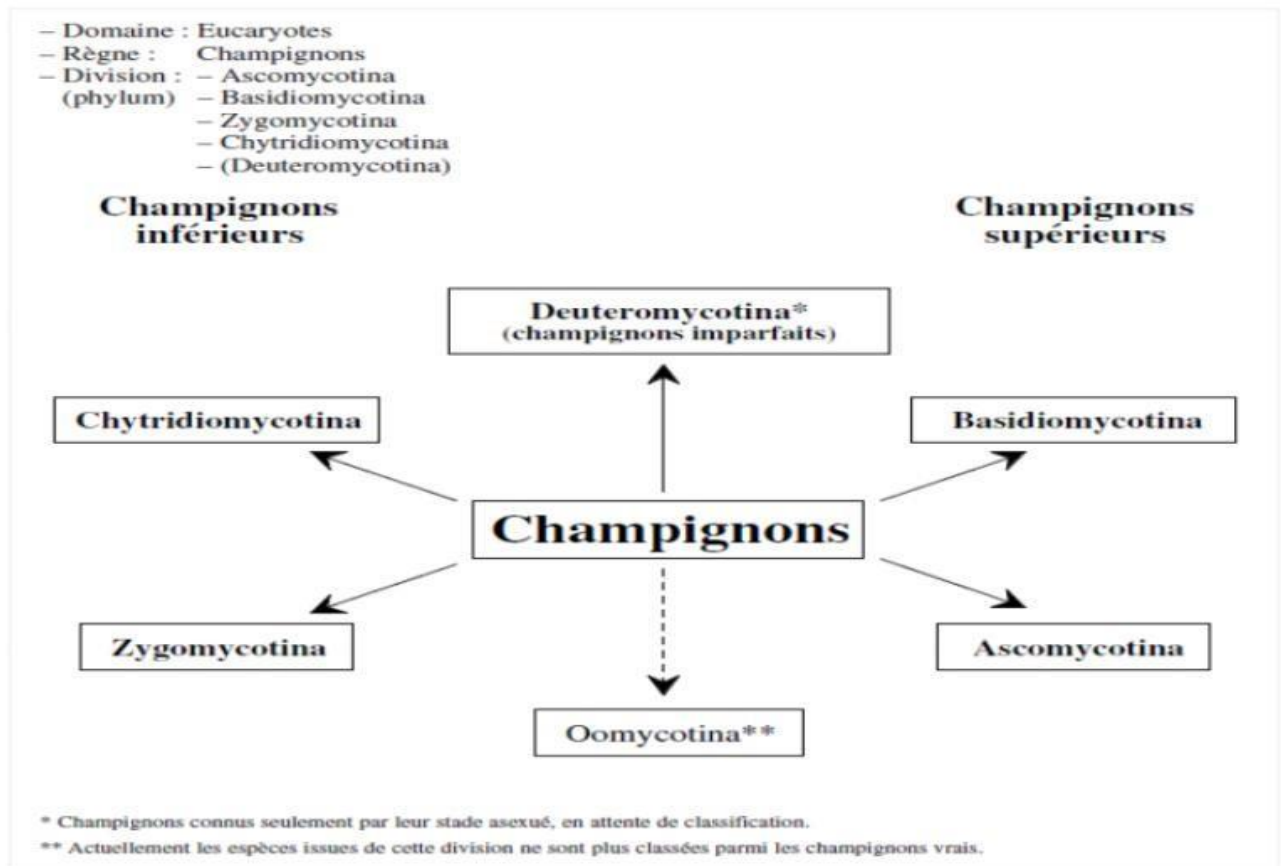
### I. 2. 2. Caractéristiques des moisissures

Les moisissures sont caractérisées par une paroi cellulaire qui contient, des glucanes ( $\alpha$ 1,3-glucane) cellulose, des mannanes et de la chitine. La membrane cellulaire des champignons est constituée principalement de stérols (l'ergostérol), et leur cytoplasme est dépourvue de chlorophylle.

La plupart des champignons microscopiques possèdent un mycélium, constitué de tubes appelés hyphes. Chez les champignons supérieurs, les hyphes sont cloisonnés ou septés, tandis que chez les champignons inférieurs ou primitifs, les cloisons intercellulaires sont rares ou inexistant (**Stevens et al., 2006**). Les moisissures ont un matériel génétique confiné dans un noyau au même titre que les animaux et les plantes.

### I. 2. 3. Classification de moisissures

Leur classification est basée aussi bien sur des caractères morphologiques (structures du mycélium) que sur le mode de leur reproduction (**Devet, 1996**).



**Figure 1 :** Classification général des champignons (Devet,1996).

### I. 2. 3. 1.Principe de la classification

Dans le monde de mycète, c'est en fonction de la modalité de la reproduction des spores qu'on classe les champignons par division :

Les Mycota correspondent au règne fongique actuel au sens strict ayant une reproduction sexuée et produisant des spores non (ou uni) flagellées. D'après (Hawksworth et al. In « Dictionary of Fungi (1995) », la règne des champignons et dévisé quatre division « phylum » : Chytridiomycota, zygomycota, ascomycota, et Basidiomycota.

- Les Chytridiomycota produisent des spores mobiles uniflagellées ;
- Les Zygomycota ont des spores non flagellées, et à thalle siphonnés (Trichomycète et Zygomycète). Ils sont caractérisés par leur aptitude à fusionner leur mycélium pour former une gamétangie qui donnera des zygomspore ;
- Les Ascomycota produisent des spores non flagellées sexuées, à thalle septé et formant en général 8 ascospore à l'intérieur dans des sacs appelées asques (8 ascospores de chaque asque) ;

- Les Basidiomycota produisent des spores non flagellées sexuées, à thalle septé donnant en général 4 basidiospores de chaque baside).

La germination des ascospores ou des basidiospores donne des filaments cloisonnés. Ils ont également un mode de reproduction asexués, qui implique la production de conidiospores.

Les Deuteromycota ou deutéromycètes (champignons imparfaits) se reproduisent uniquement par voies végétative ne sont plus reconnus en tant que division autonome.

### I. 2. 3. 2. Reproduction

Les moisissures produisent des organes de reproduction que l'on appelé de façon générale spore et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative. Les spores d'origines sexuelle résultent d'une fécondation (zygospore et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) alors que les spores d'origine végétatives résultent d'une simple mitose que l'on appelé fréquemment conidie. Elles assurent la reproduction et la dissémination chez les espèces de formes imparfaites mais on les trouve également chez les autres groupes ou elles coexistent des formes de reproductions sexuées et leur type varies selon les moisissures.

- **Les thallospores** : sont formées aux dépens du thalle par transformation d'élément préexistant.
- **Les sporangiospores** : sont des cellules flagellées ou non ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle.
- **Les conidiospores** : sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'portion préexistante du thalle. Ces spores toujours terminales naissent d'un filament appelé conidiospores (metulae, phialides...) (**Guiraud, 1998**).

Pour un même champignon, selon ses conditions de vie, deux types de processus peuvent être à l'origine de la production des spores (aussi nommée fructification) :

- Sexué : champignons téléomorphes ou (parfait)
- Et/ou asexué : champignons anamorphe ou (imparfait)
- Les deux formes de reproduction peuvent coexister chez un même champignon qu'on appelle holomorphe

## **I. 2. 4. Isolement et Identification de moisissures**

### **I. 2. 4. 1. Isolement des moisissures et milieux de culture**

Le choix de milieu de cultures déterminés dans l'isolement et le dénombrement de la microflore du produit à analyser. Trois catégories peuvent être distinguées :

- Les milieux de routine peu sélectifs, permettant l'isolement d'un grand nombre de moisissures ;
- Les milieux sélectifs adaptés à la recherche d'une espèce ;
- Les milieux différentiel utilisés pour la détermination de champignons.

### **I. 2. 4. 2. Identification des moisissures**

L'identification repose sur l'étude de critères cultureux (température et vitesse de croissance) et morphologiques. Ces derniers constitués des paramètres macroscopiques (l'aspect, la couleur, odeur...) et microscopiques (l'aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores) (**Cahagneret Richard-Molard, 1998**).

#### **I. 2. 4. 2. 1. Critères d'identification macroscopique**

- L'aspect de colonie représente un critère important d'identification (forme duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutés, poudreuses, ou granuleuses)
- Le relief des colonies : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure)
- La taille des colonies : être très variable en fonction des genres fongiques.
- La couleur des colonies ; elle est un caractère important pour l'identification.
- Les pigments : être localisé au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*)  
Ou diffuser dans le milieu (*Fusarium*) (**Botton et al., 1990**).

#### **I. 2. 4. 2. 1. Critères d'identification microscopique**

L'examen microscopique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au bleu de coton pour mettre en évidence la plupart

des éléments importants d'identification : spores et leur aspect, appareil végétatif, le mode de reproduction (Cahagnier Richard- Mollard, 1998 ; Peterson, 2006; De Hoog et Guarro, 1995).

### I. 2. 5. Condition de croissance des moisissures

#### I. 2. 5. 1. Macroéléments

Le carbone constitue l'élément le plus abondant dans la cellule fongique, il représente environ 50% de la cellule, tandis que la teneur en azote varie entre 10 et 15 (Riviere, 1975 ; Scriban, 1993). Ainsi, le rapport carbone / azote influe considérablement la croissance et il est pour les mycètes de l'ordre de 20/1 ; un rapport proche de 20 permet une bonne croissance mycélienne (Barker et Worgan, 1981 ; Botton et al., 1990). Grâce à la glycolyse et au métabolisme aérobie.

Les mycètes assimilent les sucres facilement métabolisables comme le glucose, le maltose, le saccharose et les polymères tels que l'amidon (Nicklin et al., 1990).

#### I. 2. 5. 2. Sources minérales

La présence des ions minéraux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques. Il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus ou moins différentes, selon l'espèce (Uchicoba et al., 2001). Des autres éléments tels que le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques... (Boiron, 1996).

#### I. 2. 5. 3. Température

Les moisissures sont mésophiles avec un optimum de croissance de 25 à 35°C (Botton et al., 1999 ; Julien, 2002). Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au-dessus de 50°C) avec une croissance optimale aux environs de 20 à 25°C, *Aspergillus fumigatus* est un bon exemple (Botton et al., 1999 ; Nicklin et al., 2000). D'autres sont psychrophiles ou psychrotolérantes se développent à basses températures (entre -5 et 10°C) tel que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et



*Cladosporiumherbarum*, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans entrepôts frigorifiques (Davet, 1996 ; Bottonet al., 1999).

**Tableau 4 :** Catégories de champignons selon leur gamme de température de développement (Roquebert, 1997).

Types de champignons	Gamme de température	Température optimale
Mésophiles	0 à 50°C	15 à 30°C
Thermophiles	20 à 50°C	35 à 40°C
Thermotolérant	0 à 50°C	15 à 40°C
Psychrophiles	0 à 20 °C	0 à 17°C

#### I. 2. 5. 4.pH

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4,5 - 8,00 (Botton et al., 1999). bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH.

*Fusariumculmorum*, *Trichodermaharzianum* et *Aspergillusoryzae* ont une tendance à croître dans des milieux légèrement acide (Urbanek et al., 1984 ; Delgado et al., 2002).

**Tableau 5 :** Aperçu de degré de résistance de spores fongiques (Carille et al., 2001).

	Seuil de résistance	Durée de la viabilité	Exemples d'espèces concernées
Chaleurs très élevés	90°C (Feux de forêt)	Quelques mois	Ascospores de <i>byssochlamyces</i>
Froid intense	Congélation	Un hiver	Plusieurs espèces du Nord
Sécheresse de l'ail ambiant	±0% d'humidité relative	Semaine à année	<i>Eurotium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>

Présence de l'humidité dans le milieu sur lequel se déposent les spores	De 0 à 50 % de l'humidité + de 50% d'humidité	Jusqu'à des années A ces taux , les spores devraient germer dans le cas contraire	<i>Eurotium</i> spp Toutes les espèces
---	---	---	---

### **I. 2. 5. 5. Aération**

La quantité d'oxygène est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeant peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*, certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (Bourgeois, 1996 ; Botton et al., 1999).

### **I. 2. 5. 6. Lumière**

La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leur spores (Botton et al., 1999).

### **I. 2. 5. 7. Teneur en O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>**

La plupart des moisissures sont aérobies et exigent une bonne oxygénation et un taux de CO<sub>2</sub> inférieur ou égal à 10%. Cependant, certains tolèrent des quantités relativement faible d'oxygène et peuvent même se développer en anaérobiose.

### **I. 2. 6. Usage des moisissures**

Les champignons sont d'une grande importance pour l'homme dans de nombreux domaines d'activités (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Différents domaines d'activités des moisissures.

Domaine	Microorganismes	Activité
---------	-----------------	----------

Agroalimentaire	Levure saccharomyces	Fromagerie, pâtisserie, production de boissons alcooliques	Piskur et al. (2006)
Médicale	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etude de processus cellulaire	Goffeau et al. (1996)
	<i>Penicillium</i>	Production des antibiotiques pénicillines	Strohl (1997)
Ecologique	Champignon saprophyte	Maintien de l'équilibre écologique	Joffin (2003)
Biotechnologie	<i>Ashbya gossypii</i>	Production des vitamines A, B, D Synthèse des médicaments	Santos et al. (2009)
	<i>Trametes versicolor</i>	Production des polysaccharides K	Dongmo (2009)
Agriculture	<i>Beauveria bassiana</i>	La lutte biologique	Becker et al. (1998)

## I. 2. 7. Généralité sur Les mycotoxines

### I. 2. 7. 1. Définition

Les mycotoxines sont des substances chimiques synthétisés par des champignons microscopiques (**Steyn, 1998**). Plusieurs genres de moisissures sont connues comme producteurs de mycotoxines à savoir *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps* qui peuvent produire plusieurs mycotoxines selon les conditions de culture (**Boudih, 2013**).

De manière générale, les mycotoxines sont définies comme étant des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, produites par les moisissures et provoquant de nombreuses maladies chez l'homme et animaux (**Coker, 1997**).

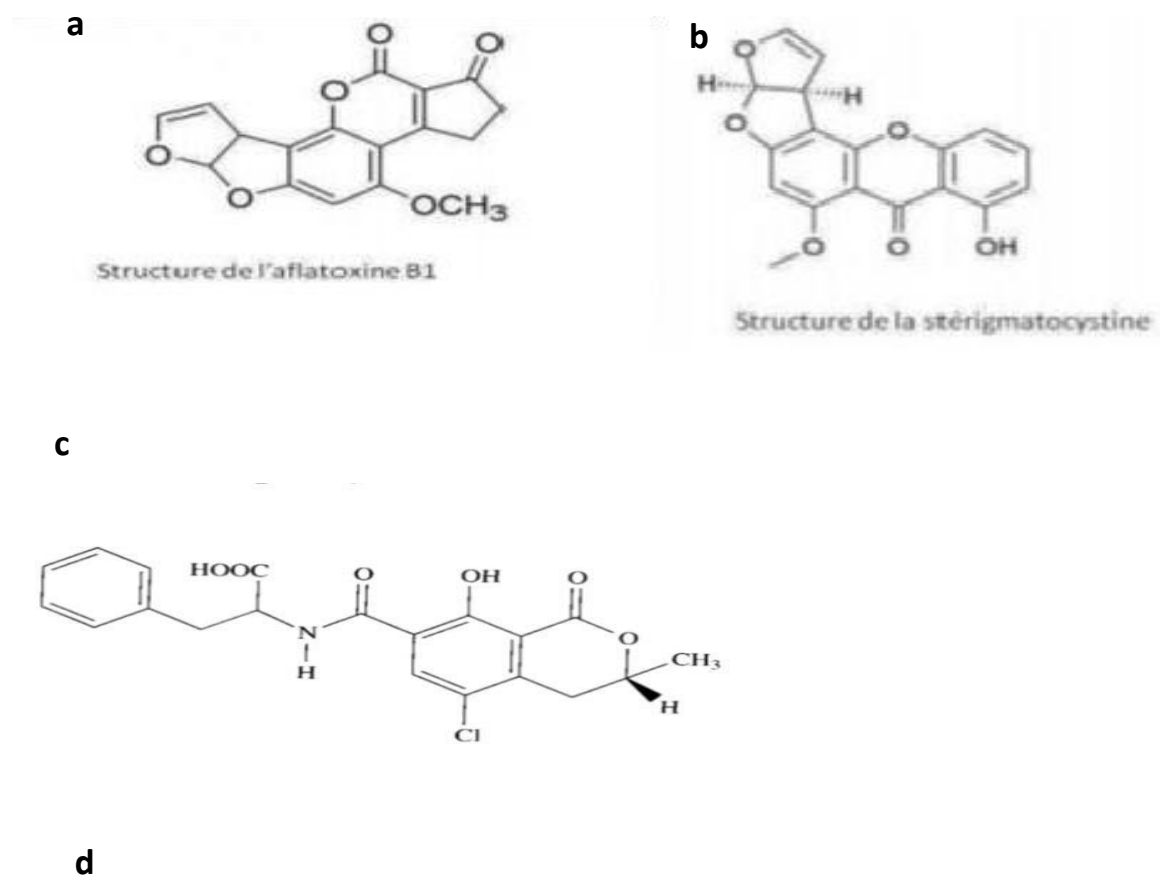
**Tableau 7 :** Principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines (**Coker, 1997**).

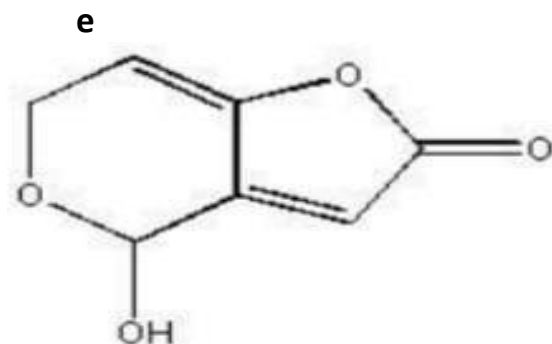
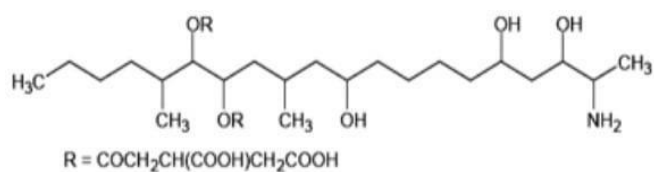
Espèce fongique reproductrice	Mycotoxine
<i>Aspergillus</i> sp	Gliotoxines, acide helvolique, aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine
<i>Alternaria</i> sp	Alternariol, acide ténuazonique
<i>Claviceps</i> sp	Alcaloïde (ergotamine et dérivés)
<i>Fusarium</i> sp	Zéralénone, fusarine, fumonisines, moniliformine
<i>Penicillium</i> sp	Ochratoxine A, Patuline, Citrinine

### I. 2. 7. 2. Structure des mycotoxines

La mycotoxinogénèse est l'ensemble de facteurs de synthèse et d'excrétion des mycotoxines appelle aussi (toxinogénèse). La production des mycotoxines est directement liée à la croissance fongique (Olsen et al., 2003). La production de mycotoxines est une conséquence combinée des propriétés génétiques de la souche et des facteurs environnementaux (Olsen et al., 2003 ; Blumenthal, 2004).

La figure 4 illustre des exemples mycotoxines et leur structure.





**Figure 04** : Exemples des mycotoxines et leur structure. a) aflatoxine B1, b) stérigmatocystine, c) ochratoxine, d) fumonisines, e) patuline (Molina et Gianuzzi, 2002).

### I. 2. 7. 3. Effets des mycotoxines

Le tableau 8, synthétise les effets de mycotoxines.

**Tableau 8** : Effets des mycotoxines.

Mycotoxines	Leur effets
Aflatoxine	Hépatotoxique – Mutagène – cancérogène-Immunotoxique
Citinine	Néphrotoxine
Fumonisine B1	Neurotoxique-Hépatotoxique –Immunotoxique- Cancérogène
Ochratoxines	Néphrotoxines – Cancérogènes – Mutagène
Patuline	Neurotoxique –Mutagène
Pénitrème	Neurotoxique
Stérigmatocystine	Cancérogène – Hépatotoxique

### **I. 2. 8. Genres fongiques responsables de la synthèse des mycotoxines**

Les mycotoxines sont produites par 5 genres de moisissures : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps* (Miller et Trenholm, 1994).

#### **I. 2. 8. 1. Genre *Aspergillus* spp.**

Ce genre appartient au sous-embranchement des Ascomycotina par leur mode de reproduction sexué. Le thalle, hyalin ou coloré présente un mycélium cloisonné porte des conidiophores dressés, terminés en vésicule (Eltem et al., 2004) (Figure 7a).

#### **I. 2. 8. 1. 2. Genre *Penicillium* spp.**

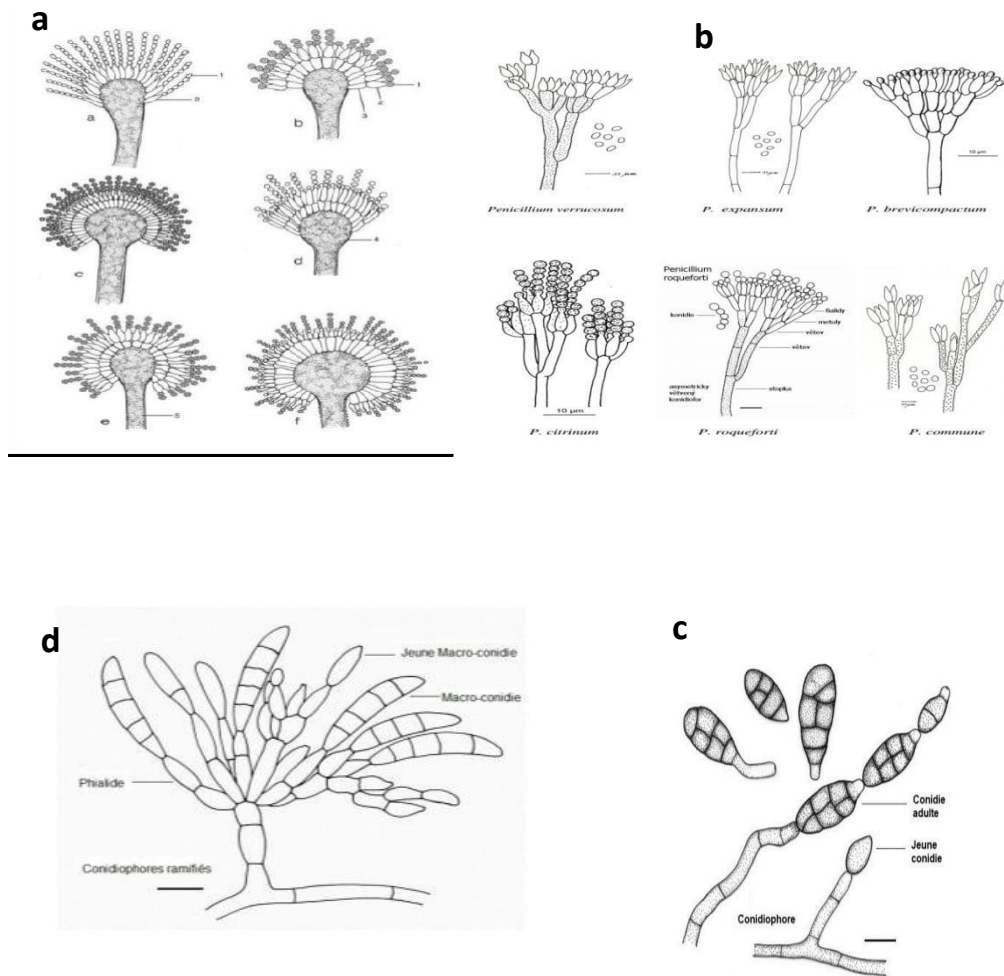
Le *Penicillium* appartenant au phylum des Ascomycètes, ce genre définie d'après les caractères du thalle, des Pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les espèces du genre *Penicillium* se développent sous les climats tempérés. Les *Penicillia* sont caractérisées par un filament dressé, formant des conidies en chaînes (Figure 7b).

#### **I. 2. 8. 1. 3. Genre *Alternaria* spp.**

Des champignons filamenteux appartenant à la classe des Deutéromycètes, les spores d'*Alternaria* sont grandes, colorées (brunâtres) et compartimentées par des septes (cloisons) transversaux, obliques (Figure 7c).

#### **I. 2. 8. 1. 4. Genre *Fusarium* spp.**

Sont des champignons filamenteux imparfait appartenant à la classe des Deutéromycètes, elles peuvent produire des mycotoxines dangereuses (toxine T-2, Zéaralénone, Vomitoxine, fumonisine). Les *Fusarium* ont un intérêt vétérinaire important (Figure 7d).



**Figure 05:** Aspects microscopiques de certaines moisissures. a) *Aspergillus*spp., b) *Penicillium*spp., c) *Alternaria*spp., d) *Fusarium*spp.

## **II. PARTIE EXPERIMENTALE**



## **MATERIEL ET METHODES**

### **II. 1. 1. Lieu et période d'étude**

L'intégrité de ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de microbiologie, faculté des sciences et des technologies, Université de Ain Témouchent à partir de 16 mai 2021.

L'objectif de ce travail était de rechercher, d'isoler, d'identifier morphologiquement et de caractériser la croissance de moisissures isolés à partir de poudre de lait utilisé pour la fabrication de Yaourt dans la région d'Ain Témouchent.

### **II .1. 2. Echantillonnage et prélèvements**

Dans les deux unités de fabrication à Ain Témouchent, le yaourt est fabriqué à base du lait en poudre. Les échantillons de la matière première ont été prélevés à partir de deux unités de production de Yaourt. Six échantillons de la matière première ont été prélevés de chaque unité de production A et B (Tableau 10). Une quantité de 10g a été prélevée aseptiquement puis transférée au laboratoire à 4°C. Les échantillons étaient analysés le jour même de prélèvement.

**Tableau09:** Origine des échantillons prélevés du lait en poudre utilisé pour la fabrication de Yaourt.

<b>Marque</b>	<b>Nombre des échantillons</b>	<b>Poids/Volume</b>	<b>Date de prélèvement</b>
<b>A</b>	6	10g	17- 05-2021
			19-05-2021
			20-05-2021
			23-05-2021
			24-05-2021
			26-05-2021
<b>B</b>	6	10g	17-05-2021
			19-05-2021
			20-05-2021
			23-05-2021
			24-05-2021
			26-05-2021

### II . 1. 3. Caractérisation sensorielle de poudre du lait

Les qualités organoleptiques et sensorielles ont été évaluées par un panel d'un laboratoire d'analyse de la qualité des aliments « El Feth » à Oran. Les critères de qualités organoleptiques et sensorielles recherchés sont illustrés dans le tableau 11.

**Tableau 10:** Bulletin d'analyse des caractères organoleptiques d'après laboratoire d'analyse de la qualité EL-FETH, Oran.

Caractères	Résultat	Références
Couleur	Blanches	Examen visuel
Aspect	Pâteux	Examen visuel
Texture	Lisse	Examen visuel
Odeur	Sans défaut	Sensoriel
Gout	Caractéristiques à la banane	Dégustation
Apparence	Sans défaut	Examen visuel

### II . 1. 4. Caractérisation physico-chimiques de la poudre du lait

Les analyses physico-chimiques étaient réalisées dans le laboratoire de microbiologie de l'université BELHADJ Bouchaïb. La procédure utilisée est celle décrite par la réglementation algérienne. Seulement les critères limitant la croissance de microorganismes sont évalués à savoir le pH, l'extrait sec et l'humidité.

#### II . 1. 4. 1. Mesure de pH

La valeur du pH est un indicateur d'état de fraîcheur et/ou de stabilité (Mathier, 1998). La mesure consiste à étalonner pH-mètre à l'aide de deux solutions tampons. Ensuite, une quantité de 10g du lait en poudre était pesé puis dissous dans 90mL d'eau distillée. Puis, l'électrode de pH mètre était trempé dans le mélange. Sous agitation, la valeur de pH était enregistrée, une fois la valeur se stabilise (Figure 08). A la fin de manipulations l'électrode était rincée avec l'eau distillée.



**Figure 08** :Démonstration de mesure de pH de poudre du lait utilisée pour la fabrication de Yaourt.

#### II . 1. 4. 2. Mesure de l'extrait sec (ES)

La mesure de la matière sec est basée sur l'élimination de toute l'eau à la température de 130°C jusqu'à l'obtention du poids constant de la prise d'essai analysée. Elle consiste à placer une quantité de 10g du lait en poudre dans l'étuve pendant 2h à la température 130°C. Ensuite, l'aliquote étuvé était pesé qui représente l'extrait sec.

#### II . 1. 4. 3. Mesure l'humidité (H)

Le taux d'humidité est l'un des critères très importants en termes de qualité du yaourt et de croissance de microorganismes. L'humidité est la présence d'eau ou de vapeur d'eau dans l'air ou dans une substance. Elle favorise la croissance de microorganismes. L'équation 1 est utilisée pour la détermination de l'humidité :

$$\text{Humidité (H\%)} = m_p - m_{ES}$$

**Eq. 1**

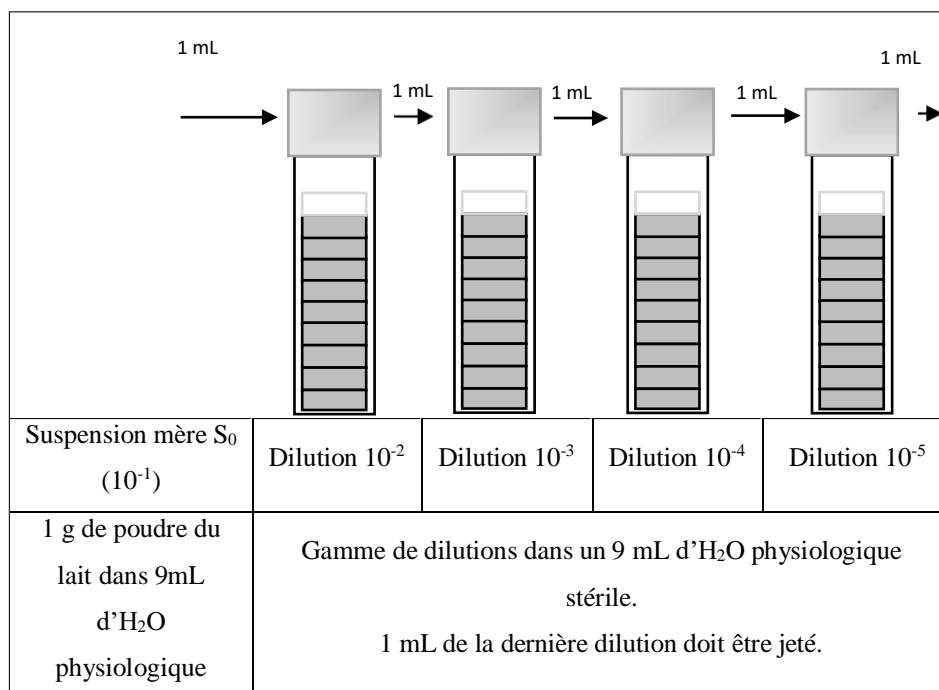
$m_p$  : Quantité du lait en poudre étuvée (10g)

$m_{ES}$  : Quantité de l'extrait sec trouvé (g)

### II . 1. 5. Dénombrement et isolement de moisissures

La procédure utilisée pour le dénombrement des moisissures dans le lait en poudre est celle décrite par la norme algérienne de JORAD N°36 (2017). Elle consiste à dissoudre 1g du lait en poudre dans 9mL de l'eau physiologique. Après homogénéisation de mélange, une série de dilutions décimales a été réalisée.

A partir de chaque dilution, 1mL était déposé au fond de la boîte de Pétri stéril puis coulée par milieu Dichloran gélosé additionné d'une antibiotique tétracycline pour empêcher le développement des bactéries. Après solidification, les cultures étaient incubées à 25°C pendant 5-7jours.



**Figure 09:** Procédure de dilutions décimale de poudre du lait.

Les colonies obtenues ont par la suite purifié par repiquages successifs sur milieu PDA additionné de l'antibiotique Oxytétracycline (afin d'inhiber la croissance de bactérie). Les cultures étaient incubées à 25°C pendant 7 jours.

## **II . 1. 6. Caractérisation et l'identification des isolats**

L'identification de genre fongique fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques des moisissures isolées à l'état pure comme montré par **Bourgeois et Leveau**(1996).

### **II . 1. 6. 1. Etude macroscopique de colonies**

Elle permet de mettre en évidence la morphologie de colonie obtenue sur les milieux solides. Il s'agit d'une observation à l'œil nu pour déterminer les critères suivants (texture, couleur de thalle, présence d'un pigment et la taille).

### **II . 1. 6. 2. Etude microscopique**

L'observation de caractères microscopiques a été réalisée par la technique de scotch. Elle consiste à mettre une partie de l'adhésif « Scotch » sur l'extrémité de la colonie obtenue à partir de milieu PDA, puis déposé sur une goutte de solution de montage « bleu de Cotton sur une lame ». Ensuite, l'observation microscopique a été réalisée aux grossissements 10×, 40× puis 100× avec quelques gouttes d'huile à immersion. Elle permet d'avoir des informations sur l'aspect du mycélium, l'aspect des spores et l'aspect des conidiophores.

## **II . 1. 7. Etude mycotoxinogénèse**

La mise en évidence de la production de mycotoxine a été effectuée en basant sur le protocole de Gacem (2011). Elle se fait en deux étapes : (1) détection visuelle et (2) par révélation sur plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) après production sur milieu YES.

### **II . 1. 7. 1. Détection visuelle de la production de mycotoxine**

Elle consiste à ensemencer le milieu à base de l'extrait de noix de coco additionné 0,8 mL de désoxycholate de Sodium. Ensuite, les cultures ont été incubées à 25°C pendant 14 jours. Après incubation, la production de mycotoxine a été mise sous la lumière UV à 365 nm. La production de mycotoxines s'est traduite par une fluorescence.

## **II . 1. 7. 2. Détection de mycotoxine par CCM**

### **II . 1. 7. 2. 1. Production de mycotoxines**

Une öse de colonie obtenue à partir de milieu PDA, a été repiquée 50mL milieu YES additionné d'antibiotique et vitamine B<sub>1 2</sub> (induit les réactions conduisant à la production des mycotoxines). Le mélange est agité pendant 10min puis incubé à 25°C pendant 14 jours. Les flacons sont agités quotidiennement durant 3jours.

### **II . 1. 7. 2. 2. Extraction de mycotoxine**

Après 14 jours d'incubation, la culture est filtrée à travers papier filtre type Wattman N°1. Les 50mL du filtrat obtenu sont additionnés à 100 mL de chloroforme. Le mélange a été agité pendant 10min, puis laisser décanter en utilisant une ampoule à décantation. Cette opération est répétée en additionnant successivement 50mL et 30mL du chloroforme chaque séparation.

La phase chloroforme obtenue est filtrée sur papier Wattman N°1 puis concentré par évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un volume de 2 à 3mL.

### **II . 1. 7. 2. 3. Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince est une méthode qui permet une séparation efficace des mycotoxines et leur identification. Elle est effectuée dans une cuve en verre fermée, par le contact de la plaque avec la phase mobile contenant un mélange de solvant d'éluion. La procédure consiste à activer d'abord la plaque de CCM à 130°C pendant 10min. Après activation, à l'aide d'une micro pipette, un spot de 20 µl et un autre de 40 µl de chaque extrait chloroformique concentré sont déposés sur la plaque CCM. Ensuite, la plaque est déposée verticalement dans la cuve à chromatographie qui contient la phase mobile composée de toluène/Acétate d'éthyle/Acide formique (5 : 4 : 1).

Après la migration, la plaque est examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. L'observation des plaques sous UV (365nm) permet de visualiser l'aflatoxine forme des taches bleu.

### II . 1. 8. Etude de la croissance de moisissures

La croissance radiale de tous les isolats obtenus est testée sur milieu PDA. Elle consiste à déposer une öse centrale sur milieu PDA puis incubé à 25°C. Le diamètre des colonies macroscopiques (centimètres) est mesuré quotidiennement.

Les paramètres de croissance des isolats étudiés ont été estimés à l'aide de modèle primaire de Baranyi(**Baranyi et Roberts 1994**). Le modèle utilisé est représenté par l'équation 1 et 2 :

$$\gamma = \gamma_0 + \mu_{\max} A - \ln \left( 1 + \frac{[\exp(\mu_{\max} A) - 1]}{\exp(\gamma_{\max} - \gamma_0)} \right) \quad \text{Eq. 1}$$

$$A = t + \left( \frac{1}{\mu_{\max}} \right) \ln [\exp(-\mu_{\max} t) + \exp(-\mu_{\max} \lambda) - \exp(-\mu_{\max} t - \mu_{\max} \lambda)] \quad \text{Eq. 2}$$

$\gamma$  est le rayon de la colonie (mm).  $\gamma_0$  est le rayon initial de la colonie(mm).  $\gamma_{\max}$  est le rayon maximal de la colonie (mm). $\mu_{\max}$  est le taux maximum de croissance radial ( mm / j ) de la colonie, $\lambda$  est la phase de latence ( j,temps pour rayon > 2.5mm),et t est le temps en jours ( j ).



## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### II . 2.1. Mesures de pH et d'humidité

Les résultats de cette étude ont montré de pH égal à 6,68 est conforme aux exigences de la réglementation algérienne **J.O.R.A (1998)**.

Par ailleurs, les échantillons du lait en poudre utilisé lors de fabrication de Yaourt contiennent des faibles taux humidité de 19,7% acceptable aux exigences de la commission du codex Alimentaires.

Dans ces conditions de pH et humidité, les moisissures sont en générale plus opté à la croissance (**Davet,1996**).

### II. 2. 2. Dénombrement de moisissures

Les résultats de dénombrement montrent que l'ensemble des échantillons de la marque « A » sont contaminés par les moisissures, tandis que aucune contamination n'est révélée pour la marque « B ». Les résultats de la marque B est probablement lié à la faible quantité prélevée qui diminue la probabilité d'avoir les microorganismes.

Pour les échantillons contaminés de la marque « A », les concentrations sont comprises entre 10 et 500 ufc/g avec un médian de 30 ufc/g. ces résultats sont en accord avec résultats de Medina et Jordano (1993), Haridy(1993) et Saad et al. (1983). Ces auteurs ont montré que l'ensemble des échantillons analysés sont contaminés avec des concentrations s'étalent entre 15 et 330 cfu/g. Cependant, les résultats obtenus dans cette étude, sont moins contaminés par rapport aux résultats de Van-Uden et al. (1957).

Quant aux genres identifié dans cette étude, ils étaient identifiés également par plusieurs auteurs à savoir Dalia et al. (2016) et Buehler et al. (2018). Ces mêmes auteurs ont montré la présence des autres genres. Dans notre étude, la biodiversité est certainement limitée par le nombre étroit des échantillons.

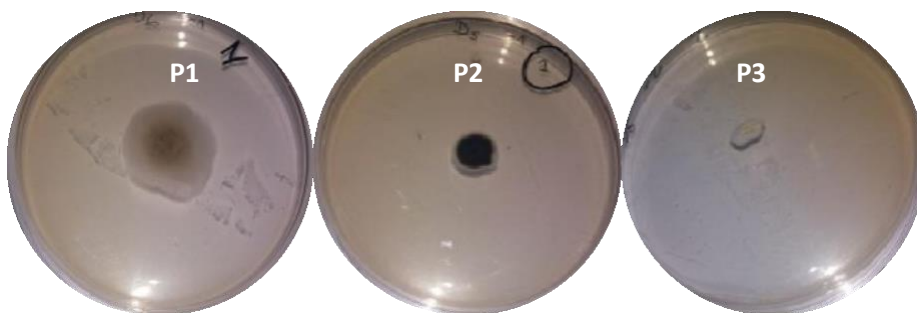
Une présence importante des différentes espèces fongiques dans la poudre du lait, est probablement dû à la présence des conditions appropriés à leur croissance. Beaucoup d'autres auteurs reportent le développement et l'activité des moisissures (**Cuero et al., 1987 et lacey, 1990**).L'évolution du niveau de contamination par les moisissures et important car elle permet

de fournir des informations aussi bien sur la qualité des produits alimentaires que d'éventuelle présence des mycotoxines.

**Tableau 11** :Dénombrement des souches de moisissures obtenues après incubation.

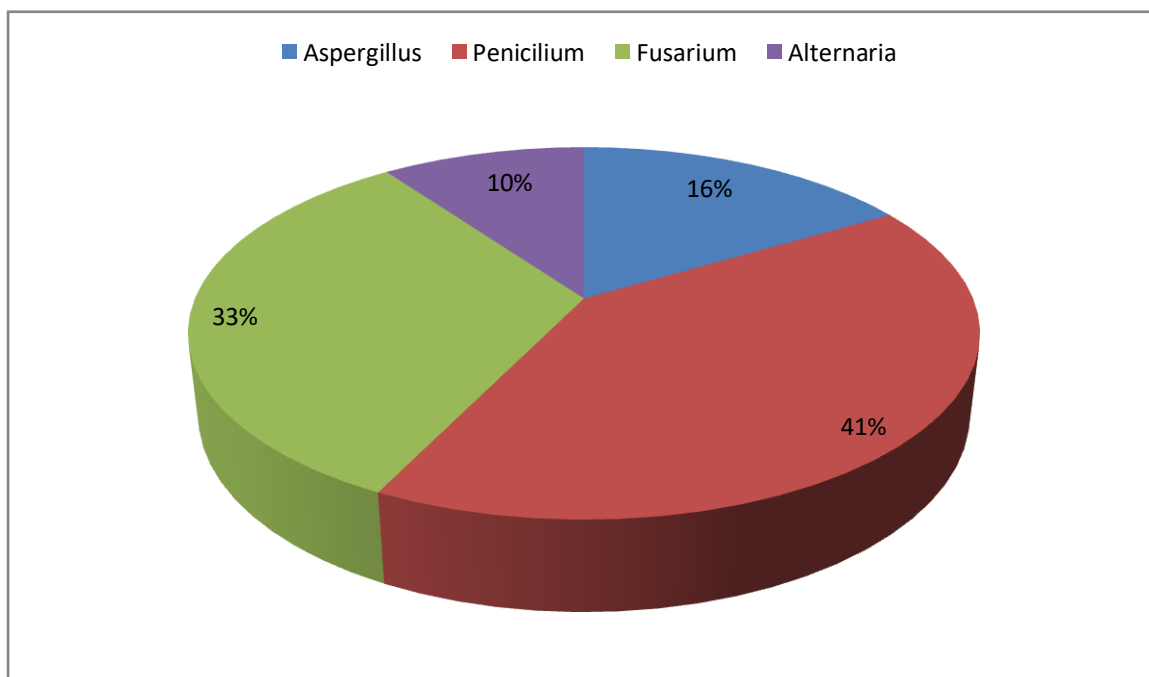
Marque	Isolat	ufc/g	Median (ufc/g)
A	P1	30	30
	P2	200	
	P3	10	
	P4	500	
	P5	20	
	P6	30	
B			

A partir de boites de dénombrement et d'isolement de moisissures, 6 isolats ont été repéré et purifié sur milieu PDA. Les isolats obtenus ont été identifiés en basant sur l'observation microscopique. L'identification macroscopique est difficile à réaliser à cause de variabilité macroscopique de colonies. Les caractères macroscopiques sont illustrés dans le tableau 13.



**Figure 10:** Culture de purification des isolats.

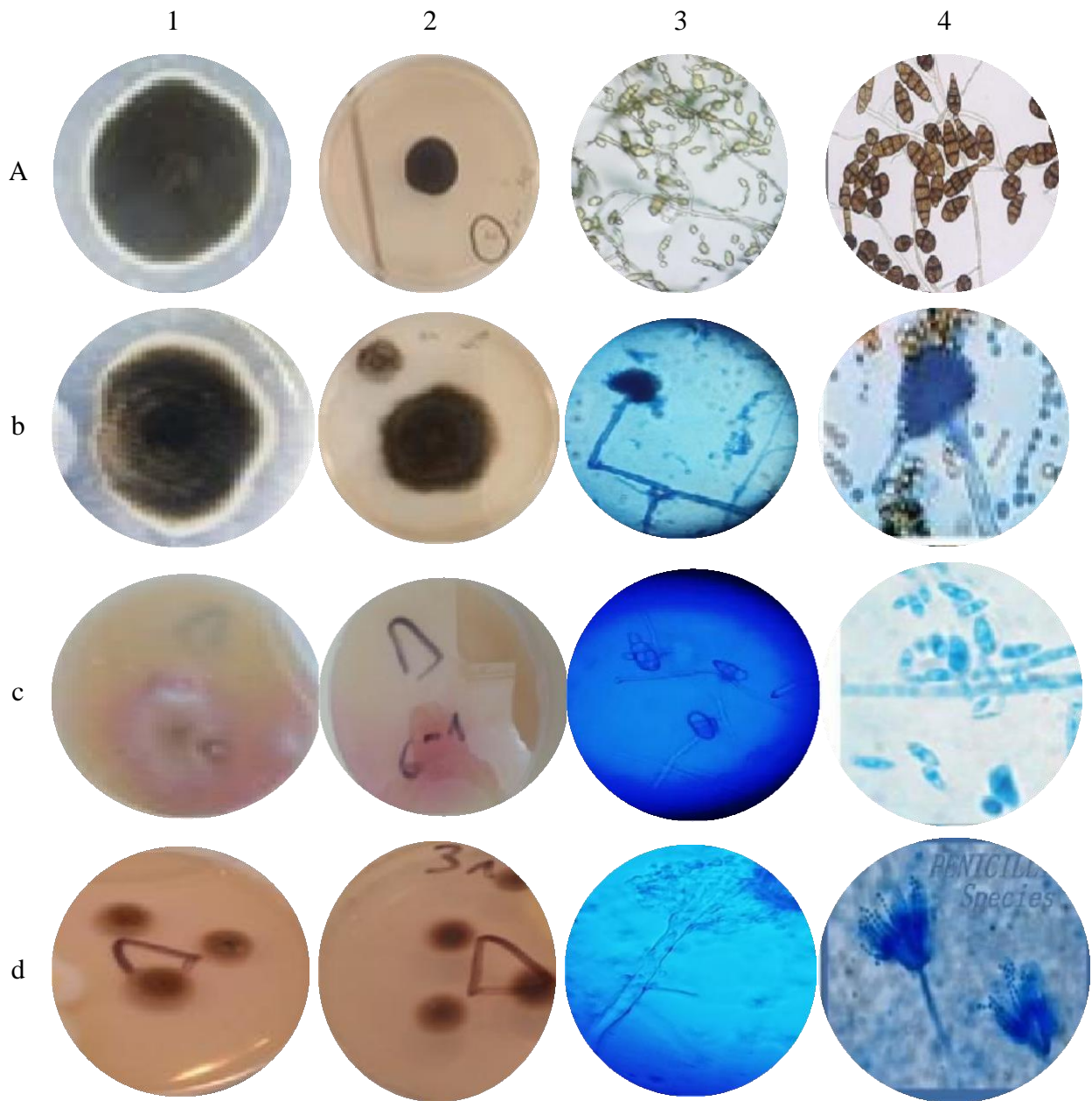
L'identification microscopique a permis d'identifier 4 genres (Figure 11) appartiennent à *Alternariaspp.* (10%), *Aspergilluspp.* (16%),*Fusariumspp.* (33%) et *Penicilliumspp.* (41%)(Figure 12).



**Figure 11** :Secteurs de répartition de différents isolats fongiques isolés à partir de l'échantillon de lait en poudre.

**Tableau 12 :** Caractères macroscopiques et microscopiques des isolats.

Isolats	Vitesse de croissance	Caractères microscopique	Espèces
P1	Vitesse de croissance rapide. <u>Recto</u> :blanc puis vers-gris puis gris foncé,à gris noirâtre. <u>Verso</u> : agris noirâtre.	Thalle septé. Grosses conidies globuleuses	<i>Aspergillus spp</i>
P2	Vitesse de croissance moyenne. <u>Recto</u> : Blanc puis beige, puis jaune orangé à brun foncé avec un centre jaune. <u>Verso</u> : jaune blanchâtre.	Thalle septé,conidiophore lisse se termine par une tête conidienne bisériée. Conidies uni cellulaire globuleuse.	<i>Aspergillus spp</i>
P3	Vitesse de croissance rapide. Colonies apparaissent noires et duveteuses.	Les conidies sont ovoïdes ; Elles portent souvent à leur extrémité un bec conique à cylindrique, brun et court. Ces spores asexuées pluri cellulaires conidiophore simple, lisse.	<i>Alternariaspp</i>
P4	Vitesse de croissance rapide <u>Recto</u> : Blanc puis jaune cotonneuse <u>Verso</u> : incolore à jaune pâle.	Hyphes septés. Conidiophores court. Macroconidies fusiformes pluricellulaires. Macroconidies ovales, isolées ou en chainettes.	Fusarium. Spp.
P5	Vitesse de croissance lente. <u>Recto</u> : rose, puis souvent blanche avec un centre noir. <u>Verso</u> : couleur rose diffusible au revers de la culture	Les hyphes septés ,macroconidies , fusiformes, pluri septé.	<i>Fusarium. spp</i>
P6	Vitesse de croissance lente. Couleur de mycélium vert foncée, colonie simple, poudreuse. Revers : noire.	Conidiophores isolés simple,globuleuse. Pinicillescontitué de phialides branché directement à l'extrémité du conidiophores.	<i>Penicillium spp.</i>

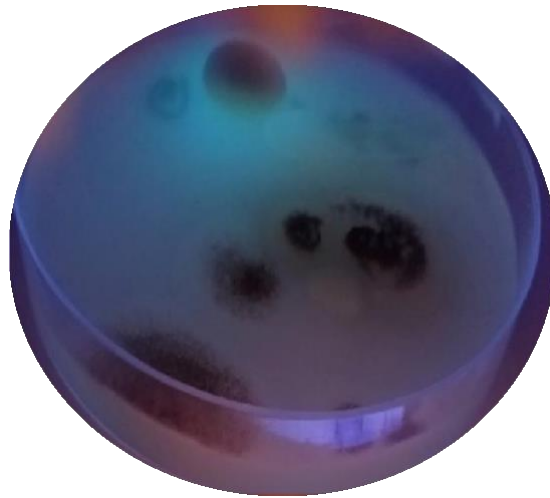


**Figure 12 :** Caractères microscopiques et macroscopique de isolats identifiés. A) *Alternaria*spp, b) *Aspergillus*spp; c) *Fusarium*spp, d) *Penicillium*spp. 1)macroscopiquerecto, 2) macroscopique verso, 3) aspect microscopique à 40×, 4)

#### Détectiondu pouvoir producteur des mycotoxines

Comme montre la figure 13, les isolats testés ont montré leur pouvoir producteur de mycotoxine révélé par la fluorescence bleu-vert sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).

La détection de la production d'aflatoxines par la visualisation de la fluorescence sur milieu CAM est aussi performante que la détection par CCM

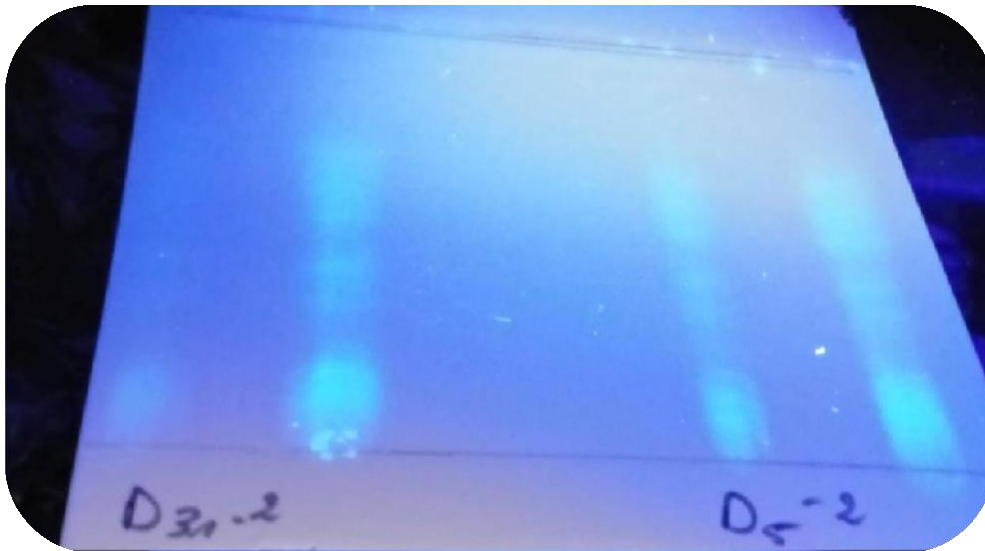


**Figure 13 :** Mise en évidence de la production de la mycotoxine par la fluorescence sous lumière UV (365nm) sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).

La détection par la chromatographie sur couche mince (CCM) a démontré que les isolats sont producteurs des aflatoxines montrées par une fluorescence bleue (Figure 14).

L'ensemble des résultats de détection de pouvoir mycotoxinogène sont en accord avec les résultats de LEMKE et al (1989). Les résultats de CCM montrent que les isolats testés produisent au moins 0.5 ppb (poids par milliard) qui représente le seuil de détection de la méthode CCM (Zakaria et Majerus, 1992).

La sécrétion des métabolites secondaires par les souches fongiques toxigènes dans la poudre de lait dépend également d'autres facteurs liés à l'isolat comme montré par **Olsen et al. (2003) ; Blumenthal. (2004)**. A titre d'exemple, l'Ochratoxine A (OTA) produite par *Penicillium nordicum* (Olsen et al., 2003), *Aspergillus niger* (Abraca et al., 1994). Parmi ces facteurs, (1) l'activité d'eau de la poudre de lait, (2) comme montré par **Pfohl-Leszkowicz (2001)**, la disponibilité en eau a une influence déterminante pour les différentes mycotoxines y compris les aflatoxines, (3) défaut d'oxygénation (**Le Bars, 1982**), (4) la température optimale de toxigénèse (**Morceau C., 1991**), (5) le pH permettant la toxigénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique (**Keller et al., 1997**).



**Figure 14** : Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (365nm) de la production de mycotoxines sur CCM

### Modélisation de croissance radiale

La figure 15 montre les cinétiques de croissance des isolats obtenus. Les paramètres de croissance sont illustrés sur le tableau 14, les temps de latence et  $\mu_{T^{\circ}C}$  s'étalent entre [0 – 0.1jour] et [0.03-0.46jour<sup>-1</sup>] respectivement. Les résultats montrent que les paramètres de croissance dépendent de la souche. La souche C34 présente une croissance rapide par rapport aux autres souches. Cette variabilité est observée également par Baydaa (2017) et Pandey et al. (2018).



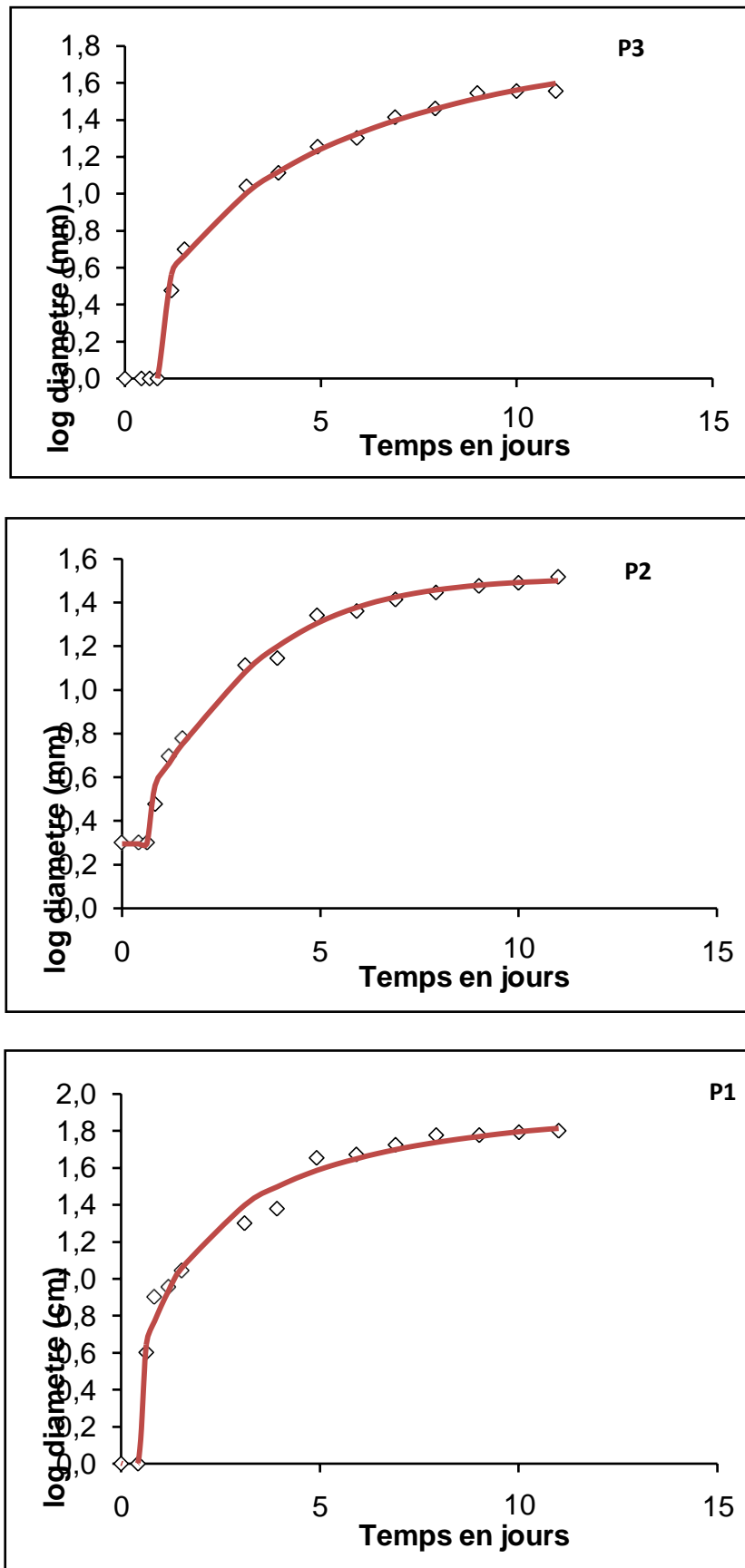


Figure 15 :Cinétiques décroissances de trois isolats de poudre du lait utilisé pour la fabrication de yaourt.

**Tableau 13 :** Paramètres de croissances des isolats de moisissures.

	P2	P3	P4
logR0 (mm)	0,12769027	0,00161515	0,002
logRmax	0,65731115	0,83381655	0,887
lag ( $\lambda$ ) (jour)	0	0,1094768	0
$\mu_{\max}$ (jour-1)	0,46259887	0,1428883	0,036
SCE	0,01544375	0,05060553	0,000

## CONCLUSION

Le but de cette étude est d'isoler et de dénombrer les moisissures dans la poudre de lait utilisée pour la production de yaourt ainsi que de caractériser la de croissance des moisissures dans la région d'Ain Témouchent.

Aux termes de ce travail, les résultats ont montré la contamination de poudre du lait utilisé pour la fabrication de yaourt. 4 genres ont été identifié dans des isolats d'*Aspergillus*spp et *Penicillium*spp sont productrice de mycotoxines par les deux techniques utilisées sur milieu CEM et milieu YES dont la révélation est visuelle et par CCM pour les deux méthodes respectivement.

Les résultats obtenus ouvrent un perspective (1) d'étendre l'étude sur une gamme élevée des échantillons, (2) modéliser la croissance de moisissures dans le produit au long de sa fabrication, distribution et consommation, (3) modéliser la production de mycotoxines.

Le risque lié au mycotoxines reste inévitable vu que les moisissures sont toujours présentes à cause de leur caractères ubiquitaires et désamination rapide. Cependant, la minimisation de la contamination et croissance de champignons peuvent être ciblé.

Au terme de ce travail plusieurs recommandation, peuvent être proposer :

- Respecter le principe d'hygiène et les bonnes pratiques de fabrication ;
- Réduire les quantités achetées ;
- Améliorer les conditions de stockage de produits et de matières premières ;
- Sensibiliser les acteurs de la filière de risque de mycotoxines.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Abarca, M.L, Bragulat, M.R, Castella, G, Cabanes, F.J. 1994.** Ochratoxin A production by strains of *Aspergillusnigervar-niger*. Applied and EnvironmentalMicrobiology 60, 2650-2652.

**ANDARY, C, Chir, M. 1988.**Les mycotoxines . Encycl. (Paris, France) Intoxications 16070 AID 1, 4p.

**Anonyme, 2009.**Traite des vaches laitières.Matériel, installation, entretien.1<sup>ère</sup> édition. France agricole, institut de l'élevage :554p.

**Barker, T.W, WorganJ.T. 1981.**Theapplicationof air. Lift fomenters to the cultivation of filamentation.AppiedMicrobiology and Biotechnololgy35, 292-296.

**Benkakouz, M.2002.**Production de la protéase neutre par *Aspergillusoryzae* sur déchets d'organe. Optimisation du milieu de culture, purification partielle et étude des propriétés physico-chimique de l'enzyme. Thème de magistère.

**Blumenthal, C.Z. 2004.** Production of toxic metabolites in *Aspergillusniger*, *Aspergillusoryzae* and *Trichodermareesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi.RegulatoryToxicology and Pharmacology 39, 214- 228.

**Boiron,P.1996.**production de la proteaseneuter par *Aspergillus oryzae* sur déchets d'organe. Optimisation de milieu de culture,purification partielle et étude des propriétés physico-chimique de l'enzyme. Thème de magistère.

**Botton, B, Bertron, A, Fevere, M, Gauthier, S, Guph, D, Larpent, J.P, Reymond, P, Sanglier, J.J, Vaysser, Y, Veau, S. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle, 2<sup>ème</sup> Ed *Masson collection biotechnologies*.p :5-10.

**Boudih, S. 2011.** Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro. Thèse de Doctorat, Ecole doctorale, Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé. Université Paris Est, consulté en juillet 2015, disponible sur <https://tel.archivesouvertes.fr/tel-00781807/document>.

**Bouix, M, Leveau, J.Y. 1999.**Production des enzymes. In scriban R (Ed Biotechnologie). Edition Lavoisier .P:344-400.

**Bourgeois, C.M, G.F, Met J.Z 1996** « les moisissures » en microbiologie tome 1 ; aspect microbiologique de la sécurité alimentaire des aliments : tec et doc (*Lavoisier*) chapitre 3 , p 238-248.

**Cahagnier, B, Richard-Moulard, D.1998.** Moisissures des aliments peu hydratés, les moisissures, collection sciences et techniques agroalimentaires, Ed : *Lavoisier* :p39-41.

**Cayot, P, Lorient, D. 1998.** Structures et Technofonctions des Protéines du Lait. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.

**Coker, R.D. 1997.** Mycotoxins and their control: constraints and opportunities. NRI bulletin 79, Chatham, UK : Natural Resources Institute.

**Davet, P.1996 .**Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris .p :52-57.

**De Hoog, G.S, Guarro, J.(1995).** Atlas of Clinical Fungi. Ed.CBS.Barcelona.

**Debry, G. 2001 ;** lait, nutrition et santé. Ed : Technique et documentation, Lavoisier. Paris : 566p.

**Dio, I, M. 1978.** DIO, I, M. 1978. Etude des problèmes posés par les aflatoxines dans les aliments du bétail et de l'homme. Thèse Vet. Dakar. N°12.

**Esteban, A, Abarca, M, Bragulat, M.R, Cabane, F.J. 2004.** Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology* 155,861-866.

**FAO, 1995.** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine Collection FAO: Alimentation et nutrition n° 28 .ISBN 92-5-20534-6,1995, chapitre 5.

**F.A.O. 1977.** Food and nutrition paper 2 mycotoxines Nairobi Sept 19-27 Food Cosmet. Toxicologie. 1979 17 159-166.

**FAO, 1995.** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Amazon, Rome, Italie.

**FAO, 1998.** Archives de documents de la FAO, le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. WWW.FAO.Org.

**Fredot, E.2009.** Connaissance des aliments : Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. 2<sup>ème</sup> Edition. Ed. Lavoisier, 2009, p 530.

**Fridot, E. 2005.** Connaissance des aliments-bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, tec et doc, Lavoisier : 25(397 pages).

**Jean, C. Dijon. 1993.** Au fil du lait . ISBN 2-86621-172-3. 3p-8p.

**Jeantet, R, Croguennec, T, Mahaut, M, Schuck, P, Brulé, G, 2008.** Les produits laitiers. 2<sup>eme</sup> Edition, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France, 2008, p185.

**Jeantet, R, Croguennec, T, Schuck, P, Brule, G.2006.** Science des aliments : biochimie/microbiologie - procédé – produits, volume 1 : stabilisation biologique et physicochimique, Ed. TEC et DOC, Paris, 2006, p 383.

**Joafara, B.H. 2016.** Qualité microbiologique des produits de charcuterie fabriqués à Antananarivo. Faculté des sciences.

**Keller, S.E, Sullivan, T.M, Chirtel, S. 1997.** Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *Industrial Microbiology, Biotechnology.* 19, 305- 309.

**L :** Traite des vaches laitières : Matériel, installation, entretien. 1<sup>ere</sup> édition. France Agricole, institut de l'élevage : 554p.

**Lannabi, I.S.A. 2015.** Analyse microbiologique d'un produit laitier (yaourt) : Enquête alimentaire. Faculté de science de la Nature et de la Vie. Université des frères Mentouriconstantine. Master en Microbiologie générale. 78p.

**Lclerc, H, Meyer, A, Deianu, J. 1955.** Cours de microbiologie générale (nouveau programme). Ed Doin P :77.

**Le Bars, J. 1982.** Toxinogénèse en fonction des conditions écologiques du système grain/microorganismes, In « Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés», Multon J. L., Tec & Doc Lavoisier Paris (F), 376-393 (1982).

**Lee, W.J. Lucey, J.A.** Formation and Physical Properties of Yogurt. *Asian Australasian Journal of Animals Sciences*, N°23,2010, pp 1127 -1136.

**Loones, A.1994.** Laits fermentés par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques. Vol 2. (De Roissart, H. et Luquet, F. M.), Lorica, Paris, France, 1994.

**Luquet, F.M. 1994.** Bactéries lactiques. Lorica, Uriage, ,pp 135\_154.



- Mahaut, M, Jeantet, R, Brulé, G, Schuck, P.** 2000. Les produits industriels laitiers. Tec et Doc, Lavoisier, Paris. France, 2000.
- Meletiadis, J, Meis, J, Mouton, J.W, Verweu, P.E.** 2001. Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 478-484.
- Miller, J.D, Trenholm, H.L.** 1994. Mycotoxins in grain , compounds other than aflatoxine .Eagan press , minnesota ,USA.
- Molina, M, Giannuzzi, I.** 2002. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research international* (2002) 35, 585-594.
- Moreau, C.** 1991. Les moisissures, In Bourgeois C. M., and Leveau J. Y. (Eds.), *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires* 234-235. Ed Tec. & Doc.
- Moreau, C.** 1974. MOISSURES TOXIQUES DANS L'ALIMENTATION PARIS -VIE Masson ET CIE 1974 471P.
- Nickin, J, Greame-Cook, K, L'aget, T, Kilington, R.** 1990. *Essentiel en microbiologie .Berti.* Paris.P : 26-42.
- OMS.** 1980. Résumé de mycotoxines critères d'Hygiène et de l'environnement Genève .1980.n 51.142p.
- Olsen, M, Jonsson, N, Magan, N, Banks, J, Fanelli, C, Rizzo, A, Haikar, A, Dabson, A, Frisvad, J, Holmes, S, Olkku, J, Persson, S.J, Borjesson, T.** 2003. prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final report. Quality of Life and Management of Living Ressources. Project No. QLK1-CT-1990-00433.
- Oswald, I.P.** 2000. Mycotoxines et immunotoxicité. Association pour la Recherche en Toxicologie, *Actualités* 2000, numéro de décembre ; 32-34.
- Ott, A, Germond, J.E, Chaintreau, A.** 2000. Origin of acetaldehyde during milk fermentation using <sup>13</sup>C-labeled precursors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, V 48, 2000, pp1512-1517.

**Pfohl-Leszkowicz, A. 2001.**Définition et origines des mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, Ed : Tec & Doc, 3-14.

**Rousseau, M.2005.** La fabrication du yaourt , les connaissances INRA.\* **Roquebert M.-F.** Les moisissures, nature biologie et contamination (1997) **100.santé – médecine. Net adhère aux principes de la charte « health on the Net »** (honcode destinée au site web médicaux et de la santé juin 2014).

**Rivierer, J. 1970.** Microbiologie industrielle et genie biochimie, (edn) Masson et Cie.

**Schorsch, C, Wilkins, D.K, Jones, M.J., Norton, I.T. 2001.**Gelation of casein whey mixtures: effect of heating whey proteins alone or in the presence of casein micelles. Journal of Dairy Research,V 68, 2001,pp471-481.

**Scriban, R. 1993.** Biotechnologie. 4eme edition. Technique et documentation. Lavoisier. Paris .

**Sondi, I., Remenf, F, Haddad, S,Corrieu, G. 2004.** The relative effect of milk base,starter and process on yogurt texture. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,V 44, 2004 ,pp 113-137.

**Stevens, N.J,Schmitt, D.O, Cole, T.M, Chan, L.K. 2006.**Technical note :out of plane angular correction based on a trigonometric function for use in two dimensional kinematic studies, *American*

**Tamime, A.Y, Deeth, H.C.1980.** Yoghurt : technology and biochemistry . journal of food protection, 43(12), 939-977.

**Tamime, A.Y, Robinson, R.K.** Yogurt science and technology, 2ème Edition, 1999.

**Troller, J.A. 1980.** Influence of water activity on microorganisms in foods. Food Technology 34 (5), 76.

**Uchikoba, T.,Mase, T, Arima, K, Yoneza, H, Kaneda, M.2001.**Isolation and characterization of a trypsin-like protase from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.*382:1509-1513. Masson.Paris. P:12-426.

**Walstra, P, Woulters, J.T.M,Geurts, T.J.2006.** Milk components. In: Dairy science and Technology (Taylor C.R.C. et Francis G.), Florida, USA. 2006.

**WEBOGRAPHIE**

[http://www.inbpinnov.com/media/mycotoxines\\_afssa\\_075603600\\_1217\\_21092010.](http://www.inbpinnov.com/media/mycotoxines_afssa_075603600_1217_21092010)

[http://www.afssa.fr.](http://www.afssa.fr)

[http://www.jnsciences.org.](http://www.jnsciences.org)

## **ANNEXES**

**Annexe01 :**

1- **Matériel Lourd** : tous les matériels lourds utilisés durant cette étude est présenté dans le tableau suivant :

Matériels	Références
-Autoclave	OPTIKA
-Agitateur	TRADE Raypa
-Bec benzène	Model SELECTE
_Bain marin	La marque ENIEM
-Balance électronique	RADWAG WagiElektroniczne
-Béchers	schott
-Burette à robinet gradué	schott
-Etuve	TRADE Raypa
-Fioles jaugées	schott
-Microscope optique	OPTIKA
-PH mètre	BPH-237
-pipette pasteur	schott
-pipette gradué	schott
-plaque chauffante	WiteglabortechnikGmbH
-Réfrigérateur	ENIEM
-vortex	

**2-Matériels léger et accessoires :**

Les accessoires, les matériels léger, produits chimiques et des réactifs utilisés sont présentés dans tableau 2 suivants :

Accessoires	Verrerie	Colorants et réactifs	Solvants
-------------	----------	-----------------------	----------

## Résultats et discussion

Anse de platine	-Béchers	-Blue de méthylène	-Chloforme
Boîte de pétri	-Cuve chromatographique	- Bleu de cotton	-toluène
Ecouvillon		- huile à émersion	- Acétate d'éthyle
Micropipette	-Eprouvette gradue		-Acide formique
Pince	-Erlenmeyers		
Scotch	-fiolle jaugés		
Plaque de silicagel	-flacons		
	-lame /lamelle		
	-pipette gradue		
	-pipette pasteur		
	-Tubes à essais		



13/21

76/84



13/21

76/84

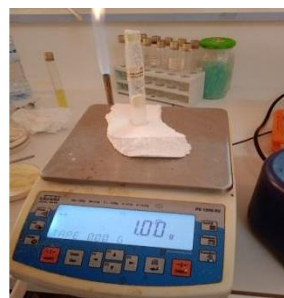


Amexes



13/21

76/84





13:22

75/84

**Annexe 2 :**

**Milieux de culture** : Illustratif de composition des milieux de cultures utilisés .

**Milieu de base :**

Milieu de culture	Composition	PH
Gélose de base	Extrait de levure en poudre..... 5g	6,6
	Glucose .....20g	
	Agar-Agar .....15g	
	Eau distillé ..... 900ml	

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15min

**Milieu PDA (Potatose Dextrose Agar) :**

Est un milieu de culture le plus largement utilisé pour cultiver des champignons qui attaquent les plantes vivantes , matière organique végétale ou animale

Milieu de culture	Composition	PH
Milieu PDA	Pomme de terre ..... 200g	6,5
	Dextrose..... 20g	
	Agar .....15g	
	Eau distillé ..... compléter jusqu'à 1000ml	

Autoclavé 120°C pendant 20min de PH=6,5

**Milieu CYA ( CzapekYeastExtract Agar ) :**

Le milieu CYA a été utilisé pour la croissance et identification des champignons appartenant aux genres Aspergillus , Penicillium . De plus , ce milieu a aussi milieu optimal pour la production des mycotoxines ainsi que pour la conservation des moisissures (+4°C) .



Milieu de culture	Composition	PH
<b>Milieu CYA</b>	Czapek ..... 10 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... 1g Extrait de levure ..... 5g Sucrose ..... 30g Agar... ..... 15g Eau distillé..... 100ml	<b>7,0</b>

Autoclavé à 121°C d'une durée de 15min de PH=7,0

**Milieu YES (YeastExtract) :**

Milieu de culture	Composition	PH
<b>Milieu YES</b>	Extrait de levure ..... 4,0g Sucrose ..... 20,0g KH <sub>2</sub> P04..... 1.0g Mg SO4..... 0,5g Agar ..... 15,0g Eau distillé ..... 1Litre	<b>6,2</b>

Autoclave pendant 15min à température de 121°C de pH= 6,2.

**Annexe 03 :Les préparation des milieux de cultures utilisés**

**Milieu solide :**

**Mode opératoire du milieu de base :**

Dans une balance électronique, On pèse sur verre de montre un 15g du agar, puis 5g du l'extrait de levure et 20g du glucose ensuite en ajouter 900ml de l'eau distillé . on l'agité jusqu'à homogénéisation ,On le mettre dans le bain marin jusqu'à solidification , puis montrer directement dans l'autoclave d'une durée de 15 MIN (118-120°C) .

**Mode opératoire de milieu à base d'extrait de noix de coco :**

100grammes de la noix de coco déchiquetée ont été homogénéisé pendant 5min avec 300ml D'eau distillé chaude dans un bécher .la solution est filtré à l'aide du tissu d'agar a été (20g/litre) .le mélange a été alors stérilisé à 121°C pendant 15min



**Milieu liquide :**

**Mode opératoire du milieu YES:**

Sur une balance électronique , On pèse dans un bécher mettre 20g du extrait de levure et ajouter 40g du sucrose , puis 1g du potassium dihydrogène phosphate anhydrous ( $KH_2 PO_4$ ) , ensuite ajouter le 0,5 g du Magnésiumsulfateheptahydrate ( $Mg SO_4$ ), puis 15g du agar finalement ajouter 1litre d'eau distillé .On agit le mélange jusqu'à l'homogénéisation .

Dans chaque flacon on met 50ml du bouillon préparé (milieu YES) , puis ajouter dans chaque flacon 0,5ml du vitamine B12 .



**Annexe 04 :**

**solution au chlorhydrate d'oxytétracycline :**

**composition :**

<p>Chlorhydrate d'oxytétracycline (C<sub>22</sub> H<sub>30</sub> O<sub>11</sub> ,HCl)... ..... 50mg Eau .....50ml</p>
---

**Milieu complet :**

**Solution de chlorhydrate :**

<p>D'oxytétracycline..... 10ml Milieu de base .....90ml</p>
---

**Préparation :**

Refroidir le milieu de base stérilisé , amener juste avant l'emploi . la solution de chlorhydrate d'oxytétracycline , ajouter 10ml de cette solution aseptiquement à 90ml du milieu de base .