

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de
l'Univers
Département d'Agronomie

MEMOIRE

Présenté par

M^r Bekkaoui Djaffar

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En technologie des industries Agro-alimentaire

Thème

Identification et caractérisation des bacilles thermophiles isolés à partir du lait de vache pasteurisé produit dans deux laiteries de la région de Tlemcen.

Soutenu le, devant le jury composé de :

Président	Mr. AZZI R.	Maitre de conférences de classe A	Tlemcen
Examineur	Mr. BENYOUB N.	Maitre-assistant de classe A	Tlemcen
Promotrice	Mme. MALEK F.	Maitre de conférences de classe B	Tlemcen

Année Universitaire : 2015-2016.

Dédicaces

A mes parents pour avoir toujours su me montrer les valeurs essentielles, merci pour votre amour et votre soutien inestimable. Je souhaite ici vous témoigner très sincèrement toute mon affection et ma reconnaissance.

A mon frère Ismail et mes sœurs Houaria et Mokhtaria pour leurs présence et encouragements sans faille

À ma nièce préférées Janna, gros bisous.

Mes neveux Ashraf, Khaled et Yacine.

A ma grande mère et toute ma famille,

Merci A mes amis ; Mimoune et Mehdi

Étudiants de ma promotion

A ceux que j'ai manqué de citer.

A tous ceux que j'aime.

Merci



Djaffer

Remerciements

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie moléculaire au département de biologie et laboratoire de microbiologie à **INSFP** Mansourah Tlemcen et Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Je tiens à remercier mon encadreur **Mme Malek F.** Maître de conférences classe B au Département de Biologie Université de Tlemcen pour la confiance qu'elle m'a attribué en acceptant à diriger mon travail, pour ces précieux conseils qu'elle n'a cessé de prodiguer, ainsi que sa rigueur scientifique qui m'a illuminé pour l'élaboration de ce mémoire, sans oublier sa patience.*

*Je remercie toute les gens qui mon aider au laboratoire en particulier **M^{elle} Baroudi Kamila.***

Je remercie aussi l'ensemble du personnel travaillant au laboratoire du département de Biologie Université de Tlemcen. Qui ont contribués pour mener à bien ce travail

Mes remerciements vont également à mes enseignants qui m'ont accompagné pendant cette année.

Enfin j'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Les bacilles thermophiles sont largement incriminés dans les problèmes d'altération du lait pasteurisé et d'autres produits laitiers et de la diminution de leur durée de vie.

Dans ce travail nous avons mis en évidence la présence des bacilles thermophiles dans le lait de vache pasteurisé en sachet de 1 litre produit dans deux laiteries de la région de Tlemcen. L'isolement des souches a été réalisé sur gélose trypticase soja à 55 °C. Les souches isolées sont caractérisées par une forte diversité phénotypique tels que montré par les biotypes obtenus par galerie API 20 E.

L'évaluation des propriétés d'hydrophobicité de la surface des spores par la technique MATH a montré qu'hormis une souche qui s'est révélée fortement hydrophobe toutes les autres souches testées ont des spores hydrophiles.

La technique de coloration au cristal violet a montré que les souches testées sont capables de former le biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits en polystyrène, le potentiel de formation de biofilm est également important notamment à 42°C.

Ces résultats montrent la contamination du lait de vache pasteurisé par les bacilles thermophiles et leur implication potentielle dans la limitation de sa durée de vie. Ils soulignent également le problème des spores et de leur biofilm dans l'industrie laitière.

Mot clés : Bacilles thermophiles, lait pasteurisé, spore, hydrophobicité, biofilm, durée de vie.

Abstract:

Thermophiles are widely involved in the corruption problems of pasteurized milk and other dairy products and reducing their shelf-life.

In this work we demonstrated the presence of thermophilic bacilli in pasteurized cow milk (1 liter sachet) produced at some dairies in Tlemcen localities

Isolation of the strains was carried out on trypticase soy agar at 55 ° C. The isolated strains are characterized by a high phenotypic diversity as shown by biotypes obtained by gallery API 20 E.

The assessment of spore surface hydrophobicity by the MATH method shows that, apart from one highly hydrophobic strain all the others display hydrophilic spores.

The technique of crystal violet staining showed that the tested strains are able to form biofilm in the polystyrene microplates, the biofilm formation potential is also important in particular at 42 ° C.

These results show the contamination of pasteurized cow milk by thermophilic bacilli and their potential involvement in the limitation of its shelf-life. They also highlight the problem of spores and their biofilm in the dairy industry.

Keywords: Thermophilic bacilli, pasteurized milk, spore, hydrophobicity, biofilm, shelf-life

Tables des matières

Résumé

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale 1

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : **Le lait pasteurisé : généralités**

1	Définition du lait :	2
2	Le lait de vache :	2
3	La composition du lait	3
4	Microbiologie du lait :	4
4.1	Flore originelle :	4
4.2	Flore de contamination :	5
5	Procédés de traitement thermique :	6
5.1	La pasteurisation :	6
5.2	Stérilisation	7
6	Le processus de production :	8

Chapitre II : **les bacilles thermophiles en industrie laitière**

1.	Introduction :	12
2.	Les bacilles thermophiles :	12
2.1	Définition :	12
2.2	Systematiques :	14
2.3	Les caractéristiques spécifiques de certain Bacille thermophiles	15
3	Sporulations des Bacilles thermophiles :	16
3.1	Définition :	16
3.2	Formation des spores:	16

3.3	Germination	17
3.4	Résistance :.....	17

Chapitre III : Le problème du biofilm en industrie laitière

1.	Introduction.....	18
2.	Définition du biofilm.....	18
3.	La formation du biofilm	19
3.1	Film de conditionnement	19
3.2	Transport	20
3.3	Adhérence	20
3.4	Maturation du biofilm	21
3.5	Le détachement.....	22
4.	Influence des propriétés de surface sur la formation du biofilm industriels	23
4.1	La rugosité	24
4.2	Hydrophobicité.....	25
5	Lutte contre les biofilms dans les industries laitières	27
5.1	Problématique.....	27
5.2	Caractéristiques des biofilms des bacilles thermophiles :.....	27
5.3	Nettoyage industriel des équipements laitiers :	29
5.4	Efficacité du CIP sur les biofilms laitiers	29

Parti II : Etudes expérimentale

1-Matériels et Méthodes

Objectif du travail.....	31
1. Prélèvements :.....	32
1.1 Transport des échantillons	32
1.2 Traitement des échantillons :.....	32
1.2.1 Préparations des dilutions décimales :.....	32
1.2.2 L'ensemencement :	33
2 Identification morphologique des souches	34
2.1 Caractères culturaux:	34
2.2 Morphologies cellulaire:.....	34
3 Identification biochimique.....	35
3.1 Test de catalase	35
3.2 Identification par galerie API 20 E	35

4	Conservation des souches	36
5	Etude de l'adhésion et la formation des biofilms des bacilles thermophiles.....	36
5.1	. Préparation de la suspension sporale :	36
➤	Traitement thermique de la suspension sporale:	36
5.2	L'adhésion à l' hexadécane: méthode MATH.....	37
5.3	Formation de biofilm dans les microplaques de titration	37

Résultat et discussion

1.	Caractérisations phénotypiques des isolats :	40
1.1.	Aspect macroscopique :	40
1.2.	Aspect microscopique :	41
2.	Caractères biochimiques	42
2.1.	L'étude du type respiratoire.....	42
2.2.	Détermination du profil biochimique.....	42
3.	Evaluation de l'hydrophobicité des spores des bacilles thermophiles :	44
4.	Détermination du potentiel de formation de biofilm :	46
	Conclusion générale	49

Références bibliographiques

Annexe

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition moyenne du lait entier	4
Tableau 2 : Flore originelle du lait cru	5
Tableau 3 : Germes contaminant le lait cru (Vignola, 2002)	5
Tableau 4 : Durée de vie du lait en fonction des traitements thermiques. (Vandercammen, 2011)	8
Tableau 5 : les principales caractéristiques de quelque bacilles thermophiles	14
Tableau 6 : Facteurs impliqués dans la formation des biofilms (Wimpenny et al. 2000).....	22
Tableau 7 : Les résultats de l'identification des bacilles thermophiles par la galerie API.....	42
Tableau 8 : Détermination des biotypes des bacilles thermophiles.....	43
Tableau 9 : Détermination du caractère hydrophile/hydrophobe des 7 souches des bacilles thermophiles.....	44

Liste des figures

Figure 1 : procédé de fabrication de lait pasteurisé.....	11
Figure 2 : Photomicrographie des spores subterminales de <i>Anoxybacillus Leibniz-Institut bacdive.dsmz.de</i>	15
Figure 3 : Photomicrographie des <i>Geobacillus stearothermophilus</i> <i>ww.lookfordiagnosis.com</i>	16
Figure 4 : Aspect d'un biofilm mature Center for Biofilm Engineering Montana State University-Bozeman	18
Figure 5 : Cycle de formation d'un biofilm (Davies, 2004).....	19
Figure 6 : Représentation des étapes de colonisation des surfaces par des microorganismes (Van Loosdrecht et al., 1990).....	23
Figure 7 : Micrographe en MEB de surfaces en inox avec différents finis de surface. A : sans traitement de polissage, B : polissage 80 grit, C: polissage 120 grit, D: électropolissage. (Hilbert et al., 2003).....	24
Figure 8 : Adhésion de différents microorganismes sur des surfaces en acier inoxydable. (A-B) : adhésion par de <i>taphylococcus caprea</i> et <i>Pseudomonas fluorescens</i> à l'inox avec un fini de surface 2B, (C-D) : adhésion des spores de <i>B. cereus</i> sur des supports avec des topographies irrégulières. Adapté de Faille et Carpentier (2009) par Marchand et al., (2012). Les cellules peuvent adhérer de manière isolée ou par groupe.....	25
Figure9 : Certaines surfaces sont plus « attachantes » que d'autres pour les pathogènes : après 24 heures de contact à 20°C, la bactérie <i>Escherichia coli</i> se fixe beaucoup plus au plastique (A) qu'à l'acier inoxydable (B).	25
Figure 10 : Micrographie électronique à balayage d'un biofilm de 18h formé par <i>A. flavithermus</i> sur une surface en acier inoxydable (Flint et al. 2001).....	28
Figure 11 : Structures de biofilms in vitro observés en microscopie électronique à balayage environnemental. A: Biofilm de bacille thermophile b: biofilm de <i>B. cereus</i> (Malek, 2016 b)...	28
Figure 12 : Biofilms formés in situ sur des lames en inox installés dans une conduite de lait pasteurisé (D'après Malek 2016 b).....	30
Figure 13 : préparation des dilutions décimales	32
Figure 14 :Recherche et dénombrement des bacilles thermophiles	33

Figure 15: Schémas représentant le protocole de formation des biofilms par la méthode de microplaques de titration 96 puits	39
Figure 16: photo montre l'aspect des colonies sur TSA.....	40
Figure 17: Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (Observation par microscope optique G×100 a immersion).....	41
Figure 18: Observation au microscope optique de la spore après coloration au vert malachite à chaud.....	41
Figure 19: Résultats des plaques API20E de quelques souches.....	44
Figure 20: Adhésion des 7 souches du groupe bacilles thermophiles à l'hexadécane	45
Figure 21: Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 42°C	46
Figure 22: Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 55°C	47

Liste des abréviations

DO : Densité Optique

°C : degré Celsius

H : heure

Min : minutes

ml: Millilitre

% : pour cent

EDS : Eau Distillé Stérile

T° : Température

µl : Microlitre

TSA: Trypticase soja agar

TSB: tryptic soy broth

CIP: Cleaning in place

MATH: Microbial adhesion to hydrocarbon

MATS : La méthode d'adhésion aux solvants

UV : Ultra violet

UHT : Ultra haute température

EPS : Eau physiologique stérile

QS : Quorum sensing

AW : Activité de l'eau

NEP : Nettoyage en place

G : grossissement

EPS : Extracellulaire polymérique substance (substance polymériques extracellulaire)

PHE : échangeurs de chaleur à plaques

Introduction générale

Le lait est un excellent milieu de croissance pour les microorganismes et leur nombre peut augmenter rapidement dans le lait si les conditions de production et d'entreposage ne sont pas bien contrôlées. Toutefois, et malgré les traitements thermiques la qualité du lait pasteurisé et sa durée de vie sont limitées par le développement des populations microbiennes de contamination. La qualité hygiénique du lait constitue un facteur important pour la filière laitière.

La contamination microbienne des surfaces des équipements utilisés en industrie agroalimentaires est de plus en plus souvent identifiée comme la source de problèmes industriels sévères. Ce phénomène peut être à l'origine d'une diminution des rendements et d'une augmentation des coûts de production. Les microorganismes peuvent non seulement entraîner la dégradation prématurée des équipements et l'altération des propriétés organoleptiques des produits en cours de fabrication, mais également de se retrouver dans le produit fini et favoriser le développement de toxi-infections alimentaires collectives.

La découverte des biofilms a montré que la plupart des micro-organismes favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée sur un support (état sessile) plutôt que libre et isolée dans le milieu environnemental. Après attachement sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle William Costerton a donné le nom de « biofilm » (**Costerton et al., 1999**). En particulier, les microorganismes organisés en biofilms sont beaucoup plus résistants aux agents antimicrobiens que les microorganismes planctoniques. Ce qui rend leur élimination très difficile par les systèmes classiques de nettoyage/désinfection.

La flore thermorésistante telle que les bacilles thermophiles est un groupe important de contaminants en industrie laitière. Ces bacilles sont capables de former des biofilms responsables de leur persistance sur les équipements laitiers et sont à l'origine des altérations qui se traduisent par des défauts de goût et d'arômes.

Le but de cette étude est de rechercher les bacilles thermophiles dans le lait de vache pasteurisé et de déterminer les propriétés de surface des spores en utilisant la technique MATH, qui permet de mesurer l'hydrophobicité des cellules. L'hydrophobicité est une caractéristique importante des propriétés des surfaces bactériennes impliquées dans l'adhésion. Le plan expérimental est le suivant:

-) Isolement des bacilles thermophiles dans des échantillons de lait de vache pasteurisé.
-) Identification phénotypique des souches isolées.
-) Evaluation de pouvoir d'adhésion via la mesure de l'hydrophobicité des spores
-) Détermination du potentiel de formation de biofilm

Le lait est un aliment complet capable de fournir à l'organisme tous les éléments essentiels et nécessaires à sa croissance et à son développement (**Anonyme, 2000**).

1 Définition du lait :

Il s'agit d'un groupe d'aliment, dont la matière première de base est le lait et constitué par une gamme de produits très variés aussi bien au niveau de leur présentation que de leurs qualités organoleptiques. Ainsi il comprend (**FREDOT, 2005**) :

- le lait : c'est un produit naturel sécrété par les mammifères. A la fois aliment et boisson, il est donc d'un grand intérêt nutritionnel ;
- Les laits transformés : ils résultent de traitement technologique destinés à prolonger leur conservation (exemples : lait stérilisé, pasteurisé, en poudre ...) ;
- Les laits modifiés : ils ont subi des modifications de texture, de structure (exemples : yaourt, dessert lacté frais...)

2 Le lait de vache :

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1908, lors du premier congrès international pour la répression des fraudes alimentaires, comme « produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli, proprement et ne pas contenir de colostrum » (**LARPENT, 1997**).

En général, le lait est sécrété par les glandes mammaires des femelles mammifères dont l'activité chez la vache commence à la mise basse et se poursuit pendant une dizaine de mois, tant que dure la traite. La dénomination "lait" sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservée au lait de vache. Tout lait provenant d'une femelle laitière autre que la vache doit être désignée par la dénomination "lait" suivie de l'indication de l'espèce animale dont il provient : "lait de chèvre", "lait de brebis", "lait d'ânesse » (**Arrêté Interministériel, 1993**).

3 La composition du lait

Le lait est reconnu depuis longtemps comme étant un aliment bon pour la santé. Source de calcium et de protéines, il peut être ajouté à notre régime sous plusieurs formes. Les laits sont les seuls aliments naturels complets qui existent, chacun d'eux étant adapté à la race qu'il permet de développer.

Le lait est une source importante de protéines de très bonne qualité, riches en acides aminés essentiels, tout particulièrement en lysine qui est par excellence l'acide aminé de la croissance. Ses lipides, caractérisés par rapport aux autres corps gras alimentaires par une forte proportion d'acides gras à chaîne courte, sont beaucoup plus riches en acides gras saturés qu'en acides gras insaturés. Ils véhiculent par ailleurs des quantités appréciables de cholestérol et de vitamine A ainsi que de faibles quantités de vitamine D et E (**FAVIER,1985**).

La composition moyenne du lait entier est représentée dans le tableau 1 rappelle que le lait est constitué de quatre phases :

-) Une émulsion de matières grasses ou phase grasse constituée de globules gras et de vitamines liposolubles (A, D).
-) Une phase colloïdale qui est une suspension de caséines sous forme de micelle.
-) Une phase aqueuse qui contient les constituants solubles du lait (protéines solubles, lactose, vitamines B et C, sels minéraux, azote non protéique).
-) Une phase gazeuse composée d'O₂, d'azote et de CO₂ dissous qui représente environ 5 X du volume du lait.

Tableau 1 : Composition moyenne du lait entier (FREDOT, 2006)

<i>Composants</i>	<i>Teneurs (g/100g)</i>
<i>Eau</i>	89.5
<i>Dérivés azotés</i>	3,44
<i>Protéines</i>	3.27
<i>Caséine</i>	2.71
<i>Protéines solubles</i>	0.56
<i>Azote non protéique</i>	0.17
<i>Matières grasses</i>	3.5
<i>Lipides neutres</i>	3,4
<i>lipides complexes</i>	<0,05
<i>Composés liposolubles</i>	<0.05
Glucides	4,8
<i>Lactose</i>	4.7
<i>Gaz. dissous</i>	5% du volume du lait
<i>Extrait sec total</i>	12,8g

4 Microbiologie du lait :

Le lait est par sa composition, un aliment de choix, il contient des matières grasses, lactose, protéines, sels minéraux, des vitamines et de 87% d'eau. Son pH est de 6.7, il va être un substrat très favorable au développement des microorganismes. (GUIRAUD, 1998).

4.1 Flore originelle :

Comme le montre le tableau 2, la flore du lait est composée essentiellement de germes saprophytes : microcoques, streptocoque lactique et lactobacilles (LARPENT, 1997). D'autre microorganisme peut se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade, ils sont généralement pathogènes et dangereux au point de vue sanitaire, Il peut s'agir d'agents de mammites (GUIRAUD, 1998).

Tableau 2 : Flore originelle du lait cru (Vignola, 2002)

Microorganismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus sp.</i>	30-90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus ou Lactococcus</i>	< 10
Gram négatif	<10

4.2 Flore de contamination :

Les sources de contamination sont nombreuses et variées (tableau 3), le lait peut se contaminer par des apports microbiens divers : Fèces et téguments de l'animal : Coliformes, Entérocoques Clostridium, Salmonella. Sol : Streptomyces, Listeria, bactéries sporulées, spores fongiques. L'air et l'eau : Flores diverses, bactéries sporulées. (Guiraud, 2003).

Tableau 3 : Germes contaminant le lait cru (Vignola, 2002).

	Groupes	Caractères
-Bactéries «Gram +»	1-bactéries lactiques	Activité biologique : fermentation du lactose
	2-Microcoques	* Flore banale de contamination du lait *Activité enzymatique réduite
	3-Staphylocoques	*Anaérobies facultatifs, fermentent le lactose exemple : <i>Staphylococcus aureus</i> *Développement dans le lait à 15°C pendant plusieurs heures
	4-Bacillaceae.	*Mésophiles, inhibées à 45°C, * Absentes dans le lait crus et les produits laitiers qui n'ont pas été chauffés, *Responsables des altérations des laits insuffisamment stérilisés.
-Bactéries « Gram-»	1-Entérobactéries.	*Des coliformes, fermentent le lactose *Leur présence est liée à une contamination fécale *Moins abondantes dans le lait par rapport à d'autres Gram (-), *Ces espèces résistent aux antibiotiques, se développent à des températures très différentes.
	2-Achromobactériaceae	*Ces microorganismes forment l'essentiel de la flore psychrotrophe * Ne fermentent pas les sucres.
	3- Bactéries divers.	Les plus importantes Pseudomonas véhiculées par les eaux non potables et brucella pathogènes.

5 Procédés de traitement thermique :

5.1 La pasteurisation :

Les laits de consommation se caractérisent notamment par le traitement thermique qui leur est appliqué pour leur conservation, et le taux de matière grasse. L'arrêté interministériel de 29 Safar 1414 correspondant au 18 Aout 1993 relatif à la spécification et à la présentation de certains laits de consommation p. 16. JORA N° 69 du 27-10-1993 a déclaré l'obligation de la pasteurisation de lait crus de vache ou le lait reconstitué, soit à une température de 63°C pendant une durée de 30 minutes, soit à une température de 85°C pendant une durée de 15 à 20 secondes. Ceci permet la destruction de la presque totalité de la microflore banal et pathogène, à condition de ne pas affecter la structure physique du lait, sa composition, son équilibre chimique, ses enzymes et ses vitamines

Le lait pasteurisé, fabriqué à partir de lait cru ou de lait reconstitué, écrémé ou non, est un lait qui a subi un traitement thermique (pasteurisation) qui détruit plus de 90 % de la Flore (jusqu'à 98 %) contenue dans le lait (notamment tous les germes pathogènes non sporulés, tels que les germes de la tuberculose et de la brucellose). La pasteurisation a pour objectif la destruction de toutes les formes végétatives des micro-organismes pathogènes du lait sans altérer la qualité chimique, physique et organoleptique de ce dernier (**HARDING, 1995**).

On distingue trois types de traitements :

) Pasteurisation basse (62-65°C/30min) : elle est abandonnée en laiterie.

) Pasteurisation haute (71-72°C/15-40s) ou HTST (high temperature short time) :

Elle est réservée aux laits de bonne qualité hygiénique. Au plan organoleptique et nutritionnel, la pasteurisation haute n'a que peu d'effets. Au niveau biochimique, la phosphatase alcaline est détruite par contre la peroxydase reste active et les taux de dénaturation des protéines sériques et des vitamines sont faibles. La date limite de consommation (DLC) des laits ayant subi une pasteurisation haute est 7 jours après conditionnement (bouteille en verre ou en carton, polyéthylène ou aluminium).

) Flash pasteurisation (85-90°C/1-2s) : elle est pratiquée sur les laits crus de qualité Moyenne ; la phosphatase et la peroxydase sont détruites.

J -Ultra-pasteurisation(UP) : Permet aux transformateurs laitiers de produire des laits et des produits laitiers avec une durée de conservation prolongée similaire aux processus UHT, Elle emploie un traitement thermique plus élevée que la pasteurisation, mais inférieure aux processus UHT. Le lait doit être stocké de 4 à 8°C avant et pendant l'utilisation. **(Simon et Hansen., 2001)**. Le lait ultra pasteurisé vendu en emballage aseptique est traité à des températures allant de 137 à 143 °C avec des temps de maintien de 2 à 3s. **(Tomasula et al ., 2004)**. L'ultra pasteurisation est parmi les nouvelles techniques de fabrication introduites pour la production de lait ESL (extended shelf life) comme un lait à durée de vie étendue avec un goût du lait frais et dont la durée de conservation maximal est de 4 semaine dans la chaîne de distribution à froid. **(Schmidt et al., 2011)**.

5.2 Stérilisation

Selon le procédé de stérilisation, on distingue le lait stérilisé et le lait stérilisé UHT. Ces laits doivent être stables jusqu'à la date limite de consommation. **(LESEUR et MELIK., 1999)**

J **Lait stérilisé** : La dénomination « lait stérilisé » est réservée au lait préalablement conditionné dans un emballage hermétique, puis chauffé pendant 15 à 20 minutes à une température de 115-120°C afin de détruire tous les germes susceptibles de s'y développer. Le lait est ensuite rapidement refroidi. Il se conserve à température ambiante, tant que l'emballage n'a pas été ouvert **(Merigaudal et., 2009)**.

J **Lait stérilisé UHT** : Le traitement UHT du lait et des produits laitiers c'est l'application continue de la chaleur qui se déroule à des températures élevées entre 135-150° C durant un bref moment qui rend le produit commercialement stérile, lorsqu' il est combiné à un conditionnement aseptique **(Siddappa Et al .,2012)**.Les bactéries aussi bien que les spores sont détruites, et un certain nombre d'enzymes sont inactivés, ce qui fait que le lait emballé se conserve plus longtemps (3mois au minimum).Une fois l'emballage ouvert, le lait ne se conserve toutefois que quelques jours au réfrigérateur. **(Vandercammen ,2011)**.

Le tableau 4 montre les différents types de lait traité thermiquement

Tableau4 : Durée de vie du lait en fonction des traitements thermiques. (Vandercammen, 2011) :

	Types de traitements thermiques	Caractéristiques
Lait crus	Pas de traitement thermique ou de chauffages a plus de 40C°	Il se conserve 48h avant l'ouverture réfrigérateur
Lait pasteurisé	Chauffé à une température inférieure à 100°C puis refroidi rapidement	Il se conserve 7 jours au réfrigérateur avant ouverture.
Lait UHT(ultra haute température	Chauffé à une température entre 130 et 150°C pendant 2 secondes	Durée de conservation +/- 4 mois à température ambiante
Lait stérilisé	Chauffé à une température entre 100 °C et 115°C pendant 20 minutes	Durée de conservation +/- 6 mois à température ambiante
Lait en poudre	Déshydratation qui permet de réduire la teneur en eau à 3 %	Durée de conservation : 2 ans à température ambiante

D'après le tableau la température joue un rôle positif sur la durée de conservation du lait, car chaque fois qu'on augmente la température on obtient une prolongation du délai de conservations de ce produit fini.

6 Le processus de production :

)Réception

Pour produire un lait prêt à la consommation de qualité irréprochable, il est indispensable que le lait cru soit de première qualité. Il ne devrait pas avoir plus de 48 h au moment du premier traitement thermique (**Eberhard et Gallmann 1988**). Le lait qui parvient à l'usine provient des centres de collecte, il est acheminé au moyen des camions citernes qui assurent un transport à une température de 4 à 6°C. Le lait doit répondre à des normes bien définies, c'est pour cela qu'à la réception, le lait subit une série d'analyse physico-chimique se rapportent à sa qualité de production.

Les critères d'acceptation :

-Densité à 20°C : 1027.5

-Acidité : 14-17°D

-PH : 6.6-6.8

-Alcool 80° : Négatif

-Matière grasse : 30g/l

-Test formol : Négatif

-Test amidon : Négatif

-Test Ramsdell : stable

) *Dégazage* :

Le lait passé dans le dégazeur dans le but d'éliminer toutes les odeurs et les bulles de gaz trouvés dans le lait

) *La filtration* :

La filtration est réalisée dans le but de débarrasser le lait des impuretés physiques éventuelles apportées par la poudre de lait, le lait est filtré à travers un filtre pressé. (**VEISSEYRE. R 1979**)

) *Homogénéisation* :

Consiste à pousser le lait cru à travers un atomiseur pour former des particules minuscules de telle sorte que la matière grasse est dispersée de façon uniforme dans tout le lait, l'arrêt de la graisse flottant à la partie supérieure du récipient.

) *L'écémage :*

Implique tourner le lait dans une centrifugeuse pour séparer la crème du lait. Après séparation, la crème et le lait restant sont remixés pour fournir la teneur en matière grasse souhaitée pour les différents types de lait produit.

Pour "lait entier," la crème est réintroduite jusqu'à la teneur en matières grasses atteint 3,25%. Pour « lait faible en gras," la teneur en matières grasses est de 1%. Pour « lait écrémé » (parfois appelé de lait écrémé) la teneur en graisse est 0,05%.

) *La pasteurisation :*

Conservé dans d'énormes tanks de stockage pouvant contenir 100 000 litres de lait cru, le lait doit passer par une première étape importante, la pasteurisation. Cette pasteurisation permet d'éliminer les micro-organismes indésirables pour l'homme. Elle s'effectue grâce au contact de plaques chaudes. Le lait est ainsi chauffé à 72°C pendant 15 secondes.

) *Le Diagramme de fabrication :* la figure1 présente le procédé de fabrication de lait pasteurisé.

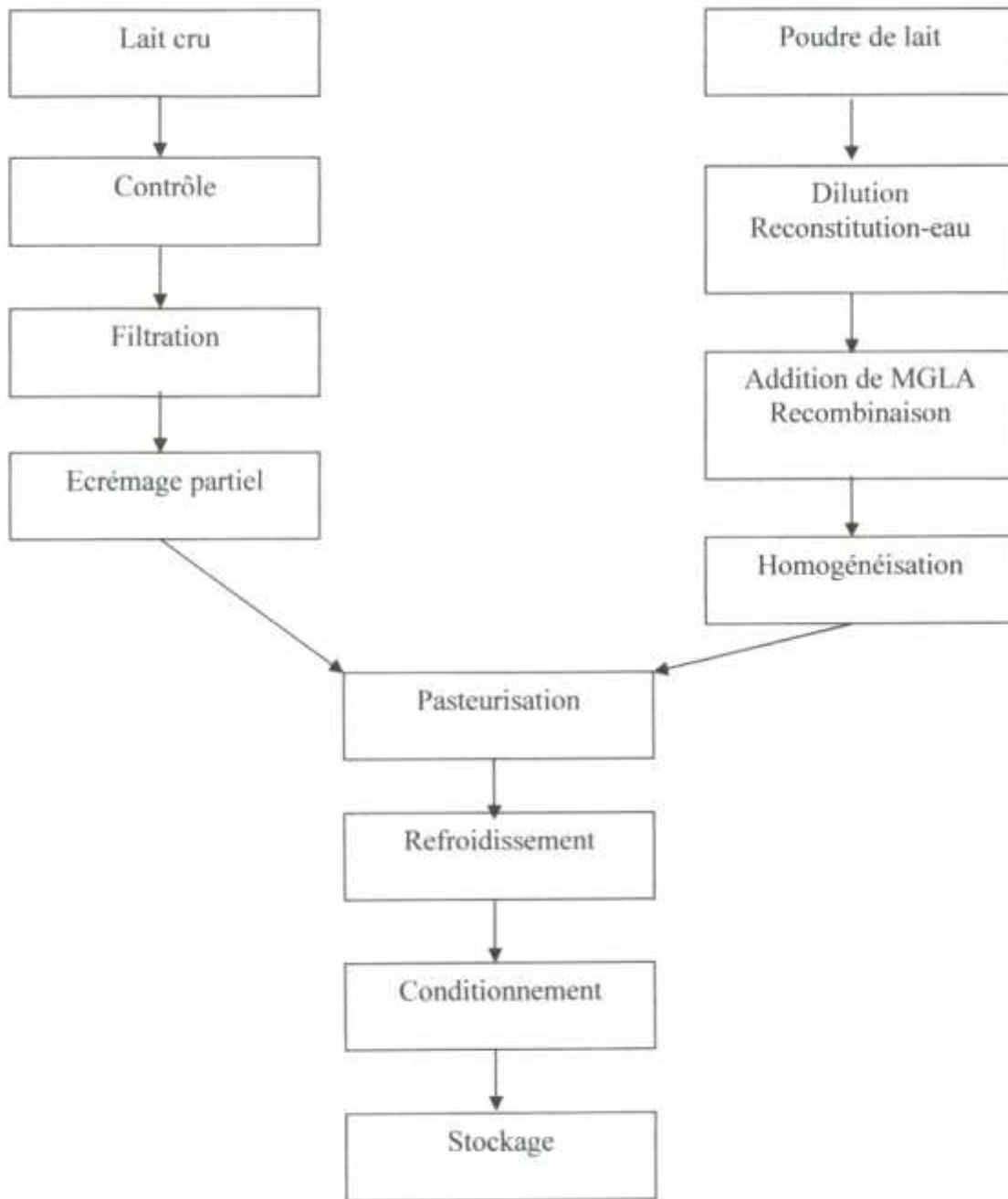


Figure 1 : procédé de fabrication de lait pasteurisé (M'boya et al., 2001).

1. Introduction :

Les bacilles thermophiles comme *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus* spp, constituent un groupe important de contaminants dans l'industrie laitière leur présence dans les produits laitiers est un indicateur d'une mauvaise hygiène et un grand nombre ne sont pas acceptables pour les clients. En outre, leur croissance peut entraîner des défauts dans les produits laitiers causés par la production d'acides ou d'enzymes, conduisant potentiellement à des défauts de qualité, telle que l'altération de la saveur de l'aliment. **(Burgess & al., 2010)**.

Ces bacilles thermophiles sont généralement sélectionnés par les conditions de fabrication des produits laitiers. Ils sont capables de croître dans les compartiments de ces usines de fabrication où les températures atteignent 40 à 65°C **(Ronimus et al., 2003 ; Nazina et al., 2001)**. De plus, ils sont difficiles à éliminer à cause de leur capacité de sporuler. Les bacilles thermophiles présentent aussi une large gamme de température de croissance optimale, caractérisée par un taux de croissance rapide (temps de génération d'environ 15 à 20 min) et une aptitude pour former facilement des biofilms **(Burgess et al., 2010)**. En outre les biofilms des bacilles thermophiles sont spécifiques à cause de leur formation rapide dans les lignes de production du lait pasteurisé. Leur connaissance et la compréhension de leurs caractéristiques sont nécessaires pour développer des mesures efficaces de contrôle.

2. Les bacilles thermophiles :

2.1 Définition :

Les bacilles thermophiles sont des contaminants potentiels dans une variété d'industries où les températures élevées (40-65 °C) prévalent lors de la production du processus de fabrication ou de stockage. **(Burgess & al., 2010)**

Dans l'industrie laitière, les bacilles thermophiles sont généralement énumérés en utilisant la méthode standard des germes aérobies (PCA) incubé à 55 C. Ceux qui ont été isolés à partir de produits laitiers à cette température d'incubation peuvent être divisés en deux groupes :

) Les thermophiles obligatoires

) Les thermophiles facultatifs (également connu sous le nom micro-organismes thermotolérants).
(Burgess & al., 2010)

) Les thermophiles obligatoires

Les thermophiles obligatoires ne poussent qu'à des températures élevées (Environ 40 à 68°C) et comprennent *Anoxybacillus flavithermus* et les espèces au genre *Geobacillus* (Flint et al., 2001 ; Ronimus et al., 2003).

) Les thermophiles facultatifs

Les thermophiles facultatifs appartiennent au genre *Bacillus* et ont la capacité de croître à deux températures mésophiles et thermophiles, en fonction de la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans* et *Bacillus subtilis* (Flint et al., 2001 ; Moreno Switt., 2014).

D'autres caractéristiques des bacilles thermophiles sont décrites dans le tableau n° 05 : d'après :
(Burgess et al., 2010) :

Tableau n° 05 : les principales caractéristiques de quelque bacilles thermophiles :

Caractère	<i>A. flavithermus</i>	<i>G. stearothermophil</i>	<i>G. thermocovorans</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. sporothermodyura</i>
T°max	65-72	65-68	70	50-55	45-55	57-61	50-55	45-55
T°min	30-38	37	37-47	15	5-20	15-25	5-15	20
C.A	oui	non	non	oui	non	oui	non	non
pH	6-9	6-8	5.2-8	5.5-8.5	5.5-8.5	4-10.5	5.5-8.5	inconnue
S.G	oui	oui	oui	non	non	variable	non	non
p.de S	Terminal	Terminal	Terminal	central	central	Sub terminal	central	terminal
VP	positive	négative	négative	positive	positive	variable	positive	négative
C.NaCl	non	non	non	oui	oui	non	oui	non
NA.NI	oui	variable	oui	oui	oui	variable	non	non
H.C	oui	variable	variable	oui	oui	non	oui	faible
H.G	non	oui	variable	oui	oui	variable	oui	non
H.A	oui	positive	variable	oui	oui	oui	non	non

T max : température de croissance maximal (C°), *T° min* : température de croissance minimal (C°), *CA* : croissance anaérobie, *S. G* : sporange gonflé, *P de S* : position de spore, *VP*: réaction de Voge Proskauer, *C.NaCl*: la croissance de 7% NaCl, *NA.NI*: nitrate réduit en nitrite, *H.C*: hydrolyse de la caséine, *H.G*: hydrolyse de la gélatine, *H.A*: hydrolyse de l'amidon.

2.2 Systématiques :

Les études taxonomiques ont fourni la preuve que le genre *Bacillus* est très diversifié, un reclassement des espèces dans des genres nouveaux a été réalisé. Ceci a conduit à classer par exemples : *Bacillus stearo-thermophilus* dans le nouveau genre *Géobacillus* et *Bacillus flavothermus* a été reclassé entant que *Anoxybacillus Flavithermus* (Nazina et al., 2001)

2.3 Les caractéristiques spécifiques de certain Bacille thermophiles

- ***Anoxybacillus Flavithermus*** : cette espèce est décrite comme :

- Un thermophile anaérobie facultatif
- Mobile
- Endospores terminal.
- La température de croissance est comprise entre 30 et 70 °C avec un optimum de croissance à 60 °C. Cependant, les isolats obtenus à partir de lait en poudre ont tendance à avoir une température optimale de croissance comprise entre 50 et 65 °C. (Burgess & al., 2010)



Figure 2 : Photomicrographie des spores subterminales de *Anoxybacillus*

(Leibniz-Institut bacdive.dsmz.de)

- ***Geobacillus*** :

Comprend les espèces thermophiles qui étaient précédemment classés dans le groupe *Bacillus* :

- Sont très étroitement liés, avec la température de croissance optimale de ce genre au-dessus de 50 °C.
- Les souches *Geobacillus* sont été isolées à partir des environnements chauds, tels que les sources d'eau chaude, champs pétrolifères, la mer profonde, sédiments, des raffineries et des usines sucrières laitiers. (Nazina et al., 2001)

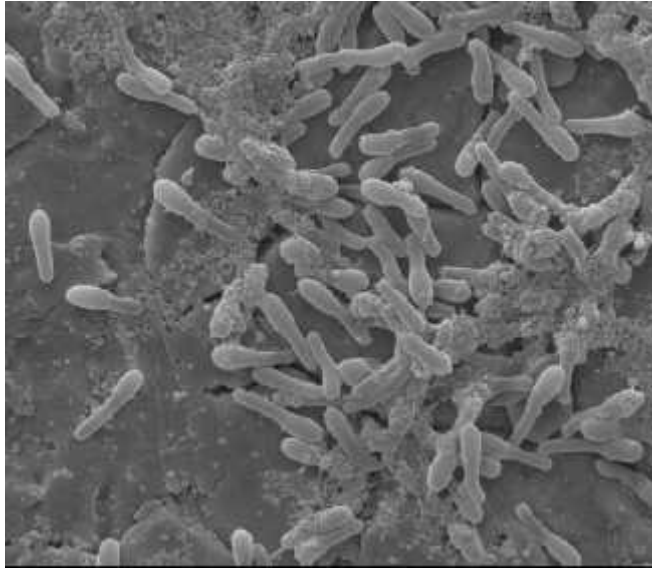


Figure 3: Photomicrographie des *Geobacillus stearothermophilus*
(www.lookfordiagnosis.com)

3 Sporulations des Bacilles thermophiles :

3.1 Définition :

La sporulation est un processus naturel dans le cycle de croissance de certains groupes de bactéries telles que les espèces des *Bacillus*. Il s'agit d'un mécanisme de survie, généralement considérée comme un processus qui se produit lorsque l'organisme est en situation de stress. Dans l'environnement des produits laitiers, les endospores, les Bacilles thermophiles sont caractérisés par la formation rapide de spores. Le processus de sporulation est supposé être similaire à celui des Bacille mésophiles comme *Bacillus cereus* *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulast* (**Burgess & al., 2010**)

3.2 Formation des spores :

La sporulation est un processus complexe, divisé en une série d'étape qui est considéré comme étant très similaire entre aérobie et anaérobies facultatives chez les bactéries sporulées. En général la température optimale et le pH optimal pour la formation de spores sont similaires à la croissance des cellules végétative, mais l'éventail de ces deux paramètres est plus étroit. (**Burgess & al., 2010**)

Les conditions qui déclenchent la formation de spores des bactéries thermophiles dans un environnement laitier sont mal définies. Cependant, la présence de minéraux tels que le magnésium, le calcium et le potassium composés peuvent jouer un rôle. Ces minéraux sont important pour le développement d'une spore mature et peut être impliqué dans l'activation du processus de formation de spores (**Burgess & al., 2010**). Toutefois, il a été récemment démontré que certains isolats de *Geobacillus* ont réussi à sporuler dans le bouillon tryptone de soja avec des sels ajoutés (CaCl_2 , MnSO_4 , FeSO_4 , ou MgCl_2) avec un rendement maximum (105-107spores/ml) dans 12 – 18h. (**Burgess & al., 2010**)

3.3 Germination

Trois étapes sont impliquées dans le processus de passage d'une spore à une cellule végétative : l'activation, la germination et la prolifération. L'activation des spores peut se faire par la chaleur, les produits chimiques ou en diminuant le pH à 2-3. Dans l'industrie laitière, la température est un procédé de l'activation des spores avant la germination, en raison de son utilisation extensive de la chaleur comme une technologie de conservation. Par exemple, les spores de *G.Stearothermophilus se* sont avérés être activées à des températures aussi élevé jusqu'à 110 °C, alors que les spores de *B. subtilis* auraient une plus faible température d'activation de 65 à 70°C. Les spores dormantes de longue durée peuvent nécessiter une température ultérieure d'activation par rapport aux spores dormantes à courte durée qui germent facilement. (**Burgess & al., 2010**).

Après l'activation des spores mésophiles, la germination est déclenchée par des nutriments (Par exemple L-alanine) qui se lient à des récepteurs de germination ou par d'autres moyens tels que haute pression, des sels ou lysozymes (**Giffel et al., 1995 ; Setlow., 2003**).

3.4 Résistance :

Les spores sont résistantes à la chaleur, une rupture mécanique et une large variété de produits chimiques, ce qui rend très difficile de les détruire dans les produits laitiers lors du processus de fabrication. Dans le cas des bacilles mésophiles et thermophile facultative, des combinaisons de plusieurs propriétés sauraient contribuer à l'ensemble résistance des spores de *Bacillus*, notamment leur faible teneur en eau, l'imperméabilité de la membrane interne, la couche de spores, le peptidoglycane. (**Burgess & al., 2010**).

1. Introduction

La formation de biofilm semble être un dispositif universel des microbes. (**Kolter et Greenberg, 2006**). Beaucoup d'espèces bactériennes peuvent coloniser une série des substrats. Les cellules adhérentes deviennent attachées, se développent et se divisent pour former des microcolonies, La croissance en microcolonies mène au développement des biofilms. (**Costerton et al., 1995 ; Watnick et Kolter, 2000**). Actuellement ils sont établis aux manières les plus communes pour la vie des bactéries est celle d'adhérer aux surfaces et de former des biofilms, où elles sont incluses dans une matrice (**Lasa, 2006**).

2. Définition du biofilm

Les biofilms sont définis en tant que populations bactériennes adhérentes incluses dans une matrice organique (**Costerton et al., 1995 ; Davey et O'Toole, 2000., Greenberg, 2003 ; Kolter et Greenberg, 2006**). Les biofilms sont également définis comme des micro-organismes qui sont trouvés dans un éventail d'écosystèmes en tant que communautés multi-espèces fortement structurées. (**Stoodley et al., 2002 ; Palmer et al., 2007**). Et organisés en une architecture tridimensionnelle marquée (figure 04)

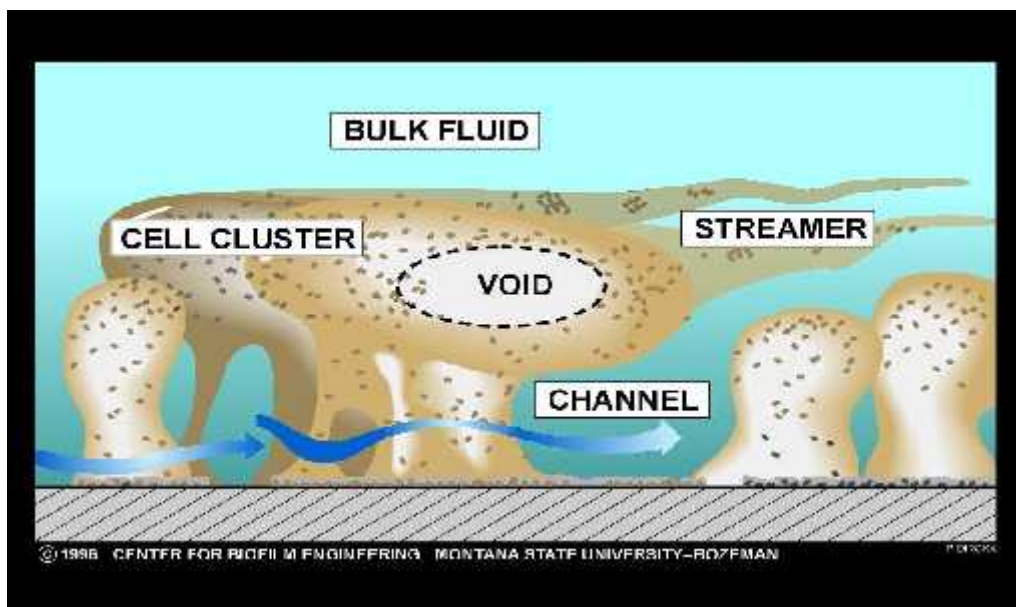


Figure 4: Aspect d'un biofilm mature

Center for Biofilm Engineering Montana State University-Bozeman

3. La formation du biofilm

Le développement du biofilm est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes et aboutit à la formation d'une communauté complexe d'organismes (figure 5). Pour former ces communautés, les organismes doivent intégrer des messages extérieurs et intérieurs, communiquer entre eux (détection de la densité de population et des espèces) et se coordonner dans le temps.

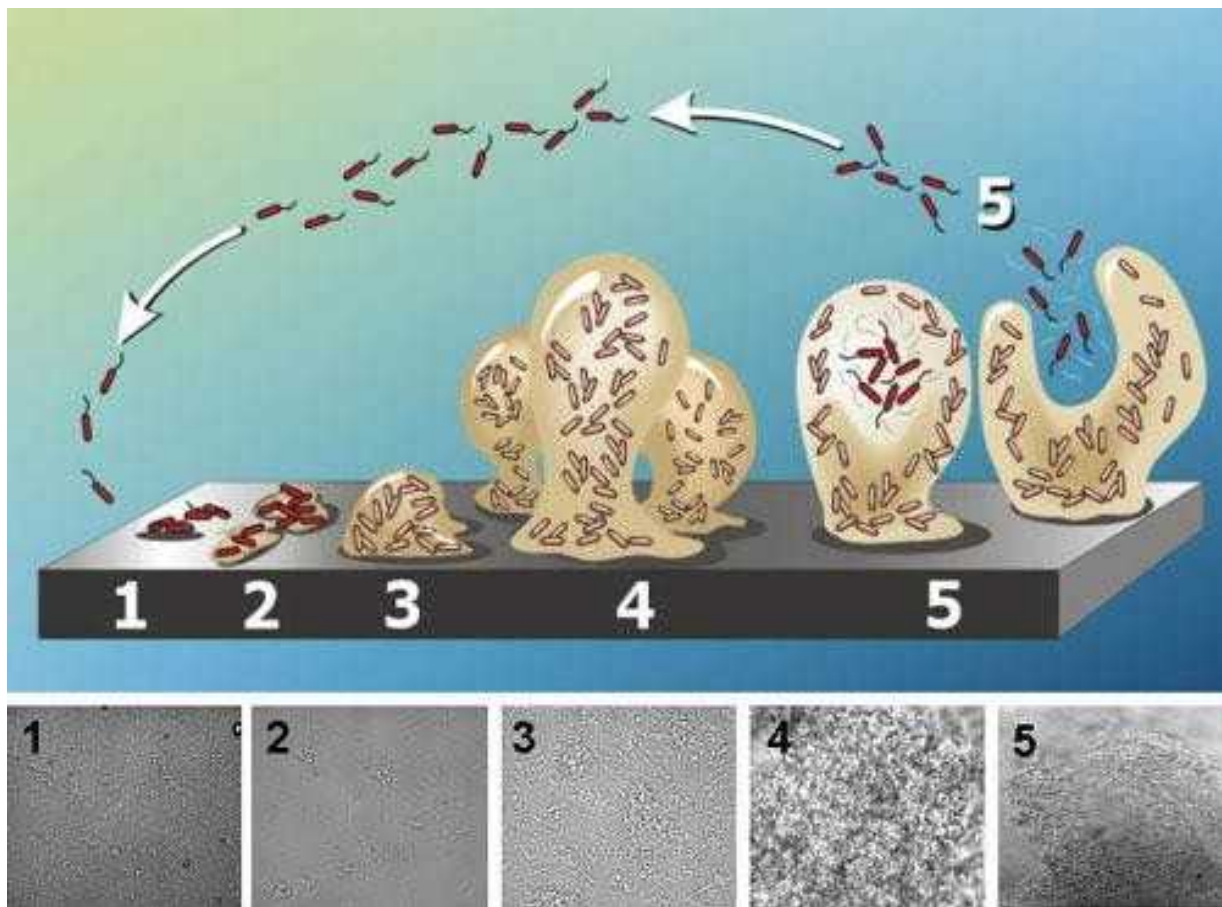


Figure 5 Cycle de formation d'un biofilm (Davies, 2004)

3.1 Film de conditionnement

En premier lieu, un film de conditionnement, est produit pendant l'immersion dans un liquide (**Belmar-Beiny et Fryer, 1992 ; Boyd et al., 2000**). Le film de conditionnement peut être constitué par des composés chimiques inorganiques ou organiques ou des composés biologiques de l'environnement

(Zottola et Sasahara, 1994). La nature du film de conditionnement sera affectée par la nature de la surface et la composition de la phase liquide (Pratt-Terpstra et Busscher, 1998 ; Boyd et al., 2000).

D'une façon générale, la surface de tout support exposé à un milieu aqueux sera inévitablement et presque immédiatement conditionnée ou recouverte de polymères provenant de ce milieu. L'adsorption de ces molécules provoque des modifications des propriétés physico-chimiques de surface du support et affecte l'adhésion bactérienne qui sera ainsi favorisée ou inhibée. Le film de conditionnement joue un rôle très important dans les surfaces en contact avec les aliments (Malek et al., 2013).

3.2 Transport

La deuxième étape correspond au transport des microorganismes à proximité de la surface. Le transport des bactéries dépend de la nature du milieu dans lequel elles évoluent (viscosité, force ionique, etc.) ainsi que du mouvement de ce milieu (écoulement, flux, mouvement brownien, sédimentation, etc.). Les appendices (pili, flagelles) aident la bactérie à se déplacer dans un milieu, et sont indispensable à la formation du biofilm (Vallet et al., 2001). Chez *Escherichia coli*, la présence de flagelles est importante pour le mouvement de la bactérie le long de la surface et celle des pili pour les interactions initiales avec la surface (Pratt et Kolter, 1998).

3.3 Adhérence

L'adhésion d'un microorganisme à une surface est décomposée en adhésion réversible et adhésion irréversible qui constitue la première étape de la formation du biofilm (Costerton, 1999).

❖ Adhésion réversible

Les interactions initiales développées entre les cellules bactériennes et la surface sont désignées sous le nom d'adhérence réversible. Les diverses forces d'interaction influençant le procédé réversible d'adhérence sont les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques et les interactions hydrophobes. Pendant cette étape, les bactéries peuvent encore être facilement enlevées par les forces de cisaillement (Marshall et al., 1971).

❖ Adhésion irréversible

Lors de l'adhésion irréversible des interactions de courte distance et forte amplitude interviennent, des réactions spécifiquement moléculaires entre les structures de la surface des bactéries et la surface du substrat deviennent prédominantes (**in Malek et al, 2013**). La bactérie acquiert de nouvelles structures (flagelles latéraux, fimbriae, adhésines, exopolymères) et modifie son phénotype en réponse au contact avec la surface. Les bactéries vont s'ancrer au support par l'intermédiaire d'appendices cellulaires, les pili. Chez *Klebsiella pneumoniae*, les pili de type III ont un rôle important dans la colonisation des surfaces (**Di Martino et al ; 2003**). L'adhésion est également renforcée par la production des substances polymériques extracellulaires (EPS). Ces nouvelles structures macromoléculaires sont à l'origine de nouvelles interactions entre la bactérie et le support comme des liaisons chimiques (électrostatiques, covalentes, hydrogène), des interactions dipôles (dipôle – dipôle, dipôle – dipôle induit, ion – dipôle) et des interactions hydrophobes (**Millsap et al., 1997 ; Donlan, 2002; Simões et al., 2008**).

3.4 Maturation du biofilm

La croissance et la maturation du biofilm correspond à la formation des micro colonies et de la matrice organique. Celle-ci est en fait un mélange complexe de macromolécules constitué outre les EPS, de protéines et d'ADN (**Sutherland, 2001**). Différents facteurs physiques, chimiques et biologiques vont influencer la formation du biofilm. Certains de ces différents paramètres sont regroupés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Facteurs impliqués dans la formation des biofilms (Wimpenny et al. 2000).

Facteurs	Implication(s)
Facteurs génétiques	Génotype spécifique de l'organisme Expression de gènes liés aux propriétés des surfaces Expression de système signal Production d'EPS Taux de croissance, affinité pour les substrats Expression de facteurs génétiques non directement liés à la formation de biofilm (mobilité, chimiotactisme)
Facteurs physico-chimiques	Composition de la surface et rugosité Nature du substrat Concentration et gradient du substrat Température, pH, potentiel hydrique, pression, oxygène disponible, radiation
Processus stochastiques	Colonisation initiale : attachement et détachement Modifications aléatoires des facteurs biotiques et abiotiques
Phénomènes déterministes	Interactions spécifiques entre les organismes : compétition, neutralité, coopération et prédation
Processus mécaniques	Forces de cisaillement

3.5 Le détachement

Le détachement des cellules du biofilm est la dernière phase du cycle de croissance du biofilm. Il est à la fois soumis à une régulation génotypique et à l'influence du milieu environnant. La carence nutritionnelle est le facteur déclencheur du phénomène poussant les bactéries à trouver un milieu plus favorable (O'Toole et al., 2000). Le détachement de cellules est considéré comme un événement lié à divers stress dont les signaux peuvent être portés par le liquide traversant le biofilm (Picioreanu et al., 2001). Les mouvements du liquide et les forces de cisaillements, la multiplication cellulaire (Allison et al., 1990) et une dégradation enzymatique, semblent contribuer très favorablement à la dispersion des bactéries. Cette dispersion se fait soit de manière individuelle, soit de façon plus générale par détachement d'un groupe de cellules (Vats and Lee, 2000).

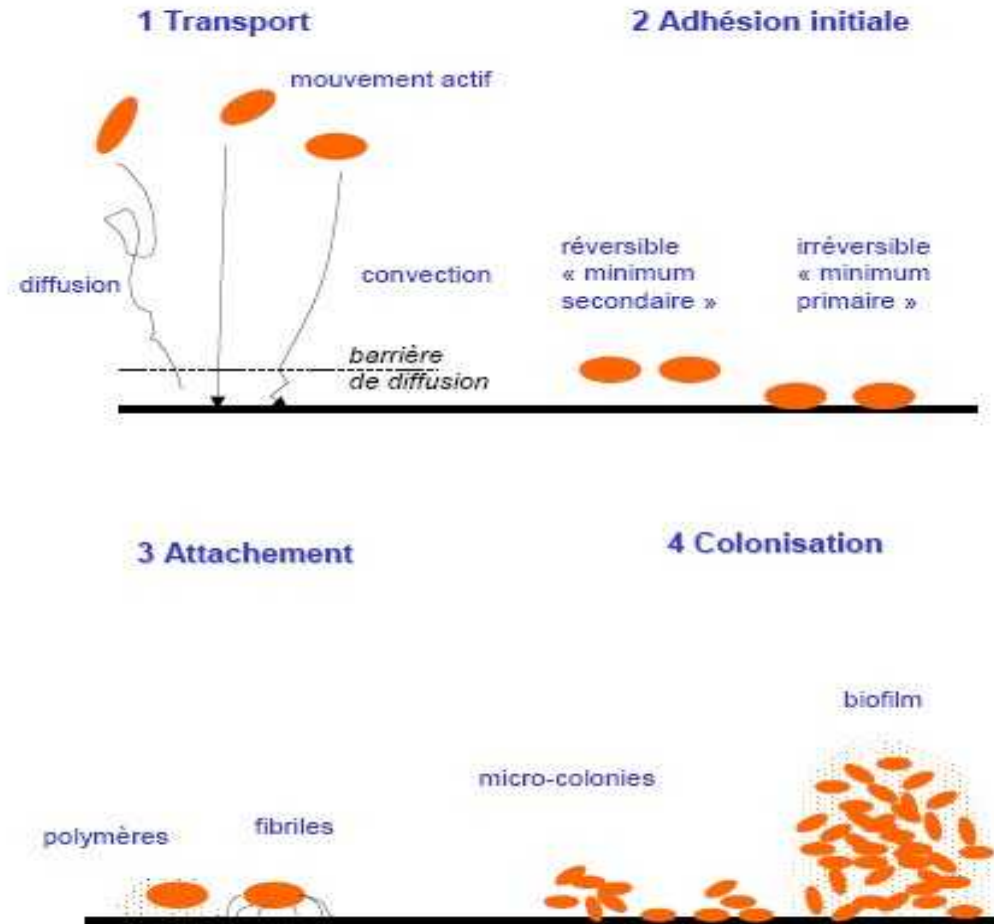


Figure 6 : Représentation des étapes de colonisation des surfaces par des microorganismes (Van Loosdrecht et al., 1990)

4. Influence des propriétés de surface sur la formation du biofilm industriel

En tête de liste des conditions favorisant la génération d'un biofilm dans l'industrie se trouve le type de surface avec laquelle la bactérie est mise en contact. Les bactéries affectionnent particulièrement les surfaces poreuses, comme le bois ou la céramique, à cause de leurs micro-cavités hospitalières. Parmi les matériaux communément utilisés dès les industries de transformations alimentaires (systèmes ouverts comme les ateliers ou fermés comme les lignes de transformation), l'acier

inoxydable demeure le matériel de choix, parce que, en plus d'être non seulement résistant à la corrosion en milieux alcalin et acide, il est extrêmement hygiénique (**Boulangé-Petermann et al., 1997**).

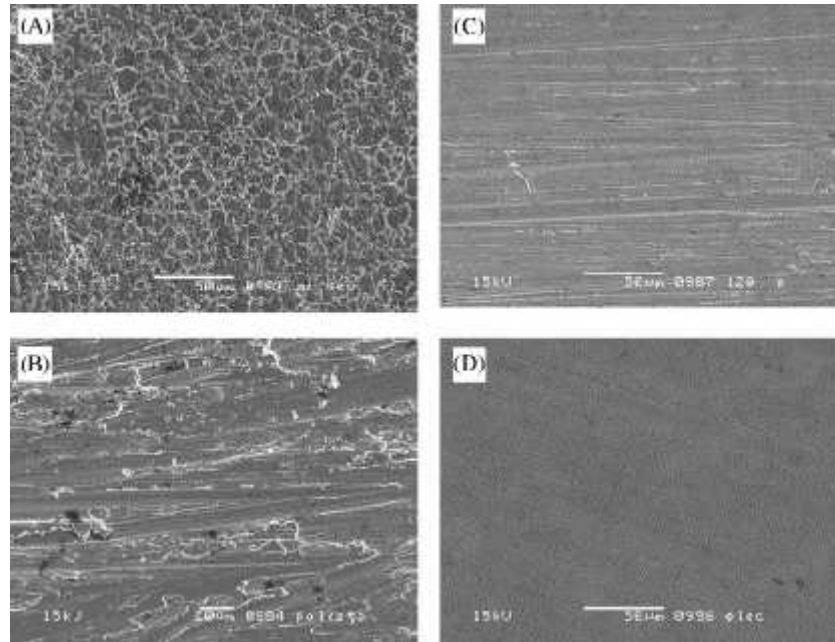


Figure 7 : Micrographe en MEB de surfaces en inox avec différents finis de surface. A : sans traitement de polissage, B : polissage 80 grit, C : polissage 120 grit, D : électropolissage. (**Hilbert et al., 2003**).

4.1 La rugosité

La rugosité d'un support peut favoriser l'adhésion en protégeant les microorganismes des phénomènes de cisaillement hydrodynamique. En effet, la rugosité permet d'augmenter la surface de contact entre le microorganisme et le support, favorisant l'attachement (**Donlan, 2002**). Des chercheurs ont rapporté une corrélation positive entre l'adhérence et l'augmentation de la rugosité de la surface (**Hoffman, 1983; Pedersen, 1990; Leclercq-Perlat et Lalande, 1994; Wirtanen et al., 1995**). Généralement l'augmentation de la rugosité de la surface affecte la rétention des micro-organismes sur cette surface (**Whithead et Verran, 2006**).

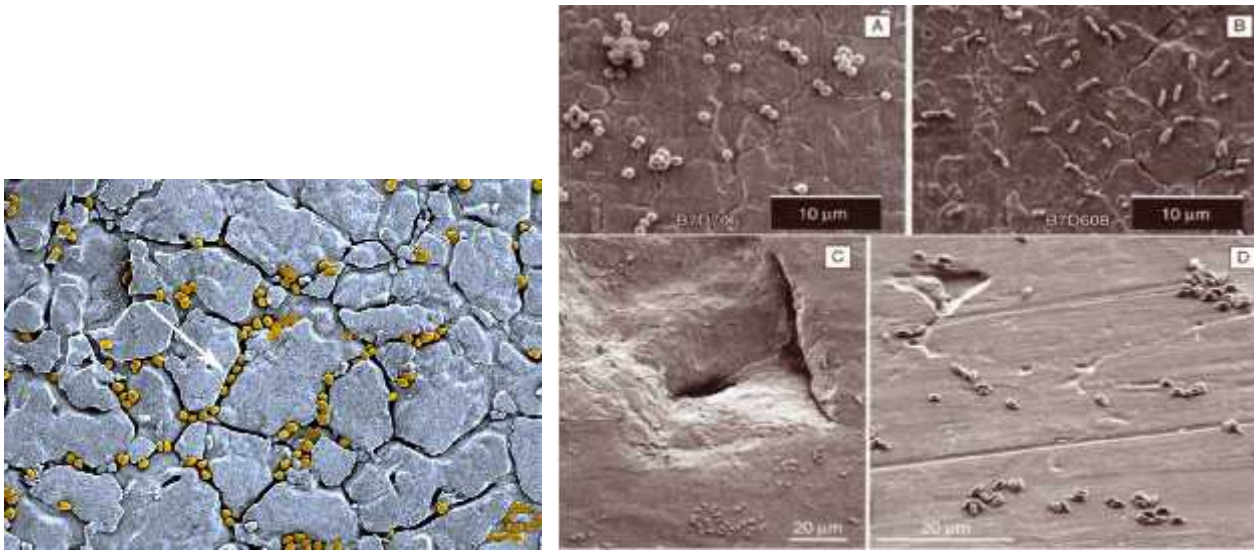


Figure 8 : Adhésion de différents microorganismes sur des surfaces en acier inoxydable. (A-B) : adhésion par de *taphylococcus caprea* et *Pseudomonas fluorescens* à l'inox avec un fini de surface 2B, (C-D) : adhésion des spores de *B. cereus* sur des supports avec des topographies irrégulières. Adapté de **Faille et Carpentier (2009)** par **Marchand et al., (2012)**. Les cellules peuvent adhérer de manière isolée ou par groupe.

4.2 Hydrophobicité

Si la porosité joue un rôle clé, l'hydrophobicité (propriété qui permet aux liquides de s'étaler plutôt que de perler) semble aussi revêtir une importance primordiale. En effet, les matériaux hydrophobes, peu chargés (téflon, polyéthylène, polystyrène, etc.) fixeraient plus facilement les bactéries que ceux de nature hydrophile, comme le verre. (Figure 9)

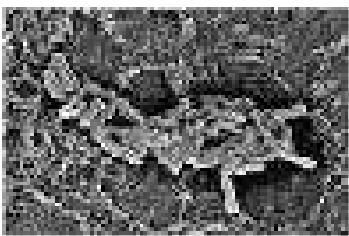


Figure A

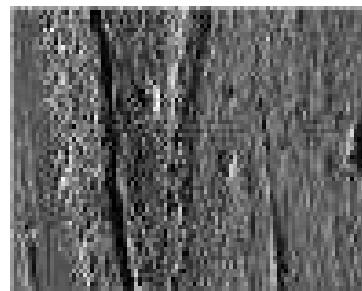


Figure B

Figure 9 : Certaines surfaces sont plus « attachantes » que d'autres pour les pathogènes : après 24 heures de contact à 20°C, la bactérie *Escherichia coli* se fixe beaucoup plus au plastique (A) qu'à l'acier inoxydable (B).

L'hydrophobicité des bactéries est également impliquée dans son adhésion à une surface inerte et elle est due en grande partie à la présence des composés de surface de la bactérie, utiles à l'adhésion (**Rosenberg et al., 1990**).

) Techniques de mesure de l'hydrophobicité

Pour évaluer l'hydrophobicité d'une surface, deux techniques ont été utilisées : la mesure d'angle de contact et la mesure de l'adhésion aux solvants. Cette dernière technique s'applique seulement aux cellules vivantes.

- La mesure de l'angle de contact entre une goutte d'eau et la surface à étudier permet une évaluation directe des propriétés hydrophobes / hydrophiles de la surface (**Rosenberg et al., 1990**). La surface est dite hydrophobe quand l'angle est supérieur à 50° et hydrophile quand l'angle est inférieur à 50°.

- La méthode d'adhésion aux solvants (MATS) dérive d'une première méthode mise au point par (**Rosenberg et al., 1980**) qui utilisait l'adhésion à l'hexadécane uniquement. (**Bellon- Fontaine et al., 1996**) et ont développé cette technique avec l'étude de quatre solvants hexadécane et hexane (solvant apolaire), éther (solvant polaire basique, donneur d'électrons) et chloroforme (solvant polaire acide, accepteur d'électrons).

La méthode MATH consiste à mettre en contact une suspension bactérienne de densité optique (DO) connue avec le solvant. Après une brusque agitation, des micro- gouttelettes de solvants se forment sur lesquelles les bactéries adhèrent, ou non, selon l'hydrophobicité. Il suffit de mesurer la DO de la phase aqueuse et de déterminer le pourcentage d'adhésion au solvant, à l'aide de ce rapport :

$$\frac{\text{DO (phase aqueuse de départ)} - \text{DO (phase aqueuse après mélange)}}{\text{DO (phase aqueuse de départ)}}$$

Il est permis de dire qu'une bactérie est hydrophobe quand ce pourcentage est supérieur à 60%, hydrophile quand ce pourcentage est inférieur à 40% et moyennement hydrophobe quand le pourcentage est entre ces deux valeurs (**Lee et Yii, 1996**).

5 Lutte contre les biofilms dans les industries laitières

5.1 Problématique

La formation de biofilm pose des problèmes dans beaucoup de branches de l'industrie alimentaire (**Poulsen ,1999**). En industrie laitière, les biofilms se forment habituellement sur les surfaces qui sont en contact avec des fluides, et peuvent être une source de contamination bactérienne responsable de la réduction de la durée de conservation des produits et de la transmission de maladies (**Carpentier et Cerf, 1993 ; Zottola et Sasahara, 1994 ; Dunne, 2002 ; Agarwal et al., 2006**). La formation des biofilms sur les équipements laitiers peut mener à des problèmes d'hygiène et à des pertes économiques (**Bremer et al., 2006 ; Zhao et Liu,2006 ; Gram et al., 2007**).

Les biofilms sont plus résistants aux agents antimicrobiens comparés aux cellules planctoniques ce qui fait de leur élimination à partir des équipements de traitement des denrées alimentaires un défi important (**Simões et al., 2006 ; Simões et Vieira, 2009**). . La résistance des biofilms aux traitements conventionnels augmente la nécessité de développer de nouvelles stratégies de prévention (**Singh et al., 2002 ; Simoes et al., 2009**).

5.2 Caractéristiques des biofilms des bacilles thermophiles :

En industrie laitière des pressions sélectives sont exercées par la chaleur, les résidus alimentaires, le pH et l'activité de l'eau. La structure des biofilms formés par les bacilles thermophiles, basé sur l'acier inoxydable peuvent être former d'une monocouche dans les sections régulièrement nettoyé (**Flint et aL,1997**) (**figure10**).

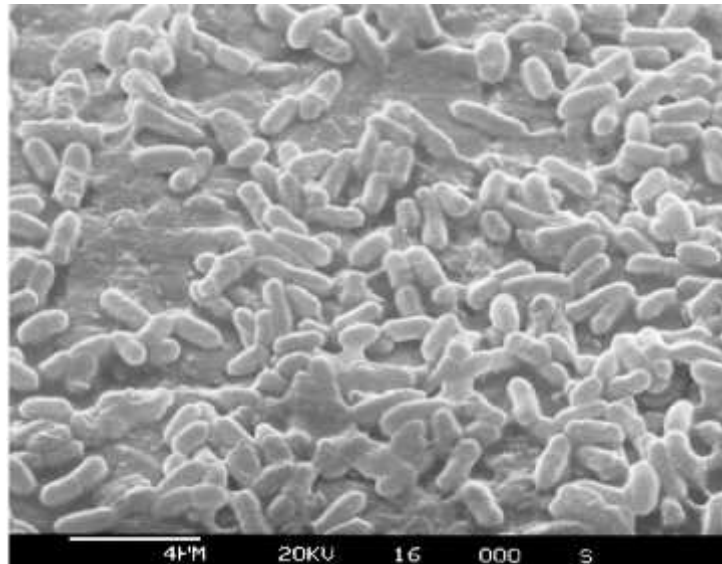


Figure 10 : Micrographie électronique à balayage d'un biofilm de 18h formé par *A. flavithermus* sur une surface en acier inoxydable (Flint et al. 2001)

En outre la formation de biofilm des bacilles thermophiles se produit dans les sections où les températures sont élevées de (40-65 °C). Les exemples incluent les sections de préchauffage et de l'évaporation du lait, échangeurs de chaleur à plaques (PHE) utilisés lors du processus de la pasteurisation, séparateurs centrifuges (utilisé pour séparer la crème du lait entier) fonctionnent à des températures chaudes (45 - 55 °C) le recyclage des boucles dans les usines de fabrication de beurre, chauffe-crème en matière grasse laitière anhydre (Burgess et al., 2010). D'une manière générale, les biofilms des bacilles sont des structures extensives qui ont tendance à s'étaler contrairement aux biofilms de *B. cereus* plus compacts et organisés en hauteur (figure 11)

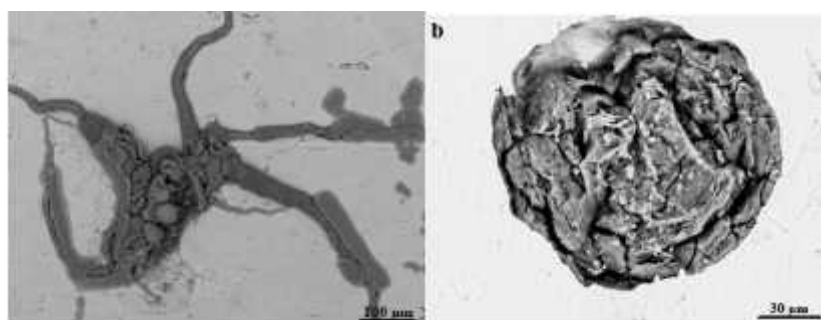


Figure 11 : Structures de biofilms in vitro observés en microscopie électronique à balayage environnemental. A : Biofilm de bacille thermophile b : biofilm de *B. cereus* (Malek, 2016 b)

5.3 Nettoyage industriel des équipements laitiers :

Le contrôle des équipements et des installations dans les laiteries comporte généralement un processus de nettoyage en place (NEP ou CIP en anglais pour Cleaning in place). Le NEP est défini comme le nettoyage des circuits d'usine ou de canalisation sans démonter ou ouvrir l'équipement et avec peu ou pas de participation manuelle de la part de l'opérateur (**Romney, 1990**).

Dans l'industrie laitière, l'efficacité avec laquelle les opérations du nettoyage et de désinfection sont effectuées affecte considérablement la qualité des produits finis (**Bremer et al., 2006 ; Sharma et Anand, 2002**). Généralement, le procédé standard inclut les étapes suivantes :

- Rinçage du système avec de l'eau à la température ambiante propre pendant 5 à 20 minutes. Ce rinçage assure l'élimination des restes de la matière première produite ou traitée
- Nettoyage avec une solution alcaline (la concentration appropriée de NaOH par exemple est habituellement 1.0 à 1.5%) à une température de 75 - 80°C pendant 6 à 45 minutes. La solution alcaline enlève les contaminants organiques (protéines, polysaccharides) collées à la surface
- Rinçage avec de l'eau chaude
- Nettoyage avec un agent acide (la concentration appropriée de l'acide est généralement de 0.5 à 1%) pendant 5 à 45 minutes à une température entre 60°C et 90°C.

L'acide assure l'élimination des sédiments inorganiques ; il n'est pas nécessaire de l'appliquer à chaque traitement ; une fois par semaine est suffisante. La fréquence est conditionnée par la dureté de l'eau et le degré de contamination inorganique.

-Rinçage final avec de l'eau à la température ambiante pendant 5 à 20 minutes. (**Bylund,1995 ; Tamine et Robinson 1999**).

5.4 Efficacité du CIP sur les biofilms laitiers

L'efficacité des régimes de NEP dans l'élimination des bactéries à Gram positif connues par leur capacité à former des biofilms dans les installations laitières, telles que les streptocoques thermophiles et les espèces de Bacillus est limitée (**Flint et al., 1999 ; Lindsay et al.,2002 ; Parkar et al., 2004**).

D'après **Bremer et al. (2006)**, il est très difficile d'éliminer un biofilm formé sur des équipements

laitiers même avec des CIP efficaces. Cette situation est illustrée par la figure 12 qui montre des biofilms formés dans un lactoduc et dont l'image a été prise après l'application du CIP dans une laiterie de la région de Tlemcen (**Malek 2016 b**).

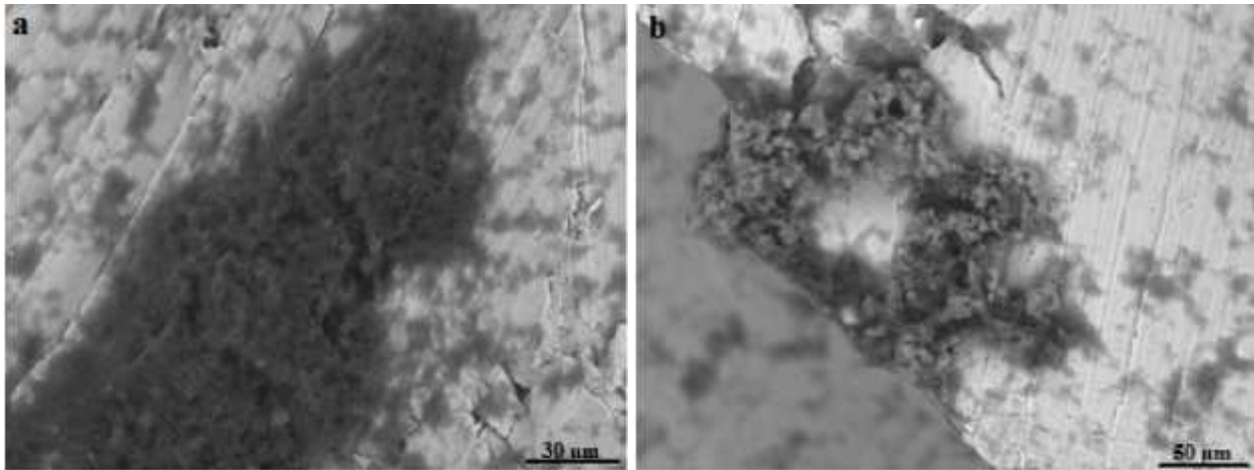


Figure 12 : Biofilms formés in situ sur des lames en inox installés dans une conduite de lait pasteurisé (D'après Malek 2016 b)

Objectif du travail

Le travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie moléculaire département de biologie, et laboratoire de microbiologie à INSFP Mansourah

Les bacilles thermophiles font partie de la flore d'altération de la qualité du lait pasteurisé et de la réduction de sa durée vie. L'objectif de ce travail est l'évaluation et la caractérisation de la contamination de deux laiteries produisant du lait pasteurisé par les bacilles thermophiles. Le plan expérimental de ce travail est :

-) Mise en évidence la présence des bacilles thermophiles dans le produit final (le lait pasteurisé de vache) de deux laiteries de la région de Tlemcen.
-) Identification des souches isolées par galerie API, et l'observation microscopiques
-) Caractérisation des souches isolées à travers l'étude des propriétés d'adhésion et de formation du biofilm.

1. Prélèvements :

Sept échantillons ont été prélevés durant les mois d'Avril et Mai à partir des différents lots de lait de vache pasteurisé constitué comme suit :

-) Le lait de vache pasteurisé en sachet (LPG)
-) Le lait de vache pasteurisé en sachet (LPB)

1.1 Transport des échantillons

Les échantillons sont transportés dans une glacière à 4°C et sont analysés tout suite après leur réception au laboratoire pour que l'échantillon soit représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage tel que préconisé par la norme (N.M08.0.109., 2004).

1.2 Traitement des échantillons :

1.2.1 Préparations des dilutions décimales :

Près de la zone stérile, on essuie une extrémité du sachet de lait de vache pasteurisé avec un coton imbibé d'alcool, et par un couteau ou une anse de platine bien stérile, on coupe l'une des extrémités, une fois le sachet est ouvert on prend 1 ml par pipette stérile et on le verse dans un tube en verre stérile qui contient 9 ml de TSE pour faire des dilutions décimales jusqu'à la dilution 10^{-3} .

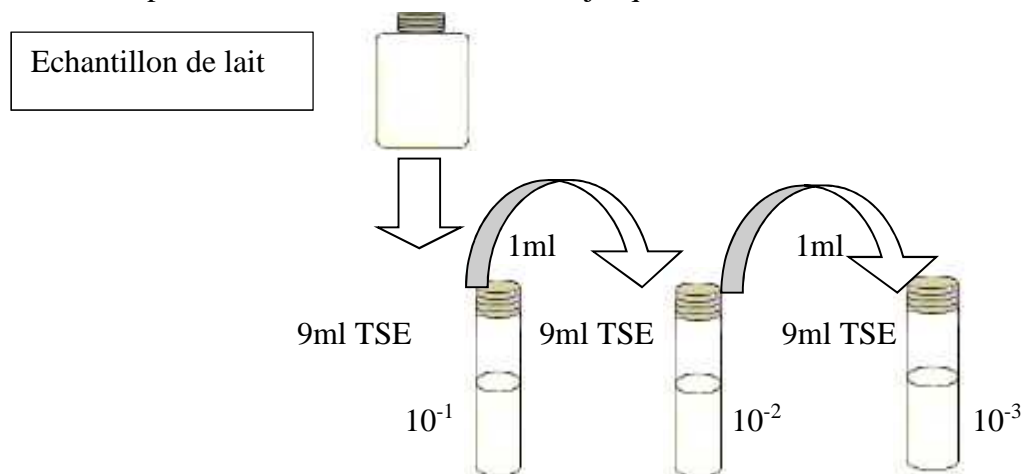
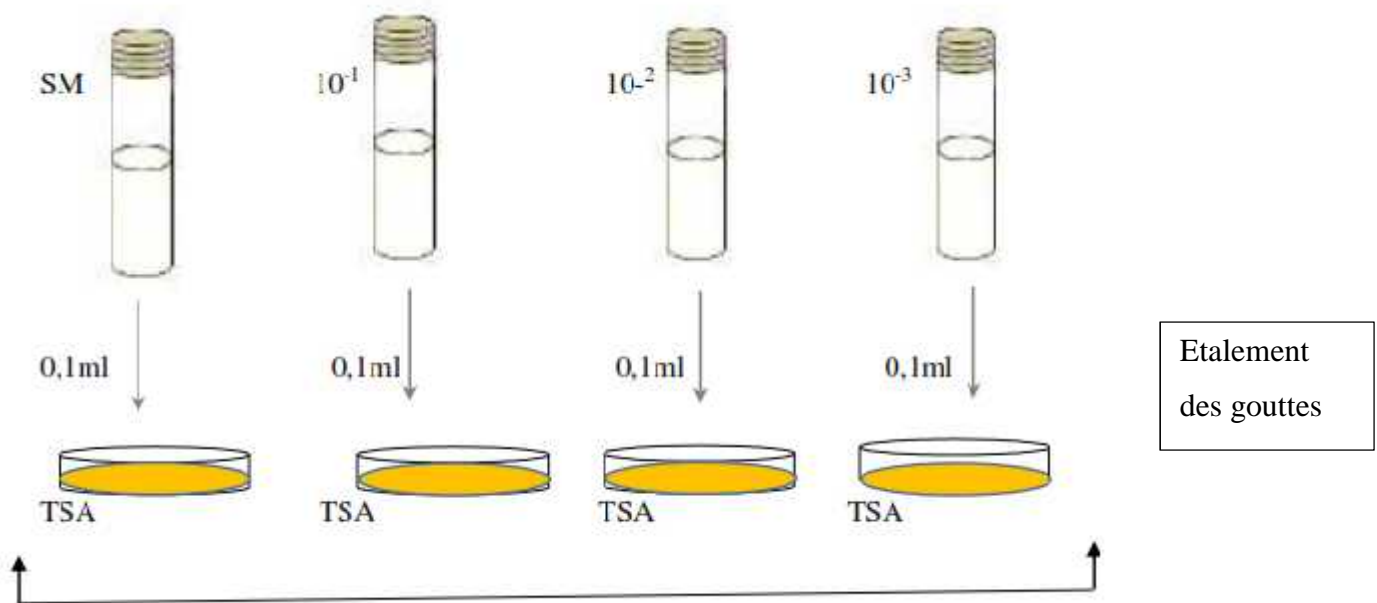


Figure 13 : préparation des dilutions décimales

Un enrichissement du lait de vache pasteurisé (LPG et LPB) avec ces dilutions décimales est effectuées en incubant à 55°C pendant 24h.

1.2.2 L'ensemencement :

L'ensemencement des bacilles thermophiles s'effectue en surface sur le milieu (Trypticase Soja-agar) coulé dans les boites de pétri. Grâce à des micropipettes on dépose 100 µl de la solution mère et de chaque dilution dans les boites de pétri préparée qui contient le milieu. On utilise des pipettes pasteur en forme d'un râteau pour étaler uniformément cet inoculum sur la gélose. Les boites seront incubées à 55°C pendant 24-48h.



Incubation à 55° C, 24 à 48 h

Figure 14 : Recherche et dénombrement des bacilles thermophiles

2 Identification morphologique des souches

On doit examiner les isolats bactériens par la coloration de Gram, et celle de la spore pour la caractérisation morphologique et la production de catalase pour la confirmation de l'identification aux bacilles sporogènes aérobies.

2.1 Caractères cultureux:

) **Aspect macroscopique:**

Cette étude consiste à l'observation directe à l'œil nu l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieu TSA (Trypticase soja agar) après 48h d'incubation en tenant compte des critères suivants :

- ✓ La forme des colonies : rond, irrégulières, circulaire et autres caractéristiques.
- ✓ La taille des colonies par mesure de diamètre.
- ✓ La couleur.
- ✓ L'élévation: convexe, concave, plate.
- ✓ L'opacité : opaque, translucide ou transparente.
- ✓ La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée, et autres caractéristiques.

2.2 Morphologies cellulaire:

) **Coloration de gram:**

Faire un frottis des bactéries sur une lame propre et sèche ;

- Sécher le frottis;

) Fixer à l'alcool puis rincé à l'eau, ou à la flamme en passant trois fois dans la flamme (ou au-dessus du bec) ;

- Colorer au Violet de Gentiane pendant 30 secondes ;
- Recouvrir la lame de Lugol 3 fois 10 secondes ;
- Faire couler l'éthanol sur la lame jusqu'à décoloration ;
- Rincer à l'eau distillée;
- Contre colorer à la Fuschine phénolée pendant 15 secondes.

- Rincer à l'eau distillée;
- Sécher le frottis.

Observation de la préparation:

Observer le frottis à l'immersion (objectif $\times 100$), il faut noter la forme, la taille et le mode de groupement.

) Recherche des spores

La recherche des spores est réalisée sur des cultures de 7 jours après coloration à la fuchsine et observation au microscope, à l'immersion.

3 Identification biochimique

3.1 Test de catalase

Sur une lame en verre bien nettoyée on met une goutte de l'eau distillée, puis on dissocie un fragment de culture bactérienne, en formant une suspension et on ajoute une goutte d'eau oxygénée. Le dégagement d'oxygène se traduit par effervescence qui est un résultat positif visible à l'œil nu, l'absence d'effervescence est un résultat négatif.

3.2 Identification par galerie API 20 E

Les 12 premiers tests de la galerie API 20 E sont utilisés pour l'identification au genre *Bacillus* et autres genres proches. 4 souches sont choisies et soumises à une détermination du biotype par la galerie API 20 E (Guide API 20 E) :

) Préparation de l'inoculum

- A l'aide d'une pipette prélever une colonie de 24h bien isolée sur milieu gélosé.
- Réaliser une suspension bactérienne dans 5 ml de l'eau physiologique stérile puis homogénéiser la suspension vortex.

) Inoculation et lecture de la galerie

La galerie est inoculée et lue selon le guide API 20 E. A cause de la déshydratation les plaques ont été incubées à 42°C.

4 Conservation des souches

La conservation des souches s'effectue dans des tubes à essai contenant de la (TSA) inclinée. Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par des stries et incubées à 55°C pendant 24h, ensuite laissées sporuler pendant 3 jours, pour être conservées à 4°C.

5 Etude de l'adhésion et la formation des biofilms des bacilles thermophiles

5.1 . Préparation de la suspension sporale :

La suspension sporale est préparée selon la technique de **(Simmonds et al, 2003)** : Après l'enrichissement des souches un ensemencement par écouvillonnage est effectué sur gélose nutritive. Les boîtes sont incubées pendant 2 jours à 55°C et 4 jours à la température ambiante et un tapis se forme à la surface. Ces cultures sont utilisées pour un taux de sporulation supérieure à 90% de spores, vérifié par examen microscopique après coloration au cristal violet (coloration de spore).

Les spores sont récupérées selon le protocole suivant :

Le tapis microbien formé sur les boîtes d'agar est recouvert par l'EDS, ensuite il est raclé à l'aide d'une pipette Pasteur sous forme de râteau

Le mélange obtenu est recueilli dans un Bécher stérile, puis versé dans des tubes à hémolyses, pour subir 3 centrifugations à 2000g pendant 20 min où le surnageant est jeté à chaque fois et remplacé par l'EDS au même volume.

➤ Traitement thermique de la suspension sporale:

Les suspensions sporales obtenues subissent un traitement thermique à 80°C pendant 10 min afin d'éliminer les formes végétatives. Par la suite on réalise une série de dilutions afin d'avoir des suspensions sporales avec des densités optiques à 590 nm comprises entre $I \sim D_0 \sim 0.6$. Les suspensions sporales ainsi préparées sont conservées à 4°C.

5.2 L'adhésion à l'hexadécane: méthode MATH

➤ **Protocole expérimental:**

Le Protocole mise au point pour *B.cereus* (Faïlle et al., 2010) a été utilisée avec quelques modifications 2 ml de suspension sporale dont la densité optique à 590 nm est ajustée dans un intervalle allant de 0.6 à 1 (Di), sont prélevés et mis dans un tube à hémolyse en verre, et aux quels 400 microlitre de solvant sont ajoutés. L'ensemble est vortexée pendant 10 secondes de façon à obtenir une émulsion.

Une décantation de 15 min pour l'obtention de deux phases séparées est réalisée

- Une mesure de la densité optique de la phase aqueuse à 590 nm est effectuée par un Colorimètre.

Le pourcentage d'adhésion au solvant est alors donné par la relation suivante :

$$A = (D_i - D_f) / D_i \times 100$$

D_i : représente la densité optique initiale,

D_f : représente la densité optique de la phase aqueuse après décantation finale, pour l'hexadécane, lorsque A est supérieure à 60, la spore est dite hautement hydrophobe si A est inférieur à 40, la spore est dite hydrophile, si A est compris entre ces deux valeurs, la spore est dite hydrophobe.

5.3 Formation de biofilm dans les microplaques de titration

La technique de microplaque de titration à 96 puits selon (Auger et al., 2009) est utilisée pour étudier la capacité des souches des bacilles thermophiles à former le biofilm (figure 15)

) **Technique**

Dans les puits des microplaques de titration en polystyrène stérile, 100µl du milieu TSB (tryptic soy both) et 50µl de la suspension bactérienne préparée dans l'eau physiologique et ajustée à une DO (Densité optique) de 0.6 à 0.8 nm sont introduits. La première rangée est laissée vider pour le contrôle du lecteur et le deuxième est rempli par le milieu non ensemencé comme un témoin. Les plaques sont incubées à 42 et 55°C Pendant 24h.

) **Coloration de biofilm au cristal violet**

Après le temps d'incubation, les biofilms formés sur les parois des puits sont mis en évidence par coloration au cristal violet.

- Les microplaques sont d'abord vidées par la micropipette.
- Rinçage à l'eau distillé trois fois pour éliminer les cellules non adhérentes.
- Laisser sécher 10 à 15 min.
- Remplir les puits avec 200µl de cristal violet 1%
- Laisser agir 15 min puis rincer à l'EDS 3 fois.
- Séchage des plaques en position renversé.

)Lecture

Avant la mesure de la DO au spectrophotomètre muni d'un lecteur de microplaque à 630 nm, les puits sont remplis avec une solution dissolvante constitué d'éthanol et d'acide acétique glacial dilué dans du l'eau distillé. Le protocole de formation des biofilms par la méthode microplaques de titration 96 puits est présenté dans la (figure15).

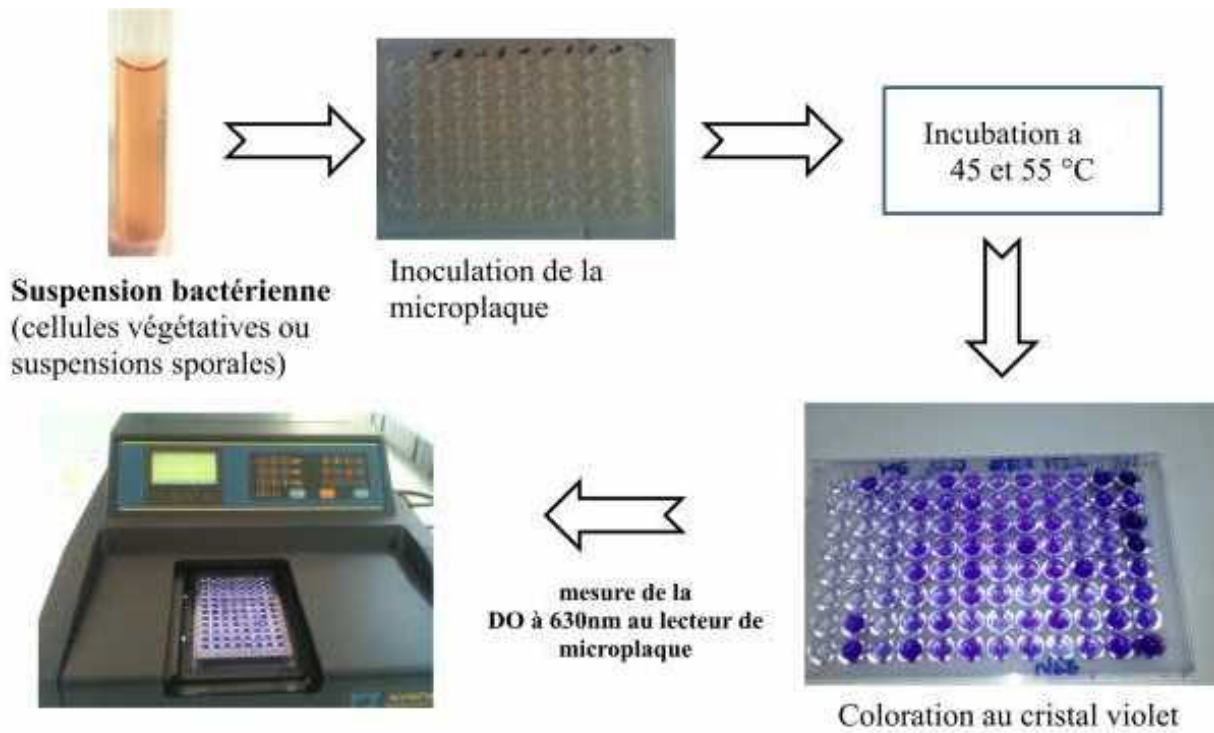


Figure 15 : Schémas représentant le protocole de formation des biofilms par la méthode de microplaques de titration 96 puits

L'analyse des différents échantillons du lait de vache pasteurisé a permis l'isolement de 7 souches de bacilles thermophiles. La caractérisation phénotypique des isolats a porté sur l'étude des caractères morphologiques, physiologique et biochimiques.

1. Caractérisations phénotypiques des isolats :

1.1. Aspect macroscopique :

Les isolements des échantillons du lait de vache pasteurisé et des échantillons de surfaces ont été réalisés à température : 55° après enrichissement 24h à 55°C. L'aspect macroscopique montre des aspects différents qui forment de grosses colonies envahissantes et irrégulières (dentelés), légèrement convexes, ainsi des colonies moyennes à bord circulaires crémeuses. (Figure 16).



Figure 16 : photo montre l'aspect des colonies sur TSA

1.2. Aspect microscopique :

L'aspect microscopique observé après la coloration de Gram, a permis de révéler que toutes les souches se présentent sous formes de bâtonnets de taille variable droits à extrémités arrondies et regroupés sous formes de diplobacille, palissade ou en chainettes, à Gram positifs avec une endospore ovale centrale ou sub-terminale non déformante. (Figure 17,18), Les résultats sont conformes au traits généraux du genre *Bacillus* et autres genres proches, notamment les bacilles thermophiles décrits dans la littérature (**VOS et al., 2009**) et (**Madigan et al., 2006**).



Figure 17 : Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (Observation par microscope optique G×100 a immersion)

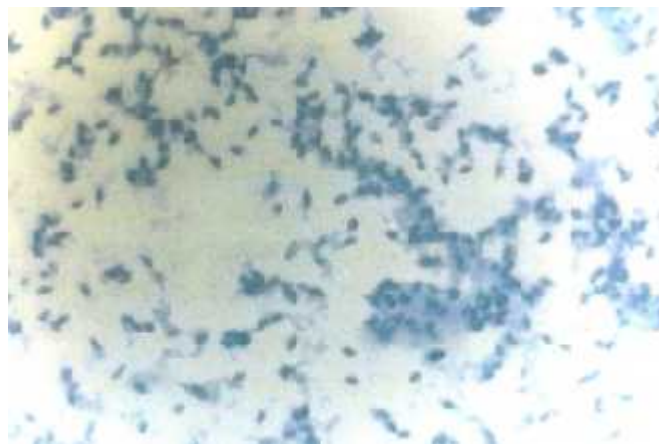


Figure 18 : Observation au microscope optique de la spore après coloration au vert malachite à chaud

2. Caractères biochimiques

2.1. L'étude du type respiratoire

Les résultats du test de la catalase ont montré que toutes les souches analysées sont catalase positives la présence de catalase se traduit par la production des bulles de gaz. Ce résultat confirme l'identité des bacilles thermophiles qui font partie de la flore sporogone aérobie

2.2. Détermination du profil biochimique

Les tests biochimiques ont été réalisés sur plaques API 20 E, 4 souches ont été sélectionnées et identifiées, les résultats obtenus sont analysés par le logiciel API feuille de calcul pour l'identification microbienne.

Tableau 7 : Les résultats de l'identification des bacilles thermophiles par la galerie API

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
S3	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
S4	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+

D'après les résultats du tableau 7 on remarque que la majorité des souches possèdent arginine d'hydrolase, gélatinase, dégrade le mannitol, les souches 3, 4 possèdent la 3-galactosidase, inositol et sorbitol. La souche 3 possède en plus ornithine décarboxylase, production d'indole, dégrade saccharose.

La souche 4 peuvent utiliser le citrate comme source de carbone, la capacité de produire l'acétoïne, et la citrate réductase. D'après ces résultats, 4 biotypes différents sont déterminés (tableau 8).

Tableau 8 : Détermination des biotypes des bacilles thermophiles

biotype	souches	origine	Espèces
Biotype 1	S1	LPB	<i>Bacillus smithii</i> <i>Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis</i> <i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i> <i>Bacillus sphaericus/fusiformis/badius</i> <i>Geobacillus thermoglucosidiasus</i>
Biotype 2	S2	LPB	<i>Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis</i> <i>Bacillus sphaericus/fusiformis/badius</i> <i>Bacillus smithii</i> <i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i> <i>Bacillus firmus</i>
Biotype 3	S3	LPG	<i>Bacillus firmus</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis</i>
Biotype 4	S4	LPG	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus pumilus</i>



Figure 19 : Résultats des plaques API20E de quelques souches

3. Evaluation de l'hydrophobicité des spores des bacilles thermophiles :

Le caractère hydrophobe/hydrophile, des bactéries peut être déterminé à l'aide de la méthode MATH qui repose sur l'affinité des micro-organismes à un hydrocarbure : l'hexadécane. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'adhésion au solvant (tableau 9) :

Tableau 9 : Détermination du caractère hydrophile/hydrophobe des 7 souches des bacilles thermophiles

Souches	Hydrophobicité (%)	Caractère
S1	22	Hydrophile
S2	27	Hydrophile
S3	68	Hydrophobe
S4	36	Hydrophile
S5	28	Hydrophile
S6	19	Hydrophile
S7	23	Hydrophile

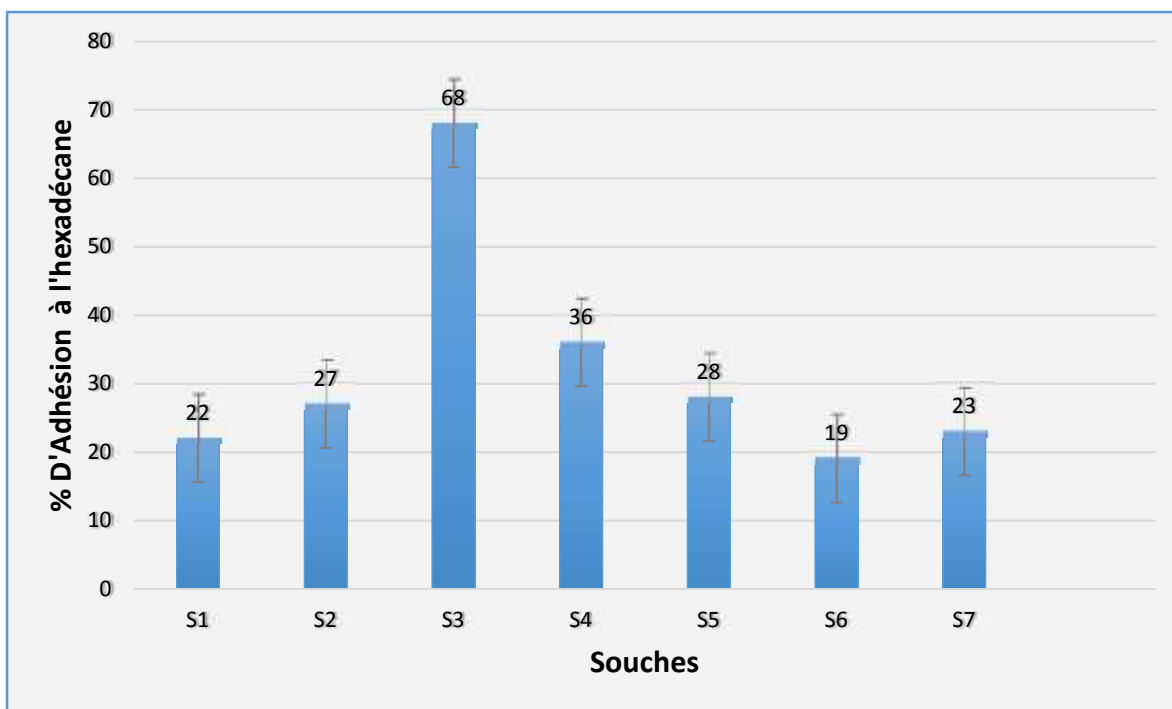


Figure 20 : Adhésion des 7 souches du groupe bacilles thermophiles à l'hexadécane

D'après les résultats du test d'adhésion (Tableau N°9 et figure N°20) on remarque une variabilité chez les spores des 7 souches de bacilles thermophiles dans l'adhésion au solvant apolaire l'hexadécane. 6 souches (S1, S2, S4, S5, S6, S7) montrent une affinité inférieure à 40. Ces spores sont hydrophiles, une souche (S3) est hautement hydrophobe avec une valeur de l'ordre de 68%). La caractérisation de la surface des spores montre que la majorité de nos spores sont hydrophiles.

Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par **Seale (2008)** qui ont trouvé que les spores étudiées avait un caractère hydrophile.

L'hydrophobicité élevée de la souche S3 pourrait être due à la présence d'un exosporium formé par des protéines hydrophobes et des EPS contrairement aux souches hydrophiles qui ne possèdent pas un exosporium (**Seale, 2010**).

En effet selon la littérature l'augmentation de l'hydrophobicité des spores bactériennes est due à l'abondance relative des protéines dans les couches extérieures et l'exosporium (**Doyle et al., 1984**).

Koshikawa et al. (1989) ont examiné la relation entre l'hydrophobicité et la présence d'un exosporium. Ils ont constaté que la propriété hydrophobe des spores est principalement due à l'exosporium, tandis que le manteau des spores a une propriété hydrophobe plus faible.

L'hydrophobie joue un rôle majeur dans l'adhésion des spores (**Faille et al., 2013**). En raison de leur hydrophobicité, l'adhésion des spores est particulièrement élevée pour les matériaux hydrophobes tels que l'acier inoxydable qui est couramment utilisé dans les équipements de transformation des produits laitiers.

4. Détermination du potentiel de formation de biofilm :

L'observation des microplaques à l'œil nu après coloration au cristal violet a montré une coloration intense des parois des puits des microplaques ce qui traduit une production importante de biofilm. La mesure des D.O a confirmé ces résultats pour certain souches en indiquant que la D.O peut être supérieure à 2.5. En retenant la valeur 0.5 comme valeur seuil pour la production de biofilm (**Auger et al 2009**).

Il est possible de définir 4 classes :

-) **Classe 1** : $DO < 0,5$: Faiblement productrice du biofilm.
-) **Classe 2** : $0,5 < DO < 1,5$: Moyennement productrice du biofilm.
-) **Classe 3** : $1,5 < DO < 2,5$: Fortement productrice de biofilm.
-) **Classe 4**: $DO < 2,5$: Hyper productrice.

Les résultats correspondant sont repartis dans les figures (21,22) :

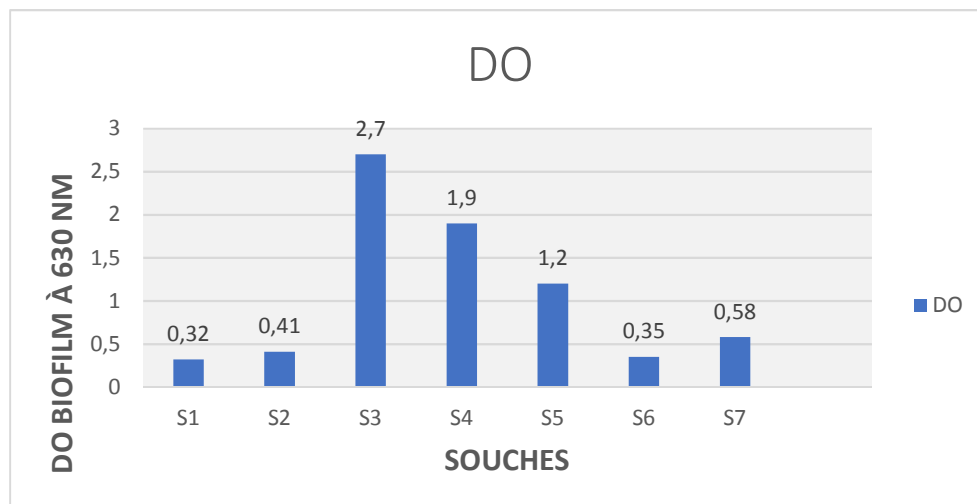


Figure 21 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 42°C

A 42°C : les souches (S1, S2, S6) ont montré des valeurs inférieures à 0,5 donc elles sont faiblement productrices de biofilm, les souches (S5, S7) présentent des valeurs inférieures à 1,5 ils sont considérés comme producteurs moyen de biofilm .la souche S4 présente une valeur supérieure à 1,5 donc c'est une souche fortement productrice de biofilm, la souche S3 une valeur supérieure à 2,5 donc c'est une souche hyper productrice de biofilm (figure 21)

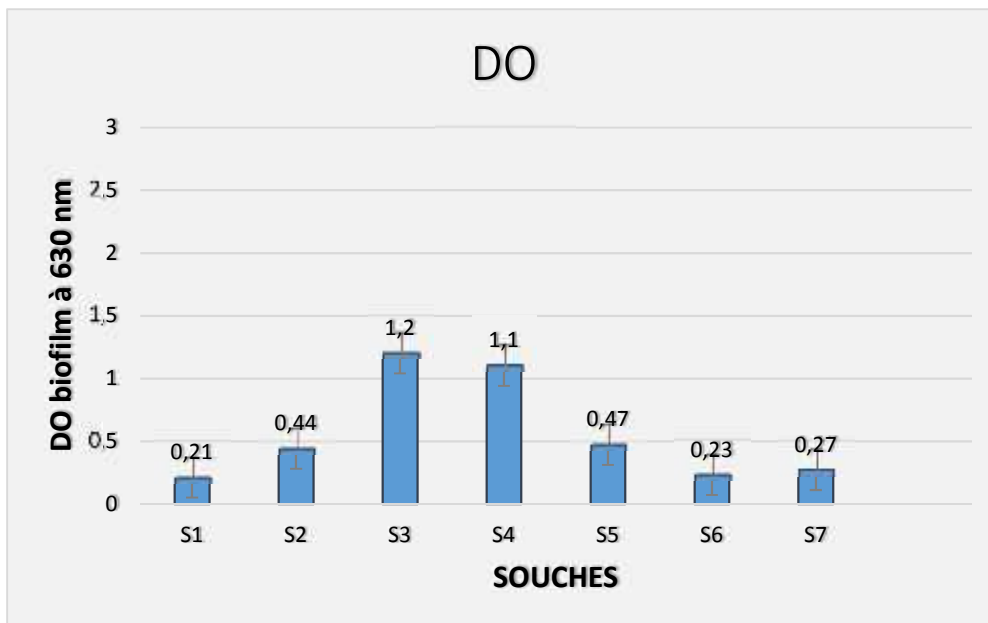


Figure 22 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 55°C

A 55°C :

A cette température la majorité des souches montrent des DO inférieures à 0,5, la production de biofilm chez les souches S3 et S4 diminue, les DO de biofilm sont de l'ordre de 1,2 et 1,1.

Les souche S3 et S4 montrent des DO supérieure à 1,5. Elles sont fortement productrices de biofilm. Tandis que les mêmes souches à 55°C sont faiblement productrices de biofilm. À cette température, elles ont une DO inférieur à 1,5. Les résultats obtenus par **Burgess (2010)** sont différents, une formation importante de biofilm est obtenue aux températures élevées. Cette différence peut être expliquée d'une part par la différence des souches, d'autre part par la technique utilisée.

D'après les résultats présentés dans les 2 figures, il est possible de dire que, le potentiel de formation du biofilm est influencé par la température et que 42°C est la température optimale pour la croissance en biofilm par certaines souches de bacilles thermophiles isolées du lait de vache pasteurisé.

D'après les résultats obtenus la température pour une production optimale du biofilm par les bacilles thermophiles est 42°C elle est inférieure à leur température optimale de croissance. Ces résultats confirment ceux obtenus par les autres mémoires (**Batahri 2015 ; Bensafi ., 2013 ; Benyahia ., 2013 ; Chouiti ., 2013 ; Zeghoudi ., 2016**).

Conclusion générale

Les bactéries adhérentes à la surface d'équipements sont une source majeure de contamination des aliments dans l'industrie agro-alimentaire. Le but fondamental de ce travail est la caractérisation de la contamination du lait pasteurisé produit localement, par les bacilles thermophiles. L'approche méthodologique comprend, d'une part, l'isolement des souches de bacilles thermophiles à partir d'échantillon de lait de vache pasteurisé et leur identification phénotypique (détermination du biotype), d'autre part, la caractérisation des propriétés physico-chimique de la surface des spores, notamment la mesure de leur hydrophobicité et la détermination de leur potentiel de formation des biofilms.

Sept souches sont isolées et retenues pour cette étude. La caractérisation morphologique de ces souches a révélé qu'elles sont des bâtonnets à Gram positif, capable de croître à 55°C et de former les endospores. Elles sont biochimiquement différentes mais partagent quelques caractères entre elles, et sont identifiés aux genres *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinbacillus* et *Geobacillus*.

L'évaluation de l'hydrophobicité de la surface des spores par mesure de leurs pourcentages d'adhésion à l'héxadecane a montré la dominance du caractère hydrophile parmi ces isolats laitiers. Six souches (S1, S2, S4, S5, S6, S7) se sont révélées hydrophiles et une seule souche (S3) présente un caractère fortement hydrophobe. Leur profil d'adhésion et de formation du biofilm tel que déterminé par la technique des microplaques a révélé différents capacité de formation le biofilm. (Faible, moyenne, forte).

Enfin pour prévenir contre la contamination il faut appliquer les bonnes pratiques d'hygiène avec un système HACCP, et améliorer le système de nettoyage en place (CIP) des équipements laitiers.

1. **ANONYME, (2000)**. « Manuel de transformation du lait, 2ème édition ,105 p».
2. **Apilanez I., Gutiérrez A. and Diaz M. 1998**. Effect of surface materials on initial biofilm development. *Bioresource Technology*.66: 225-230.
3. **Arrêté interministériel (1993)**. D'après le journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire. N°69 correspondant aux spécifications et à la présentation de Certains laits de consommation. P 2-5.
4. **Auger S, Ramarao N, Faille C, Fouet A, Aymerich S, Gohar M (2009)**. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and non pathogenic and non pathogenic strains of the Bacille cereus group. *American society for microbiology*. 3:6661-6618.
5. **Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., Gohar, M. (2009)**. Biofiim Formation and Ceil Surface Properties among Pathogenic and Nonpathogenic Strains of the Bacillus cereus Group. *Applied and environmental microbiology* 75(20), 6616-6618.
6. **Belmar-Beney M .T., Fryer P J. 1992**. Bulk and surface effects on the initial stages of whey fouling. *Food and Bioproducts Processing*. 70: 193-199.
7. **Block J.C., Sibille 1., Gatel D., Reasoner D.J., Lyking B., Clarck R.M., 1997**. Biodiversity in drinking water distribution systems: a review. *Proceedings of the specialized conference on ‘The microbiologically quality of water’, IWSA and FBA, London, pp.63-70.*

8. **Boulangue-Petermann, L., Rault, J., and Bellon-Fontaine, M.N. (1997).** Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling* 11, 201-216.
9. **Bremer P. J., Fillery S., McQuillan A. J. 2006.** Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 254–262.
10. **Burgess SA, Lindsay D, Flint SH., (2010).** Thermophilic Bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* 144: 215-225.
11. **Bylund G. 1995.** Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund: 436.
12. **Chen, X. G., Stabnikova, O., Tay, J. H., Wang, J. Y., & Tay, S. T. L. (2004).** Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. *Extremophiles*, 8(6), 489-498.
13. **Chouti fadia., « caractérisation des bacilles thermophiles dans le lait recombinaé et le lait de vache » Université Aboubekr Belkaid Tlemcen (2013)**
14. **Costerton J.W. and Lewandowski Z. 1995.** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiology*.49: 711-745.
15. **Costerton J.W. 1999.** Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*.11: 217-221.
16. **Di Martino P., Cafferini N., Joly B. and Darfeuille-Michaud A. 2003.** *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology*.154: 9-16.

17. **Dufrêne, Y.F., Boonaert, C.J.P., and Rouxhet, P.G. (1996).** Adhesion Didi Raoult - Dictionnaire de maladies infectieuses (1998) Elsevier Paris Edition scientifique et médicale, P 365.. *BBiointerfaces*, 7 , 113-128
18. **Elimelech, M., Gregory, J., Jia, X., and Williams, R. (1995).** Particle Deposition and Aggregation: Measurement, Modelling and Simulation. (Oxford: Butterworth-Heinemann).
19. **-F. Malek, B. Moussa Boudjemaa, A. Aouar-Métri & M. Kihal.2013.** Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria Dairy Science & Technology Official journal of the Institut National de la Recherche Agronomique 93:75-76
20. **Faille, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garénaux, E., Guerardel, Y. (2010).** Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or floted with an exosporium Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* 143, 125-135.
21. **Faille, C., Sylla, Y., Le Gentil, C., Bénézech, T., Slomianny, C., Lequette, Y. (2010).** Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. *Food Microbiology* 27, 769 -776.
22. **FAVIER J.C., (1985).** Composition du lait de vache-Laits de consommation, <http://www.horizon.documentation.fr>
23. **Fletcher M. 1980.** Adherence of microorganisms to smooth surfaces. In *Bact. Adher.*, ed E.H. Beachy. Chapman and Hall, London.

24. **Flint B, Brooks JD., (1997)**:Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of controle 54:81-97.
25. **Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., & Crawford, R. (2001)**. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, 90(2), 151-157.
26. **FREDOT E., (2005)**. *Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique*, Tec et Doc, Lavoisier:10-14 (397 pages).
27. **FREDOT E., (2006)** *Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique*, Tec et Doc, Lavoisier: 25 (397 pages).
28. **Guiraud, J.P. 1998**. *Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire*. Ed ©Dunod, Paris.
29. **HARDING F., (1995)** *Milk quality*, Blackie academic et professional : 113(166 pages).
30. **Hilbert L R, D Bagge-Ravn , J Kold ,, L Gram. 2003**. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance.*International journal of biodeterioration and biodegradation*, 52: 175-185.
31. **Jakob E., Winkler H. et Haldemann J. (2009)**. Critères Microbiologiques Pour La Fabrication Du Fromage. Edition, Agroscope Liebfeld-Posieux. Groupe de discussions N° 77. F. pp :5-31.
32. **Jenkinson H.F. and Lappin-Scott H.M. 2001**. Biofilms adhere to stay. *TRENDS in Microbiology*.9: 009-010.
33. **Kadurugamuwa J.L. and Beveridge T.J. 1995**. Virulence factor are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal

growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *Journal of bacteriology*.177: 3998-4008.

34. **Kolter R., Greenberg E. P. 2006.** Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature*. 441: 300–302.
35. **Larpent, J.P. 1997.** Mémento technique de microbiologie .3^{eme} Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 910 pages.
36. **Lasa I. 2006.** Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int. Microbiol.* 9: 21–28.
37. **Leenars, A.F.M. (1988).** A new approach to the removal of sub-micron particles on surfaces, detection, adhesion and removal, K.L. Mittal, ed (New York: Plenum press), pp. 361-372.
38. **Madigan, M. T. (2006).** The family heliobacteriaceae. In *The prokaryotes* (pp. 951-964). Springer US.
39. **Madigan, M. T. (2006).** The family heliobacteriaceae. In *The prokaryotes* (pp. 951-964). Springer US.
40. **-Malek F., B.Moussa-Boudjema., F.Khaouani-yousfi., A.Kalai and M. Kihel,(2012).** Microflora of biofiim on algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality ofpasteurized milk. *African Journal ofMicrobiology Research* 6, 3863-3844.
41. **Millsap K. W., Reid G., van der Mei H. C., Busscher H. J. 1997.** Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow. *Biomater.* 18: 87–91.

42. **Mouton C., Bilak R., Michaïlesco P. and Valcarcel J. 1999.** Les biofilms bactériens de la cavité buccale. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 14: 112-120.
43. **Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., (2001).** Taxonomic study of aerobicthermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thennodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius* and *Geobacillus therrmodenitrificans*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51.
44. **Norme marocain., 2004. 08.0.109.** Microbiologie alimentaire –Dénombrement des Enterobacteriaceae par comptage des colonies à 30°C.
45. **O'Toole G.A., Gibbs K.A., Hager P.W., Phibbs P.V. and Kolter R. 2000.** The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology.182: 425-431.
46. **POUGHEON S. et GOURSAUD J., (2001)** Le lait caractéristique physicochimiques In DEBRY G., Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 6(566 pages).
47. **Pratt L. A., Kolter R. 1998.** Genetic analysis of *Escherichia Coli* biofilm formation :roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol. Microbiol. 30: 285-293.
48. **Pratt LA, Kolter R. 1998.** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol ; 30 : 285-93.

49. **Prigent-Combaret C, Brombacher E, Vidal O, et al. 2001.** Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol*; 183 : 7213-23.
50. **Ramage, G., VandeWalle, K., Wickes, B.L., and Lopez-Ribot, J.L. (2001).** Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2475-2479.
51. **Romney A. J. D. 1990.** *Cip: Cleaning in Place*. The Society for Dairy Technology, Cambridge shire, UK.
52. **Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. W. (2003).** A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International journal of food microbiology*, 85(1), 45-61.
53. **Roques C. 2000.** Biofilms bactériens. *Précis de biologie clinique*, 391-405.
54. **Rosenberg, R. (1980).** Effect of oxygen deficiency on benthic macrofauna. In' Freeland, J. H., Farmer, D M., Levings, C D. (eds.) *Fjord oceanography*. Plenum Publ. Corp., New York, p. 499-514
55. **Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W. and Davies D.G. 2002.** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*.184: 1140-1154
56. **Semmler A.B., Whitchurch C.B., Mattick J.S.1999.** A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*.145: 2863-2873.
57. **Simmonds, P., Mossel, B.L., Intaraphan, I., Deeth, H.C.(2003).** Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *Journal of food protection* 66, 2070-2075.

58. **Simões M., Simões L. C., Cleto S., Pereira M. O., Vieira M. J. 2008.** The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 335–341.
59. **Stewart P.S. 2001.** Multicellular resistance: biofilms. *TRENDS in Microbiology.*9: 204.
60. **Stickler D. 1999.** Biofilms. *Current Opinion in Microbiology.*2: 270-275.
61. **Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., Faille, C.(2006).** Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology* 110,254-262.
62. **Trulear M.G. and Characklis W.G. 1982.** Dynamics of biofilm processes. *J. WPCF.*54: 1288-1301.
63. **Valle A., Bailey M .J., Whiteley A. S., Manefield. 2004.** “N-Acyl-L-Homoserine Lactones (AHLs) Affect Microbial Community Composition and Function in Activated Sludge”. *Environ. Biol.* 6: 424-433.
64. **Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A. 2001.** The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa* : identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *ProcNatlAcadSciUSA* ; 98 : 6911-6.
65. **Van loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., et Zehnder, A.J. B. (1990).** « Influence of interfaces on microbial activity ». *Microbiological Reviews*, vol. 54, no1, p. 75.87.
66. **van Oss, C.J. (1996).** Forces interfaciales en milieu aqueux. (Paris: Masson).

67. **Vignola C. (2002)**. Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp. 3-75.
68. **VIGNOLA C.L., (2002)** Science et technologie du lait –Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN: 29-34 (600 pages).
69. **Visser, J. (1976)**. Adhesion of colloidal particles. In Surface Marijevic, ed (New York: John Wiley and Sons), pp. 3-84.
70. **Vos P. D &, Logan, N. A. (2009)**. Bacillus. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.
71. **Vos P. D &, Logan, N. A. (2009)**. Bacillus. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.
72. **Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C. and Mattick J.S. 2002**. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*.295: 1487.
73. **Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, et al. Nature 2001**. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001 ; 413 : 860-4.
74. **Wimpenny, J., Manz, W. & Szewzyk, U. (2000)**. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 24, 661–671.
75. **Zottola A. E., Sasahara K. C. 1994**. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern?. *Int. J. Food Microbiol.* 23:125-148.

Annexe 1 : Matériels utilisés

) Equipement

- Etuve
- Spectromètre
- Autoclave
- Four Pasteur
- PI-I mètre
- Agitateur- plaque-chauffante
- Vortex
- Centrifugeuse
- Microscope optique
- Balance
- Bec bunsen
- Réfrigérateur
- Micropipette
- Bain marie

) Verrerie :

- Erlenmeyer de 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml
- Becher de 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml
- Fiole jaugée ;
- Flacons en verre de 250 ml ;
- Boite de Petrie en plastique ;
- Pipette Pasteur ;
- Pipette graduées ;
- Anse de platine ;
- Tubes à essais ;

- Tubes à hémolyses ;
- Lames et lamelles ;
- Pincés ;
- Cuvette de spectromètre ;

Annexe 2 : solutions et diluants

) Produits chimiques

- Hexadécane;
- Cristal violé ;
- Fuchsine ;
- Bleu de méthyle ;
- EDS ;

Annexe 3 : les milieux de culture

Trypticase soja agar (TSA)

Poudre déshydraté	40g
Eau distillée.....	1000ml

Tryptone-sel-eau (TSE)

Eau distillée.....	1000ml
NaCl	8.5g
Tryptone	1g

- **Eau physiologie**

Eau distillée	1000 ml
NaCl	1g

- **Solution dissolvant**

Ethanol	200ml
Eau distillé	250 ml

Acide acétique glacial 50 ml

- **Cristal violet**

Cristal violet 2g

Eau distillée 100ml