



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2021

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Présenté et soutenu par :
NAILI Saoussane

Le: dimanche 4 juillet 2021

Contribution à l'étude de la qualité microbiologique du fromage frais type Mozzarella

Jury :

Mme. Bouguenoune Widad	MCB	Université de Biskra	Président
Mme. Mohammedi Kenza	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Baba arbi Soaud	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020-2021

Remerciement

Je tiens à remercier tout d'abord le Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, je tiens à remercier mon encadreuse **Mme Mohammedi Kenza** pour son encadrement, ses conseils et son aide précieux et constant qu'elle m'a apporté tout au long de ce travail, ainsi que pour les remarques constructives qu'elle m'a donné lors de la rédaction de ce mémoire.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury, et pour l'intérêt qu'elles ont portées à mes recherches en acceptant d'examiner mon travail Et de l'enrichir par leurs propositions.

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous les enseignants de département des sciences de la nature et de la vie qui, par leur enseignement, ont contribué à ma formation durant tout mon cursus universitaire.

Merci encore une fois

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait moi ce qui je suis
aujourd'hui.

Particulièrement, à **mon père** et **ma mère** pour le goût à l'effort qu'ils ont suscité en moi, de par
leur rigueur.

A mon frère « **Younes** » et mes sœurs « **Sara, Linda, Abir et Wiam** » qui m'avez toujours
soutenu et encouragé durant ces années d'études

Et a toutes mes amies sans exception

Sommaire

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction.....	1

Partie Bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur le fromage

1.1. Définition du fromage.....	3
1.2. Composition chimique du fromage.....	3
1.3. Valeur nutritionnelle de fromage.....	3
1.4. Fabrication du fromage	4
1.5. Classification du fromage.....	5
1.5.1. Fromages à pâte fraîche.....	5
1.5.2. Fromages à pâte pressée	5
1.5.3. Fromages à pâte molle.....	5

Chapitre 2 : La microbiologie du fromage

2.1. Les microorganismes utiles.....	6
2.1.1. Les bactéries	6
2.1.1.1. Les bactéries lactiques	6
2.1.1.2. Les bactéries propioniques.....	6
2.1.1.3 Les microcoques, les staphylocoques non pathogènes (<i>Staphylococcus equorum</i> , <i>S. oxylorus</i> , <i>S. lentase</i>) et les bactéries corynéformes (<i>Brevibacterium</i> , <i>Arthrobacter</i>).....	7
2.1.2. Les levures : <i>Kluyveromyces</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Candida</i> et <i>Yarrowia</i>	7
2.1.3. Moisissures : <i>Penicillium camemberti</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> et <i>Mucor</i>	8
2.2. Les microorganismes responsables d'altération.....	9

2.2.1. Les bactéries	9
2.2.2. Levures et moisissures	10
2.3. Les microorganismes potentiellement pathogènes	10

Partie Expérimentale

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes	11
3.1. Matériel	11
3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	11
3.1.2. <i>Salmonella spp.</i>	12
3.1.3. <i>Pseudomonas spp.</i>	12
3.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.1.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	13
3.2. Méthodes	13
3.2.1. <i>Escherichia coli</i>	13
3.2.2. <i>Salmonella spp.</i>	14
3.2.3. <i>Pseudomonas spp.</i>	14
3.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.2.5. <i>Listeria monocytogenes</i>	16

Chapitre 4 : Résultats et discussion

4. Résultats et discussion	18
4.1. Résultats	18
4.1.1. <i>Escherichia coli</i>	18
4.1.2. <i>Salmonella spp.</i>	18
4.1.3. <i>Pseudomonas spp.</i>	20
4.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	22

4.1.5. <i>Listeria monocytogenes</i>	22
4.2. Discussion	23
4.2.1. <i>Escherichia coli</i>	23
4.2.2. <i>Salmonella spp.</i>	25
4.2.3. <i>Pseudomonas spp.</i>	26
4.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	27
4.2.5. <i>Listeria monocytogenes</i>	29
Conclusion	32
La Bibliographie.....	34

Liste des tableaux

Tableau 1. Les compositions de quelques fromages (Cheftel et Cheftel, 1997).....	3
Tableau 2. Résultats de l'analyse microbiologique du fromage mozzarella (Castro <i>et al.</i> , 2012).	19
Tableau 3. Résultats de dénombrement de <i>Pseudomonas spp.</i> (Faccia <i>et al.</i> , 2019).....	21
Tableau 4. Résultats de recherche de <i>Staphylococcus</i> dans le fromage mozzarella (Facchin <i>et al.</i> , 2012).....	22

Liste des figures

Figure 1. Schéma général de la fabrication du fromage (Jeantet <i>et al.</i> , 2008).....	4
Figure 2. Micrographie électronique à balayage (MEB) de <i>Propionibacterium acidipropionici</i>	7
Figure 3. <i>Geotrichum candidum</i> montrant des hyphes des arthrocondies en chaînes et arthrocondies individuelles issues de la fragmentation des chaînes (X400) LPCB.	8
Figure 4. Image microscopique du <i>Penicillium</i> en zone aérienne dans la forme d'un pénicille jeune (-X600 –Fond clair –Bleu coton lactophenol-).....	9
Figure 5. Résultats de dénombrement de <i>L. monocytogenes</i> . (Nava <i>et al.</i> , 2016).	23

Liste des abréviations

ALOA: Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti.

BPLS: Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose.

BPW: Buffered Peptone Water.

BS: Bismuth Sulfite.

CFC: Cephaloridine Fucidin Ceftrimide.

CFU: Colony-Forming Unit.

EHEC: Entero-Hemorrhagic *E. coli*.

EPEC: Entero-Pathogenic *E. coli*.

FBR: Rabbit Plasma Fibrinogen.

FSB: Final Simple Buffer.

FSR: Financial Reporting Standard.

HFSB: Helium Filled Soab Bubble.

LPCB: Loss Prevention Certification Board.

LIA: Lysine Iron Agar.

LSM: Lipase Salt Mannitol

LTS: Laury Sulfate Tryptose.

MAC: Mac Conkey Agar

MEB: Micrographie Electronique à Balayage.

MKTT: Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin.

MOX: Modified Oxford agar.

MST: Maladies sexuellement transmissibles.

PAB: *Pseudomonas* Agar Base.

PBS: Phosphate Buffered Salin.

RVC: Rappaport Vassiliadis soja.

TIAC: Toxi-Infection alimentaire collective.

TSI: Triple Sugar Iron

TT: Tétrationate

UVM: Universal Vertification Methodology.

XLD: Xylose Lysine Désoxycholate.

Introduction

Le fromage est l'un des principaux anciens aliments consommés par l'Homme, il fait partie de notre régime alimentaire depuis meilleur d'années.

Il représente un produit laitier très préféré par les consommateurs, en raison de leurs excellentes caractéristiques organoleptiques et sa longue période de conservation par rapport aux autres produits laitiers. Le fromage est un bon aliment, une importante source des nutriments bénéfiques tels que le calcium, il est riche en protéines et en graisses les quelles fournissent à notre corps des éléments de construction importante (les acides aminées et les acides gras). Le fromage contient aussi d'autre éléments essentiels parmi lesquels des vitamines et des minéraux nécessaires pour rester en bonne santé (Castro A. C. S. *et al.*, 2012).

Bien que le fromage mozzarella soit l'un des plusieurs fromages à pâtefilée originaires d'Italie, elle est consommé dans le monde entier, en grande partie en raison de la population croissante de la pizza et des aliments similaires. Il était produit exclusivement à partir de lait de bufflonne, mais en raison de sa rareté il était mélangé à du lait de vache (Garbaj A. M. *et al.*, 2007).

Comme des nombreux produits le fromage mozzarella, de par sa composition, avec une teneur élevée en protéines, lipides, hydrates de carbones, sels minéraux calcium, phosphore et vitamines, est un aliment nutritif mais il devient également source potentielle des microorganismes détériorants et pathogènes qui provient de la matière première et peuvent également être acquis lors de la transformation du produit (Fonseca S. F. *et al.*, 2009).

Dans ce travail, on a réalisé une analyse des travaux déjà fait sur le fromage mozzarella, pour le but d'évaluer la qualité microbiologique de ce fromage par la recherche des principaux microorganismes responsables à l'altération ou à des infections alimentaires chez les consommateurs tels que *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*.

Ce document est structuré en deux parties

- La première partie : synthèse bibliographique qui comprend deux chapitres dont le premier présente des généralités sur le fromage et le deuxième chapitre traite la microbiologie du fromage.
- La deuxième partie : partie expérimentale qui est divisée aussi en deux chapitres dont le premier chapitre décrit le matériel et les méthodes étudiés par des travaux ultérieurs et le deuxième chapitre rapporte les résultats et leurs discussions.

Partie

Bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur le fromage

1.1. Définition du fromage

Le fromage est un aliment d'importance croissante sur le marché international. Bien qu'il soit rarement source d'intoxication alimentaires, on l'a récemment accusé d'en avoir causé de graves.

La dénomination fromage est réservée aux produits laitiers fermentés ou non, affiné ou non obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitières suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisé seule ou en mélange et coagulé en tout ou en élimination partielle de la partie aqueuse (Joffin et Joffin, 2010).

1.2. Composition chimique du fromage

Le fromage est un aliment très hétérogène dont la composition est variable selon la qualité du lait utilisé ou selon la technique de fabrication.

Tableau 1. Les compositions de quelques fromages (Cheftel et Cheftel, 1997).

Type de fromage	Eau %	Matière grasse %	Matière sèche %	Sels minéraux %
Camembert	50	26	20	1.2
Roquefort	40	33	22	2.3
Cheddar	36	32	25	2.0
Comté	38	28	27	2.3
Parmesan	31	28	38	3.0

1.3. Valeur nutritionnelle de fromage

Le fromage peut presque remplacer le lait dans l'alimentation bien qu'une partie des vitamines B et la grande partie du lactose soient entraînés avec le lactosérum.

Le fromage est généralement bien toléré et de digestion facile. Comme le lait, il est indispensable pour la couverture des besoins en calcium et en protéines. La matière grasse de fromage et en outre riche en vitamines (A, D, E et K). La vitamine D étant indispensable pour l'assimilation du calcium (Eck et Gillis, 2006).

1.4. Fabrication du fromage

La fabrication fromagère peut être considérée comme un phénomène d'agglomération correspondant à une synérèse associée à un phénomène d'écoulement. Il s'agit de l'agglomération des éléments protéiques du lait de la caséine principalement plus ou moins modifiées qui emprisonnent les autres constituants et ensuite de l'agglomération de morceaux de caillé moulés. Ce phénomène d'agglomération est associé à celui d'un écoulement de la phase liquide, composée de l'eau du lait et des éléments solubles emprisonnée dans les pores puis libérée (Luquet, 1990).

Selon Jeantet *et al.* (2008), la fabrication des fromages est réalisée par six grandes étapes représentées dans la Figure 1.

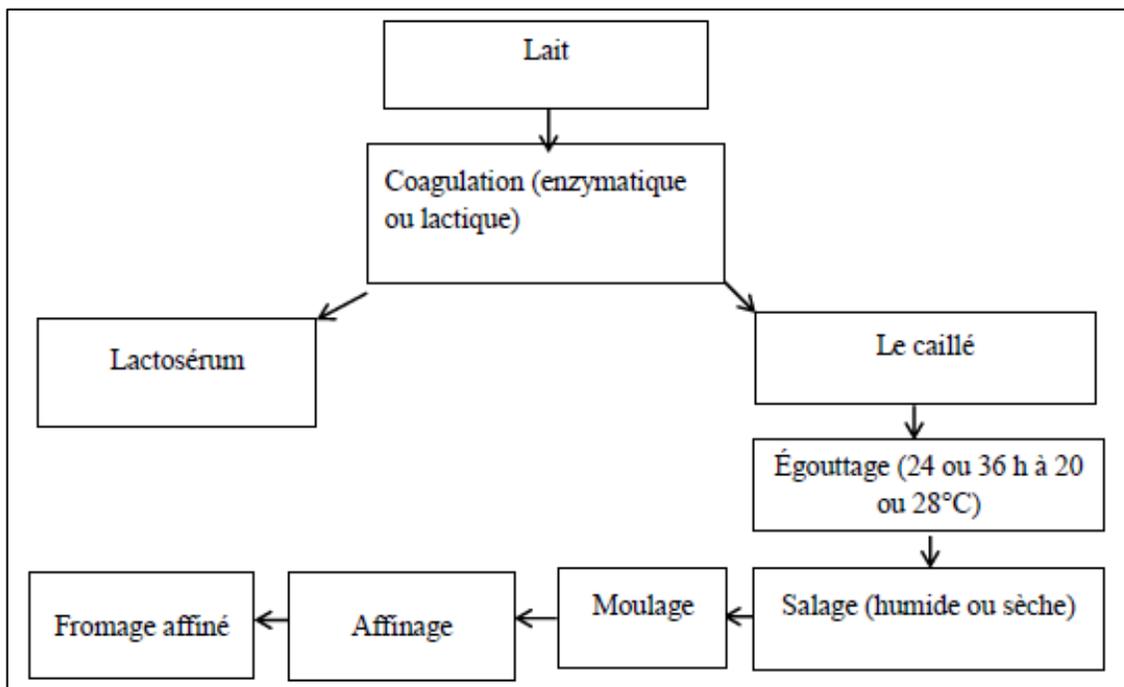


Figure 1. Schéma général de la fabrication du fromage (Jeantet *et al.*, 2008).

1.5. Classification du fromage

Il existe une grande variété des fromages qui se diffèrent par le goût, l'odeur, la texture ou la forme. Cette variété dépend de plusieurs paramètres liés à l'origine de lait, la matière dont le lait est transformé et de son traitement thermique.

On peut classer les fromages en 3 catégories différents

1.5.1. Fromages à pâte fraîche

Un fromage à pâte fraîche a une texture molle granuleuse ou lisse, crémeuse et veloutée. C'est un fromage peut égouttés caractérisé par une teneur très élevée de l'humidité et une teneur de 60 à 80% de la matière grasse (Majdi, 2009).

1.5.2. Fromages à pâte pressée

Ce sont des fromages dont le caillé est pressé après soutirage puis mis à l'affinage. Dans cette catégorie, on peut distinguer les fromages à pâte pressée non cuite et les fromages à pâte pressée cuite (pâte dur, le caillé chauffé à 65°C) (Majdi, 2009).

1.5.3. Fromages à pâte molle

Le fromage à pâte molle est un camembert affiné en surface par les moisissures. La texture de ce type de camembert est molle caractérisée par une couleur du blanc cassé allant au jaune pâle. Une croûte molle recouverte des moisissures blanches (Mdahou, 2017).

Chapitre 2

La microbiologie du fromage

Le fromage est le siège d'un développement important de microorganismes qui appartiennent à des groupes ou des espèces très diverses et qu'ils sont originaires de plusieurs sources : le lait, les levains, le sel ou les saumures, le matériel de la fromagerie ou bien l'atmosphère des locaux (Choisy *et al.*, 1997).

On peut classer les microorganismes des fromages en 3 catégories (Hermier *et al.*, 1992) :

- Microorganismes utiles
- Microorganismes responsable d'altération
- Microorganismes potentiellement pathogènes

2.1. Les microorganismes utiles

2.1.1. Les bactéries

2.1.1.1. Les bactéries lactiques

Ce sont des bactéries Gram + (coques ou bacilles), anaérobies facultatives, ils produisant de l'acide lactique par fermentation des glucides simples (fermentation lactique).

Les principaux genres sont *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sterptococcus thermophilus*, les lactobacilles mésophiles et thermophiles et les entérocoques. Elles ont un rôle essentiel dans la formation du goût (protéolyse, production d'arômes), de la texture (Hermier *et al.*, 1992).

2.1.1.2. Les bactéries propioniques

Ce sont des bactéries Gram+, fermentant les lactates pour donner de l'acide acétique et propionique ainsi que du CO₂. Ils participent à la formation du goût et de l'ouverture des fromages à pâte pressée cuite (Emmental, Comté et Gruyère) (Hermier *et al.*, 1992).

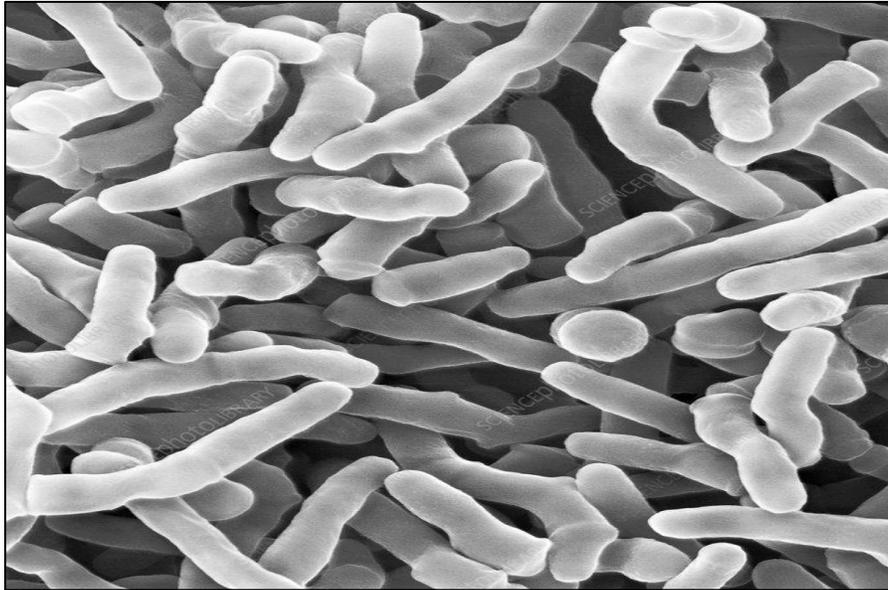


Figure 2. Micrographie électronique à balayage (MEB) de *Propionibacterium acidipropionici*.

2.1.1.3 Les microcoques, les staphylocoques non pathogènes (*Staphylococcus equorum*, *S. oxylus*, *S. lentase*) et les bactéries corynéformes (*Brevibacterium*, *Arthrobacter*)

Ce sont des bactéries Gram+, constituants de la flore de surface des fromages affinés. Ils jouent un rôle essentiel dans la formation du goût des fromages à croûte lavée, fleurie ou croûte mixte (Munter, Camembert, Pont d'Evêque, etc....) (Hermier *et al.*, 1992).

2.1.2. Les levures : *Kluyveromyces*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces*, *Candida* et *Yarrowia*

Les levures sont retrouvées à la surface des fromages (à pâte molle notamment) qu'à l'intérieur. Elles interviennent dans la désacidification de la pâte en début d'affinage, permettant ainsi l'implantation ultérieure d'une flore acido-sensible comme les bactéries corynéformes et interviennent également dans la formation du goût (Hermier *et al.*, 1992).

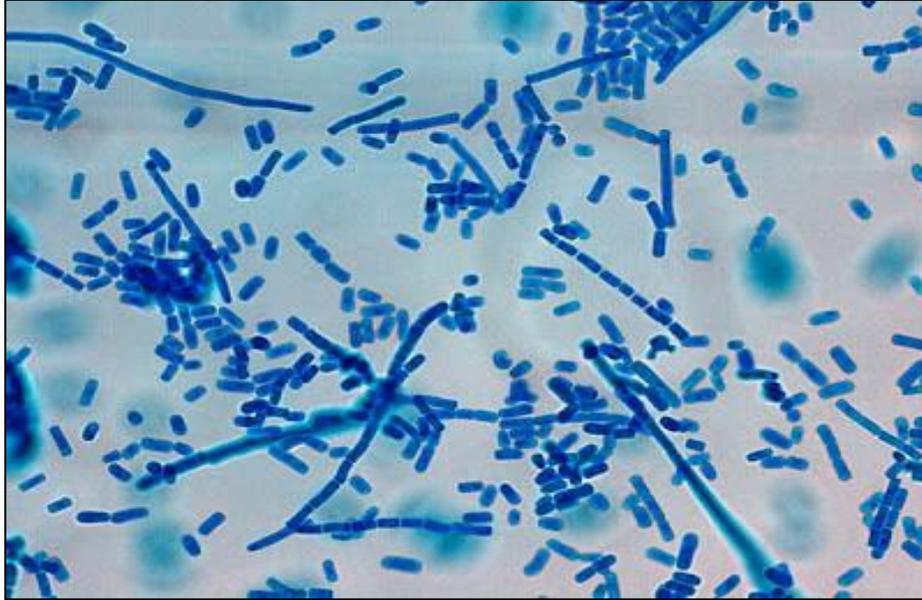


Figure 3. *Geotrichum candidum* montrant des hyphes des arthrocondies en chaînes et arthrocondies individuelles issues de la fragmentation des chaînes (X400) LPCB.

2.1.3. Moisissures : *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* et *Mucor*

P. camemberti est présent à la surface des fromages à pâte molle à croûte fleurie comme le camembert ou les fromages de chèvre. *P. roqueforti* est la moisissure interne des bleus comme le bleu d'auvergne (lait de vache) ou le Roquefort (lait de brebis). *Mucor* est la moisissure dominante à la surface du Tomme de Savoie et du Saint Nectaire fermier. Par leurs aptitudes biochimiques les moisissures jouent un rôle essentiel dans la formation des caractéristiques sensorielles des fromages (Hermier *et al.*, 1992).

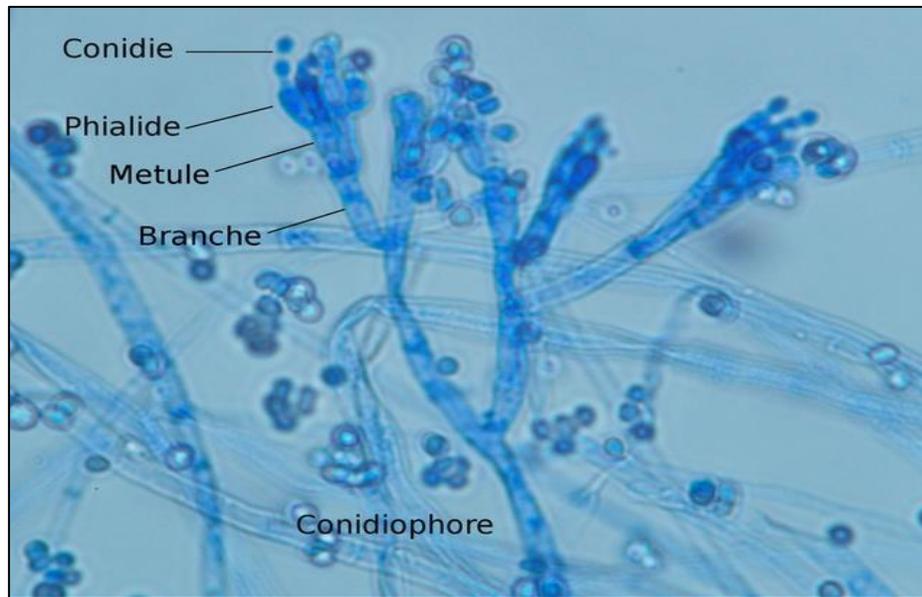


Figure 4. Image microscopique du *Penicillium* en zone aérienne dans la forme d'un pénicille jeune (-X600 –Fond clair –Bleu coton lactophenol-)

2.2. Les microorganismes responsables d'altération

2.2.1. Les bactéries

Les coliformes peuvent être responsables de gonflement précoces dans les fromages, conduisant notamment en pâte molle, à des accidents spectaculaires (fromages à aspect spongieux). Ce gonflement est dû principalement à la formation d'hydrogène très peu soluble dans le fromage.

Les bactéries psychotropes (*Pseudomonas*, *Bacillus*) généralement thermostable tels que les lipases et les protéases. Ces enzymes peuvent provoquer des défauts de goût dans les fromages (goût de rance, amertume).

Les bactéries butyriques (*Clostridium tyrobutyricum*) peuvent se développer dans les fromages (à pâte pressée cuite et non cuite) et donner des défauts de goût et d'ouverture (gonflement tardif) par fermentation butyrique (production de l'acide butyrique et d'hydrogène).

2.2.2. Levures et moisissures

Mucor est responsable de l'accident dit « poil de chat » principalement en fromage à pâte molle, se caractérisant par un défaut d'aspect des fromages et par l'apparition des mauvais goûts. De même, *Geotrichum candidum* peut devenir un agent d'altération (défaut de texture et de goût) en technologie pâte molle s'il est amené à trop se développer (accident de « la graisse » ou « la peau de crapaud »).

Il est à noter que le regroupement des microorganismes en flore utile ou flore d'altération est à nuancer en fonction de technologies considérées. Par exemple, le *Mucor* est utile en Tomme de Savoie, mais nuisible en Camembert (Hermier *et al.*, 1992).

2.3. Les microorganismes potentiellement pathogènes

Staphylococcus aureus peut produire des entérotoxines dont l'ingestion provoque des vomissements, souvent accompagnés de diarrhée. *Salmonella* peut provoquer les mêmes symptômes, caractéristiques d'une toxi-infection alimentaire, ainsi qu'*Escherichia coli*.

Listeria monocytogenes peut provoquer la listériose qui atteint préférentiellement la femme enceinte (avortement) le nouveau-né et l'adulte immunodéprimé (septicémie, méningite).

Outre ces quatre bactéries pathogènes classiquement recherchées en contrôle qualité, le fromage susceptible de contenir d'autres microorganismes potentiellement pathogènes tels que : *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* ou *Aspergillus* (production de mycotoxines) (Hermier *et al.*, 1992).

Partie

Expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes

Afin d'évaluation la qualité microbiologique du fromage, des travaux précédents liées au type de fromage frais « Mozzarella » ont été étudiés et examinés. Les germes les plus recherchées sont des germes d'intérêt hygiénique, des germes de contaminations fécales et des germes pathogènes et toxigènes responsables aux maladies infectieuses et des toxi-infections alimentaires chez les consommateurs.

Les germes étudiés sont :

- *Escherichia coli*
- *Salmonella spp.*
- *Pseudomonas spp.*
- *Staphylococcus aureus*
- *Listeria monocytogenes*

3.1. Matériel

3.1.1. *Escherichia coli*

- 25 g de fromage de mozzarella
- Solution tampon phosphate, eau peptonée tamponnée
- Bouillon lauryl sulfate (LTS)
- Sac stomacher stérile, pulvérisateur de type stomacher
- Plaque petrifilm, PBS
- Gélose au bleu méthylène Levin eosine, gélose MAC, Violet Red Agar

3.1.2. *Salmonella spp.*

- 25g de fromage mozzarella
- Boite réfrigéré (+4°C)
- 225ml eau tamponnée à pH 6.8, bouillon tetrionate (TT), eau physiologique
- Milieu XLD, BS, LIA, TSI et BPLS, milieu Brilliance TM *Salmonella* Agar Base
- Milieu BPW, RVS et MKTT

3.1.3. *Pseudomonas spp.*

- Echantillon du fromage
- Solution physiologique, solution peptone
- Sac stomacher, pulvérisateur type stomacher
- Milieu sélective (Biolife)
- Milieu Base Agar à *Pseudomonas* (PAB), supplément sélectif FSR 103
- Gélose CFC, gélose Gélisate (Gelatin Peptone Agar)

3.1.4. *Staphylococcus aureus*

- Anse de Drigalski
- Émulsion de jeune d'œuf
- Solution de tellurite de potassium
- Milieu FPR avec plasma du lapin
- Gélose Braid-Parker, gélose au sang de mouton, gélose nutritive.

3.1.4. *Listeria monocytogenes*

- Echantillon de 10 g du fromage mozzarella
- 90 ml de solution de citrate de sodium à 2% (p/v)
- Bouillon Fraser
- Diluant PBS
- Milieu MOX, milieu HFSB, FSB
- Milieu ALOA, LSM
- Gélose Palcan, Oxford

3.2. Méthodes

3.2.1. *Escherichia coli*

D'après Volcan Maia *et al.* (2019) ; Marinheiro *et al.* (2015) ; Facchin *et al.* (2013) ; Faccia *et al.* (2019) ; Castro *et al.* (2012) et Osman *et al.* (2010), le démembrement d'*Escherichia coli* a été effectué grâce à des plaques EC petrifilm 3M selon la méthode AOAC 991.14 qui consiste à homogénéiser 25 g de fromage avec 225 ml d'eau peptonée tamponnée puis des dilutions en série ont été effectuées et 1ml de chaque dilution en été placé sur les plaques et incubées à $35 \pm 1^\circ \text{C}$ pendant 24-48 h ensuite les colonies caractéristique ont été sélectionnés selon les instructions de fabricant.

Selon Laslo et György (2018) ; Ricciardi *et al.* (2015) et Alam et Goyal (2010), la détection d'*E. coli* a été réalisée avec des méthodes de cultures bactériologiques sur des milieux de culture sélectifs, 1g de échantillon du fromage a été transféré dans une solution physiologiques de 90ml à partir de celle-ci des dilutions sérielles ont été préparées, ensuite un volume de 0.1ml a été étalé sur milieu ChromoBioh Coliform (Biolab).

Conformément au Duan *et al.*(2007) et Lucera *et al.*(2014), les échantillons sont stockés à $10 \pm 1^\circ \text{C}$ environ 7 a 14 jours, ensuite 10 g de chaque échantillon inoculé a été mélangé avec 90

ml de diluant PBS dans un sac stomacher stérile et homogénéisé à l'aide d'un pulvérisateur à 230 rpm pendant 2 minutes, après l'homogénéisation les suspensions ont été plaquées sur la gélose MAC et incubées à 37°C pendant 24 h.

3.2.2. *Salmonella spp.*

D'après les travaux de Castro *et al.* (2012) ; Marinheiro *et al.* (2015) et Facchin *et al.* (2012) l'analyse de *Salmonella* nécessite un pré-enrichissement dont 25g du fromage ont été dissoudre dans 225ml d'eau peptonée tamponnée à 1% et incubée à 36°C pendant 16-20 heures.

L'enrichissement sélectif a été effectué dans le bouillon Rappaport Vassiliadis et le bouillon Tetrionate à 41 ±0.5°C pendant 24 à 30 h. après cette procédure, une étape d'ensemencement sélectif différentiel dans un milieu de culture XLD et BS Agar puis incubation à 35°C pendant 18-24 h. enfin pour la confirmation préliminaire des colonies typiques de *Salmonella* des preuves ont été utilisés sur les milieux LIA et TSI.

Selon Laslo et György (2018), le démembrement du *Salmonella spp.* a été réalisé avec des techniques de culture bactériologiques sur le milieu Brilliance TM *Salmonella* Agar Base (Oxoid) dont 1g de chaque échantillon du fromage prélevé a été transféré de manière aseptique dans 9ml de solution physiologique puis des dilutions ont été préparées, et un volume de 0.1ml a été étalé sur le milieu de culture, après l'inoculation les milieux ont été incubés pendant 48 h à 37°C.

D'après l'étude de Zottola *et al.* (2009), les échantillons ont été transportés dans une boîte réfrigéré (+4°C) au laboratoire, la détermination du *salmonella spp.* a été effectué sur un milieu BPW à 37°C pendant 24 h, un milieu RVS à 41°C pendant 24 h et le milieu MKTT à 37°C pendant 24h.

3.2.3. *Pseudomonas spp.*

Selon Ricciardi *et al.* (2015) et Fuccia *et al.* (2019), chaque échantillon du fromage a été analysé en double, la firme dilution décimale a été effectuée dans du citrate trisodique stérile à 2 % tandis que les dilutions ultérieures ont été effectuées dans une solution de Ringerstérile au quart. *Pseudomonas spp.* a été dénombrée par ensemencement en spirale sur la gélose Gélisate (Gelatin

Peptone Agar, 21°C, 25 h) et base d'agar *Pseudomonas* avec supplément CFC (25°C, 48h), les colonies ont été dénombrées à l'aide d'un compteur numérique des colonies.

D'après Nava *et al.* (2016), l'énumération du *Pseudomonas spp.* au moyen de la méthode ISO/TS 11059IDF/RM.225.2009 (ISO, 2009).

Selon Duan *et al.* (2007), l'analyse microbiologique a été réalisé après 7 à 14 jours de stockage à $10 \pm 1^\circ\text{C}$, environ 10 g de chaque échantillon ont été mélangés à 90 ml de diluant (1% de peptone) dans un sac stomacher stérile et homogénéisé à l'aide d'un pulvérisateur de type stomacher à 230 rpm pendant 2 minutes puis les suspensions ont été placées sur la gélose *Pseudomonas* CFC et incubée à 25°C pendant 48 h.

D'après Laslo et György (2018), la culture de germe a été réalisée sur le milieu *Pseudomonas* sélective agar à 37°C pendant 48 h.

Conformément aux travaux de Lucera *et al.* (2014), 20 g du fromage mozzarella ont été diluées dans 180 ml d'une solution saline stérile (0.9%) et homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur, ensuite des dilutions décimales ont été effectuées et placées sur le milieu base agar à *Pseudomonas* (PAB) additionnée du supplément sélectif SR 103 et incubée à 25°C pendant 48h.

3.2.4. *Staphylococcus aureus*

D'après Castro *et al.* (2012) et Lasto et György (2018), pour l'analyse des *Staphylococcus aureus* des dilutions ont été préparés puis un volume de 0.1 ml a été étalée sur la surface de la gélose Braid-Parker complétée par une émulsion de jeune d'œuf et une solution de tellurite de potassium. Les plaques ont été retirées et les colonies typiques de *Staphylococcus* ont été comptées.

Après croissance, les colonies de *Staphylococcus* ont été comptées et classées comme typique de *S. aureus*, colonies noires de jais à gris foncé, lisses, convexes, marges entière avec une zone opaque, halo claire au-delà de la zone opaque et colonies atypiques, colonies noires de jais à gris foncé, marge entière sans halo. Dix colonies de chaque échantillon (5 typique et 5 atypique) ont été sélectionnées et transférées dans des tubes individuels contenant la gélose

nutritive (culture mère) et testées pour la coagulation, la thermonucléase (TNase), la fermentation anaérobie du glucose et du mannitol, la production d'hémolysine et la sensibilité à la furazolidone (Facchin *et al.*, 2012).

Selon Marnheiro *et al.* (2015), la détection de *Staphylococcus* nécessite la réalisation d'un test de coagulasse qui consistant à mélanger 0.3 ml de chaque suspension de culture dans le bouillon d'infusion de cerveau et de cœur avec 0.3 ml du plasma de lapin et l'incuber à $36 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 6 heures pour observer la coagulation. La proportion des colonies coagulasse- positives a été calculée par rapport au des colonies typiques et atypiques sur la plaque et le résultat final de chaque plaque a été obtenu en additionnant le nombre des colonies coagulasse- positives.

3.2.5. *Listeria monocytogenes*

D'après Feitosa *et al.* (2003), pour le test *Listeria monocytogenes* 25 g de l'échantillon ont été homogénéisés dans 225 ml de bouillon d'enrichissement *Listeria* (UVM) puis incubés à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 h, ensuite 0.1 ml de la culture a été inoculé dans 10 ml de bouillon Fraser et incubé à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 – 48 h. les milieux de cultures sélectifs différentiels utilisés étaient la gélose Palcan et gélose Oxford, incubées à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 à 48 heures, parmi les plaques qui ont une croissance de *Listeria*, trois colonies ont été utilisées pour l'identification des espèces, comme recommandé par BRASIL en 2003.

Selon Zettola *et al.* (2009), le dénombrement du *Listeria monocytogenes* a été réalisé sur le milieu HFSB, incubée à 37°C pendant 24 h, un milieu FSB à 37°C pendant 48 h et le milieu ALOA et LSM à 37°C pendant 24 – 48 h.

Selon Nava *et al.* (2016) ; Greco *et al.* (2014), la présence / l'absence du *L. monocytogenes* a été évaluée à l'aide de la méthode VIDAS LM02 AFNOR BIO-12/11-03/04 consistant essentiellement en un dosage immuno-enzymatique par fluorescence utilisant l'instrument VIDAS® tandis que la méthode de référence pour sa numérotation était la norme ISO 11290-2 : 2005 (UNI 2005).

L'identification biochimique pour la confirmation des colonies suspectes a été réalisée avec le VITEK® 2 compact biomatériaux.

D'après Duan *et al.* (2007), la détection du *L. monocytogenes* a été effectué après une période de stockage (14jours) à $10 \pm 1^\circ\text{C}$, 10 g de chaque échantillon a été mélangé avec 90 ml de diluant PBS à l'aide d'un pulvérisateur (stomacher) puis les suspensions ont été étalée sur le milieu MOX et incubée à 37°C pendant 48 h.

Chapitre 4

Résultats et discussion

4. Résultats et discussion

4.1. Résultats

4.1.1. *Escherichia coli*

Selon Volcan Maia *et al.* (2019), *E. coli* a été isolé dans 5 % des échantillons de fromage. Des résultats similaires ont été observés par Wang *et al.* (2017) qui ont trouvé *E. coli* dans 5.9 % des échantillons au Japon tandis que Zang *et al.* (2016) ont trouvé des niveaux élevés (39.2 %).

D'après Castro *et al.* (2012), le nombre d'*E. coli* a été inférieur à 5×10^3 CFU/g dans tous les échantillons analysés, alors que Laslo et György (2018) ont trouvé un nombre d'*E. coli* supérieur à 300 UFC/g.

Selon Marinheiro *et al.* (2015), le taux d'*Escherichia coli* a été supérieur ou égal à 1100 CFU/g en désaccord avec ce qui est établi par la législation actuelle tandis que Duan *et al.* (2007) ont trouvé un taux entre 3.90 et 4.48 log₁₀ CFU/g.

Selon Ricciardi *et al.* (2015), le nombre d'*E. coli* a été de 10^1 et 10^2 log (CFU/g) tandis que Faccia *et al.* (2019) ont trouvé un nombre d'*E. coli* varié entre 2.93 – 8.04 log₁₀ (CFU/g), et un nombre de 7.15 log₁₀ (CFU/mg) a été trouvé par Osman *et al.* (2010), alors que Alam et Goyal (2010) ont trouvé un nombre de 3.0 log₁₀ (CFU/g).

D'après Facchin *et al.* (2012), les résultats de dénombrement révèlent un taux d'*Escherichia coli* de 1.97 NPP/g qui n'étaient pas conformes aux normes tandis que Lucera A. *et al.* (2014) ont trouvé un taux d'*E. coli* environ 4.4 log CFU/g et 4.06 log CFU /g.

4.1.2. *Salmonella spp.*

D'après Castro *et al.* (2012), 33.33 % des échantillons ont présenté des résultats positifs pour *Salmonella spp.* (présence dans 25 g) (tab.2).

Tableau 2. Résultats de l'analyse microbiologique du fromage mozzarella (Castro *et al.*, 2012).

Les échantillons	<i>Salmonella spp.</i>
Echantillon 1	Présent dans 25 g
Echantillon 2	Présent dans 25 g
Echantillon 3	Présent dans 25 g
Echantillon 4	Absence dans 25 g
Echantillon 5	Absence dans 25 g
Echantillon 6	Absence dans 25 g
Echantillon 7	Absence dans 25 g
Echantillon 8	Absence dans 25 g
Echantillon 9	Absence dans 25 g
Echantillon 10	Présent dans 25 g
Echantillon 11	Absence dans 25 g
Echantillon 12	Absence dans 25 g
RDC Standard	Absence dans 25 g

Selon les résultats obtenus par Laslo et György (2018), la charge totale de *Salmonella spp.* varient entre 10 et 10³ UFC/g tandis que Marinheiro *et al.* (2015), ont trouvé un taux de *Salmonella spp.* égale à 3.24 %.

D'après Facchin *et al.* (2012), *Salmonella spp.* n'a été trouvée dans aucun des échantillons du mozzarella, ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par Zottola *et al.* (2009).

4.1.3. *Pseudomonas spp.*

D'après Ricciardi *et al.* (2015), le nombre des *Pseudomonas spp.* a été entre 5.65 - 8.38 log CFU/g tandis que Duan *et al.* (2007) ont trouvé un nombre entre 0.40 et 1.40 log₁₀ CFU/g.

Selon Lucera *et al.* (2014), la numération microbienne du *Pseudomonas spp.* pour tous les échantillons de mozzarella était d'environ 3.13 log CFU/g.

D'après Laslo et György (2018), la croissance de *Pseudomonas spp.* dans le fromage mozzarella varient entre 10 et 3×10^3 UFC/g.

Suivant au Faccia *et al.* (2019), les résultats de dénombrement du *Pseudomonas spp.* sont présenté dans le tableau 3

Tableau 3. Résultats de dénombrement de *Pseudomonas spp.* (Faccia *et al.*, 2019).

	Jours	<i>Pseudomonas spp.</i>
Essai 1		
Contrôle	0	3.51
Contrôle	7	3.64
Expérimental		3.81
Contrôle	14	7.04
Expérimental		5.97
Contrôle	21	6.95
Expérimental		5.72
Essai 2		
Contrôle	0	5.01
Contrôle	7	6.40
Expérimental		3.97
Contrôle	14	7.78
Expérimental		7.19
Contrôle	21	8.19
Expérimental		7.20
Essai 3		
Contrôle	0	2.78
Contrôle	7	6.99
Expérimental		6.54
Contrôle	14	8.21
Expérimental		6.78
Contrôle	21	9.28
expérimental		7.28

4.1.4. *Staphylococcus aureus*

Selon Laslo et György (2018) et Castro *et al.* (2012), le nombre de *Staphylococcus aureus* a été supérieur à 10^3 UFC/g.

D'après Marinheiro *et al.* (2015), 18.75 % des échantillons représentent un nombre de *staphylococcus aureus* supérieur à la limite établie par la législation.

Selon Facchin *et al.* (2012), 18 échantillons étaient positifs au *Staphylococcus aureus*, les résultats sont représentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Résultats de recherche de *Staphylococcus* dans le fromage mozzarella (Facchin *et al.*, 2012).

	<i>Staphylococcus</i> (CFU/g)	
	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Fromage A (n=18)	< 3-5.34	0-< 3
Fromage B (n=12)	< 3-2.82	ND- < 3
Fromage C (n=12)	2.48-5.28	ND-4.98

ND : Non Détecté, n : nombre d'échantillons.

4.1.5. *Listeria monocytogenes*

Selon Duan *et al.* (2007), le résultat de dénombrement de *Listeria monocytogenes* a été de 4.32 à 4.48 log₁₀ CFU/g.

D'après Greco *et al.* (2014), 18.2 % des échantillons testés présentaient des valeurs de *L. monocytogenes* supérieurs à 100 CFU/g, tandis que Facchin *et al.* (2012), ont détectés la présence de *L. monocytogenes* dans 9 % et 15 % des échantillons.

Conformément aux résultats obtenus par Nava *et al.* (2016), la *Listeria monocytogenes* a été détectée dans tous les échantillons analysés, les résultats sont présentés dans la Figure 5.

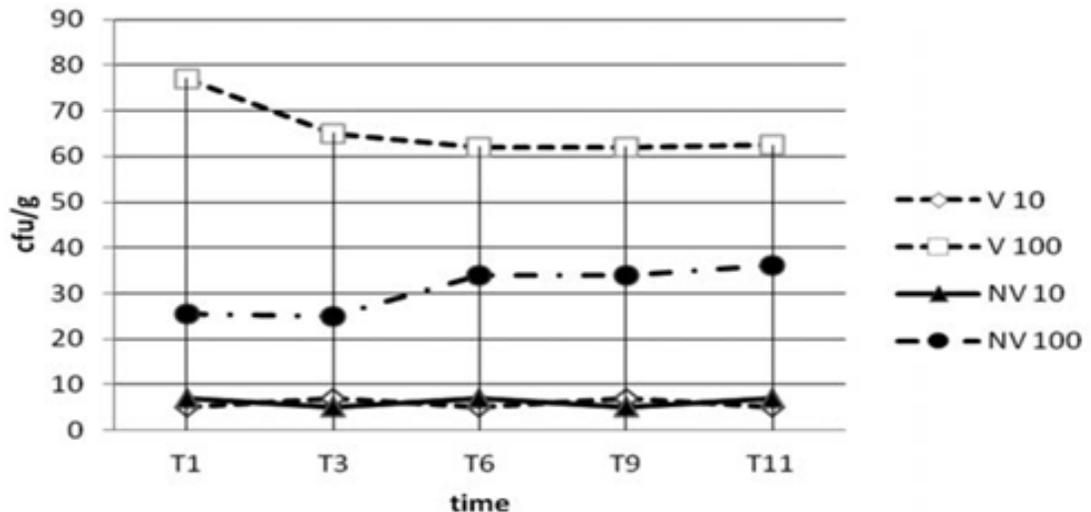


Figure 5. Résultats de dénombrement de *L. monocytogenes*. (Nava *et al.*, 2016).

V : cultivable ; NV : viable mais non-cultivable ; 10-100 : quantité d'inoculum (unité formant colonie).

Selon Feitosa *et al.* (2003), *Listeria monocytogenes* n'a été trouvée dans aucun des échantillons de fromages, ces résultats sont similaires aux résultats obtenus pour la mozzarella collectée dans l'état de São Paulo par Buzi *et al.* (2009).

4.2. Discussion

4.2.1. *Escherichia coli*

Les résultats révèlent que la présence d'*Escherichia coli* dans les fromages indique qu'une contamination a peu se produire pendant le processus de fabrication ou après la transformation. ce germe représente un indicateur important de contamination fécale et mauvaises pratiques d'hygiène (Volcan Maia *et al.*, 2019).

Sur la base des résultats obtenus par Castro *et al.* (2012), il peut suggère que les échantillons qui présentaient une charge élevée des bactéries sont des produits de qualité inférieure et peuvent être la cause des maladies d'origine alimentaire (MST).

La contamination microbienne des fromages est très importante dans l'environnement industriel car elle peut provoquer des altérations organoleptiques et un risque de transmission d'agents pathogènes comme *Escherichia coli* qui est la principale bactérie associée à la détérioration des fromages, elle provoque une fermentation anormale et un goût désagréable au produit final (Castro *et al.*, 2012).

Conformément au Laslo et György (2018), *Escherichia coli* représente un organisme indicateur d'hygiène dans la production de fromage reflétant la contamination fécale. En ce qui concerne les facteurs de virulence spécifique et les caractéristiques phénotypiques, les entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) ...etc., à l'échelle mondiale, le sérotype *E. coli* O₁₅₇ H₇ est responsable d'épidémies de maladies d'origine alimentaire.

D'autre côté suivant au Volcan Maia *et al.* (2019), il convient de noter que des taux différents de contamination des aliments par *E. coli* peuvent se produire en raison de plusieurs facteurs tels que, le type d'échantillonnage, le nombre des échantillons choisis, la qualité sanitaire et l'emplacement géographique.

La réduction de nombre de ce germe dans le fromage peut être obtenue par la réduction de la température et la baisse du pH ou bien le respect de l'hygiène personnelle et des processus d'assainissement (Laslo et György, 2018).

A travers les résultats obtenus il a été observé que malgré le contrôle sanitaire effectué par les agences d'inspection, on trouve encore dans le commerce de produits finis qui ne répondent pas aux normes de qualité, notamment les produits laitiers. Il est important de souligner l'importance d'un plus grand soin dans l'élaboration et la mise en œuvre des programmes d'autocontrôle dans l'industrie notamment en ce qui concerne l'hygiène des manipulations et le nettoyage et la désinfection des équipements et des surfaces qui entrent en contact avec les aliments et d'une plus grande rigueur dans la supervision par les organismes d'inspection officiels afin de réduire la commercialisation des produits contaminés (Marinheiro *et al.*, 2015).

4.2.2. *Salmonella spp.*

Les Salmonelles sont considérées comme des pathogènes majeurs et font partie des critères microbiologiques de surveillance des produits laitiers au lait cru en raison de la gravité des symptômes dont elles peuvent être responsables (Guy, 2006).

Elles appartiennent aux agents zoonotiques capables de transférer une infection de l'animal à l'homme, la Salmonellose est d'ailleurs la première des zoonoses alimentaires en France (Guy, 2006).

Elles sont susceptibles de provoquer chez l'homme deux types d'affections des gastro-entérites et les fièvres typhoïdes. Dans le cadre des toxi-infections alimentaires, nous ne parlerons que des gastro-entérites. Les Salmonelles sont en France les premières causes des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) déclarées (Guy, 2006).

A partir des résultats obtenus on peut dire que la contamination par *Salmonella spp.* est due à un contrôle inadéquat de la température de stockage ou à des pratiques de manipulation incorrectes. Sa simple présence dans les aliments implique le rejet de tout le lot (Castro *et al.*, 2012).

Il est possible que les conditions de températures favorables, une acidification lente et un phénomène de concentration de la bactérie lors de la formation du caillé entraînent une augmentation du nombre de Salmonelles en débit de fabrication. Ensuite en fonction des procédés de fabrication, on peut prévoir des évolutions différentes de la contamination (Marinheiro *et al.*, 2015)

Le taux de sel présent dans le fromage peut aussi représenter un frein au développement des Salmonelles, surtout lorsqu'il est associé à une acidité importante. On considère que la croissance de ces bactéries est inhibée par des teneurs en sel supérieur à 3 à 4 %. En règle générale, la plupart des fromages ne sont pas suffisamment salés pour bénéficier de cet effet (Marinheiro *et al.*, 2015).

De plus la température joue un rôle très important dans le développement de *Salmonella spp.*, elle peut se développer que à des températures situées entre 4 et 47 °C mais en dessous de 7

°C leur multiplication est nettement freinée : l'affinage, s'effectuant entre 8 et 10 °C, participe à l'inhibition de la croissance de ces bactéries (Marinheiro *et al.*, 2015).

En revanche l'activité de l'eau des fromages reste toujours supérieure à 0.93. Elle ne représente pas un facteur limitant de la croissance des Salmonelles (Marinheiro *et al.*, 2015).

Cependant des études réalisées par Facchin *et al.* (2012), montrent une diminution voire une disparition du nombre des Salmonelles au cours de l'affinage qui semble plus rapide dans les fromages à pâte dure. Ce serait dû à la production des métabolites secondaires par les bactéries propioniques avec une activité d'eau faible (Guy, 2006).

En réalité, les fromages n'offrent pas un milieu de culture idéale pour le développement de *Salmonella spp.* D'ailleurs les produits laitiers ne sont pas des aliments les plus souvent incriminés dans les cas d'intoxication par les Salmonelles (Guy, 2006).

Néanmoins, leur capacité de survie et d'adaptation n'est pas à négliger (Guy, 2006).

4.2.3. *Pseudomonas spp.*

Les résultats obtenus montrent que les dénombrements étaient significativement plus élevés dans les échantillons. Cela peut être dû à la fois à un pH initial significativement plus élevé et à la compétition et à l'amensalisme dus aux bactéries lactiques présentes dans les fromages (Ricciardi *et al.*, 2015).

Les *Pseudomonas spp.* sont les microorganismes psychotrophes les plus dominants isolés du lait et produits laitiers, les basses températures comme 3 – 7 °C et la capacité d'utiliser de grandes molécules de lipides et de protéines favorisent leur croissance. Il a démontré que ces bactéries peuvent réduire la teneur en diacétylène dans certains types des fromages frais, ce qui se traduit par un goût de vert ou de yaourt (Laslo et György, 2018).

L'apparition des souches de *Pseudomonas spp.* est due à une contamination post-processus, la réfrigération et le contenu riche en protéines du produit sont bénéfiques pour ces microorganismes.

Il a été signalé que les *Pseudomonas spp.* provenant principalement de l'eau utilisé pendant la fabrication, se développent assez souvent sur la surface du fromage et provoquer un goût amer et une mauvaise odeur grâce à des réactions lipolytiques et protéolytiques, ce qui entraîne l'altération du fromage. L'échec de la croissance de ce germe pourrait être dû à la présence des bactéries lactiques dans les fromages (Duan *et al.*, 2007).

Neuebauer et Grilliand (2004) ont découvert que la croissance de *Pseudomonas spp.* dans le fromage était inhibée par le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques. La survie de ces bactéries dans le fromage mozzarella indique un danger potentiel en cas de contamination post-traitement (Duan *et al.*, 2007).

D'autres chercheurs ont également rapporté que le chitosan inhibait la croissance de *Pseudomonas spp.* et prolongeait la durée de vie du fromage mozzarella en ajoutant directement une solution d'acide lactique/chitosan à la culture de départ utilisée pour la fabrication du fromage. Le mécanisme antimicrobien exact du chitosan est encore inconnu, mais plusieurs hypothèses ont été proposées. L'hypothèse la plus plausible est la modification de la perméabilité cellulaire causée par l'interaction entre les molécules de chitosan chargées négativement l'interaction conduit à la fuite des constituants protéiques et autres constituants intracellulaires. Le chitosan inhibe également la production des toxines comme l'aflatoxine et la croissance microbienne, la chélation des métaux traces, des éléments de spores et des nutriments essentiels. Le chitosan pénètre également vers les noyaux des microorganismes et interfère avec la synthèse de l'ARNm et des protéines en se liant à l'ADN (Duan *et al.*, 2007).

Sur la base des résultats obtenus pour la présence des *Pseudomonas spp.* dans le fromage mozzarella, il est donc souligné l'importance du respect de normes liée aux bonnes pratiques de fabrication, de stockage et de commercialisation afin d'obtenir des produits de bonne qualité sensorielle et de qualité hygiénico-sanitaire adéquate (Castro *et al.*, 2012).

4.2.4. *Staphylococcus aureus*

Les résultats révèlent un taux élevée du *Staphylococcus aureus* ne conforme pas à la norme. Ces résultats présupposent que le traitement thermique du lait pour la fabrication du fromage a été inefficace ou que la contamination s'est produite après le traitement en raison de la

manipulation ou du contact avec des surfaces qui n'est pas été correctement désinfectées (Marinheiro *et al.*, 2015).

La contamination du fromage mozzarella par *Staphylococcus aureus* est généralement lors de leur fabrication par les manipulateurs qui sont naturellement porteuses de *S. aureus* au niveau de la peau et des muqueuses, les localisations préférentielles de ce germe sont les fosses nasales et les mains. La présence de cette bactérie est plus importante chez les sujets malades que les sujets sains. Alors la contamination lors de la transformation du fromage est possible par contact direct ou par voie aérienne (Marinheiro *et al.*, 2015).

De plus, le matériel de traite, et notamment la machine à traite, peut être une source secondaire de contamination. *Staphylococcus aureus* est capable de survivre grâce à des biofilms sur des milieux inertes, c'est un élément de résistance de la bactérie vis-à-vis aux conditions extérieurs (pH, température, pression osmotique...etc.) (Castro *et al.*, 2012).

Les staphylocoques peuvent également être présents au niveau de tous les éléments en caoutchouc, en effet des petites fissures se forment et les bactéries vont se loger à l'intérieur. Le lavage de la machine n'est pas suffisant pour éliminer ces microbes, qui sont protégées dans leur crypte et peuvent contaminer le fromage (Castro *et al.*, 2012).

Selon Laslo et György (2018), les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des producteurs d'enzymes protéolytiques dans les fromages, mais aussi des bactéries potentiellement dangereuses pour la santé publique. Le *Staphylococcus aureus* est un agent pathogène zoonotique qui cause différents maladies et infections.

Sur la base de la production de coagulase, elles sont divisées en souches coagulase positives et en souches coagulase négative hébergent des facteurs thermorésistante, une catalase, une coagulase, des hémolysines, une protéine A, une lipase, une leucocidine, une staphylokinase, une toxine de choc toxique ou des toxines exfoliants A et B. ces métabolites permettant aux bactéries de résistées dans les aliments pendant des longs durées et facilitent la pénétration à l'intérieur de l'organisme afin de provoqué des infections et des intoxication alimentaires graves (Laslo et György, 2018).

D'après Facchin *et al.* (2012), la présence et le nombre élevé de *S. aureus* indiquant un risque potentiel pour la santé publique et des mesures d'hygiène douteuse dans l'industrie fromagère, puisque ce microorganisme fait partie du microbiote humain normal de la peau l'intoxication alimentaire à *Staphylococcus aureus* est causée par l'ingestion des fromages contenant des entérotoxines préformées.

Le contrôle de *Staphylococcus aureus* dans les fromages peut être effectuée par des traitements à haute pression et elle peut être inhibée par la présence des bactéries lactiques tels que les bactéries du genre *Lactobacillus* ces bactéries produisent de l'acide lactique qui entraîne la diminution du pH de milieu qui va inhiber la multiplication du *S. aureus* (Facchin *et al.*, 2012).

D'autre part, des souches des bactéries lactiques sont capables de produire des bactériocines qui empêchent la croissance de *Staphylococcus* (Facchin *et al.*, 2012).

4.2.5. *Listeria monocytogenes*

La *Listeria monocytogenes* est recherchée dans le cadre des analyses obligatoires pour l'autocontrôle des aliments car elle peut être à l'origine d'intoxication alimentaire grave (Greco *et al.*, 2014).

La listériose, une infection sévère d'origine alimentaire liée à la consommation d'aliments contaminés, particulièrement le lait et les produits laitiers tels que le fromage, cette maladie représente un réel risque sanitaire étant donné le taux élevé de mortalité ($\pm 30\%$) des personnes infectées (Greco *et al.*, 2014).

Dans le cas de fromage mozzarella, la présence de *L. monocytogenes* peut être due à plusieurs facteurs dont la contamination initiale de la matière première (le lait cru), une température de pasteurisation insuffisante, une contamination dans les phases suivant le traitement thermique prévu dans le processus de production (Greco *et al.*, 2014).

Listeria monocytogenes est un germe capable de résister pendant des années dans l'environnement de manipulation des aliments et de développer une résistance aux produits courants utilisés pour les opérations de désinfections. Cette caractéristique est facilitée par la production des biofilms que *L. monocytogenes* peut former seul ou avec d'autres germes de

contamination environnementale. Dans ce dernier cas les procédures de nettoyage et d'assainissement qui doivent être appliquées aux différents types de surfaces sont d'une importance fondamentale, qui si elles ne sont pas en mesure d'éliminés complètement la matrice adhésive et protective des biofilms entraînent inévitablement des risque de contamination secondaire (Greco *et al.*, 2014).

Au cours des 30 derniers années, plusieurs épidémies d'intoxication alimentaire dues à des fromages contaminés par *L. monocytogenes* ont été signalées. Cette bactérie peut survivre dans des substrats contenant jusqu'à 16 % de sel, et peut même doubler dans des substances plus frais moins matures et contenant moins de sel (Nava *et al.*, 2016).

Les infections à *Listeria monocytogenes* sont connues depuis 1920 et elles s'observent essentiellement (mais pas uniquement) chez les femmes enceintes (quel que soit le terme de la grossesse), les nouveau-nés contaminés par leurs mères et les individus présentant des troubles du système immunitaire dus à diverses causes.

La matrice du risque lié à *Listeria monocytogenes* commence par la mise en place d'un système d'autocontrôle adapté à la transformation du fromage, la matrice du froid et l'acidification permet aussi de limiter et de stopper le développement des ces microorganismes éventuellement présentes. Le respect des règles d'hygiène dans les industries fromagères est nécessaire pour réduire les risques de contamination. (Duan *et al.*, 2007).

De plus, le traitement antimicrobien des matières (ionisation, irradiation, systèmes lactoperoxydase, utilisation d'antimicrobiens biologiques, traitement par des acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide citrique ou l'acide acétique) a fait l'objet de très nombreux travaux. C'est notamment le cas de l'utilisation des bactériocines produites par des bactéries lactiques (*Carnobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Pediococcus sp.* ..) (Duan *et al.*, 2007).

Il faut comprendre qu'il extrêmement difficile d'assurer la totale absence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments, mais si les pays ayant une approche réglementaire plus stricte doivent être convaincus qu'un niveau de tolérance plus élevé est acceptable. Les pays qui ont adopté une tolérance plus grande par exemple 100 CFU/g, doivent faire la preuve que leur

approche garantit la sécurité. Ceci nécessitera un diagnostic et un recensement plus précise des intoxications alimentaires, qui à leur tour nécessiteront des meilleur techniques microbiologiques (Feitosa *et al.*, 2003).

Conclusion

Le fromage mozzarella est un type de fromage frais à pâte filée très apprécié en Italie et dans le monde. Elle est fabriquée à partir de lait de bufflonne ou bien le lait de vache, elle est généralement conservée dans un liquide froid composée d'eau du robinet ou d'une solution diluée de sels (NaCl et/ou CaCl₂) (Lucera *et al.*, 2013).

En raison de sa forte teneur en eau et nutriments. La mozzarella fraîche est particulièrement périssable et sa durée de conservation est courte. Bien qu'elle subisse un traitement thermique pendant l'étirage du caillé, une contamination par des microorganismes peut se produire après le traitement, causant l'altération du fromage et un risque pour la santé des consommateurs (Lucera *et al.*, 2013).

La qualité microbiologique de la mozzarella est évaluée par des contrôles trimestriels effectués par des laboratoires externes sur des échantillons choisis au hasard dans les lignes de production de la mozzarella. Les analyses concernant la présence de bactéries pathogènes et contaminants, mais sont encore insuffisantes pour garantir le contrôle microbiologique constant nécessaire pour un produit particulière comme la mozzarella (Losito *et al.*, 2013).

En effet, il serait important d'évaluer la qualité microbiologique avant que le produit ne soit vendu et consommé pour permettre une intervention rapide. Les analyses doivent donc être rapides, fiables, économiques et exécutables par le personnel sans dépendre de laboratoires externes (Losito *et al.*, 2013).

En conclusion, comme résultat préliminaire de l'étude, nous pouvons considérer que, dans la production de mozzarella les risques microbiologiques peuvent être prévenus, contrôlés et éliminés par la sélection des fournisseurs de lait de bufflonne, l'assainissement des environnements et des équipements et surtout l'hygiène du personnel, le contrôle de ces éléments est crucial pour réduire l'impact de la contamination microbienne responsable de l'hygiène de processus de production (Zettola *et al.*, 2009).

La
Bibliographie

- Alam T. et Goyal G. k. 2010. Effect of MAP on microbiological quality of mozzarella. JFood sci Technol 48(1):120-123.
- Castro A. C. S., Pinto Júnior W. R., Tapia D. M. T., Cardoso L.G. V. 2012. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de queijos do tipo mussarela comercializados no ceasa de vitória da conquista-ba. Alim-Nutr Araraquara 23(3):407-413.
- Cheftel J. C. et Cheftel H. 1977. Microbiologie alimentaire. 5^{ème} édition, centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine, p. 91.
- Choisy C., Desmazeaud M. J., Gripon J. C., Lambert G., Lenoir J. 1997. Partie I les mécanismes généraux de la transformation du fromage Chapitre 4 : la biochimie de l'affinage dans le fromage. 3^{ème} édition, Tec et Doc, Lavoisier, pp. 86-153.
- Duan J., Park S. I., Daeschel M. A., Zhao Y., 2007. Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coating for Enhancing Microbial Safety of mozzarella cheese. Food science 72(9):355-362.
- Eck A. et Gilis J. C. 2006. Le fromage. Tec et Doc, Lavoisier, Paris.
- Facchin S., Barbosa AC., Carmo L. S., Silva M. CC., Oliveira AL., Maruis PB., Rosa CA. 2013. Yeast and hygienic-sanitary microbial indicators in water buffalo mozzarella produced and commercialized in Minas. Gerais, Brazil. Brazillian Journal of Microbiology 44(3):701-707.
- Faccia M., Gambacorta G., Natrella G., Capino F. 2019. Shelf life extension of italian mozzarella by use of calcium lactate buffered. Food Control 100:187-291.
- Faccia M., Gambacorta G., Pasqualon A., Summo C., Capino F. 2021. Quality, Characteristics and Consumer acceptance of high-moisture mozzarella obtained from Heat-Treated Coat Milk. Foods 10:833.
- Feitosa T., Borges M. DF., Nassu R. T. 2003. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do rio grande de norte. Giênc technol Aliment Campinas 23(supl) :162-165.

- Garbaj A. M., Naas H. T., Gammaudi F. T., Moaward A. A. 2007. Bacteriological Quality of mozzarella cheese sold in Tripoli Governorate. Beni-sulf veterinary medical journal 17(1):99-104.
- Gorrasi G., Bugatti N., Tamaro L., Vertuccio L., Vigliotta G., Nittoria V. 2016. Active coating for storage of mozzarella cheese packaged under thermal abuse. Food Control 64:10-16.
- Greco S., Tolli R., Bossu T., Rodus E. M. F., Di Giamberrardino F., Disino A., Vita S., De Angelis V., Bilei S., Sonnessa M., Gattaso A., Lanni L. 2014. Case of contamination by *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese. Italian journal of Food Safety 3:1708.
- Guy F. I. 2006. Elaboration d'un guide méthodologique d'intervention lors de contamination par les salmonelles de produits laitiers au lait cru en zone de productions fromagères AOC du Massif Central. Thèse de doctorat d'état, Université Paul-Sabatier de Toulouse, 175p.
- Hermier J., Lenoir J., Weber F. 1992. Les groupes microbiens d'intêrt laiter, CEPIL, Paris, 6 p.
- Jeantet R., Croguennec T., Schuck P., Brale G. 2007. Sciences des aliments Technologie des produits laitieres, Lavoisier TEC et DOC, Londres. Volume 2, Paris, Newyork, pp. 11-44.
- Joffin C. et Joffin J-N. 1990. Microbiologie alimentaire. 5^{ème} édition, centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine, p. 91.
- Laslo É. et Gryörgy É. 2018. Evaluation of microbiological quality of some dairy products. Alimentaria 11:27-44.
- Losito F., Arienzo A., Bottini G., Priolisi F. R., Mari A., Antonini G. 2013. Microbiological safety and quality of mozzarella cheese assessed by the microbiological survery method. J-dairy sci 97:46-55.
- Lucera A., Mastromatteo M., Conte A., Zambrini A. V., Faccia M., Del Nobile M. A. 2013. Effect of active coating on microbiological and sensory properties of fresh mozzarella cheese. Food Packaging and shelf life I:25-29.

- Luquet F., 1990. Lait et produits laitiers : vache, brebis et chèvre Tome II Technique et Documentation . 2^{ème} édition, Lavoisier, Paris.
- Majdi A. 2009. Les fromages AOP et IGP. INT-Ingénierie Agronomie, 88 p.
- Marinheiro M.F., Ghizzil G., Cereser U. D., De Lima H. G., Timm C. D. 2015. Qualidade microbiológica de queijo mussarella empeça e fatiado. Ciência-Agrárias- Londrina 36(3) :1329-1334.
- Mdahou A. 2017. Etude de l'évolution de la flore microbienne indigène d'un fromage industrielle à pâte molle type Camembert au cours de son affinage et évolution de ces aptitudes technologiques. Thèse de doctorat d'état, université d'Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, 132 p.
- Nava D., Capo S., Caligion N., Giaccone V., Biondi L., Vaccaro G. F., Guarino A., Cupuano E. 2016. Study of the population dynamics of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in buffalo mozzarella by means of challenge testing. Italia Journal of food Safety 5:5690.
- Osman M., Osman Abdalla M., Ibrahim M. 2010. Chemical and microbiological evaluation of mozzarella cheese during storage. Australian Journal of Basic and Applied sciences 4(3):532-536.
- Ricciardi A., Guidone A., Zotta T., Matera A., Clups S., Parente E. 2015. Evolution of microbial counts and chemical parameters in high-moisture mozzarella cheese during refrigerated storage. Food science and Technology 63:821-827.
- Volcan Maia D.S., Haubert L., Dos Santos Soares K., Rauber Würfel S. DF., Da Silva W. P. 2019. *Butia odorata* Bab Rodr extract inhibiting the growth of *Escherichia coli* in sliced mozzarella. Cheese JFood sci Technol 56(3):1663-1668.
- Wang L. Nakamura H., Kage-Nakadai E., Hara Kudo Y., Nishi Kawa Y. 2017. Prevalence antimicrobial resistance and multiple locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of

diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. Int J Food Microbial 249:44-52.

- Zang S., Wu Q., Zang J., Lai Z., Zhu X. 2016. Prevalence genetic diversity and antibiotic resistance of enterotoxinogenic *Escherichia coli* in retail ready -to-eat foods in chiana. Food Control 68:136-243.
- Zettola T., Briganti P., Cuoco E., D'Amici L., De Gregorio A., Guzzon L., Manocchio A., Mancuso M., Condoles P. U. 2009. Study of the microbiological Hazards in the production of mozzarella Buffalo cheese. A.I.V.I n.4:39-43.

المخلص

يعتبر جبن الموزاريلا منتج متوسطي و أحد منتجات الحليب الأكثر استهلاكاً في العالم. إذ إنه وسيلة نمو ممتازة لمجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة المسؤولة عن حوالي ربع من خسائر الإمدادات الغذائية ومشكلة اقتصادية وأخلاقية ضخمة في جميع أنحاء العالم. وقد تطرق هذا العمل إلى جانبين ، الأول دراسة نظرية على الجبن ، بعض العموميات ، مكوناته ، طريقة تصنيعه وأنواعه المختلفة. بالإضافة إلى ذلك ، فقد أظهرنا الميكروبات الرئيسية (البكتيريا والخمائر والفطريات) الموجودة فيه. أما الجانب الثاني فهو عبارة عن دراسة وتحليل لبعض المقالات المتعلقة بجبن الموزاريلا. حيث قمنا بتحليل دراسات على بعض الأجناس البكتيرية التي تلوث جبن الموزاريلا والأمراض والتهابات السمية التي تسببها وتقنيات الكشف عنها. وفي الأخير إستخلصنا أن الحفاظ على سلامة جبن الموزاريلا والجودة الميكروبيولوجية يتطلب الامتثال لقواعد النظافة، ممارسات التصنيع، التخزين والتسويق الجيدة للحد من مخاطر التلوث والحد من انتشار عوامل الفساد ومسببات الأمراض التي تؤثر على الجودة الصحية للمنتج النهائي.

الكلمات المفتاحية: جبن موزاريلا ، جراثيم ، عدوى سمية ، الجودة الميكروبيولوجية ، التلوث.

Résumé

Le fromage mozzarella est un produit méditerranéen qui est devenu l'un des produits laitiers les plus consommés dans le monde. Elle constitue un excellent milieu de croissance pour un large éventail microorganismes qui sont à l'origine d'environ un quart des pertes d'approvisionnement alimentaire et un énorme problème économique et éthique dans le monde entière. Ce travail a touché deux aspects, la première est une étude théorique sur le fromage, quelques généralistes, ses composants, sa méthode de fabrication et ses différents types. De plus nous avons montré les principaux microbes (bactéries, levures et champignons) qui y existent. Le second est une étude et analyse de certains articles liés au fromage mozzarella. Nous avons analysé des études sur quelques genres bactériennes qui contaminent la mozzarella, les maladies et les toxi-infections qui les provoquent et les techniques de leurs détections. Nous avons conclu que le maintien de la sécurité et de la qualité microbiologique du mozzarella nécessite le respect des règles d'hygiène et les bonnes pratiques de fabrication, de stockage et de commercialisation pour réduire les risque de contamination et éliminer la prolifération des agents d'altération et pathogènes qui affectant la qualité sanitaire de produit fini.

Mots clés : mozzarella, microbes, toxi-infections, qualité microbiologique, contamination.

Abstract

Mozzarella cheese is a Mediterranean product that has become one of the most consumed dairy products in the world. It is an excellent growth medium for a wide range of microorganisms that are responsible for about a quarter of the food supply losses and a huge economic and ethical problem in the world. This work has touched two aspects, the first one is a theoretical study about cheese, some generalists, its components, its manufacturing method and its different types. In addition, we have shown the main microbes (bacteria, yeasts and fungi) that exist in it. The second one is a study and analysis of some articles related to mozzarella cheese. We analyzed studies on some bacterial genera that contaminate mozzarella cheese, the diseases and toxi-infections that cause them and the techniques of their detection. We concluded that the maintenance of the safety and microbiological quality of mozzarella requires the respect of the rules of hygiene and the good practices of manufacture, storage and marketing to reduce the risks of contamination and to eliminate the proliferation of the agents of alteration and pathogens that affect the sanitary quality of finished product.

Key words: mozzarella, microbes, toxi-infections, microbiological quality, contamination.