

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère d'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université 08 Mai 1945 Guelma  
Département de Biologie



Mémoire de master

Domaine : science de nature et de vie

Spécialité : Biochimie et microbiologie appliquée

Option : Qualité des produits et sécurité alimentaire

Thème

# *Bactériologie des nectars et des jus commercialisés en Algérie*

Réalisé par :

Saïdia Khadidja

Talbi Ismahane

Membres de jury :

Président : Mr. Djekoun Mouhamed (M.C.)

Examineur : Mr. Merzoug Abd Elghani (M.A.)

Encadreur : Mr. Houhamdi Moussa (Pr.)

Co-encadreurs : M<sup>me</sup> Bencherif Hayet ( M.A.)

M<sup>elle</sup> Amor Abda Wahiba

Juin 2010

## Remerciements

Tout d'abord nous tenons à exprimer nos gratitude à « Dieu » qui nous donné le courage et la force de mener à bien ce modeste travail;

Nos vifs remerciements s'adressent à notre encadreur monsieur Houhamedî Moussa ; professeur au département de Biologie à l'université de Guelma; qui a accepté d'orienter et de guider ce mémoire;

Nos remerciements s'adressent ainsi à monsieur Djekoun maître de conférences au département de Biologie à l'université de Guelma d'avoir honoré la présidence du jury;

Nous exprimons notre reconnaissance à monsieur Merzoug Abd Elghani; maître assistant au département de Biologie à l'université de Guelma; d'avoir examiné ce mémoire

Ainsi que pour madame Bencherif Hayet maître assistante au département de Biologie à l'université de Guelma pour ses conseils;

Un très grand merci à M<sup>lle</sup> Amor Abda Wahiba pour ses précieuses aides;

Merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à :*

*Mon exemple de courage et de persévérance ; mon père Nouar*

*Ma source de tendresse, patience et défi ma mère Zahia*

*Ma très chère nièce Abir Ayet errahmen ainsi que pour sa mère*

*Aïcha et son père Rachid*

*Mes soeurs Dalila et Chahra Zed que je leurs souhaite beaucoup*

*de succès et*

*Mon frère Soufyane*

*Touts mes oncles, tantes, cousins et cousines*

*Mon binome Isma*

*A toutes mes amies : Mouna, Mériem, Samiha, Hannane, Amel,*

*Sana, Naima, Sara, Wahiba, Loubna, Bouchera*

*Pour toute la promotion 2009-2010*

*Khadija*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à :*

*Mon exemple de courage et de persévérance ; mon père Ahmed*

*Elhacen*

*Ma source de tendresse, patience et défi ma mère Nabila*

*Mes deux anges :*

*Ma très chère nièce Lamiss*

*Et mon neveu Ibrahim*

*Ainsi que pour leur mère Amira et son époux Mouloud*

*Ma sœur Adila et Mon frère Fethi*

*Mon oncle Mouhamed et tante Wahida*

*Mes cousines Radia, Sara et sa fille Imen*

*Mes cousins Houcine, Adel et Djamel*

*Mon binome Khadidja*

*Toutes mes amies : Mouna, Mériem, Samiha, Hannane, Amel,*

*Hassna, Naziha, Wahiba, Samira, Amina et Imen.*

*A toute la promotion 2010*

*Ismahane*

## Sommaire

Liste des figures

Liste de tableaux

Liste des abréviations

	<b>Page</b>
<b>Introduction</b>	01
<b>Généralités</b>	03
1. Dénominations des nectars et des jus des fruits	03
1.1. Jus de fruits	03
1.2. Concentré de jus de fruits	03
1.3. Nectars de fruits	04
2. la valeur nutritionnelle des jus de fruits	05
3. Ingrédients de base	06
3.1. Les fruits	06
3.2. L'eau	06
3.3. Le sucre	07
3.4. Les acides alimentaires	07
<b>CHAPITRE I : Ligne de fabrication</b>	08
1. la récolte des fruits et la conservation des fruits	08
1.1. La récolte des fruits	08
1.2. Les soins à la cueillette	08
1.3. Le stockage	09
2. Ligne de fabrication	10
2.1. Prétraitement	11
2.1.1. Lavage et nettoyage	11
2.1.2. Triage	11
2.1.3. Préparation des fruits à l'extraction	11
2.1.4. Pressage	13
2.1.5. Broyage	13
2.1.6. Extraction par diffusion	13



2.2. Traitement	14
2.2.1. Tamisage	14
2.2.2. clarification- débouillage	14
2.2.3. Blanchiment et précuisson	16
2.2.4. Traitement par agents de conservation	18
2.2.5. Dégorgement	19
2.2.6. Addition de sucre, d'acide ou d'eau	20
2.2.7. Pasteurisation	20
2.3. Post traitement	22
2.3.1. Conditionnement	22
2.3.2. Refroidissement	24
<b>CHAPITRE II : Altérations et réduction des risques</b>	<b>25</b>
1. Les différentes altérations microbiologiques exercées sur les jus de fruits	25
1.1. Fermentation alcoolique indésirables	25
1.2. Fermentations hétéro-lactiques	25
1.3. Fermentation acétique	25
2. les microorganismes responsables à l'altération des jus de fruits	26
2.1. Les bactéries	26
2.2. Levures et moisissures	28
3. réduction des risques d'altération par la méthode HACCP	28
3.1. Les quatre fonctions fondamentales de la logique HACCP	28
3.1.1. L'analyse des dangers	29
3.1.2. Maîtrise des points critiques pour la salubrité des aliments	29
3.1.3. Les sept étapes à suivre pour la démarche concernant les jus de fruits	29
3.1.4. Evaluation des risques d'apports et de multiplication des microorganismes ; les cinq M	30
<b>CHAPITRE III : Matériel et méthodes</b>	<b>32</b>
1. L'échantillonnage	32
1.1. Technique et but d'échantillonnage des jus	32
1.2. Transport et conservation de l'échantillon	32

1.3. Traitement de l'échantillon avant l'analyse	32
2. Analyse bactériologique	33
2.1. Les coliformes fécaux (totaux)	36
2.2. Les coliformes thermo tolérants	36
2.3. Les streptocoques fécaux	36
2.4. Les clostridium sulfito-réducteurs	36
2.5. nombrement des germes mésophiles	36
3. Matériel	37
4. Méthodes d'analyse bactériologiques	37
4.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux avec identification d' <i>Escherichia coli</i> en milieu liquide	37
4.2. Dénombrement des streptocoques fécaux	41
4.3. Dénombrement des germes mésophiles	44
4.4. Recherche et dénombrement des clostridium sulfito- réducteurs	46
4.5. Méthode d'ensemencement sur gélose	47
4.5.1. Examen microscopique après coloration de Gram	48
4.5.2. Identification biochimique	48
4.5.3. Tests complémentaires	50
<b>CHAPITRE IV : Résultats et discussion</b>	51
1. Résultat de la recherche	51
2. Examen microscopique après coloration de Gram	52
3. Résultats de dénombrement bactéries	53
4. Résultats des tests confirmatifs	53
5. Résultat de la galerie API 20 E	53
<b>Conclusion</b>	54
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Résumés</b>	
<b>Annexe</b>	

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Ligne de fabrication des jus	10
02	Mode opératoire de la recherche bactériologique sur milieu solide	34
03	Mode opératoire du dénombrement bactériologique	35
04	Recherche et dénombrement des coliformes totaux	39
05	Test de confirmation des coliformes fécaux	40
06	Test présomptif des streptocoques fécaux	42
07	Test de confirmation des streptocoques fécaux	43
08	Recherche et dénombrement des germes mésophiles à 20 et à 37°C	45
09	Recherche et dénombrement des clostridium sulfato-réducteurs	47
10	Galerie Api20E	49
11	Fiches des résultats de l'APi20E	49
12	Test d'oxydase négatif	50
13	Test d'oxydase positif	50
14	Lecture de la catalase	51
15	Lecture de la coagulase	51
16	Résultat de l'ensemencement de l'échantillon 01 sur Chapman	53
17	Résultat de l'ensemencement de l'échantillon 03 sur Chapman	53
18	Résultat de l'ensemencement de l'échantillon 03 sur G.N.	53
19	Observation microscopique des cocci à Gram positif	53
20	Observation microscopique des coccobacilles à Gram négatif	54



## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Les types de jus de fruits	04
02	Valeurs caloriques de différents jus de fruits	06
03	Prétraitements devant précéder l'extraction du jus	12
04	Avantages et inconvénients respectifs du blanchiment à l'eau et à la vapeur	17
05	Composition des jus et nectars de fruits	20
06	Normes de pasteurisation des jus et nectars	23
07	Exemple de réactions indésirable dans les jus de riches en sucres et en acides aminés	27
08	Les sept étapes de la démarche HACCP dans l'industrie des jus	30
09	Exemple d'évaluation des risques d'apports et de multiplication des microorganismes	31
10	Les principaux staphylocoques isolés en microbiologie	52
11	Résultats des ensemencements sur les milieux de culture utilisés	53
12	Résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram	54
13	Résultats du dénombrement bactérien	55
14	Identification des espèces des cultures positives	55

## Liste des abréviations

U.F.T.	Unité formant trouble
G.N.	Gélose nutritive
B.C.P.L.	Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol
T.G.E.A.	Gélose tryptone glucose agar
V.F.	Gélose viande foie
M.C.	Milieu Mac Conkey
T.	Température
N.P.P.	Nombre le plus probable
E.P.E.I.	Eau peptonée exempte d'indole
pH	Potentiel d'hydrogène
H.A.C.C.P.	Analyse des dangers et maîtrise des points critiques

# ***Introduction***

Produced with ScanTOPDF

## Introduction

S'il est un domaine prioritaire et déterminant pour la vie des peuples c'est assurément celui de l'alimentation. Le niveau de vie de la population et la croissance démographique sont telle que les besoins en assortiments divers doivent répondre au double critère qualitatif et quantitatif.

Les jus alimentaires, en raison de leur valeur nutritionnelle rafraichissante jouent, pour les pays chauds en particuliers, un rôle de premier plan dans l'industrie des conserves. Ils peuvent aussi jouer un rôle de stimulateur pour le développement de l'arboriculture et pour la fabrication de gelée, de boissons gazeuses, de pectine ... etc.

Dans ce document, suivant l'importance de l'opération technologique établie en fonction de son incidence sur les qualités organoleptiques et microbiologique du produit fini ainsi, certains processus sont assez étoffés. C'est le cas notamment du traitement thermique, du processus de clarification conditionnement, stockage ... etc.

La qualité microbiologique d'un jus de fruit est appréciée en fonction d'un résultat d'analyse où figurent l'identification et la numération d'une ou plusieurs catégories de germes.

-La flore pathogène (Salmonelles, Staphylocoques, *Clostridium perfringens*...) qui est prise en considération lorsqu'il s'agit d'une surveillance vis-à-vis de la santé publique (intoxication alimentaire).

-La flore témoin de contamination fécale représentée en particulier par les coliformes fécaux (leur recherche permet d'apprécier le niveau d'hygiène général apportée au cours des différentes étapes de transformation des jus)

-La flore d'altération représentée par l'ensemble des germes saprophyte ; son évolution est le reflet de l'altération subie par les jus au cours de leur conservation.

Notre recherche a pour but l'expertise afin de savoir si le jus est responsable d'une intoxication alimentaire et la prévention qui permet de tester sa qualité hygiénique. La première partie de ce mémoire est une étude bibliographique présentant le procédé industriel de transformation des fruits en jus et nectars et aborde des différentes altérations microbiologiques associées aux jus de fruits et la démarche mise en œuvre pour réduire les risques de ces altérations.

La deuxième partie est une étude pratique sur la qualité microbiologique des jus de fruit commercialisé en Algérie qui englobe le matériel et les méthodes employés, et l'interprétation des résultats trouvés.

Produced with ScanTOPDF



# *Généralités*

Produced with Scan PDF

Généralement, le fruit est utilisé à maturité complète dans la fabrication d'une gamme de produits parmi lesquels on connaît les jus de fruits et les nectars.

## **1. Dénomination des nectars et des jus de fruits**

### **1.1. Jus de fruits**

Le jus de fruits est le liquide non fermenté, mais fermentescible obtenu à partir de fruits pressés directement par des procédés d'extraction mécanique ou à partir de jus de fruits à base de concentré, par la reconstitution de concentré de jus de fruits avec de l'eau potable. [1].

- Le jus est tiré de la partie comestible de fruits sains, parvenus au degré de maturation approprié et frais ou de fruits conservés frais par des moyens physiques et/ou par des traitements appliqués conformément aux dispositions de la Commission du Codex Alimentarius. [1].
- Le jus peut être trouble ou clair et doit présenter les caractéristiques essentielles typiques du jus du fruit duquel il provient. [1].
- Un seul type de jus est obtenu à partir d'un seul fruit. Deux ou plusieurs types de jus peuvent être mélangés ensemble. Le jus peut contenir des substances aromatiques, des composés aromatisants volatils, de la pulpe et des cellules ajoutés ou restaurés, à condition qu'ils proviennent des mêmes espèces de fruits et soient obtenus par des moyens physiques. [1].
- Ils sont qualifiés de "purs" s'ils sont sans additif ou ingrédient (sucre). [2].

### **1.2. Concentré de jus de fruits**

Le produit obtenu à partir de jus de fruits d'une ou plusieurs espèces par l'élimination physique d'une partie déterminée de l'eau de constitution. Lorsque le produit est destiné à la consommation directe, cette élimination est d'au moins 50 %. [3].

Les concentrés de jus de fruits peuvent contenir des substances aromatiques, des composés aromatisants volatils, de la pulpe ou des cellules, lesquels doivent tous provenir des mêmes types de fruits et être obtenus par des moyens physiques. [1].

### 1.3. Nectar de fruits

On entend par nectar de fruits le produit pulpeux ou non pulpeux, non fermenté mais fermentescible, destiné à la consommation directe, obtenu en mélangeant le jus et/ou toute la partie comestible de deux ou plusieurs fruits sains et mûrs, après tamisage et/ou broyage, non concentré ou concentré, avec de l'eau et des sucres ou édulcorants à base de glucides, tels le miel et/ou d'autres édulcorants, ou à base de la purée de fruits, concentrée ou non, ou à un mélange de ces produits. [1] [4].

Chaque type de jus est disponible au rayon frais, réfrigéré ou à température ambiante (environ 25°C.) et possède des caractéristiques différentes comme les montres le tableau suivant. [5].

**Tableau 1 : Les types de jus de fruits [5].**

Dénomination	Conservation	Teneur en fruits	Sucre ajouté	Pasteurisation	Durée de vie.
Pur jus 100 %	Frais	100 %	Non	Non	1 semaine
	Réfrigéré	100 %	Non	Oui	3 à 4 semaines
	Ambiant	100 %	Non	Oui	12 mois
Jus de fruit à base de jus concentré	Réfrigéré	100 %	Autorisé avec mention obligatoire	Oui	3 à 4 semaines
	Ambiant	100 %	Autorisé avec mention obligatoire	Oui	12 mois
Nectar	Réfrigéré	25 à 50 % minimum	Autorisé avec mention obligatoire	Oui	3 à 4 semaines
	Ambiant	25 à 50 % minimum	Autorisé avec mention obligatoire	Oui	12 mois

## **2. La valeur nutritionnelle des jus de fruits**

Les fruits sont des sources essentielles de minéraux, d'oligo-éléments, de fibres, de vitamines et d'antioxydants.

Même si d'un point de vue nutritionnel les jus de fruits ne sont pas équivalents aux fruits eux-mêmes, ils en restituent cependant bon nombre de bienfaits :

- **L'eau** : boire un à deux verres de jus de fruits par jour contribue au besoin d'hydratation de l'organisme. [5].
- **Les fibres** : les jus pulpés et les fruits mixés apportent une quantité non négligeable de fibres, indispensables pour un bon transit intestinal [5].
- **Le sucre** : les jus de fruits apportent des sucres qui fournissent à l'organisme de l'énergie rapidement disponible. Les jus de fruits sans sucre ajouté sont assez peu caloriques (50 kcal pour 100 ml en moyenne) (voire tab.2) [5].
- **Les vitamines et oligo-éléments** : la plupart des jus en contiennent en quantités importantes, en particulier la vitamine C. Un verre de jus d'orange de 200 ml apporte 60 mg de vitamine C et couvre ainsi les apports journaliers recommandés pour cette vitamine. [5].
- **Les antioxydants** : les fruits contiennent des antioxydants, molécules permettant de lutter contre l'action néfaste des radicaux libres impliqués notamment dans les processus de vieillissement cellulaire et l'apparition de cancers.

Il est tout-à-fait possible d'en prendre un grand verre avant un repas pour remplacer avantageusement un apéritif, ou de l'intégrer dans les petits-déjeuners et goûters [5].



Tableau 2 : Valeurs caloriques de différents jus de fruits [5].

Jus	Valeur énergétique
Jus de poire	64,5 Kcal
Jus de raisin	62,5 Kcal
Jus d'abricot	56,8 Kcal
Jus de fruits exotiques	55,3 Kcal
Jus d'ananas	50,1 Kcal
Jus de pomme	45,3 Kcal
Jus d'orange.	37 Kcal
Jus de carotte	30,9 Kcal
Jus de tomate	20,1 Kcal
Jus de citron	15,5 Kcal

### 3. Ingrédients de base

#### 3.1. Les fruits

La qualité d'un jus est directement associée à celle de sa matière première : les fruits doivent être frais, sains et mûrs. Ces fruits sont issus d'aires de récoltes spécifiques, clairement identifiées à travers le monde [6].

Quelle que soit le produit et quelle que soit sa provenance, le choix du moment de la cueillette a une importance décisive. D'une façon générale, celle-ci intervient au seuil de la maturité idéale des fruits quand leurs propriétés vitaminiques et gustatives sont optimales. Ne pas les récolter immédiatement, c'est prendre le risque d'une déperdition inéluctable sur le plan qualitatif [6].

Pour la production des jus, on utilise divers fruits. Les fruits destinés pour la transformation industrielle sont classés en groupes suivantes : à pépins (pommes, poires, coings), à noyaux (cerises, prunes, abricots, pêches... etc.) à baies (raisins, cassis etc.), fruits tropicaux et subtropicaux (oranges, citrons, mandarines...) (Benamara et Agougou ; 2003).



### **3.2. L'eau**

L'eau doit satisfaire les exigences d'une eau potable. Elle ne doit pas contenir des substances toxiques pour l'organisme, y compris l'ammoniac et l'hydrogène sulfuré. La dureté totale ne doit pas être supérieure à 7 mg.éq/l. (Benamara et Agougou ; 2003).

### **3.3. Le sucre**

Le sucre en poudre doit être propre, sec, mouvant, sans grumeaux sans goût ni odeur étrangère, de couleur blanche. La teneur en humidité  $\leq 0,15\%$  ; en cendre  $\leq 0,05\%$ . (Benamara et Agougou ; 2003).

### **3.4. Les acides alimentaires**

Les acides citrique et tartrique doivent contenir pas moins de 99,5 % d'acide et pas de plus de 0,1- 0,35% de cendres. L'arsenic et les sels de métaux lourds ne sont pas admis. (Benamara et Agougou ; 2003)

# ***CHAPITRE I***

## ***Ligne de fabrication***

Produced with Scantopdf

## **1. La récolte et la conservation des fruits**

### **1.1. La récolte des fruits**

Il n'est pas évident pour un jardinier amateur de fixer la date de récolte des fruits du verger. Si le ramassage des petits fruits est plus facile car le degré de maturité peut être facilement évalué à l'œil, il en va tout autrement des fruits d'automne. Prunes, pruneaux, pommes et poires sont à suivre très sérieusement, dès le début du mois de septembre [3].

Des signes simples peuvent aider le jardinier à fixer la date de récolte:

- Les fruits cessent de grossir.
- Les fruits se détachent facilement au niveau du pédoncule à la suite d'une légère pression.
- Pour les pommes et les poires, teinte de fond verte devenant progressivement jaune.
- Nuance de teinte rouge couvrant le fruit.
- La coloration blanche jaunâtre de la pulpe.
- La diminution de la chlorophylle.
- La coloration des pépins: une teinte marron uniforme.
- La saveur du fruit: il ne doit pas avoir un goût d'herbe [7].

Les professionnels utilisent des méthodes plus scientifiques comme le pénétromètre, le contrôle de la teneur en amidon, le réfractomètre... Pour les fruits d'hiver et de longue conservation, dont la maturité de consommation se prépare en cave ou en chambre froide, la date de récolte n'est pas très importante. Elle se situe entre le 15 octobre et les premières gelées [6].

### **1.2. Les soins à la cueillette**

L'opération qui consiste à détacher le fruit de l'arbre est un geste primordial qui influence sa conservation. On prend donc à pleine main le fruit, on le détache par une légère pression rotative et on le dépose délicatement dans une corbeille. Il est exclu d'imaginer garder longtemps des fruits que l'on ramasse sur le sol ou qui ont été tapés et peut-être même blessés. La cueillette s'effectue par temps sec, dès que la rosée a disparu et jusqu'à la tombée du soir. Dès que la récolte est en caisses, il faut lui éviter les coups de soleil. On déposera provisoirement les fruits à l'ombre. Enfin, plus le temps qui s'écoule entre la récolte et le stockage est court, plus les chances de réussite du stockage sont accrues [7].

### **1.3. Le stockage**

Dans des conditions de conservation inadéquates, l'aspect des fruits devient rapidement rébarbatif, ridés et privés de leur jus parfois même avant d'avoir atteint la parfaite maturité, ces fruits n'apportent aucun plaisir.

Il faut, pour conserver longtemps des fruits, que la température se situe entre 1 et 7 °C et que l'humidité relative soit entre 85 et 90 %. La température doit être la plus constante possible et seuls les fruits sains et délicatement cueillis se gardent [7].

### **2. Ligne de fabrication**

La transformation en jus et nectars peut être réalisée à l'échelle artisanale aussi bien qu'à l'échelle semi-industrielle. Selon les matériels utilisés où La matière première est soumise à un traitement et à une conservation. Le but du traitement technologique dans la production des conserves est de transformer la matière première instable en produit alimentaire stable, de faire de certaines conserves de produits à haut degré de "prêt à la consommation" et de mettre sur le marché des produits d'alimentation divers en espèce, en assortiment et de stabilité garantie. Le schéma général de la transformation des fruits en jus et nectars est illustré dans la figure suivante [11].

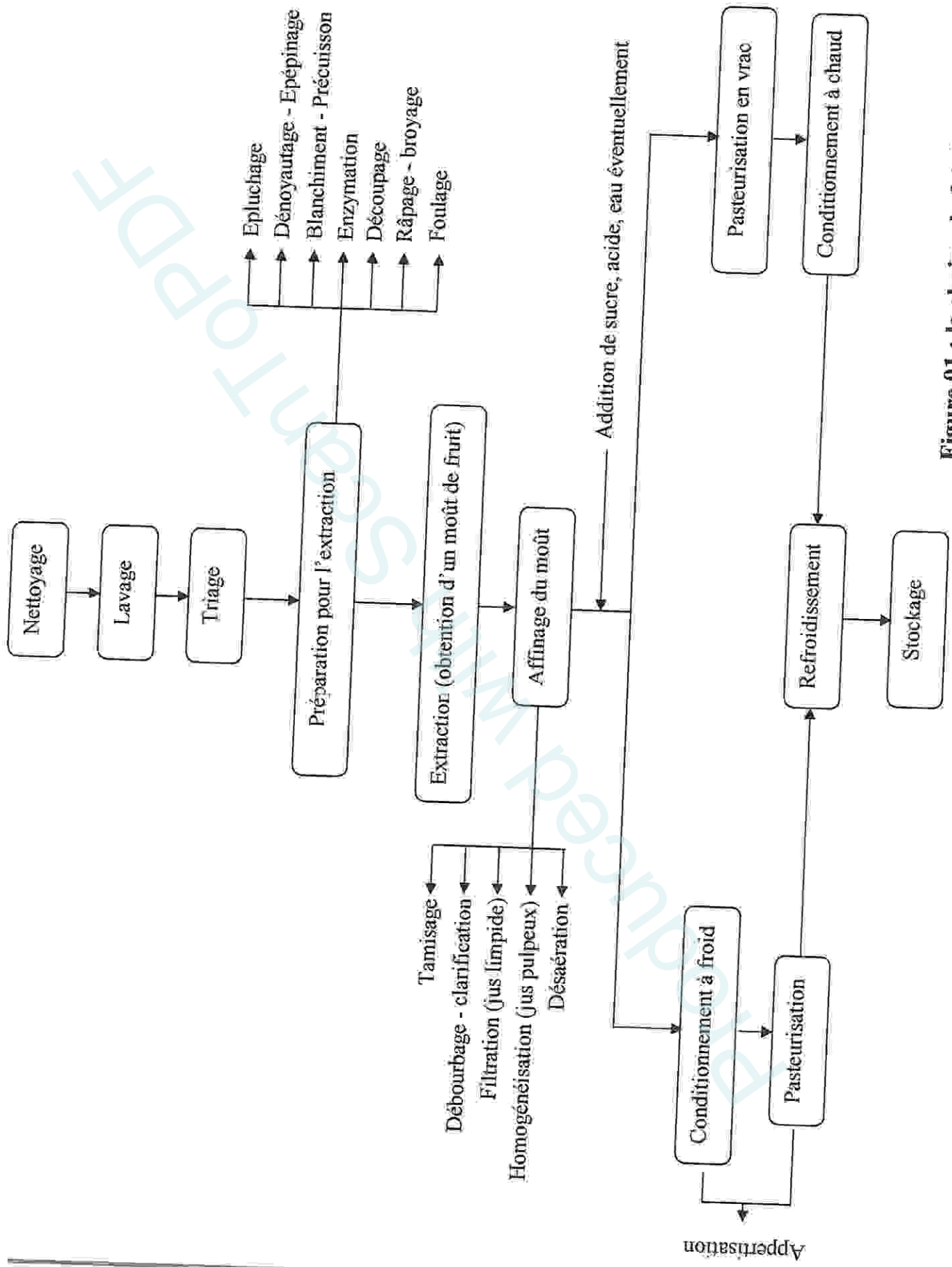


Figure 01 : la chaîne de fabrication des jus [11].



## **2.1. Prétraitement**

### **2.1.1. Lavage et nettoyage**

Ces opérations sont indispensables pour que la qualité des jus ne soit pas altérée par d'éventuels micro-organismes développés en surface des fruits. Elles doivent s'appliquer à tous les fruits [8].

### **2.1.2. Triage**

Les fruits doivent être traités au moment où ils ont atteint leur saveur et leur couleur optimale, c'est-à-dire à pleine maturité. Les fruits abîmés doivent être écartés.

La transformation permet de valoriser les rebuts de calibre (triage par taille) d'autres types de préparation (comme les fruits au sirop, par exemple) [7].

### **2.1.3. Préparation des fruits et l'extraction**

Les traitements devant précéder l'extraction du jus sont énumérés dans le tableau (03). Le jus perdu au cours de ces prétraitements doit si possible être récupéré pour être ajouté au jus provenant de l'extraction, car il est en général plus riche et plus parfumé que celui-ci. L'extraction se fait par broyage, diffusion ou pressage [8].

Tableau 03 : Prétraitements devant précéder l'extraction du jus [8]

Fruits	Epluchage	Dénoyautage	Épépinage	Blanchiment, précuisson	Découpage	Râpage Broyage	Foulage
Mangues	Vapeur 2,5 mn ou soude	X					
Abricots		X		X	En deux		
Agrumes	Facultatif (par abrasion) pour récupérer l'huile				En deux uniquement		
Grenadi- lles				Idem			
Raisins				5 mn dans l'eau à 60- 70°C (après foulage)			
Pastèques	X		X		X		
Papayes	X		X		X		
Pommes	X					X	
Ananas	X				En deux (avant épluchage), puis en morceaux		

#### **2.1.4. Pressage**

Cette opération a pour but d'extraire le jus des fruits tout en effectuant un tamisage de la pulpe. On obtient ainsi directement un jus de fruit clair et pulpeux, contrairement au broyage qui donne une purée. Les Pépins et noyaux doivent être préalablement éliminés pour ne pas enrichir le jus en tanins qui lui donneraient une astringence excessive. Le rendement en moût, c'est-à-dire en liquide obtenu par rapport aux fruits parés, est de l'ordre de 70 à 80 % pour les pommes et de 35 à 40 % pour les agrumes.

Il est assez faible par rapport aux rendements obtenus par d'autres méthodes d'extraction (diffusion, broyage), mais la qualité du jus ainsi produit est bien meilleure. Le résidu (marc) est très riche en matières sèches [10].

#### **2.1.5. Broyage**

Le broyage a surtout pour but d'obtenir un nectar ou une purée puisqu'il consiste à réduire la chair des fruits en une suspension épaisse homogène. Dans ce cas également, il faut prendre soin d'éliminer les pépins et les noyaux avant de broyer les fruits. Le rendement à l'extraction est ici de 100 % en pulpe, mais la qualité du jus obtenu est inférieure. Le broyage intégral des fruits donne un produit inconsommable en raison de son amertume que l'on doit alors diluer, sucrer, puis éventuellement réacidifier.

Les matières insolubles en excès doivent être retirées, si possible par tamisage. Le liquide obtenu est cependant très bon marché et son arôme est prononcé [10].

#### **2.1.6. Extraction par diffusion**

On cherche à obtenir l'intégralité de l'extrait sec soluble des fruits par diffusion dans l'eau ou la vapeur d'eau. Par rapport aux autres méthodes d'extraction du jus, ce procédé présente l'avantage d'avoir un rendement maximal en matières sèches contenues dans les fruits. Les qualités nutritionnelles du jus obtenu sont excellentes, la plus grande partie des vitamines diffusant facilement dans l'eau (Anonyme, 1971).

## **2.2. Traitement**

### **2.2.1. Tamisage**

Cette opération s'applique aux produits déshydratés ayant subi une opération de broyage. Elle peut également s'appliquer à des produits liquides (jus de fruits) ou pâteux (purée) et vise dans ce cas à éliminer les particules les plus grossières (pépins, débris) et les morceaux de fruits non désagrégés par précuisson (si une telle opération précède le tamisage, dans le cas des compotes par exemple) qui risqueraient de nuire à l'homogénéité des transferts de chaleur intervenant par la suite au cours de la pasteurisation [8].

### **2.2.2. Clarification - débouillage**

Le moût de fruit (liquide obtenu après extraction par pressage, broyage ou diffusion) n'est pas toujours consommable tel quel. Il convient de l'épurer, surtout en cas d'extraction préalable par broyage où l'on obtient une pulpe épaisse chargée de débris insolubles, par une série de traitements désignés sous le nom général de "clarification" ou "débouillage". Ces traitements visent à éliminer les éléments plus fins tels que matières colloïdales en solution (protéines, tanins, pectines) et matières insolubles en suspension (débris cellulosiques) [8] [10].

Cette élimination peut être réalisée par:

#### **a) Voie naturelle**

Après repos du jus pendant quelque temps, la fermentation pectique se déclare spontanément et une coagulation des pectines et gommés a lieu. La masse formée, appelée "chapeau", remonte à la surface du jus sous l'action d'un début de fermentation alcoolique et se fendille. On peut alors soutirer le jus. L'inconvénient de cette méthode est la production d'alcool qui, même présent en quantité minime, altère très sérieusement les qualités organoleptiques du jus [8].

#### **b) Centrifugation**

Quoiqu'étant le plus onéreux, ce procédé a l'avantage de ne pas modifier les caractéristiques du jus et d'être rapide [10].



### c) Préchauffage

La coagulation par chauffage (des protéines, par exemple) empêche en même temps un début de fermentation et permet un dépôt des tartrates de calcium ou de potassium (cas des raisins) ainsi que des flavonoïdes (cas des agrumes). Le préchauffage s'effectue à une température toujours inférieure à 100°C pour ne pas altérer les qualités nutritionnelles et organoleptiques du jus [8].

### d) Enzymation

On a recours à l'action des enzymes pectolytiques contenus dans le moût (il suffit alors de laisser reposer ce dernier), ou à l'addition d'enzymes de clarification produits à partir d'une moisissure comme *Aspergillus niger*. L'enzymation doit se faire à une température de 40-50°C et à un pH supérieur à 3 pendant une heure ou plus selon les espèces fruitières [10].

### e) Collage

Il s'agit de l'addition d'une matière colloïdale comme la gélatine en solution à 1 ou 2 % (10 à 20 g de gélatine pour 100 l de jus). Celle-ci se combine aux protéines et tanins du moût qui précipitent en entraînant les impuretés du jus.

Pour faciliter la précipitation des jus de fruits ne contenant pas assez de tanins, on en rajoute sous forme de tanins en solution à 0,5 à 1 % ou sous forme de jus de fruits astringents dans une proportion de 5 %.

On peut également utiliser de :

- la colle de poisson (à raison de 2 à 3 g / 100 l de jus) ;
- l'albumine en poudre (5 à 8 g / 100 l de jus) ;
- la caséine (6 à 10 g / 100 l de jus), et faire précéder le collage d'un préchauffage à 95 °C ou d'une addition de bisulfite de soude (10 g / 100 l de jus). On soutire ensuite le jus clarifié.

Avant toute adjonction de substance colloïdale, il convient de faire un essai préalable sur de petites quantités de jus afin de déterminer les doses optimales à utiliser. L'opération de collage dure 12 h au maximum. Son efficacité augmente si la température de travail est plus basse, car l'on évite ainsi tout début de fermentation. On effectue d'abord l'enzymation (en diluant la quantité d'enzyme nécessaire dans un ou plusieurs litres d'eau, puis en versant ce mélange dans le jus en brassant le tout) pendant 2 heures à 20°C environ, puis on fait un collage à la gélatine, par exemple (Anonyme, 1971).



### 2.2.3. Blanchiment et précuisson

#### a. Blanchiment

Celui-ci a pour objet:

- L'inactivation par la chaleur des enzymes responsables du brunissement ou de la modification des couleurs naturelles de certains fruits.
- La dilatation des cellules par ramollissement du fruit, ce qui provoque l'élimination de l'oxygène de l'air intracellulaire responsable de la corrosion des matériaux de conditionnement (bombage chimique des boîtes, par exemple).
- L'arrêt des fermentations et du développement des moisissures.
- La réduction de la période de trempage et de cuisson pour la reconstitution des produits séchés.
- L'assouplissement des tissus de fruit.
- L'élimination de l'anhydride sulfureux absorbé par les fruits si un traitement par agents de conservation a été effectué avant blanchiment (Bimbenet *et al.*, 2007).

Le blanchiment est effectué le plus tôt possible après la préparation des fruits et par petites quantités, de façon discontinue, selon deux méthodes:

##### ➤ Blanchiment à l'eau

Les fruits sont plongés pendant un temps déterminé dans de l'eau bouillante, éventuellement acidifiée (2 g d'acide citrique par litre en moyenne) ou salée. La même eau peut servir 5 à 10 fois environ, elle est également parfois utilisée pour le jutage des fruits au naturel, en raison des principes nutritifs ayant diffusé dans cette eau et qui, ainsi, ne sont pas perdus. On utilise environ 1 l d'eau par kg de fruits [12]

##### ➤ Blanchiment à la vapeur

Les fruits sont placés dans un courant de vapeur au-dessus d'un récipient contenant de l'eau bouillante. Ils doivent être ensuite refroidis à l'eau froide courante pour stopper les effets du traitement thermique et éviter dans certains cas (pour le séchage par exemple) qu'ils ne collent ensuite les uns aux autres. Un égouttage final est effectué [12]

Les avantages et inconvénients respectifs de ces deux méthodes de blanchiment sont exposés dans le tableau (04).

Tableau 04 : Avantages et inconvénients respectifs du blanchiment à l'eau ou à la vapeur [12]

Blanchiment à l'eau	Blanchiment à la vapeur
<b>Avantages</b>	
<p>Simplicité du matériel</p> <p>Coûts d'achat et d'entretien peu élevés</p> <p>Bonne connaissance du traitement thermique à appliquer</p> <p>Valeur élevée du coefficient d'échange thermique entre l'eau et le produit, donc temps de blanchiment plus court</p> <p>Lavage simultané du produit</p> <p>Possibilité de régler la température</p> <p>Capacité importante pour un encombrement réduit</p>	<p>Faible quantité d'eau utilisée, d'où consommation d'énergie légèrement moindre et faible quantité d'effluents</p> <p>Rétention de constituants solubles (mais à la suite d'un traitement ultérieur, comme le refroidissement à l'eau, cette perte rejoint celle causée par le blanchiment à l'eau)</p>
<b>Inconvénients</b>	
<p>Emploi d'eau en grande quantité et à température élevée d'où</p> <p>Grande consommation d'énergie (qui peut être réduite si l'eau est recyclée)</p> <p>Volume d'effluents élevé</p> <p>Perte d'éléments nutritifs dans l'eau de blanchiment par dissolution</p>	<p>Difficulté de nettoyage du treillis métallique</p> <p>Difficulté d'obtenir un chauffage uniforme</p> <p>Température de travail unique</p> <p>Encombrement important (épaisseur de couche réduite, couche non tassée)</p>

### b. Précuisson

Ce traitement présente les mêmes caractéristiques et joue le même rôle que le blanchiment dont il diffère par sa durée plus importante. En outre, la précuisson ramollit considérablement les tissus des fruits, ce qui est souvent le but recherché (cas des compotes) pour faciliter les traitements ultérieurs (Anonyme, 1971).

Cette opération peut s'effectuer à la vapeur, mais on utilise en général de l'eau bouillante en quantité très variable:

- si l'on emploie très peu d'eau, les fruits sont placés avec l'eau directement dans le récipient chauffé. Il n'y a pas de refroidissement ni d'égouttage. Les fruits ainsi traités sont en général destinés à subir une cuisson.
- si l'eau est en quantité plus importante, il s'agit d'un simple blanchiment prolongé et les fruits sont placés dans un panier, puis plongés dans l'eau (Bimbenet *et al.*, 2007).

#### 2.2.4. Traitement par agents de conservation

Ce traitement a pour but de :

- fixer et de stabiliser la coloration des fruits et d'empêcher le brunissement par inactivation des enzymes (action antioxydante) ;
- assurer une protection contre les insectes ;
- empêcher le développement de moisissures et de levures (c'est-à-dire de stopper les débuts de fermentation, alcoolique surtout). Cette action antiseptique est d'autant plus marquée que l'acidité est plus forte ;
- provoquer une rupture des cellules périphériques qui se plasmolysent, ce qui entraîne une évaporation plus rapide au séchage ;
- favoriser la conservation de la vitamine C (presque 50 % par rapport à un témoin qui en contient au départ 84 mg/100 g) [10].

Beaucoup de composés chimiques sont à exclure parce que toxiques. On peut par contre, utiliser le soufre, très efficace en fumigation ou en solution:

#### ➤ Soufrage

Par combustion directe de soufre, on obtient du  $\text{SO}_2$  (anhydride sulfureux ou dioxyde de soufre). On ajoute parfois du nitrate de sodium ou potassium (5%) pour faciliter la combustion [10].



### ➤ Sulfitage

On obtient une solution de  $\text{SO}_2$  en additionnant de l'eau et du sulfite ou du métabisulfite de sodium. On peut aussi ajouter de l'acide citrique. Ce trempage est court et suivi d'un égouttage ou essorage [10].

Bien qu'il soit plus onéreux, plus long et moins pratique, le traitement gazeux (soufrage) est préféré, car il n'engendre pas de perte de jus. Les doses moyennes sont comprises entre 100 et 200 g de produit par 100 kg de fruits. L'agent est appliqué soit sous forme gazeuse (20 g/m<sup>3</sup> de capacité du souffoir, pendant 3 à 6 h pour la plupart des fruits), soit sous forme de solution (1 à 3 %). La dose doit être supérieure à 100 g/100 kg de fruits (sinon il y a fermentation) et inférieure à 200 g/100 kg de fruits sinon les fruits sont brûlés superficiellement, la pulpe devient déliquescence et le produit prend un goût soufré. Les fruits ne doivent pas contenir plus de 2,5 à 3 ppm (parties par million) de soufre après traitement, ce qui correspond à 2,5-3 mg/kg (Bimbenet *et al.*, 2007).

L'anhydride sulfureux présente plusieurs inconvénients:

- Il décolore certains fruits rouges ou violets (la couleur réapparaît toutefois plus brillante par chauffage).
- En se combinant avec les sucres réducteurs des fruits, il donne des composés difficilement dissociables. Il est donc impossible de l'éliminer totalement.
- Il se transforme en acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) par oxydation de l'acide sulfureux formé. Cet acide sulfurique dénature la saveur et la rend acide; par ailleurs, si le conditionnement est fait en boîtes métalliques, l'acide sulfurique peut attaquer le métal et former de l'hydrogène qui, en se combinant avec le  $\text{SO}_2$  restant, produit de l'acide sulfhydrique ( $\text{H}_2\text{S}$ ) dont l'odeur est très désagréable (Bimbenet *et al.* : 2007).

### 2.2.5. Dégorgement

Cette opération est essentiellement pratiquée avant la conservation par le vinaigre de fruits en morceaux. Elle a pour but de faire rendre aux fruits une partie de leur eau de constitution afin d'éviter que cela ne se produise pendant l'étape suivante de macération dans le vinaigre, ce qui provoquerait une dilution de celui-ci ainsi qu'un ramollissement excessif de la texture des fruits [8].

### 2.2.6. Addition de sucre, d'acide ou d'eau

Le tableau (05) donne une idée des quantités d'ingrédients que l'on doit ajouter. Il faut, de façon générale, obtenir un liquide ayant un pH compris entre 3 et 4 et dont la teneur en matières sèches voisine de 13-15 % [8].

Tableau 05 : Composition des jus et nectars de fruits [8]

Fruit		Sucre(g)	Acide	Eau
Ananas	1 l jus	10	0	10 ml
Citrons Pamplemousses	1 l jus	100	0	
Oranges	1 l jus		50 ml jus de citron	
Corossols	Jus de 1 kg fruit + 1,5 l d'eau		4 g acide	
Mangues	100 g pulpe	30	10 g jus	85 g
Goyaves	100 g pulpe	50	de citron ou 2-3 g d'acide	35 g
Papayes	100 g pulpe	40	1,5 g acide	150-200 g
Grenadilles	100 g pulpe	60		
Tamarins	1 l jus	62	(très acides)	
Abricots	100 g pulpe	15		85 g

### 2.2.7. Pasteurisation

On applique au jus un couple temps/température ("barème de stérilisation") pour obtenir une destruction des micro-organismes pathogènes et une stabilité biochimique et physique.

La température doit être supérieure à 72°C pour éviter une altération du jus par les germes microbiens, mais inférieure ou égale à 100°C pour limiter un brunissement du jus, un goût de cuit et la destruction des vitamines. Le temps est compté après la montée en température, c'est-à-dire une fois que le milieu chauffant a atteint la température désirée.

On peut faire varier à volonté soit la durée du traitement, soit la température. Pratiquement, il vaut mieux fixer une température et faire varier le temps selon le fruit à traiter. [11]



Le couple temps/température est fonction du fruit utilisé, du produit fini à pasteuriser et du récipient de conditionnement. En effet, pour une même température du milieu chauffant, le transfert de chaleur est plus long si:

- Le fruit est plus riche en sucre, en amidon ou en sels minéraux.
- Le jus de fruit a une acidité plus faible (ou un pH plus élevé).
- Le jus à traiter est plus visqueux (nectar).
- Le récipient de conditionnement a un volume plus élevé.
- Le récipient est en verre et non en métal [11].

Le barème de pasteurisation est donc propre à chaque produit en fonction du type de conditionnement. On peut le déterminer sur échantillon, par mesure de la température au cœur d'une boîte contenant le produit à pasteuriser, après différents temps de chauffage, jusqu'à obtention de la température désirée; en pratique, cependant, on appliquera au milieu chauffant une température toujours supérieure à celle que l'on s'est fixée. Il est possible d'appliquer le traitement thermique aux jus de fruits soit avant, soit après le conditionnement [11].

#### a) Traitement thermique avant conditionnement

La pasteurisation des jus en vrac doit être effectuée à une température supérieure à 85°C pour tenir compte des déperditions de chaleur lors du remplissage qui suit. Après remplissage et fermeture des récipients, il faut les retourner pendant trois minutes et les agiter pour que le liquide chaud vienne au contact de toute la surface intérieure de ces récipients: c'est l'autopasteurisation (Bimbenet *et al.*, 2007).

Le traitement par la chaleur des jus non conditionnés se fait en général par "flash pasteurisation", c'est-à-dire en suivant la procédure ci-après:

- Porter très rapidement le jus à une température de 85 à 95°C (en 2-3 s).
- Le maintenir pendant 10-12 s au plus à cette température.
- Refroidir immédiatement à 82-85°C.
- Emballer à cette température (les récipients en verre supportent mal les chocs thermiques et doivent être préchauffés) [11].

On peut toutefois appliquer un traitement thermique en vrac de façon continue, par petites quantités de jus chauffées directement dans des bassines en agitant le liquide et en contrôlant la température qui ne doit pas être trop élevée pour limiter toute altération des qualités organoleptiques du jus. Le temps de pasteurisation est alors plus long que dans le

cas du flash pasteurisation (une trentaine de minutes environ), jusqu'à obtention de la température désirée (75-85°C) [11].

### b) Traitement thermique après conditionnement

Dans ce cas, le produit mis en boîte est préchauffé dans le but de:

- Combattre la corrosion des boîtes (en cas de récipients métalliques) en éliminant l'oxygène,
- Diminuer le temps de pasteurisation,
- Réduire la pression interne des récipients pendant le traitement thermique en éliminant les gaz dissous,
- Préserver la saveur, la couleur et les vitamines.

Le préchauffage se fait à une température n'excédant pas 70-75°C, parfois 80°C. Après avoir fermé les récipients, on les pasteurise immédiatement de façon à ce que la température à cœur atteigne 80-85°C pour les jus troubles ayant un pH compris entre 3,5 et 4,2 et 75-80°C pour les jus limpides ayant un pH inférieur à 3,5.

Cette technique est dénommée «appertisation», c'est-à-dire application d'un couple temps/température à un produit placé dans un récipient hermétiquement clos. Elle s'applique de la façon suivante:

- Montée en température jusqu'à 72°C minimum.
- Maintien de cette température pendant 15 minutes environ.
- Refroidissement pendant 15 minutes.

Bien entendu, les barèmes varient en fonction des divers facteurs mentionnés précédemment; les chiffres indiqués ci-dessus représentent donc une moyenne (Bimbenet *et al.*, 2007).

## 2.3. Post-traitements

### 2.3.1. Conditionnement

Pour le conditionnement des jus, on utilise les récipients suivants:

- boîtes métalliques vernies intérieurement et serties (les formats sont normalisés, on se référera au tableau 06 concernant les principales normes utilisées),
- flacons ou bouteilles de verre,
- complexes carton-aluminium ou aluminium-plastique,
- matières plastiques (sous forme de sachets thermosoudés). Les bouteilles plastiques ne seront pas étudiées ici à cause des problèmes d'herméticité que pose leur système de fermeture.

De toute façon, la pasteurisation après conditionnement n'est réalisée que dans le cas de récipients de métal ou de verre [11].

Tableau 06 : Normes de pasteurisation des jus et nectars [11]

Fruits	Préchauffage (°C)	Pasteurisation en récipients			Flash pasteurisation		
		Temps (min.)	T°C	Récipient	Temps (sec.)	T°C	Refroidissement (°C)
Pommes		30	77		30-60	88	80
Tamarins		15	100	Verre			
Corossols (nectar)		10-15	100	Verre			
Mangues (nectar)	82-85	10	100	Boîte n°2	60	88	80
Papayes (nectar)	82-85	10	100	Boîte n°2			
Ananas	70	10	100	Boîte n°2		88-95	85
		20	82	Boîte n°2			
Abricots (nectar)	82-85	15-20	100	Boîte n°1		96	85
		20-30		boîte n°1			
Raisins	85	30	80	Verre		82-85	79
		10	100	Boîte n°1 1/4			
Pommes de cajou	80	20-30	82-85				
Grenadilles		1,5	Avec agitation	Boîte n°1			
		4	77-82	Boîte n°10			
Oranges					30	87	80
Goyaves (nectar)					60	88	79
Pamplemousses	88	10	100	Boîte n°1 1/4	45	85	79
Citrons	80		74		30	77	

### **2.3.2. Refroidissement**

Après l'étape pasteurisation/conditionnement, un refroidissement rapide des récipients doit être effectué jusqu'à température ambiante (30°C environ) afin d'éviter les risques de surcuisson avec le brunissement et le goût de cuit qui en résultent. Les récipients de verre doivent être refroidis avec précaution et lentement pour éviter qu'ils ne se cassent.

On procède par trempage des récipients dans des bacs alimentés en eau courante (celle-ci doit être renouvelée constamment pour éviter qu'elle se réchauffe au contact des récipients) ou par aspersion d'eau froide (grâce à des rampes de jets situées au-dessus d'une bande transporteuse) (Bimbenet *et al.*, 2007).



# ***CHAPITRE II***

***Altérations et***

***réduction des risques***

Produced with Scan PDF



✶ Le contrôle microbiologique à un intérêt technologique. Le produit fini doit répondre à un certain nombre de critères physiques, chimiques et microbiologiques. Certaines altérations microbiologiques peuvent conduire à des modifications (physique ou chimique) indésirables du produit fini donc il est important de dépister les infections susceptibles d'altérer ces qualités. Les sources de la microflore sont la matière première, les équipements, l'eau, l'emballage, l'aire et le personnel (Benamara et Agougou, 2003)

## 1. Les différentes altérations microbiologiques exercées sur les jus de fruits

La composition et les caractéristiques des jus de fruits sont telles que les espèces acidophiles pourront s'y multiplier et engendrer des altérations. Celles-ci peuvent revêtir divers aspects.

### 1.1. Fermentation alcoolique indésirable

Les sucres assimilables des jus peuvent être transformés en alcool avec production de dioxyde de carbone, sous l'action des levures : *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*. Cette altération se caractérise par un dégagement gazeux qui rend la boisson pétillante et lui confère un goût alcoolisé. (Leyral et Vierling ; 2001)

### 1.2. Fermentation hétérolactiques

Cette fermentation est celle des sucres assimilables par des bactéries acidophiles du genre *Lactobacillus*, avec apparition de goûts ou d'odeurs anormales avec ou sans production de gaz comme le montre le tableau suivant. (Leyral et Vierling ; 2001)

### 1.3. Fermentation acétique

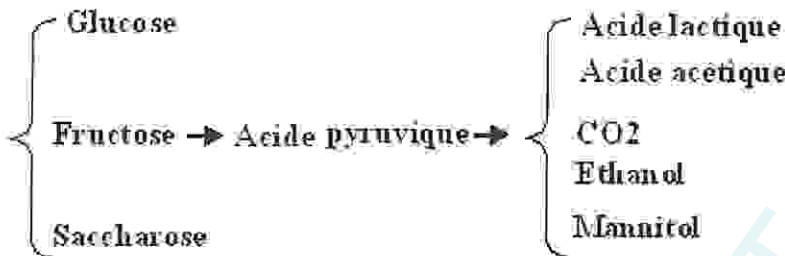
Elle est le fait d'*Acerobacter* ou de *Gluconobacter* et entraîne une acidification du a la production d'acide acétique (Leyral et Vierling , 2001).

Ces contaminants apparaissent lorsque la boisson a perdu ses propriétés sélectives en particuliers en cas de fuite d'emballage. Dans ce cas, des moisissures qui sont généralement inhibés par l'anaérobiose pourront se développer (Benamara et Agougou, 2003)

## 2. Les microorganismes responsables à l'altération des jus des fruits

### 2.1. Les bactéries :

Les bactéries associées aux jus de fruits sont en générale les Lactobacilles (acidophiles). Les lactobacilles produisent de l'acide lactique et autres acides avec un dégagement gazeux :

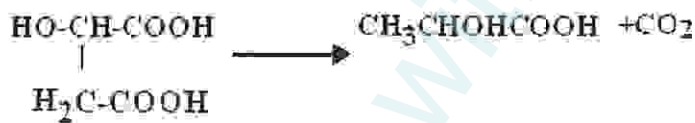


#### Exemples :

- *Lactobacillus pentoaceticus* produisent le mannitol et l'éthanol.

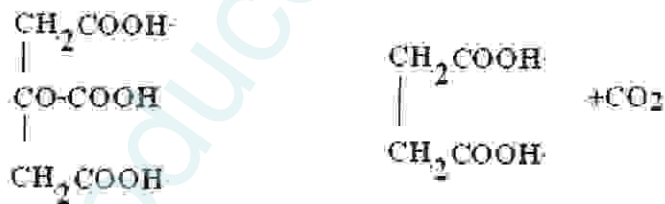
- *Lactobacillus plantarum* produisent l'acide lactique et l'acide acétique.

Autres acides du jus de fruits qui peuvent être dégradés l'acide malique, l'acide citrique et l'acide tartrique (Ait Abdelouahab, 2007).



Acide malique

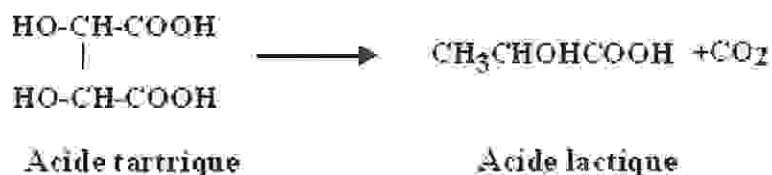
Acide lactique



Acide citrique

Acide succinique

Ces transformations sont assurées par *Bacterium succinum*



Cette transformation est assurée par *clostridium pasteurianum* qui peut se développer dans les jus d'ananas dont le pH =4 (Ait Abdelouahab, 2007).

**Tableau 07 : Exemple de réactions indésirables dans les jus riches en sucres et en acides aminés (Ait Abdelouahab, 2007)**

Substrats	Organismes responsables	Produit de la réaction
Glucose, fructose, saccharose	<i>Lactobacillus spp</i>	Acide lactique+ acide acétique + CO <sub>2</sub>
Glucose	<i>Acetobacter spp</i>	Acide gluconique
Fructose	<i>Lactobacillus Brevis</i>	Mannitol+ Ac. Lac.+Ac.acétique + CO <sub>2</sub>
Maltose	<i>Leuconostoc Mesentoroides</i>	Amylose + Glucose fructose
Saccharose	<i>Echerichia Coli</i>	
Saccharose	<i>L. Mesentoroides, Bac. Subtilis, Str. viscosum</i>	Dextrane + Fructose Levane+ glucose
Ethanol	<i>Acetobacter spp</i>	Acide acétique + H <sup>+</sup>
Acide citrique	<i>Acetobacter spp</i>	Acide lactique+ Acide acétique + CO <sub>2</sub>
Acide citrique	<i>Bactérium succinum</i>	Ac. Succinique+2CO <sub>2</sub>
Acide malique	<i>Lactobacillus spp</i> <i>Leuconostoc Mesentoroides</i>	Acide lactique+CO <sub>2</sub>
Acide tartrique	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Acide lactique+CO <sub>2</sub>

## 2.2. Levures et moisissures

Lorsque les teneurs en sucre sont comprises entre 10% et 30%, les levures qui peuvent se développer sont : *Saccharomyces millis* et *Saccharomyces rouxii*, elles fermentent le sucre pour donner de l'éthanol, et d'autre espèce de levure comme *Candida pulcherina*, *candida malicola* et *cryptococcus albidus* donnent des dextranes. (Ait abdelouahab, 2007).

Ces contaminants apparaissent lorsque la boisson a perdu ses propriétés sélectives en particuliers en cas de fuite d'emballage. Dans ce cas, des moisissures qui sont généralement inhibés par l'anaérobiose pourront se développer. On peut trouver également l'*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* et *Mucor*.

Le développement de ces moisissures provoque brunissement, trouble, apparition de formations floconneuses au sein du liquide (Leyral et Vierling, 2001).

## 3. Réduction des risques d'altération : la méthode HACCP

Mise au point en 1970 aux Etats-Unis pour les industries chimiques, la méthode HACCP (Analyse des risques et points critiques pour leur maîtrise) est appliquée depuis 1972 dans le secteur de la conserverie. En 1989, l'OMS considère cette méthode comme la meilleure pour garantir la sécurité alimentaire (Leyral et Vierling, 2001).

### 3.1. Les quatre fonctions fondamentales de la logique HACCP

La logique HACCP conduit à identifier quatre missions ou « fonctions fondamentales » :

- L'analyse des dangers ;
- La maîtrise des points critiques ;
- La surveillance des conditions d'exécution ;
- La vérification de l'efficacité du système d'évaluation [13].

#### 3.1.1. L'analyse des dangers

- **Point à risque**

Un point à risque est un point où le niveau acceptable de contamination tend à être dépassé du fait des possibilités d'apports microbiens aléatoires ou systématiques, voire de leur persistance lorsque le point critique n'est pas maîtrisé [13].



- **Points critiques (CCP)**

Ce sont les points sur lesquels on peut agir pour maîtriser le risque. Un point critique est un point équipé d'un procédé qui permet de faire évoluer le risque de façon définie, répétable, évaluable, pour qu'il atteigne un niveau acceptable. Chaque point critique est donc déterminé, pour un micro-organisme donné, en fonction de sa nature, de sa fréquence, de la gravité et de la fréquence des affections qu'il entraîne chez le consommateur ou de celles des altérations de la denrée qu'il contamine[13].

### **3.1.2. Maîtrise des points critiques pour la salubrité des aliments**

Elle consiste à fixer une valeur cible : « niveau de contamination dont l'évolution, même dans les conditions prévisibles les plus défavorables, ne lui permettra pas d'atteindre de l'utilisation, au moment de l'utilisation, une valeur pour laquelle le danger est manifeste » (Leyral et Vierling, 2001).

### **3.3.3. Sept étapes à suivre pour la démarche concernant les jus de fruits**

La démarche HACCP peut être, pour la filière alimentaire, décomposée en sept étapes; (après une étape préliminaire) ; comme le montre le tableau suivant.



**Tableau 08 : Les sept étapes de la démarche HACCP dans l'industrie des jus (Leyral et Vierling, 2001).**

Étape	Objectif de l'étape
	Constituer l'équipe HACCP, orienter son action, rechercher les informations, concevoir le développement de l'action.
1	Décrire le produit, le procédé de fabrication, identifier l'utilisation du produit. vérifier, sur le site de production, le diagramme ainsi réalisé.
2	Analyser les dangers : pour chaque étape de fabrication, identifier les points à risque. Estimer les risques. Identifier et évaluer les mesures préventives.
3	Identifier les points critiques (CCP). Etablir, pour chaque CCP, des valeurs cibles et des tolérances.
4	Etablir pour chaque CCP, un système de surveillance.
5	Définir les actions correctives à mettre en œuvre.
6	Définir les modalités de la vérification.
7	Etablir un système documentaire approprié.

### 3.3.4. Evaluation des risques d'apports et de multiplication des microorganismes : les 5M

Pour chaque étape, on maîtrisera l'apport et la multiplication des microorganismes en considérant les rôles respectifs de :

- la Matière, source d'apport initiale et de contaminations croisées ;
- le Milieu (locaux, air, eau, surfaces et biofilms) ;
- le Matériel (nature, conception, entretien) ;
- la Méthode, organisation du travail dans le temps et dans l'espace ;
- la main d'œuvre (santé et comportement du personnel sur le plan de l'hygiène) [14].

Le tableau (09) montre un exemple de résultats fournis par une approche de ce type.

**Tableau 09 : Exemple d'évaluation des risques d'apports et de multiplication des microorganismes (Leyral et Vierling, 2001)**

	Matière		Matériel		Méthode		Milieu		Main d'œuvre	
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
Réception	X									
Stockage		X	X		X	X		X		
Préparation de la matière première	X		X		X	X		x		
Préparation de l'appareillage	x		X		x					
Opération broyage-malaxage-mélange			X						X	
Conditionnement après cuisson			x						X	
Conservation		X								
Réchauffage-présentation		X								

A=apport de microorganismes

M=multiplication de microorganismes

X=très important

x=important

# ***CHAPITRE III***

## ***Matériel et méthodes***

Produced with Scan PDF

L'analyse bactériologique fait appel à divers technique de recherche et de dénombrement basées pour la plus part sur l'obtention de culture à partir des cellules présentes dans le milieu.

On a recours souvent à une analyse quantitative qui détermine un nombre de germe par ml ou par g de produit et une analyse qualitative, test de présence ou d'absence de microorganisme. (Guiraud, 1998).

## **1. L'échantillonnage**

### **1.1. Technique et but d'échantillonnage des jus**

Pour étudier la qualité bactériologique des jus, 3 échantillons ont été prélevés dont le but est de contrôler ses qualités bactériologique après leurs livraison. Le prélèvement des échantillons se fait au hasard à partir d'un lot dont les conditions de stockage et la date de péremption sont respectées (Guiraud, 1998).

Les échantillons (Vita jus, Star, Bonjos, Rouiba et Cara jus) qu'on a pris pour les analyser sont emballés en brique, en bouteille en verre et en plastique. et prélevés en fin de chaîne de distribution.

### **1. 2. Transport et conservation de l'échantillon**

Pendant le transport, il faut éviter surtout la destruction de l'échantillon, ou inversement la surcroissance de micro-organismes à l'intérieur de l'échantillon. Ceci peut être obtenu en mettant l'échantillon à labri du soleil ainsi que dans des températures basses. Habituellement, cette protection est obtenue grâce à l'utilisation d'une glacière contenant des poches de glace. On conserve généralement les échantillons à une température inférieure ou égale à +4°C (Guiraud, 1998).

### **1.3. Traitement de l'échantillon avant l'analyse**

L'échantillon fournit au laboratoire consiste en un produit liquide emballé tel qu'il est commercialisé, la préparation de l'échantillon nécessitera :

- Conditions de conservation et de transfert des échantillons.
- l'ouverture aseptique des récipients fermés.
- l'homogénéisation des échantillons prélevés. L'analyse d'une partie aliquote du produit homogénéisé doit être représentative de l'ensemble, il suffit d'agiter manuellement.

## **2. Analyse bactériologique**

La transformation des jus de fruits est susceptibles d'apporter des contaminations diverses à plusieurs niveaux. Le contrôle microbiologique devra donc être complet :

- ✓ dénombrement de la flore aérobie mésophile,
- ✓ dénombrement des indicateurs fécaux (coliformes, coliformes fécaux, streptocoques fécaux),
- ✓ dénombrement des clostridium sulfite-réducteurs (surtout pour les produits souillés par la terre),
- ✓ recherche des germes pathogènes (staphylocoques, salmonelles, pseudomonas...),
- ✓ recherche des levures et moisissures (Bourgeois et Leveau, 1980).

Les différentes étapes du travail expérimental effectuées sont indiquées dans les deux figures suivantes



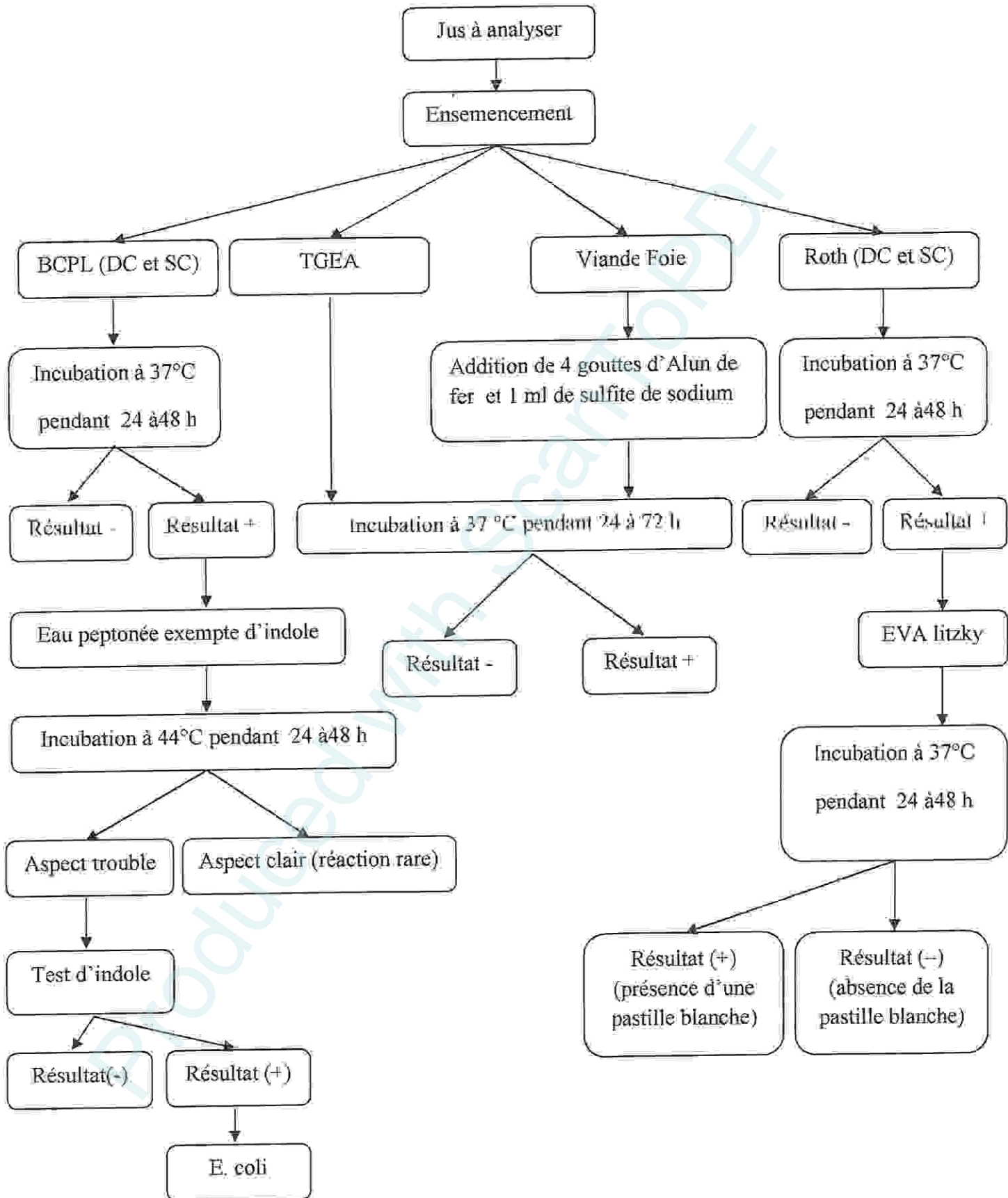


Figure 02 : Mode opératoire du dénombrement bactériologique

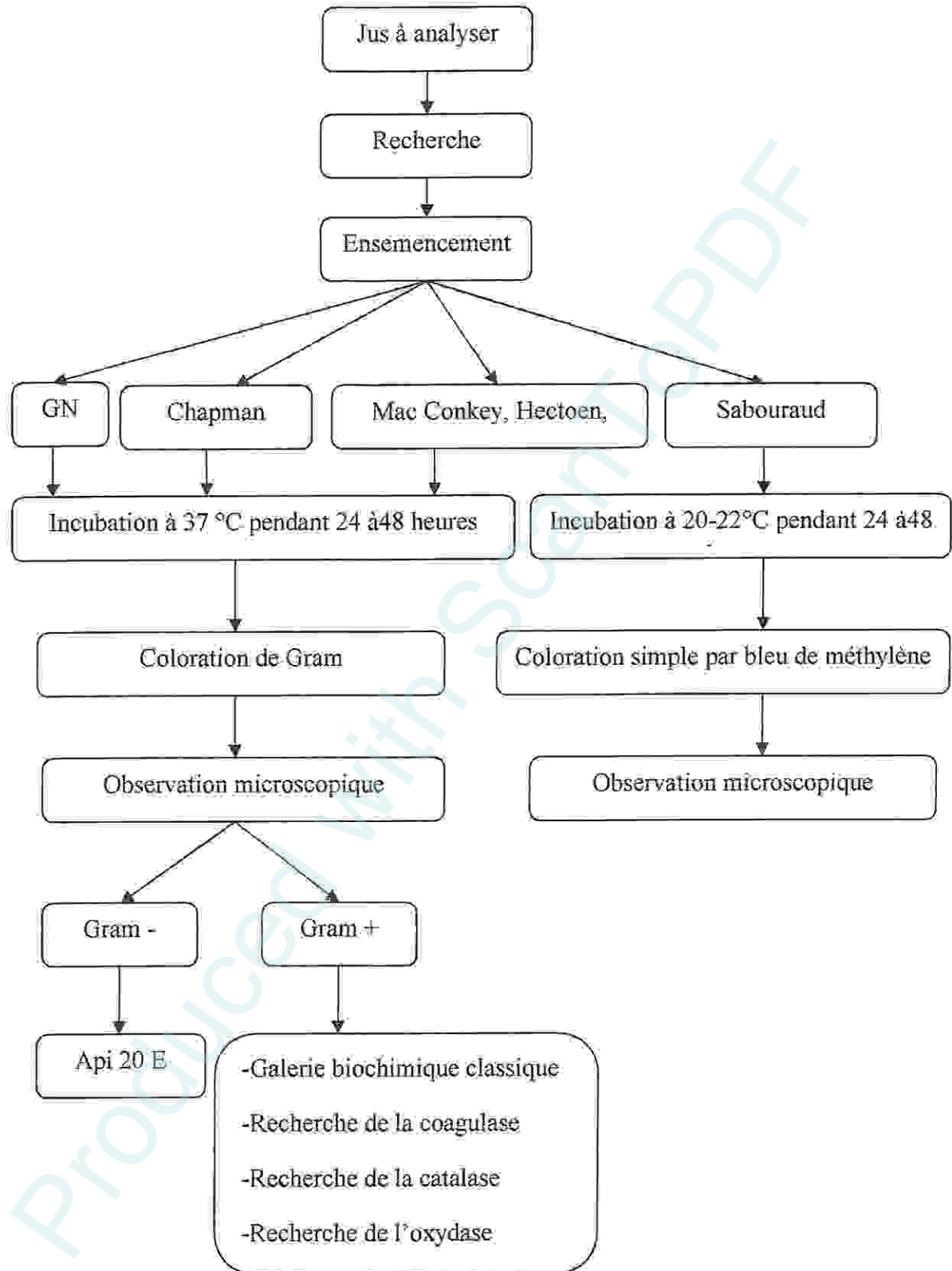


Figure 03 : Mode opératoire de la recherche bactériologique sur milieu solide

### 2.1. Les coliformes fécaux (totaux)

Les coliformes sont des bacilles à Gram négatifs, aéroanaérobies facultatif, non sporulés, ne possédant pas d'oxydase, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production d'acides et de gaz en 24 à 48 heures à une température  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . (Lebres *et al.*, 2006)

### 2.2. Les coliformes thermo tolérants

Les coliformes thermo-tolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capable de fermenter le lactose à une température de  $44^\circ\text{C}$ . L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* (*E. coli*). (Roux, 2003). La bactérie *E coli* représente toute fois 80 à 90% des coliformes fécaux détectés bien que la présence de coliformes fécaux témoigne habituellement d'une contamination d'origine fécale.

Les *Escherichia coli* sont des coliformes thermo-tolérants ayant la particularité de produire de l'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu à une température comprise entre  $42 \pm 2^\circ\text{C}$ . (Guraud, 1998).

### 2.3. Les streptocoques fécaux

Les entérocoques, qui incluent les streptocoques fécaux, survivent et se développent facilement dans les environnements d'usine. Etant donné qu'ils résistent mieux à la chaleur et aux conditions défavorables que les Entero- bacteriaceae, on les utilise comme indicateurs d'hygiène [15].

Les streptocoques sont des bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram positive, sphériques ou ovoïdes formant des chainettes, (Bourgeois et Leveau, 1980) ne possédant pas de catalase mais possédant l'antigène du groupe D. Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à  $37^\circ\text{C}$  sur un milieu sélectif à l'azoture de sodium. (Labres *et al.*, 2008).

### 2.4. Les germes mésophile

Il s'agit de microorganismes se développant bien sur milieu ordinaire, ce qui exclut un nombre important de germes : c'est le cas des bactéries filamenteuses, des bactéries sulfureuses et ferrugineuses, des germes anaérobies, etc. Cependant, la grande majorité de la flore banale est pathogène pourra se développer. Le double dénombrement à  $20 \pm 2$  et  $37^\circ\text{C}$  permet la culture d'une gamme plus étendue de microorganismes. (Guiraud ; 1998).

### 2.5. Les clostridium sulfito-réducteurs

On entend par bactéries sulfito-réductrices des bactéries qui se présentent sous formes de bacilles à Gram positif et qui en se développant à température de  $36 \pm 2$  °C en 24 à 48 heures en gélose profonde de type gélose Tryptose Sulfite Cyclosérine ou Tryptose Sulfite Néomycine ou encore gélose viande foie, donnent des colonies caractéristiques qui sont de couleur blanches entourées d'une auréole noire. Cette dernière est le témoin de réduction du sulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de  $\text{Fe}^{2+}$  qui donne  $\text{FeS}$  (sulfate de fer) de couleur noir. (Lebres *et al.* 2006)

### 3. Matériel

Nous avons travaillé dans un laboratoire de microbiologie, équipé de matériel classique : des étuves à 37, à 44 et à 22°C, des boîtes de Pétri, anse de platine, portoirs, pipettes Pasteur, bec Bunsen et des milieux de culture liquides et solides, ainsi que plusieurs réactifs (Annexe1).

### 4. Méthodes d'analyse bactériologiques

L'étude de la variation de la population bactérienne globale, le dénombrement et la recherche des bactéries d'origine fécale et la recherche des bactéries pathogènes sont les grandes lignes des analyses bactériologiques (Guiraud, 1998).

#### 4.1. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux avec identification d'*Escherichia coli* en milieu liquide

La recherche et le dénombrement des coliformes et l'identification d'*E. coli* ont été effectués par la méthode de nombre le plus probable (NPP).

Cette méthode peut être réalisée par deux tests consécutifs :

- ✓ Le test de présomption: pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux.
- ✓ Le test de confirmation : pour la recherche et le dénombrement des coliformes thermo-tolérants et d'*Escherichia coli*. (Labres *et al.*, 2008).

#### ➤ Test de présomption

##### ▪ Principe



Selon la technique du nombre le plus probable (NPP) on a réalisé 03 séries de BCPL à raison de 03 tubes pour chaque série comme suit :

- 3 tubes de BCPL D/C avec 10ml de l'échantillon.
- 3 tubes de BCPL S/C avec 1 ml de l'échantillon.
- 3 tubes de BCPL S/C avec 0.1 ml de l'échantillon.

On incube les tubes à 37°C pendant 24 à 48h.

Les tubes sont munis de cloches de Durham pour déceler le dégagement éventuel de gaz dans le milieu (fig.04) (Amor Abda, 2009).

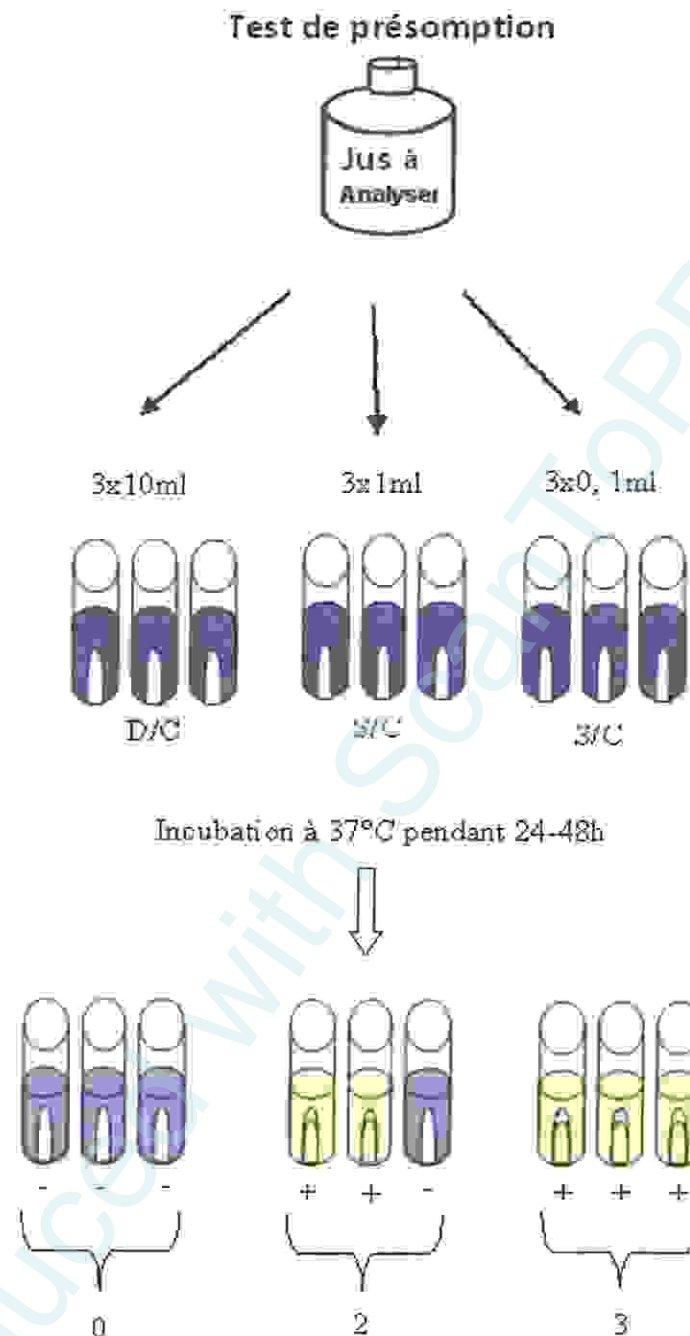
• **Lecture**

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune
- Un dégagement de gaz (supérieur au 1/10ème de la hauteur de la cloche),

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites. (Labres *et al.*, 2008).

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP. (AnnexeII)



**Figure 04 : Recherche et dénombrement des coliformes totaux**

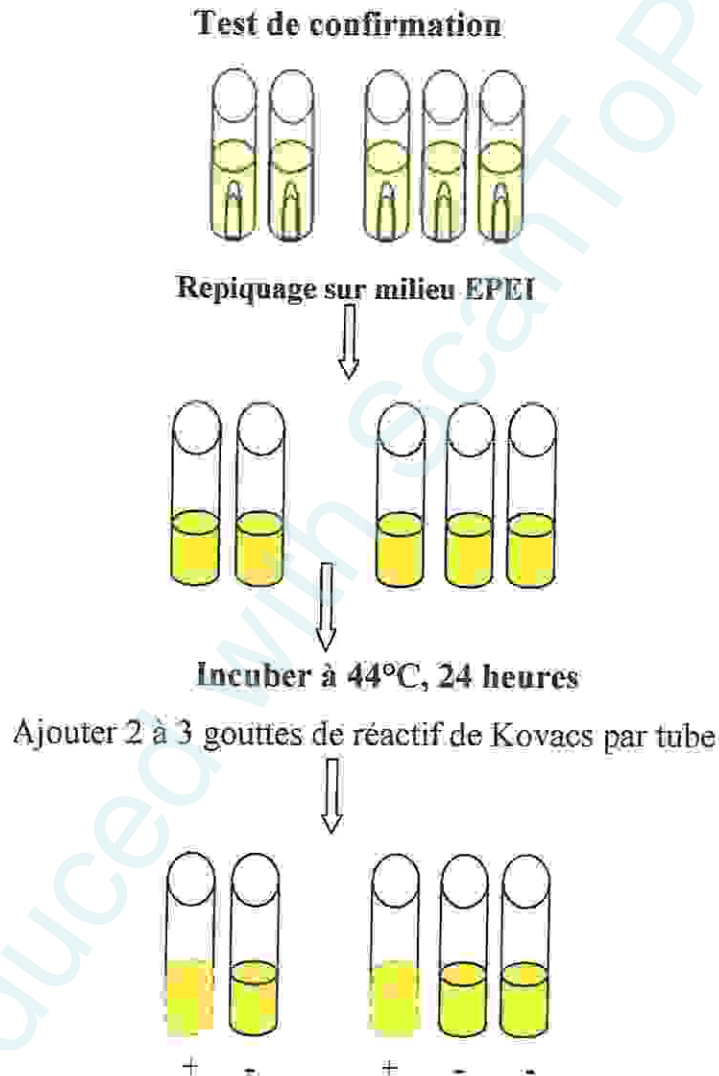
➤ **Test confirmatif**

Les coliformes thermo tolérants ont les mêmes propriétés que les coliformes mais à  $44 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les *Escherichia coli* sont des coliformes thermo tolérants ayant la particularité de produire de l'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu à  $44 \pm 1^\circ\text{C}$ . (Amor Abda, 2009).

- **Principe**

Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes feront l'objet d'un repiquage dans des tubes contenant l'eau péptonée exempte d'indole, après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif Kovacs.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table NPP (Annexe II) en tenant compte du fait qu'*E.coli* est producteur d'indole à 44°C après incubation pendant 24h.



**Figure 05: Test de confirmation des coliformes fécaux**

- **Lecture**

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après l'addition de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs. (Labres *et al.*, 2008).

**Remarque**

Etant donné que les coliformes fécaux thermotolérants font partie des coliformes totaux, il est pratiquement impossible de trouver plus de coliformes fécaux que de coliformes totaux. Les résultats sont exprimés en UFT par 100ml de jus analysé. (Labres *et al.*, 2008).

**4.2. Dénombrement des streptocoques fécaux**

Cette méthode de référence, consiste en la recherche et le dénombrement des entérocoques intestinaux ou streptocoques du groupe « D », nommés aussi streptocoques fécaux .

• **Principe**

La recherche et le dénombrement des streptocoques du groupe « D » dans les jus, en milieu liquide, se fait en deux étapes consécutives :

- ✓ Le test de présomption pour la recherche présomptive des Streptocoques fécaux.
- ✓ Le test de confirmation pour la confirmation réelle des Streptocoques fécaux du groupe « D ». (Labres *et al.*, 2002).

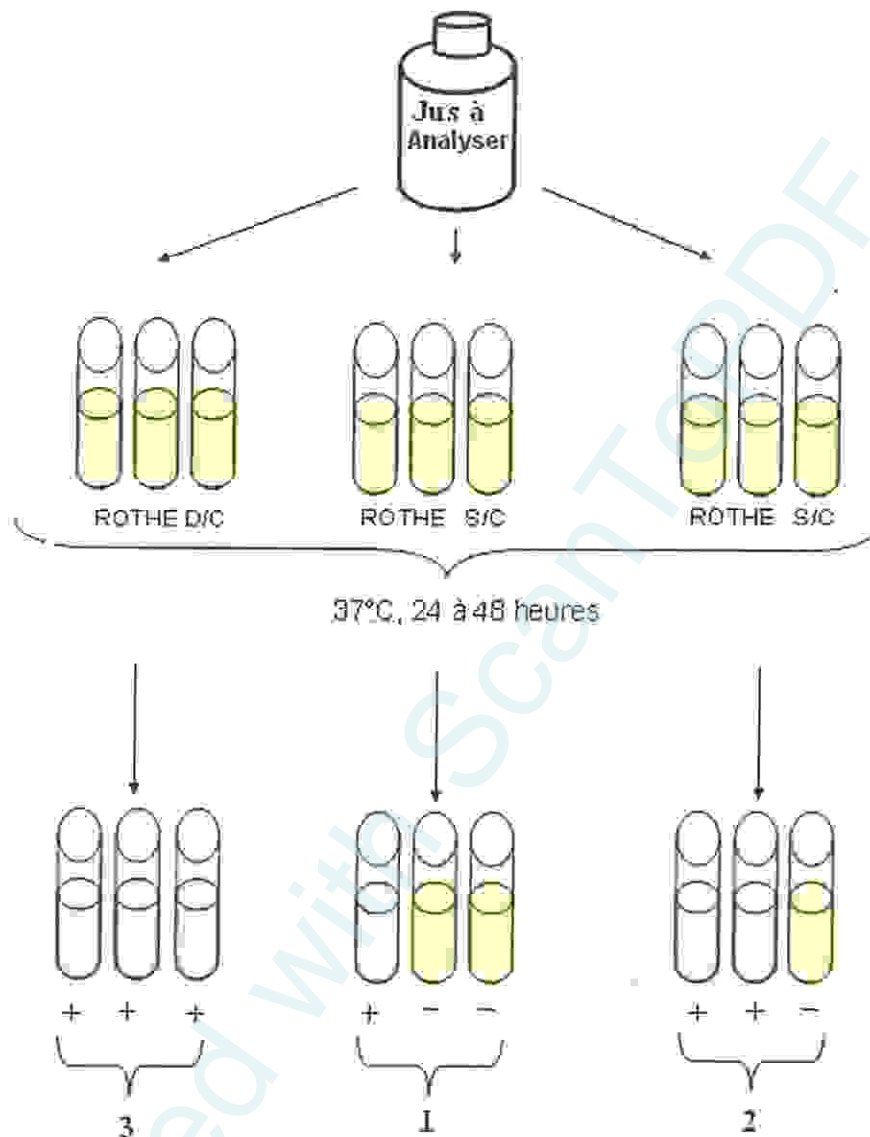
➤ **Test de présomption**

On réalise 03 séries à raison de 03 tubes pour chaque série :

- 3 tubes contenant 10 ml de milieu Roth D/C avec 10 ml de l'échantillon.
- 3 tubes contenant 10 ml de milieu Roth S/C avec 1 ml de l'échantillon.
- 3 tubes contenant 10 ml de milieu Roth S/C avec 0.1 ml de l'échantillon. (fig.O6)

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures. (Labres *et al.*, 2008).





**Figure 06: Test présomptif des streptocoques fécaux**

- **Lecture**

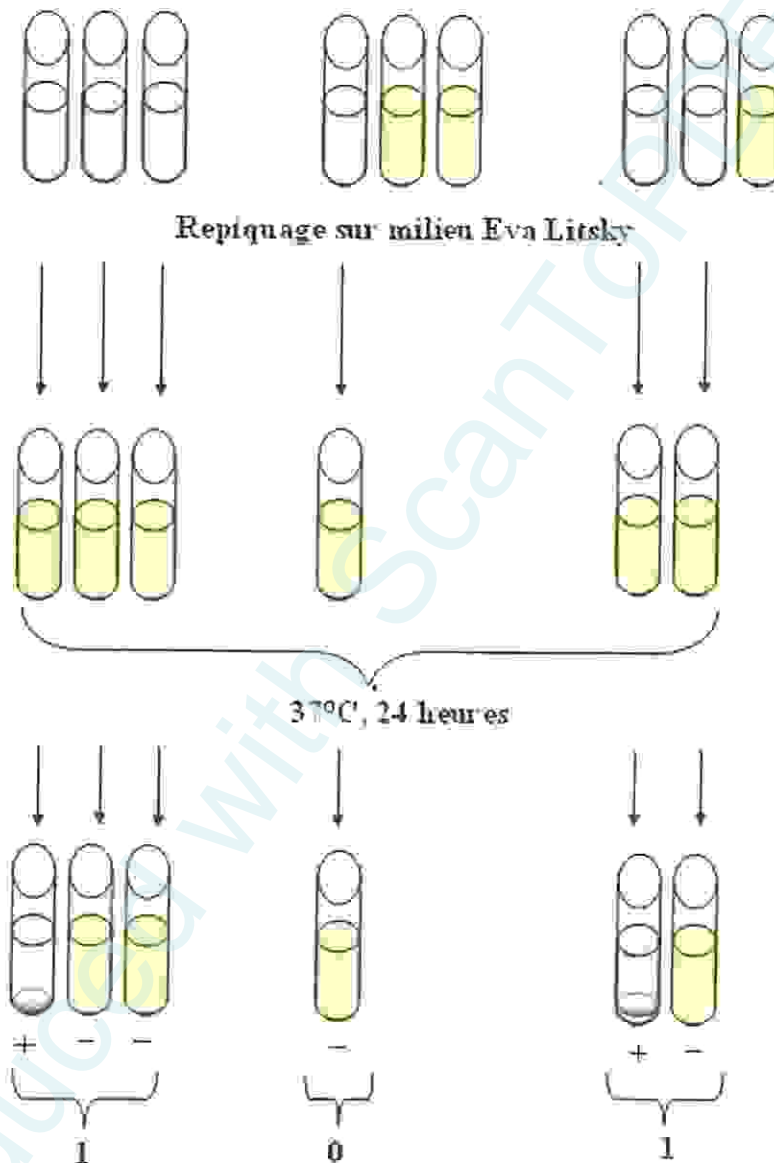
Les tubes présentant un trouble microbien pendant cette période sont présumés contenir les streptocoques fécaux et sont soumis au test confirmatif.

- **Test de confirmation**

Le test de confirmation est basé sur la confirmation de la présence des streptocoques fécaux éventuellement présents dans le test de présomption.

Les tubes de Rothe trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage dans un tube contenant le milieu Eva litsky.

L'incubation se fait à 37°C, pendant 24 heures. (Labres *et al.*, 2008).



**Figure 07 : Test de confirmation des streptocoques fécaux**

• **Lecture**

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien,
- Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP (AnnexeII). (Labres *et al.*, 2008).

### 4.3.Dénombrement des germes mésophiles

- **Principe**

A partir de jus à analyser (échantillon mère) et la dilution décimales  $10^{-1}, 10^{-2} \dots$  on porte aseptiquement 1 ml en double dans deux boites de Pétri vides, numérotées et préparées à cet usage comme l'indique la figure 07.

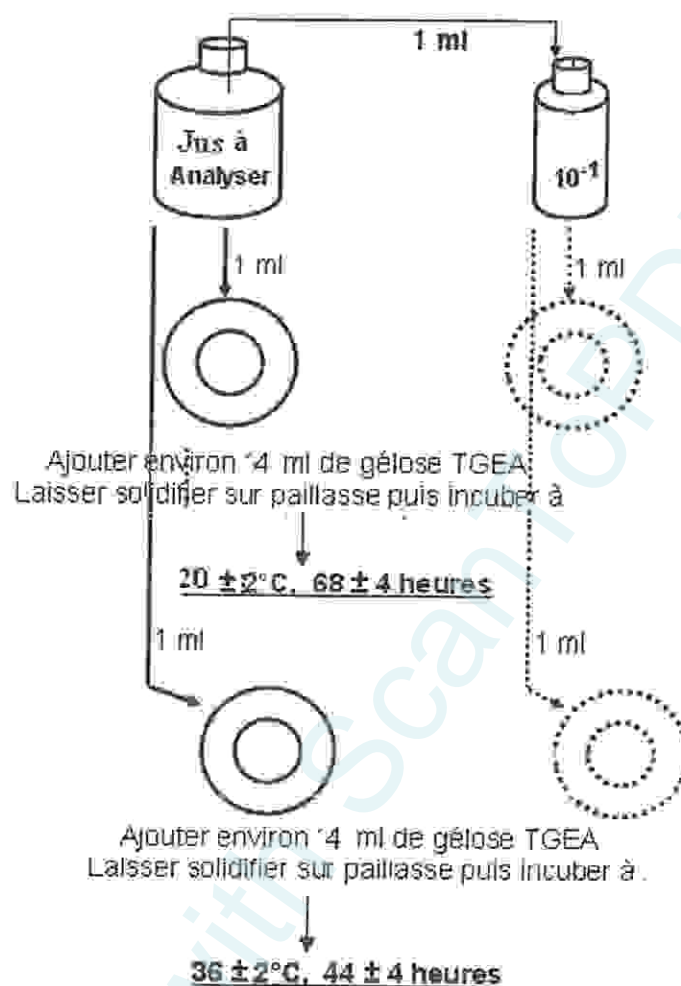
On complète ensuite avec environ 4 ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à  $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Le temps qui s'écoule entre le moment où on a distribué l'inoculum dans la boite et celui où le milieu est coulé ne doit pas excéder 15 minutes.

Ensuite on fait des mouvements circulaires et de va-et-vient sur une surface horizontale pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose.

On laisse solidifier les boites sur la pailleasse.

Les boites seront partagées en deux séries distinctes :

- La première série sera incubée à  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 72 heures,
- La seconde série sera incubée à  $37^{\circ}\text{C}$ , pendant 72 heures.



**Figure 08 : Recherche et dénombrement des germes mésophiles à 20 et à 37°C**  
(Labres *et al.*, 2008)

- **Lecture et interprétation**

Les colonies des germes mésophiles apparaissent en masse sous formes lenticulaires et bien distinctes. On retient les boîtes contenant moins de 300 colonies, au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies.

On calcule ensuite la valeur du nombre  $\underline{N}$ , de microorganismes à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  à part et celle du nombre  $\underline{N}$  de microorganismes à  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  à part, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma c}{1,1 \times d}$$



Où :

$\Sigma c$  : est la somme des colonies dénombrées sur deux boîtes de dilutions successives retenues.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

#### Remarque

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs après la virgule.

(Labres *et al.*, 2008).

#### 4.4. Recherche et dénombrement des clostridium sulfito- réducteurs

- Principe

Le dénombrement des Clostridium sulfito-réducteur se fait par incorporation d'un échantillon après destruction des formes végétatives des bactéries (par un chauffage approprié à 80°C pendant 10 minutes) dans un milieu de culture (viande de foie), contenant 1ml du sulfite de sodium et 4 gouttes de sels de fer.

- L'incorporation se fait dans un tube bien fermé et non dans une boîte afin de limiter la surface de contact entre le milieu et l'air.
- Après solidification et incubation, la présence de germes sulfito-réducteurs se traduit par un halo noir autour des colonies. Le dénombrement des colonies, se réalise après incubation pendant 24h et ou 48h à 37 °C, sous anaérobiose. (Fig.09) (Margat et Vallée, 1999).

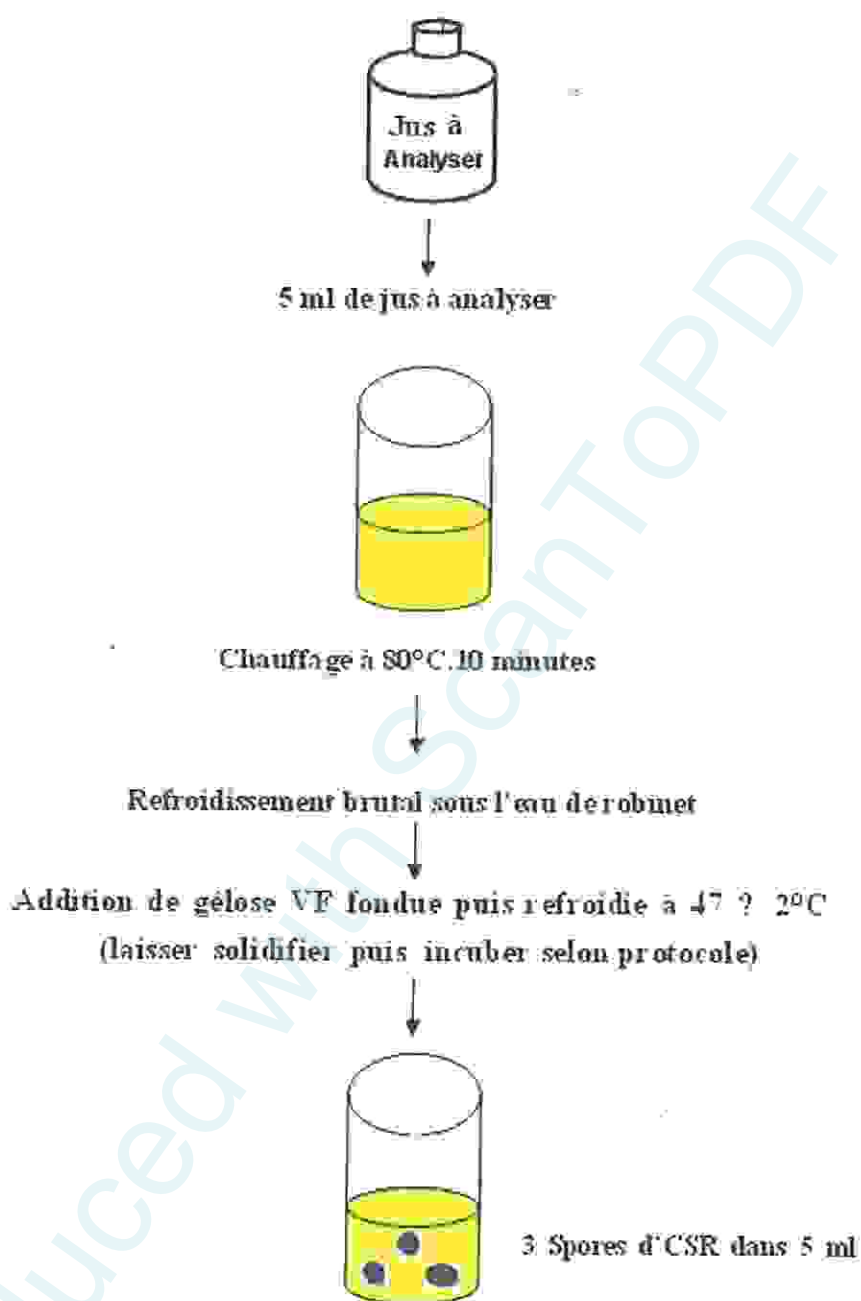


Figure 09: Recherche et dénombrement des clostridium sulfite-réducteurs

#### 4.5. Méthode d'ensemencement sur gélose

Les géloses employées sont GN, Chapman, Mac conkey, Héctoën, Sabouraud ; l'ensemencement se fait par des stries sur des boîtes de Pétris est pratiqué le plus souvent dans un but d'isolement. L'inoculum est prélevé directement à partir de jus à analysé est déposé sur

un point périphérique de la gélose puis disséminé par des stries sur toute la surface, les boîtes sont marquées puis incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

#### **4.5.1. Examen microscopique après coloration de Gram**

A partir des colonies suspectes isolées sur les milieux de culture précédents, on a réalisé une coloration de Gram.

##### **➤ Principe de la coloration**

La coloration de Gram ou coloration différentielle s'effectue de la manière suivante

- Préparation d'un frottis bactérien
- Coloration par le violet de Gentiane et on le laisse agir la solution de cristal violet pendant une minute.
- Mordançage : on laisse agir le lugol pendant une minute et on rince à l'eau.
- Décoloration : on laisse agir l'alcool pendant 30 secondes puis on rince à l'eau.
- Recoloration : on laisse agir la solution de fushine pendant 30 à 40 secondes, on lave à l'eau et on sèche à la flamme du bec bunsen ; on ajoute une goutte de l'huile de cèdre puis on examine à l'immersion.

#### **4.5.2. Identification biochimique**

##### **La galerie Api 20 E**

##### **➤ But**

La galerie Api 20 E est un système pour l'identification des entérobactériaceae et autre bacilles Gram -, utilisant 20 tests biochimique standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

##### **➤ Principe**

La galerie Api 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratés. Les tests inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition du catalogue analytique Api 20 E.

##### **➤ Mode opératoire**

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes

- On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et on répartit environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- On remplit les tubes et cupules des tests [CIT], [VP], [GEL], avec la suspension bactérienne

- On remplit uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- On crée une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S, en remplissant leur cupule avec l'huile de paraffine.
- la galerie sera incubée à 37 °C pendant 18 à 24 heures.



Figure 10 : Galerie Api20E

➤ **Résultats :**

Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées, ensuite réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : test **VP**, **TDA**, **IND**...

➤ **Identification :**

Avec le tableau d'identification on compare les résultats affichés sur la fiche des résultats avec celles du tableau ; chaque cellule de ce tableau contient le pourcentage de positivité.

Avec le catalogue analytique: les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1ou2ou4) est positive suivant l'ordre de l'emplacement de la cupule dans le groupe, ensuite on obtient un nombre de 7chiffres qui sert de code d'identification (Fig.11).

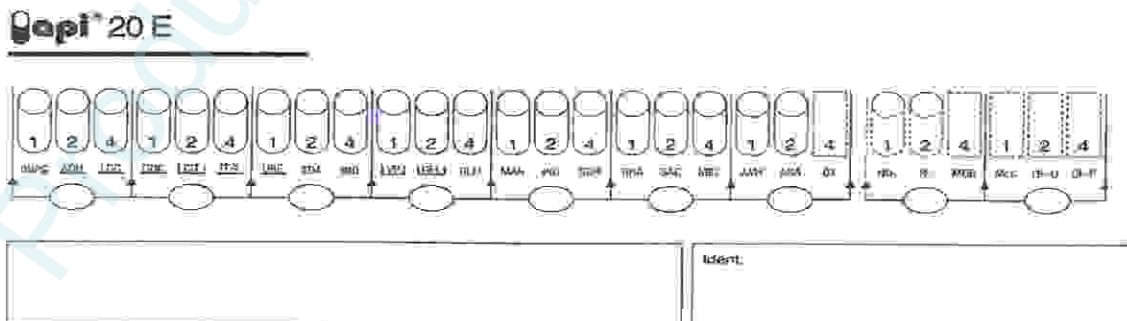


Figure 11 : Fiches technique des résultats de l'API20E



### Tests complémentaires

- **Recherche de l'oxydase:**

Le terme d'oxydase désigne une enzyme recherchée en bactériologie systématique. La présence d'oxydase serait liée à celle dans la chaîne respiratoire du complexe enzymatique cytochrome-oxydase. Certains bactériologistes préfèrent parler de cytochrome-oxydase plutôt que d'oxydase (Rodier, 1984), (6).

La recherche de l'oxydase s'effectue avec des disques prêts à l'emploi du commerce. Déposer le disque sur une lame porte-objet, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile et écraser la colonie testée sur le disque. La présence d'une oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette (fig.13) (Rodier, 1984).

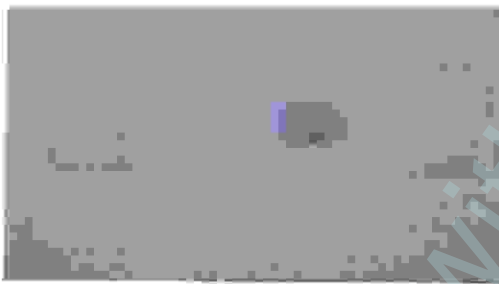


Figure 12 : Test d'oxydase négatif

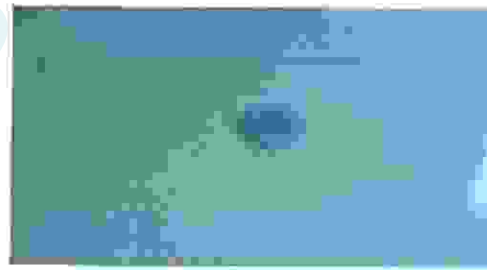


Figure 13 : Test d'oxydase positif

- **Test à la catalase**

Placer séparément deux gouttes d'une solution de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  sur une lame de microscope. Prélever une demi-colonie avec une tige de verre (pipette Pasteur) et l'émulsionner doucement dans une des deux gouttes.

Observer immédiatement et après 5 minutes s'il y a apparition (catalase positive) ou absence (catalase négative) de bulles d'oxygène. Dans le cas où il y a doute, recouvrir chacune des gouttes avec lamelle de microscope et comparer l'apparition des bulles sous les deux lamelles. Les observations peuvent se faire macroscopiquement ou à l'aide d'un microscope à faible grossissement. (Fig.14).

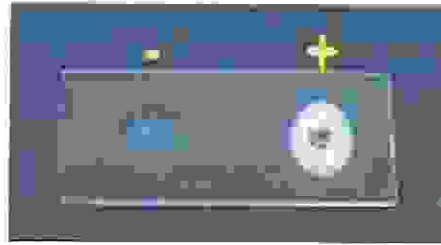


Figure 14 : Lecture de la catalase

- **Test à la coagulase libre**

Après incubation, prendre aseptiquement une demi-colonie dans un tube stérile à hémolysé contenu 0,3 ml de plasma de lapin (ou de l'homme), et incuber de nouveau à  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 2 à 6 h.

Examiner la coagulation du plasma de lapin sinon ré-incuber et examiner de nouveau à  $20 \pm 4$  heures.

Considérer que la réaction à la coagulase est positive quand le coagulum occupe plus des trois quart du volume initialement occupé par le liquide. (Fig.15). (Labres *et al.*, 2008)

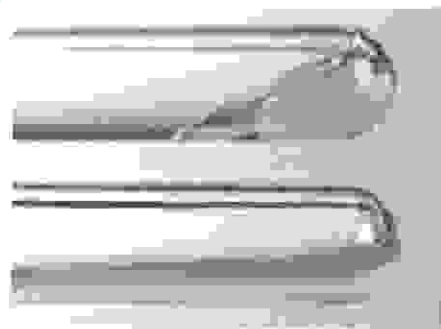


Figure 15 ; Lecture de la coagulase

Le tableau suivant résume quelques caractères biochimiques de différentes espèces de Staphylocoques (Tab.10):

Tableau 10 : Les principaux staphylocoques isolés en microbiologie [15]

Staphylocoque	<i>aureus</i>	<i>Intermedius</i>	<i>saprophyticus</i>	<i>epidermitis</i>
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	+	-	-
Mannitol	+	-	-	-

# ***CHAPITRE IV***

## ***Résultats et discussion***

Produced with Scan PDF

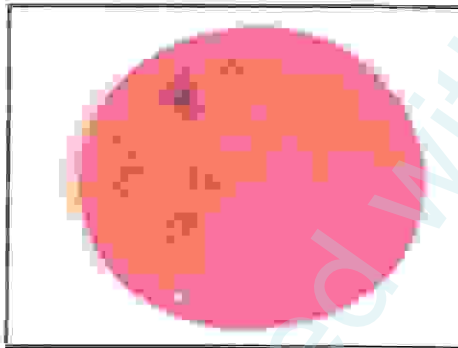
### 1. Résultat de la recherche

Après incubation, les résultats de la lecture de toutes les boîtes sont représentés dans le tableau 11 et les figures 16,17et 18.

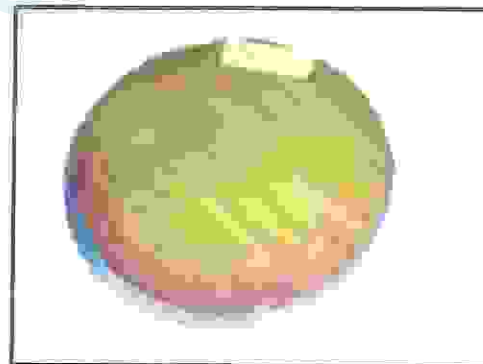
**Tableau 11: Résultat de l'ensemencement des milieux de cultures utilisés**

Milieu de culture/prélèvement	GN	Chapman	Mac Conkey	Hectoen	Sabouraud
Echantillon 1	-	+	-	-	-
Echantillon 2	-	-	-	-	-
Echantillon 3	+	+	-	-	-
Echantillon 4	-	-	-	-	-
Echantillon 5	-	-	-	-	-

(+) : Culture positive ; (-) : Culture négative.



**Figure16: Résultat de l'ensemencement de l'échantillon 01 sur Chapman**



**Figure17 : Résultat de l'ensemencement de l'échantillon 03 sur Chapman**



**Figure 18 : Résultat de l'ensemencement sur gélose nutritive**



## 2. Examen microscopique après coloration de Gram

Pour toutes les cultures positives, nous avons réalisés des colorations différentielles de Gram, nous avons distingué deux types de cellules bactériennes à partir de toutes les colonies prélevées comme le montre le tableau 11 et les figures 19 et 20.

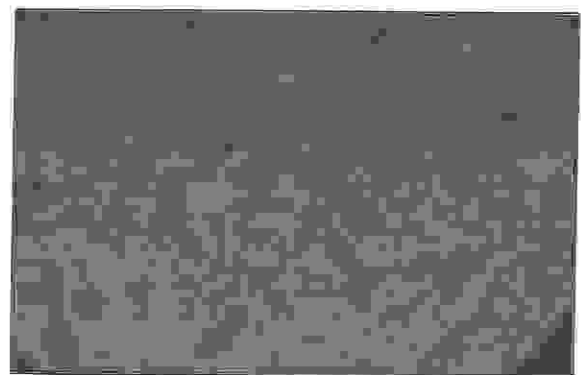
**Tableau 12 : Résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram**

Echantillon	Milieu de culture	Présence ou absence	Coloration de Gram	Forme
Echantillon 1	GN	A	/	/
	Chapman	P	G+	cocci
	Mac Conkey	A	/	/
	Hektoen	A	/	/
Echantillon 2	GN	A	/	/
	Chapman	P	G+	cocci
	Mac Conkey	A	/	/
	Hectoen	A	/	/
Echantillon 3	GN	P	G-	cocobacilles.
	Chapman	P	G+	Cocci
	Mac Conkey	A	/	/
	Hectoen	A	/	/

/ : Analyse non effectuée



**Figure 19 : Observation microscopique des cocci Gram +**



**Figure 20: Observation microscopique des cocobacilles Gram-**

### 3. Résultats de dénombrement bactérien

Après comparaison avec la table de Mac Crady (NPP) les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau 13 : Résultats du dénombrement bactérien**

Echantillon	Nombre de bactérie sur BCPL (UFT/100ml)	Nombre de bactérie sur ROTHE (UFT/100ml)
Echantillon 1	0	0
Echantillon 2	0	0
Echantillon 3	0	0
Echantillon 4	0	0
Echantillon 5	0	0

UFT : unité formant trouble

### 4. Résultats des tests confirmatifs

**Tableau 14 : Identification des espèces des cultures positives**

Echantillon	Coloration	Coagulase	Catalase	Oxydase	Manitol	Résultats
Echantillon 1	G+	-	-	-	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Echantillon 2	/	/	/	/	/	/
Echantillon 3	G+	-	+	-	+	<i>Staphylococcus intermedius</i>
Echantillon 4	/	/	/	/	/	/
Echantillon 5	/	/	/	/	/	/

### 5. Résultats de la galerie Api 20E



**Figure 21 : La galerie Api 20 E après incubation**

- **Lecture**

Après comparaison des résultats avec le catalogue analytique, on est arrivé à identifier l'espèce *Pantoae* spp2 (cocobacilles G-). Elle vit naturellement sur les arbres fruitiers et elle est utilisée comme agent microbien de la lutte antiparasitaire [14].

## **6. Discussion**

D'après les résultats obtenus nous pouvons déduire que les échantillons analysés 01 et 03 ne sont pas consommables mais ces résultats peuvent être erronés à cause des contaminations au cours de la manipulation. D'autre part l'existence de l'espèce *Pantoae* spp dans l'échantillon 03 n'altère pas la qualité de jus car elle ne produit pas de métabolites toxiques pour le consommateur.

# ***Conclusion***

Produced with ScanTOPDF

## Conclusion

La salubrité des aliments est principalement garantie par un contrôle à la source, ainsi que par une vérification du plan et du procédé de fabrication et l'application de bonnes pratiques en matière d'hygiène pendant la production, le traitement, la manutention, la distribution, l'entreposage, la vente, et l'utilisation, en association avec la mise en œuvre du système HACCP. Cette approche préventive offre davantage de garanties que l'analyse microbiologique, car cette dernière n'a qu'une efficacité limitée pour évaluer la salubrité des aliments.

Les producteurs devraient favoriser une prévention continue des problèmes, leur détection et leur correction plutôt que de se fier uniquement sur l'évaluation du produit fini pour assurer la salubrité des aliments. Les exploitants d'entreprise alimentaire peuvent maîtriser des dangers alimentaires spécifiques s'ils :

- déterminent quels sont ces dangers;
- établissent les étapes dans leurs opérations qui sont critiques pour la salubrité du jus;
- appliquent des procédures de contrôle efficaces à ces étapes en déterminant les limites critiques;
- surveillent les méthodes de contrôle pour s'assurer qu'elles continuent d'être efficaces;
- établissent des procédures de correction des écarts susceptibles de se produire dans les limites critiques;
- examinent les procédures de contrôle et les registres périodiquement et vérifient si les procédures sont efficaces ;
- établissent des dossiers à l'égard des points critiques.

Dans le cas des jus, lorsque le produit brut est cultivé sur place, les étapes de la fabrication du produit devraient comprendre les activités à la ferme. Dans le cas d'un établissement de transformation, les étapes devraient commencer avec l'arrivée du produit qui est accepté à l'installation. L'application des pratiques communes et de mesures spécifiques de maîtrise de risques pendant tout le cycle de production de jus réduira la probabilité que la salubrité du produit fini puisse être menacée.

En se qui concerne la conservation et la manipulation du produit fini, le jus devrait être entreposé, manipulé et transporté de façon à ce que toute condition



requis pour maintenir la salubrité du produit fini soit respectée et à ce que l'identification du lot soit maintenue. L'identification des lots devrait être maintenue afin de permettre une rotation appropriée des produits et, au besoin, le rappel du lot. Lorsque la température est un facteur agissant sur la salubrité des aliments, le jus devrait être conservé à cette température. Les exploitants qui entreposent, manipulent ou transportent des produits devraient avoir l'information nécessaire pour maintenir la salubrité du produit et être en mesure de démontrer que toute condition exigée est satisfaite. La documentation sur l'identification du lot, la quantité, la source, les dates d'arrivée, les dates de sortie, les destinations et la température le cas échéant doit être conservée.

*Références*

*bibliographiques*

Produced with ScantOPDF

**Références bibliographiques**

- **Ait Abdelouahab N. (2007).** Microbiologie alimentaire. *OPU*. 60p
- **Anonyme. (1971).** Les nouveaux procédés mécanisés et continus dans l'industrie alimentaire. *APRIA*. 29-37.
- **Bembinet J., Duquenoy A. et Trystram G. (2007).** Génie des procédés alimentaires. *DUNOD*. 12-19.
- **Benamara S. et Aougou A. (2003).** Production des jus alimentaires. *OPU*. 87P.
- **Bourgeois C.M. et Leveau J.Y. (1980).** Techniques d'Analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaire. *APRIA*. 331p.
- **Debatisse M. (1980),** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. *APRIA*. 53,56p
- **Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. *Dunod*. 615p.
- **Lebres E., Azizi D. et Boudjellab B. (2006).** Cours d'Hygiène et de Microbiologie des Eaux: Microbiologie des eaux et des boissons. *IPA*. 37p.
- **Lebres E., Azizi D., Hamza A., Taleb F. et Taouchichef B. (2002).** Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments microbiologie des eaux, des boissons et des produits de la mer. *IPA*. 49p.
- **Lebres et Mouffok .( 2008).** Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel de travaux pratiques des eaux. *IPA*. 53p.
- **Leyral G. et Vierling E. (2001).** Microbiologie et toxicologie des aliments. *DOIN*. 273P
- **Margat J. et Vallée D. (1999).** Ressources en eau et utilisations dans les pays méditerranéens : Repères et statistiques. *Plan bleu*. 200p.
- **Rodier J. (1984).** L'analyse des eaux, naturelles, eaux résiduaires. *Dunod*. 1365p.
- **Roux (2003).** TP de microbiologie : Analyses de l'eau. *Novello Célia*. (3). 1-9.

**Webographie**

- [01] <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/X8626F/x8626f0a.htm> (10/04/2010).
- [02] [http://209.85.129.132/search?q=cache:a0EGXPYriJUU:ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/x6732f/x6732f11.pdf+la+fabrication+des+jus\(FAO\)&cd=1&hl=fr&ct=clnk&gl=fr](http://209.85.129.132/search?q=cache:a0EGXPYriJUU:ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/x6732f/x6732f11.pdf+la+fabrication+des+jus(FAO)&cd=1&hl=fr&ct=clnk&gl=fr) (18/03/2010).
- [03] <http://atelierjusdefruit.over-blog.com/categorie-10794816.html> (23/05/2010).
- [04] <http://atelierjusdefruit.over-blog.com/ext/http://www.unijus.org.htm> (23/05/2010).
- [05] [http://www.doctissimo.fr/html/nutrition/mag\\_2002/mag0816/nu\\_5788\\_jus\\_fruits.htm](http://www.doctissimo.fr/html/nutrition/mag_2002/mag0816/nu_5788_jus_fruits.htm) (09/06/2010).
- [06] [http://www.cnta.es/fr/servicios\\_analiticos/zumos.htm](http://www.cnta.es/fr/servicios_analiticos/zumos.htm) (23/05/2010).
- [07] <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/X8626F/x8626f0a.htm> (10/04/2010).
- [08] [http://www.fastonline.org/CD3WD\\_40/CD3WD/FOODPROC/H2707F/FR/B130\\_8.HTM](http://www.fastonline.org/CD3WD_40/CD3WD/FOODPROC/H2707F/FR/B130_8.HTM) (21/05/2010).
- [09] [http://www.internetobservatory.be/organization\\_market/metrology/showole\\_FR.asp?cParam=3416](http://www.internetobservatory.be/organization_market/metrology/showole_FR.asp?cParam=3416) (06/03/2010).
- [10] <http://www.plein-fruit.com/29-nutrition-jus-de-fruits-sill> (21/05/2010).
- [11] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Pasteurisation> (06/03/2010).
- [12] [http://www.fastonline.org/CD3WD\\_40/CD3WD/FOODPROC/H2707F/FR/B130\\_5.HTM](http://www.fastonline.org/CD3WD_40/CD3WD/FOODPROC/H2707F/FR/B130_5.HTM)  
[technologiesosmosys.com/clarification-agro-alimentaire.html](http://technologiesosmosys.com/clarification-agro-alimentaire.html) (23/05/2010).
- [13] <http://www.asept.fr/pages/autres-documents/document-omsfao.php> (06/06/2010).
- [14] <http://translate.google.fr/translate?hl=fr&langpair=en%7Cfr&u=http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Juice/ucm072557.htm> (07/06/2010).
- [15] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus> (06/06/2010).
- [16] [http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/pest/\\_decisions/rd2009-08/index-fra.php](http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/pest/_decisions/rd2009-08/index-fra.php) (06/06/2010).

# ***Résumés***

Produced with ScantOPDF



## **Résumé**

L'industrie des jus de fruits constitue une branche d'activité très vaste. Elle englobe toutes les activités allant de la production brute à l'approvisionnement du consommateur, en passant par le conditionnement, la distribution et l'entreposage des produits finis. Pour cela le contrôle microbiologique est essentiel pour assurer la sécurité et la qualité de ces produits.

L'objectif de cette étude est de vérifier la salubrité des jus et des nectars commercialisés en Algérie (contrôle préventifs). Cependant, les premiers résultats bien que satisfaisants demeurent incomplets pour juger de la vraie salubrité des produits analysés. Ce contrôle doit se faire sur les conditions de fabrication du produit même tout le long de la chaîne de fabrication.

## **Mots clés :**

Qualité bactériologique, jus, nectars de fruits, contrôle bactériologique, altération, HACCP, *Staphylococcus saprofiticus*, *Staphylococcus intermidus*

Produced with Scantopdf

**Abstract**

The industry of fruit juice is a huge industry. It encompasses all activities ranging from gross output to supply the consumer through the packaging, distribution and storage of finished products. For this microbiological control is essential to ensure the safety and quality of these products.

The objective of this study is to verify the safety of juices and nectars market in Algeria (preventive control). However, although satisfactory early results remain incomplete to judge the true health of the products analyzed. This should be tested on the conditions of manufacture of the product itself all along the production line.

**Keywords :**

Bacteriological quality, juices, fruit nectars, bacteriological control, alteration, HACCP, *Staphylococcus saprophiticus*, *Staphylococcus intermidus*.

Produced with Scantopdf

## ملخص

صناعة عصير الفواكه هي صناعة ضخمة. وهو يشمل جميع الأنشطة التي تتراوح بين الإنتاج الإجمالي لتزويد المستهلك ، من خلال التعبئة والتغليف والتوزيع والتخزين للمنتجات تامة الصنع. لعنصر التحكم هذا الميكروبيولوجية أمر ضروري لضمان سلامة وجودة هذه المنتجات. والهدف من هذه الدراسة هو التحقق من سلامة العصائر وسوق العصائر في الجزائر (المكافحة الوقائية). ومع ذلك ، على الرغم من أن النتائج الأولية مرضية لا تزال غير مكتملة للحكم على صحة تحليلها الحقيقي. وينبغي اختبار هذا عن شروط تصنيع المنتج نفسه على طول خط الإنتاج.

## كلمات مفتاحية:

الجودة البكتريولوجية والعصائر والعصائر الفواكه ، ومراقبة الجرثومية والتعديلات ونظام تحليل المخاطر ،

*Staphylococcus saprofiticus*, *Staphylococcus intermidus*

# *Annexe I*

Produced with ScantOPDF

**Table A : Indice NPP : Combinaisons de résultats positifs obtenues avec : 3 portions de 10 ml, 3 portions de 1 ml, 3 portions de 0.1 ml**

Nombre de tubes donnant une réponse +			INDICE NPP
3 tubes de 10 ml	3 tubes de 1 ml	3 tubes de 0.1 ml	
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	2
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	29
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	1400



# *Annexe II*

Produced with ScantOPDF

## Composition des milieux de culture et des réactifs

### I. Milieux de culture

#### • Milieux liquides

##### ➤ B.C.P.L (bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol)

La gélose BCP est employée pour la recherche et le dénombrement de coliformes. Ces derniers, en fermentant le lactose, provoquent le virage de l'indicateur colorée et la production de gaz dans la cloche. En effet la fermentation du lactose se manifeste par une production d'acide qui provoque le virage du bromocrésol pourpre au jaune. Ce milieu ne contient pas d'agent sélectif (hormis le lactose), cette méthode n'est donc pas spécifique ; elle est dite présomptive. Tous les tubes présentant fermentation du lactose avec gaz, sont susceptibles de contenir des coliformes. Ils doivent être retenus pour les tests confirmatifs de l'analyse.

##### ✓ Formule (en gramme par litre d'eau distillée)

Peptone .....	5 g / l.
Extrait de viande .....	3 g / l.
Lactose .....	5 g / l.
Pourpre de bromocrésol .....	0,025 g / l.
pH final .....	6,9.

##### Préparation :

Mettre 12g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée. Mélanger soigneusement jusqu'à dissolution complète. Ajuster, si nécessaire, le pH à 6,9. Répartir en tubes, avec cloche de Durham, à raison de 10 ml par tube. Stériliser à l'autoclave à 115 ° C pendant 20 minutes.

##### ➤ Rothe

Le milieu de Rothe est utilisé pour la recherche et le dénombrement des streptocoques fécaux. Il est constitué de :

Azide de sodium : Sélectif des streptocoques.

Hydrolisat trypsique de caséine : Source d'azote.

Peptone bactériologique : Source d'azote.

Glucose : Source de carbone.

NaCl : pression osmotique.

Phosphate dipotassique et phosphate monopotassique : détermine le pH.

Les tubes présentant un trouble bactérien après incubation seront considérés comme pouvant contenir des streptocoques fécaux. Ils seront obligatoirement soumis au test confirmatif à l'aide du bouillon Litsky.

#### ➤ **Bouillon de Eva LITSKY**

##### **Formule (en gramme par litre d'eau distillée)**

- Polypeptone.....	20,0 g
- Glucose.....	5,0 g
- Chlorure de sodium .....	5,0 g
- Phosphate monopotassique .....	2,7 g
- Phosphate dipotassique .....	2,7 g
- Azide de sodium .....	0,3 g
- Ethyl-violet .....	0,5 mg

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,8 ± 0,2.

##### **Préparation**

Mettre en solution 35,7 g de milieu déshydraté (BK061) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes à raison de 10 ml par tube.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

(Pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

#### • **Milieux solides**

##### ➤ **Gélose nutritive**

La gélose nutritive est un milieu qui convient à la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières.

##### **Formule (en grammes par litre d'eau distillée)**

Peptone .....	5 g / l.
Extrait de viande .....	1g/ l.
Extrait de levure .....	2g/l.
Chlorure de sodium .....	5g / l.
Agar .....	15g .
pH .....	7,4 ( environ ).

### Préparation

Verser 28 g dans un litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

➤ **Milieu de Chapman** : Le milieu de Chapman mannité est un milieu sélectif pour la culture des staphylocoques

### Formule (en gramme par litre d'eau distillée)

Peptone bactériologique.....	10 g / l.
Extrait de viande de bœuf .....	1 g / l.
Chlorure de sodium .....	75 g / l.
Mannitol.....	10 g / l.
Rouge de phénol.....	0,025 g / l.
Agar.....	15 g / l.
pH .....	7,5 (environ).

### Préparation

Verser 111 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes.

### ➤ Milieu de Mac Conckey

L'utilisation de ce milieu est recommandée pour isoler et numérer les entérobactéries dans les eaux, le lait, les matières alimentaires, les urines. Il peut aussi être utilisé pour la recherche, dans les matières fécales, des *Salmonella*, *Shigella* et des *E. coli* entéropathogènes pour le nourrisson.

### Formule (en gramme par litre d'eau distillée)

Peptone bactériologique .....	20 g / l.
Sels biliaires .....	1,5 g / l.
Chlorure de sodium .....	5 g / l.
Lactose.....	10 g / l.
Rouge neuter.....	0,03 g / l.
Cristal violet .....	0,001 g / l.
Agar .....	15 g / l.
pH .....	7,1 (environ).

## Préparation

Verser 51,5 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes. Liquefier au bain-marie bouillant et couler en boîtes de Pétri. Après solidification, laisser sécher à l'étuve à 37°C (couvercle entrouvert).

### ➤ Gélose Hektoen

La gélose Hektoen est un milieu de choix pour l'isolement des entérobactéries pathogènes :

- La présence d'extrait de levures et de sucres, et la qualité des peptones favorisent la croissance des *Salmonella* et des *Shigella* même fragiles.
- Des sels biliaires assurent le pouvoir sélectif en limitant le développement des coliformes et des *Proteus*.
- L'orientation de l'identification des bactéries isolées est fondée sur l'attaque de trois sucres, le lactose, la salicine et le saccharose, permettant un repérage plus précis des *Salmonella* et des *Shigella* qui n'attaquent aucun de ces sucres
- Deux indicateurs permettent de visualiser la réaction :
  - ✓ Le bleu de bromotymol qui vire au jaune à l'acidité
  - ✓ La fuchsine qui se colore en présence d'aldéhyde (d'où une teinte saumonée si la souche utilise l'un ou plusieurs des sucres présents)
- Une différenciation supplémentaire reposant sur la production d'H<sub>2</sub>S est également possible grâce à la présence de thiosulfate et de citrate de fer : elle se traduit par des colonies à centre noir, coloration due à la formation de sulfure de fer.

**Observation :** Croissance de colonies noires plates témoignant de la production d' H<sub>2</sub>S dans un milieu bleu témoignant une basification conséquence de l'utilisation des peptones.

### ➤ Gélose Sabouraud

#### Composition

- Peptone..... 10 g
- Glucose massé..... 20 g
- Agar-agar..... 15 g
- Eau distillée (qsp)..... 1 000 mL
- vitamines et facteurs de croissance



## Caractéristiques

Naturellement acide, il inhibe la croissance de nombreuses bactéries. Additionné de chloramphénicol à 0,5 g/l ou de gentamicine à 0,04 g/l, il inhibe une grande partie des bactéries permettant la sélection des levures et moisissures. L'addition d'actidione (cycloheximide) à la concentration de 0,5 g/l permet la sélection de moisissures et levures pathogènes. L'addition de chlorure de triphényl 2-3-5-tétrazolium (TTC) (à 0,1 g/l) permet la différenciation des levures du genre *Candida*. En effet, le TTC peut être réduit par certaines levures en produits colorés.

## II. Les réactifs

➤ **Réactif kowacks** : la mise en évidence de la production d'indole :

Paradiméthylamino-benzaldéhyde .....	5g
Alcool amylique .....	75ml
Hcl pur .....	25ml

➤ **Réactif TDA** : Pour la recherche de la tryptophane désaminase :

Perchlorure de fer.....	3.4 g
Eau distillée.....	100 ml

➤ **Réactif IND** : Pour la recherche de l'indole ;

Paradiméthylaminobenzaldéhyde .....	5.0 g
Alcool isoamylique.....	75.0 ml
HCL 37%.....	25.0 ml

➤ **Réactifs de Voges Proskauer (VP)** : Pour la recherche de l'acétoïne :

### VP 1

Hydroxyde de potassium.....	40 g
Eau distillée.....	100 ml

### VP 2

Alpha naphthol.....	6 g
Ethanol.....	100 ml

➤ **Rouge de Methyl**

Rouge de Methyl .....	0.1g.
Alcool éthylique à.....	95%: 300ml.
Eau distillée.....	500ml.

➤ **Réactif de Griess pour les nitrites**

**NIT1**

Acide sulfanilique .....	0.8g.
Acide acétique 5 N .....	100 ml

**NIT2**

N-N- diméthyl- 1- naphtylamine .....	0.6 g.
Acide acétique 5 N .....	100ml.

➤ **Colorant**

✓ **Violet de Gentiane**

Violet de Gentiane .....	1g.
Ethanol à 90% .....	10 ml.
Phénol .....	2g.
Eau distillée .....	100 ml.

✓ **Lugol**

Iode .....	1g.
Iodure de potassium .....	2g.
Eau distillée .....	300ml.

✓ **Fushine**

Fuchine basique .....	1g.
Alcool éthylique.....	100 ml.
Phénol .....	5g.
Eau distillée .....	100ml.