

Chapitre III :

Matériels et Méthodes

III.1. Matériels**III.1.1. La bosse de chameau**

1Kg de la bosse de chameau est prélevé dans des conditions de stérilité au niveau de l'abattoir de M'sila le : 29 - 05 - 2006 . Elle est conservée à 4°C pour stabiliser la flore microbienne existante .

III.1.2. les milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés pour la détection et le dénombrement de la flore microbienne de la bosse (Giolitti Cantoni, Hektoen,Litzky, Mannitol-mobilité,PCA,Roth sélénite-Cystéiné, TSB, VF-sulfite-réducteurs,VRBL) (voir annexe).

III. Méthodes**III.2.1. préparation de l'échantillon de la graisse non fondue**

La solution mère est obtenue à partir de 25g de l'échantillon prélevé dans un sachet stérile auquel on a ajouté 225ml d'eau physiologique peptonée stérile dans le but de broyer et d'homogénéiser la graisse de la bosse.

III.2.2. détection et dénombrement de la flore microbienne

Les critères microbiologiques des graisses animales sont les suivantes :

La Flore aérobie mésophile, Coliformes totaux, Coliformes fécaux, germes anaérobies sulfite- réducteurs, *Staphylococcus aureus*, Absence de Salmonelles dans 25g. [22]

Tous les germes étudiés sont pathogènes a l'exception de la flore aérobie mésophile ; elle se développe dans la matière organique[23] . Donc la flore microbienne des graisses animales est une flore aérobie mésophile.

Étant donné que la bosse du chameau est une graisse animale donc la flore microbienne de cette dernière est une flore aérobie mésophile.

III.2.2.1. détection de la flore microbienne

La mise en évidence des germe aérobie mésophile s'effectue par ensemencement 2 tubes (TSB) à partir de l'échantillon de graisse non fondue. [22]

III.2.2.2. recherche et dénombrement de la flore microbienne

Plusieurs germes ont été recherchés et dénombrés dans leurs milieux spécifiques (voir Tableau n°1)

III.2.3. Détection des antihistaminiques de type H₁

La mise en évidence des antihistaminiques a été effectuée à partir de l'échantillon de graisse fondue et selon la méthode suivante :

III.2.3.1. Solubilisation de la graisse

- faire fondre 25g de la graisse dans un becher
- prélever 0,5ml de la graisse fondue et ajuster le volume à 12,5ml avec l'eau distillée (solution 1).
- prélever 0,5ml de la solution 1 et ajuster le volume à 12,5ml avec l'éthanol à 60% (solution 2).

III.2.3.2. Mesure de l'absorbance

Dans une fiole de 100ml, on mélange 1ml de molybdate d'ammonium, 4ml d'HCl, 3ml de thiocyanate d'ammonium et 3ml d'acide ascorbique .

Après 15 minutes on ajoute la totalité de la solution 2. On laisse le mélange reposer 15 minutes ensuite on ajoute 10ml de chlorure de méthylène. Secouer soigneusement pendant 1 minute pour séparer les deux phases. On récupère la phase organique et on mesure l'absorbance à 469,5 nm.[30]

Tableau n°01 : dénombrement des germes dans la graisse de la bosse du chameau

Germe	milieux de culture	Ensemencement	Incubation
Germe aérobic « la flore totale aérobic mésophile » [24]	PCA	à partir des dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})	à 30° C pendant 72h.
Coliformes totaux [25]	VRBL	à partir des dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})	à 37° C pendant 24 h
Coliformes fécaux [25]	VRBL	à partir des dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})	à 44° C pendant 24h
Salmonelle [26]	Pré- enrichissement : Eau physiologique peptonée	25 g pour 225 g de l'eau physiologique peptonée	à 37° C pendant 24 h
	Enrichissement: bouillon de sélénite-Cystéiné	1 ml dans chaque tube	à 37° C pendant 24 h
	Isolement sur Hektoen	0.1ml dans chaque boite	à 37° C pendant 24 h
Entérobactéries [26]	Pré- enrichissement : Eau physiologique peptonée	0.1ml dans chaque boite (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})	à 37 C° pendant 24 h
	Enrichissement: bouillon de sélénite-Cystéiné		
	Isolement sur Hektoen		
<i>Staphylococcus aureus</i> [27]	- Giolitti Cantoni + 15ml Téliurite de potassium	1 ml dans chaque tubes	à 37° C pendant 48h
	- isolement sur gélose Chapman	0.1ml dans chaque boite	à 37°C pendant 24h à 48h
	- pour confirmer l'absence <i>Staphylococcus aureus</i> on fait un teste de mannitol –mobilité	Piqûre centrale + 2 gouttes de la suspension	à 37°C pendant 24h
Streptocoques fécaux [28]	- Teste de présomption : Rothe D/C - Test de confirmation : Eva Litzky	1 ml dans chaque tube	à 37° C pendant 24 h
Anaérobies sulfito- réducteurs et <i>Clostridium perfringens</i> . [29]	Viande foie (gélose) Alun de fer, sulfite de sodium ,huile de vaseline	1 ml dans chaque tube	à 44 C° pendant 24 h

