



MAST-579-26/03

Mémoire de master

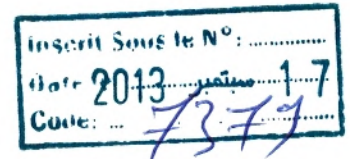
Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présentée par

Chouiti Fadia

Intitulé du Thème:



Recherche et caractérisation des bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé de vache et le lait recombinaé

Soutenu le : 07/07/2013.

Devant le Jury composé de :



M^{elle}. Benariba N.

Présidente

Maitre assistante de classe A.

M^{me}. Bensalah F.

Examinatrice

Maitre assistante de classe A.

M^{me}. Ghembaza L.

Examinatrice

Maitre assistante de classe A.

M^{me}. Malek F.

Encadreur

Maitre assistante de classe A.

Année Universitaire : 2012-2013



Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie appliqué à l'agroalimentaire au biomédical et à l'environnement **L.A.A.M.A.B.E** de Tlemcen.

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.** Maitre assistante classe A au Département de Biologie Université de Tlemcen pour la confiance qu'elle m'a attribuée en acceptant de 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.

Mes remerciements s'étendent également à **M^{elle} Benariba.N.** Maitre-assistante de classe A au département de Biologie Université de Tlemcen pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury et d'examiner mon travail. Je vous présente mes respects les plus profonds.

Je remercie infiniment **Mme Bensalah.F** Maitre-assistante de classe A au département de biologie université de Tlemcen pour avoir l'honneur de siéger mon jury et d'examiner ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à **Mme Ghembaza-Boublenza .L.** Maitre-assistante de classe A au département de Biologie Université de Tlemcen pour l'attention qu'elle m'a portée à vouloir examiner ce travail et de faire part de mon jury.

Je tiens à remercier toute l'équipe de **Giplait Mansourah**, pour leur aide lors des prélèvements des échantillons particulièrement **M^r Chaban Youcef**, responsable de la production.

Je remercie toute les gens qui m'ont aidé au laboratoire en particulier **M^{elle} Didi Wafaa.**

Dédicaces

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie
ce modeste travail*

A la mémoire de mon Père « Allah yerahmou »

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

*A Ma chère mère, Affable, honorable, aimable que je ne cesse de la
remercier pour tout ce qu'elle m'a donné.. Que Dieu la récompense pour
tous ces bienfaits.*

A mon très cher frère

*Mon ange gardien et mon fidèle compagnant dans les moments les plus
délicats de cette vie mystérieuse. Je vous dédie ce travail avec tous mes
vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*Je tiens a remercier mes amies Meriem et Nassima qu' été toujours a mes
coté et surtout a la petite sœur Manel.*

A mon très cher mari

*Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce
travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et
fidèle. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail
n'aurait pas vu le jour.*

Et a tous les membres de ma famille, de prés et de loin.

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

Fadia

Résumé :

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

Dans ce travail nous avons mis en évidence la présence des bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé recombinaison ou issu de lait de vache local. L'isolement des souches à 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 obtenues par galerie API 20 E.

La détermination du pouvoir enzymatique à montrer la capacité de produire des protéases, des amylases, et des lipases ce qui implique des capacités importantes d'altération du lait pasteurisé.

Le potentiel de formation de biofilm est également important notamment à 42°C. Ces résultats suggèrent la contribution du biofilm dans la cross-contamination du lait pasteurisé.

Mot clés :

Bacilles thermophiles, lait pasteurisé, biotype, potentiel enzymatique, cristal violet.

Abstract:

Thermophiles are widely implicated in the corruption problems of pasteurized milk and other dairy products and decrease their life.

In this work we demonstrated the presence of thermophilic bacilli in pasteurized milk or recombined milk from local cows.

The isolation of strains was performed on tryptic soy agar at 55 ° C. The isolated strains are characterized by a high phenotypic diversity as demonstrated by biotypes obtained by API 20 E. The determination of enzyme able to demonstrate the ability to produce proteases, amylases and lipases which involves significant alteration capabilities pasteurized milk.

The potential for biofilm formation is also important especially at 42 ° C. These results suggest the contribution of biofilm in the cross-contamination of pasteurized milk.

Key word:

Thermophilic bacilli, pasteurized milk, biotype, enzymatic potential, crystal violet.

Liste des abréviations

°C : D egré

CIP :Cleaing in place.

DO :Densité optique

EDS: Eau distillée sterile.

ESL :Extented Shelf life.

H :Heure.

HTST : High temperature short time

Min : Minute.

MI : Mllilitre

Nm : Nano metre.

TSA : Trypticase-Soja- Agar.

TSB : Trypticase - Soja-Bouillon.

TSE: Tryptone-Sel-Eau

U.H.T : Ultra haute température.

UP : Ultra pasteurisation

.µ: Micro.

Listes des figures

Figure 1 : Schéma représentant la ligne de production du lait pasteurisé.....03

Figure 2 : Diagramme de fabrication du lait pasteurisé.....09

Figure 3 : Sites des prélèvements.....18

Figure 4 : Photo d'une Galerie nonensemencé.....19

Figure5 : Formation de biofilm par techniques des microplaques de titration 96 puits.....23

Figure6 : Aspect des colonies TSA.....24

Figure 7: Observation au microscope optique de frottis bactérien après coloration de Gram (X100).....25

Figure 8: Observation au microscope optique de la spore après coloration de violet de gentiane (X 100).....25

Figure 9: Photo d'une souche catalase positif.....26

Figure 10 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 5-6.....27

Figure 11 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 1.....27

Figure 12 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 7.....27

Figure 13 : Activité protéolytiques des souches sur gélose au lait.29

Figure 14 : Activité lipolytique des souches sur gélose au Tween 80.....29

Figure 15 : Activité amylolytique des souches sur gélose à l'amidon.....30

Figure 16 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 30°C.....31

Figure 17 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 42°C.....32

Figure 18 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 55°C.....32

Figure 19 : Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé à 30 °C.....33

Figure 20 : Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé à 42°C.....33

Figure 21 : Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé à 55 °C.....34

Liste des tableaux

Tableau 1 : Montre les différents barèmes de pasteurisation.....	02
Tableau 2 : Modifications de la qualité nutritionnelle du lait par les traitements thermiques	05
Tableau 3 : Durée de vie du lait en fonction des traitements thermiques.....	06
Tableau 4 : Les différentes sources de contamination du lait.....	10
Tableau 5 : Spécifications du lait pasteurisé à la date de fabrication et à la péremption.....	13
Tableau 6 Origine des souches	24
Tableau 7 : Détermination des profils biochimiques des souches par galeries API 20 E.....	26
Tableau 8 : Les différents biotypes et orientation de l'identification taxonomique des bacilles thermophiles.....	28
Tableau 9 : Comparaison des activités enzymatiques des souches de bacilles thermophiles.	30

Tables des matières

Partie I : Synthèse bibliographique

Résumé

Abstract

Introduction générale

Chapitre I : pasteurisation du lait

I- Le lait dans l'alimentation humaine.....	01
I-1- La Pasteurisation du lait.....	01
I-1-1- Définition et objectifs.....	01
I-1-2 Le procédé de la pasteurisation.....	01
I-1-3-Paramètre de pasteurisation.....	02
II-Autre traitement thermiques	04
II-1-Ultra-pasteurisation (UP).....	04
II -2-Procédé UHT	04
II-3-La stérilisation.....	04
Impact du traitement thermique sur la teneur des vitamines.....	05

Chapitre II: Qualité microbiologique du lait pasteurisé.

I- le Lait pasteurisé:	07
I-1-Fabrication du lait pasteurisé.....	07
I-1-1-Reconstitution	07
I- 1-2-Recombinaison :.....	08
I -1-3-Conditionnement.....	08

I -1-4-Stockage.....	08
II-Qualité hygiénique du lait.....	10
II-1-Source de contamination du lait.....	10
II -1-1-Contaminations par la Poudre de lait	11
II- 1-2-Contamination à partir des équipements	11
II -1-3-La flore de Contamination du lait	12

Chapitre III : Bacille thermophiles dans le lait pasteurisé

I-Généralité	14
I-1 Bacille thermophile.....	14
I-1-1 Définition.....	14
I -1-2-Systématiques :.....	15
I -1-3-Les caractéristiques spécifiques de certain Bacille thermophiles.....	15
II - Sporulation des bacilles thermophiles.....	16
II -1- Définition.....	16
II -2-Formation des spores	16
II -3-Résistance.....	16
II-4-Germination.....	17

Parti II. : Etudes expérimentale

I-Matériels et Méthodes :

I-Prélèvements	18
I-1-Transport des échantillons	18
I -2-Traitement des échantillons.....	19
I -2-1-préparation des dilutions décimales.....	19
I -2-2-Ensemencement	19
I-3-Identification	19

1-3-1-Caractères culturaux :.....	20
I-3-2-Morphologie cellulaire	20
I-4-Conservation des souches	21
II-Mise en évidence des tests biochimiques :.....	21
II-1-La galerie A PI20E	21
II-2-Détermination des activités enzymatiques	21
II-Détermination du potentiel de formation de biofilm.....	22
II-1-Formation de biofilm dans les microplaques de titration :(96 puits).....	22
II-1-1-Evaluation du biofilm	23

Résultat et discussion

1-Détermination des caractéristiques phénotypiques :.....	24
1-1-Caractéristiques culturaux	24
1-2-Caractères morphologiques.....	25
Mise en évidence des tests biochimiques :.....	26
II-1-Recherche de la catalase.....	26
Détermination du biotype	26
Mise en évidence des enzymes extracellulaires	29
III-Détermination du potentiel de formation de biofilm	31
Conclusion générale.....	35
Perspectives.....	36

Introduction générale

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 flore thermorésistante telle que les bacilles thermophiles sont un groupe important de contaminants en industrie laitière. Ces Bacilles proviennent essentiellement de la poudre de lait et des biofilms formés sur l'équipement laitier. Ils sont responsables d'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 pasteurisé et déterminer le rôle qu'ils peuvent jouer dans la dégradation de sa qualité et la diminution de sa durée de vie dans une laiterie de la région de Tlemcen. Le plan expérimental est le suivant :

- Isolement des bacilles thermophiles dans des échantillons de lait pasteurisé.
- Identification phénotypique des souches isolées.
- Caractérisation des bacilles thermophiles : par l'étude du pouvoir enzymatique et leur capacité de former les biofilms.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

La pasteurisation du lait

I-le lait dans l'alimentation humaine :

Le lait est un élément essentiel de la nutrition humaine. Il est une source très essentielle de Ca, P, de la riboflavine, la vitamine B12, et une grande majorité de protéine, sucre, lipides de qualité, avec tous ces éléments nutritifs exigés en matière de nutrition humaine (Kaan-Tekinsen et al., 2007).

I-1-La Pasteurisation du lait :

I -1-1-Définition et objectifs :

Plusieurs définitions ont été données à cet effet par divers auteurs qui s'accordent tous à mettre l'accent sur l'assainissement correct du lait par la chaleur tout en se souciant de préserver la haute valeur nutritive du lait. Pasteuriser le lait, c'est détruire en lui, par l'emploi convenable de la chaleur, la presque totalité de la flore banale, la totalité de la flore pathogène, tout en s'efforçant de ne toucher qu'au minimum à sa structure physique, à ses équilibres chimiques et à ses éléments biochimiques. (Ould Mustapha et al., 2012). En autres termes d'assurer sa salubrité et de prolonger sa durée de vie. (Meunier-Goddik Et Sandra., 2002).

I-1-2-Les procédé de la pasteurisation :

La pasteurisation est un procédé consistant à chauffer du lait cru pendant quelques minutes ou secondes à une température la plus basse possible, entre 63 et 95° C, puis à le refroidir à 4°C de manière à détruire les germes nocifs qui pourraient être présents dans le lait, et réduire le nombre de microorganismes nullement dangereux pour la santé. (Ould Mustapha et al., 2012). Pour que le lait soit pasteurisé, il doit être soumis:

- Soit à une température de 63° C pendant une durée de 30 minutes à basse température cette pasteurisation est presque abandonnée
- Soit à une température de 85° C pendant une durée de 15-20 secondes (HTST/température moyenne)
- Soit encore instantanément à une température de 95° C HTST/haute température. (arrêté ; 1993). Ce type de pasteurisation haute température courte durée, est très répandu ces dernières années, où les deux préoccupations de sécurité alimentaire et le désir de prolonger la durée de conservation du lait liquide ont incité

de nombreux transformateurs de produits laitier à augmenter la pasteurisation à des températures au-dessus des conditions minimales spécifiées par le décret A du lait pasteurisé (72 ° C pour 15s). (Ranieri Et al., 2009). C'est le principe des procédés HTST. Les barèmes de température de pasteurisation sont liés proportionnellement aux temps. Le couple température/ temps joue un rôle essentiel dans la pasteurisation chaque fois que la température de pasteurisation augmente le temps est réduit.

Tableau 1 montre les différents barèmes de pasteurisation. (Meunier-Goddik et Sandra., 2002).

Température (°C)	Temps
63	30 minutes
72	15 secondes
89	1.0s
90	0.5s
94	0.1s
96	0.05s
100	0.01s

Exemple : une température de pasteurisation située entre 70 et 72 sans durée de chambrage est optimale. Dans l'industrie du lait, le chambrage est un processus dans laquelle le lait séjourne dans un tube calorifugé à une température voisine de celle de la pasteurisation pendant un temps limité, pour assurer une parfaite homogénéité thermique.

I-1-3-Paramètre de pasteurisation :

La conception des lignes de traitement du lait pasteurisé du commerce varie beaucoup d'un pays à l'autre, et même d'une laiterie à l'autre, en fonction de :

- La législation et la réglementation locale.
- La standardisation éventuelle de la matière grasse qui peut se faire avant, après ou pendant la pasteurisation.

- L'homogénéisation peut être totale ou partielle. D'autre part, la rapidité de ce traitement (quelques secondes) permet de conserver intactes les qualités organoleptiques et nutritionnelles du lait. (Ould Mustapha et al., 2012).
- Les appareils les plus souvent utilisés pour la pasteurisation du lait sont les échangeurs de chaleur à plaques. Ceux-ci sont construits selon une structure modulaire, autrement dit toutes les sections nécessaires au processus de pasteurisation sont situées dans une même installation sous forme de modules. Les différentes sections sont ordonnées de telle façon qu'à la zone la plus chaude succède la zone la plus froide, ce qui a des avantages du point de vue énergétique. Avec cette technologie, la récupération de chaleur s'élève à environ 85 %. La figure (A) présente la ligne de production du lait pasteurisé.

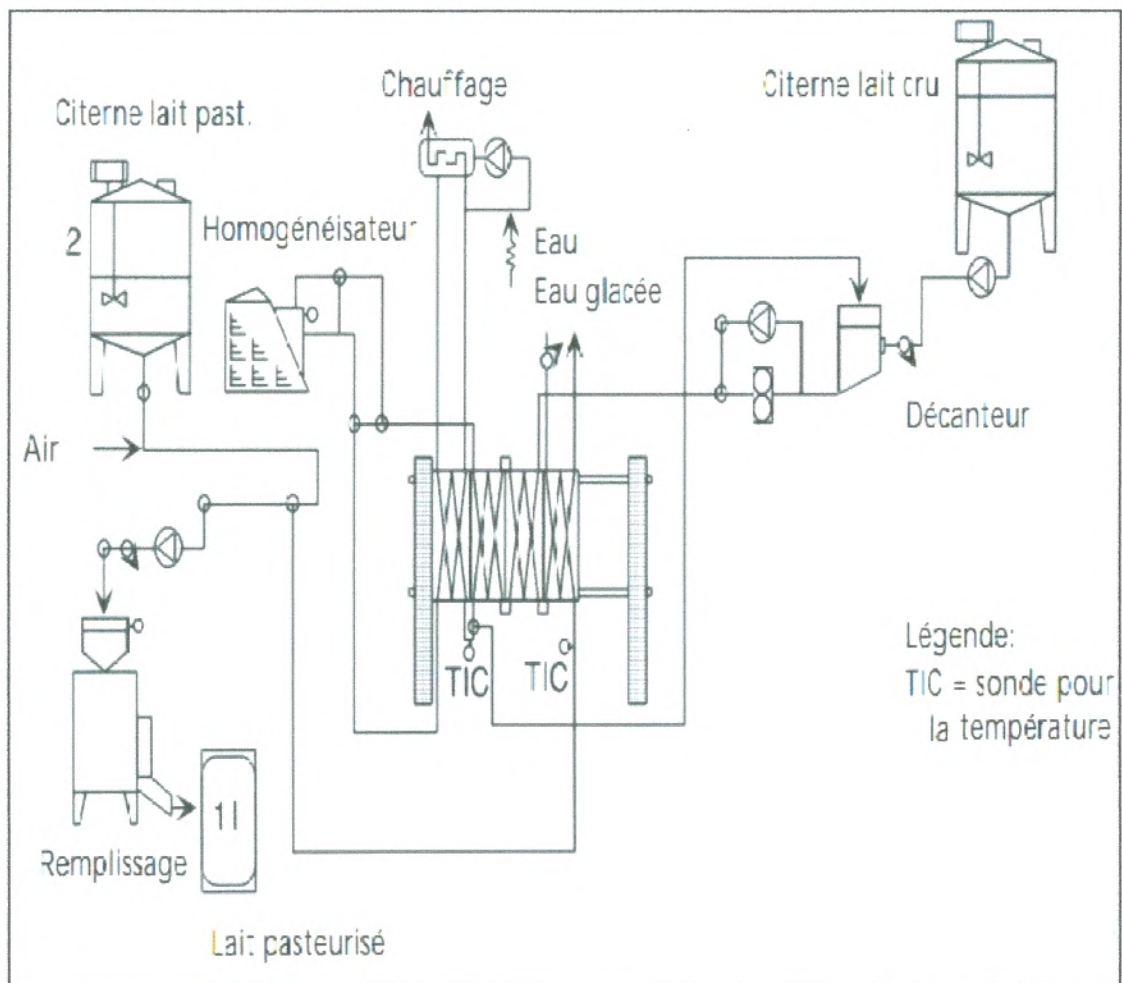


Figure (1) : Schéma représentant la ligne de production du lait pasteurisé (Strahm Et Eberhard.,2010)

II-Autre traitement thermiques.

II-1-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 chaine de distribution à froid.(Schmidt et al ., 2011).

II-2-Procédé 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).

II-3-La stérilisation :

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).

❖ **Impact du traitement thermique sur la teneur des vitamines (par litre)**

Certain traitement thermique peuvent modifier la qualité nutritionnels du lait, le tableau2 présente les différentes modifications subie par ces traitement

Tableau2 : Modifications de la qualité nutritionnelle du lait par les traitements thermiques (Vandercammen ,2011).

vitamines	Lait pasteurisé			Lait UHT			Lait stérilisé	
	Entier	Demi-écrémé	Ecrémé	Entier	Demi-écrémé	Ecrémé	Entier	Demi-écrémé
A(mg)	0,55	0.25	trace	0.55	0.25	trace	0.55	trace
D (µg)	0,30	0.01	trace	0.30	0.10	trace	0.30	trace
C (mg)	8.00	8.00	8.00	1.00	1.00	1.00	0.80	0.80
B1 (mg)	0.40	0.35	0.40	0.10	0.39	0.40	0.30	0.31
B2 (mg)	1.67	1.83	1.83	1.83	1.85	1.77	1.48	1.48
B6 (mg)	0.60	0.61	0.65	0.44	0.49	0.47	0.39	0.41
B12 (µg)	3.60	3.90	3.80	2.00	2.00	2.30	1.00	0.90
Acide pentothénique(mg)	3.60	3.14	3.20	3.26	3.38	3.28	2.94	3.33
Acide nicobnique(mg)	0.83	0.89	0.89	0.91	0.97	0.98	0.95	1.20
Biotine (mg)	20.00	21.00	23.00	19.00	19.00	17.00	19.00	21.00
Folates (µg)	57.00	58.00	53.00	8.00	19.00	12.00	2.00	3.00

On observe dans ce tableau que certain vitamine sont mieux préservé par la pasteurisation que par les autres traitements thermique.qui donneront un goût et une valeur nutritive différents au lait. Par conséquent ces traitements ont un effet bénéfique sur la conservation à durée de vie prolongée. (Tableau 3)

Tableau3 : 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 ce 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.

Chapitre II

**La qualité microbiologique
du lait pasteurisé**

I-le Lait pasteurisé:

Le lait pasteurisé peut être obtenu à partir de lait naturel provenant d'élevage ou de poudre de lait importée. C'est un lait qui a subi un traitement thermique modéré ou pasteurisation qui détruit plus de 90 % de la flore microbienne contenue dans le lait. **(M'boya et al ., 2001)**

I-1-Fabrication du lait pasteurisé :

La technologie du lait pasteurisé est simple sa production et surtout sa commercialisation doivent respecter des normes précises pour éviter toute détérioration et tout risque pour le consommateur. **(M'boya et al ., 2001)**. Dans le cas du lait pasteurisé préparé avec la poudre des opérations supplémentaires sont incluses dans le diagramme de fabrication, tel que montré dans la figure (B) .les étapes de fabrication du lait reconstitué sont résumé ci-après :

La Poudre de lait est un produit microbiologiquement stable. Il a une activité de l'eau de 0,3-0,4, ce qui est trop faible pour soutenir la croissance de micro-organismes. Cependant, après que le lait en poudre est reconstitué, il est susceptible à la croissance microbienne et l'altération. **(Augustin et al., 2003)**.

La matière grasse laitière anhydre est le produit obtenu exclusivement à partir du lait, de beurre ou de crème au moyen de procédés entraînant l'élimination quasi-total de l'eau et de l'extrait sec non gras. **(Boularak, 2005)**. L'eau utilisée pour préparer le lait reconstitué, doit être potable et répondre aux caractéristiques bactériologiques, en dehors des autres paramètres de potabilité d'eau.

I-1-1-Reconstitution :

La reconstitution est l'opération d'un mélange d'eau et de lait en poudre en vue de rétablir: un rapport eau/matière sèche du produit initial.

I-1-2-Recombinaison :

La recombinaison est un mélange de lait reconstitué et de matière grasse de lait anhydre (MGLA) en vue d'obtenir un produit dont les caractéristiques ressemblent au lait de vache. Le mélange matière grasse et lait reconstitué subit une homogénéisation à une température de 60 - 65°C afin d'éviter la remontée de la matière grasse dans le produit puis le lait doit être pasteurisé et refroidi. **(Boularak, 2005).**

I-1-3-Conditionnement :

L'étape la plus critique est le conditionnement. En effet, les risques d'introduire des microbes dans le lait pasteurisé sont importants si on ne respecte pas les règles d'hygiène élémentaires et si le conditionnement ne s'effectue pas très rapidement. Le lait pasteurisé fermente, prend un mauvais goût ou coagule. Il est invendable. **(M'boya et al ., 2001).**

I-1-4-Stockage :

Un stockage prolongé du lait pasteurisé à des températures réfrigérées favorise la croissance des bactéries psychrotrophes, qui sont capables de causer des problèmes majeurs de qualité dans l'industrie laitière. *Pseudomonas* est identifié comme étant le principal type de bactéries de contamination du lait pasteurisé, à la fin de sa durée de vie, si elle est stockée à la température recommandée de 4°C **(Smithwell et Kailasapathy, 1995)**

❖ Diagramme de fabrication : (M'boya et al ., 2001).

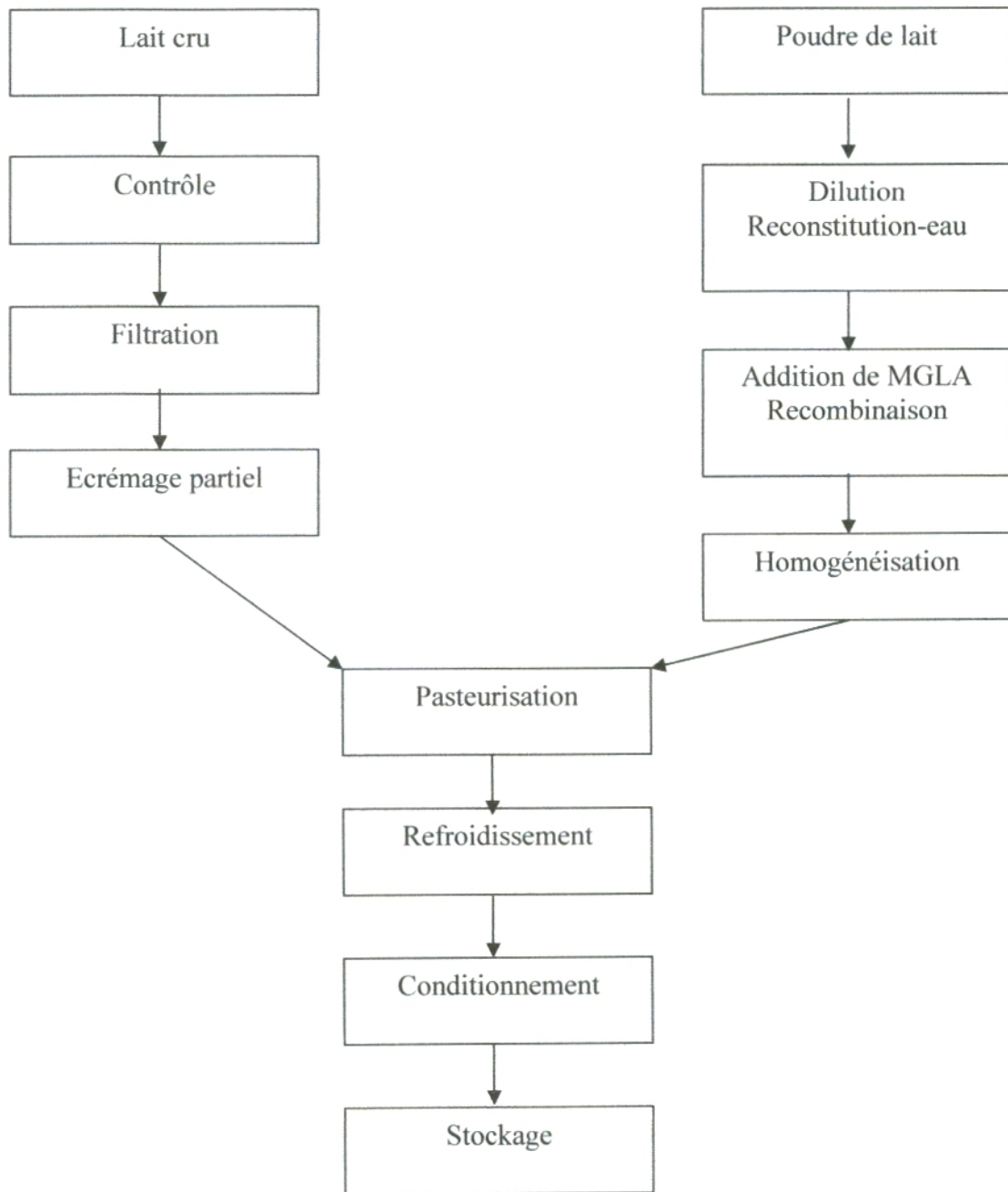


Figure (2) : Diagramme de fabrication du lait pasteurisé.

II-Qualité hygiénique du lait :

Le lait est un aliment hautement nutritif par sa richesse en glucides, protéines, lipide vitamines et sels minéraux, qui peut néanmoins représenter un danger pour le consommateur, spécialement quand il véhicule des agents zoonotiques et des résidus des substances antimicrobiennes. De ce fait le contrôle d'hygiène du lait pasteurisé s'avère d'une très grande importance, (Aggad & al., 2009).

II-1-Sources de contamination du lait :

Les sources de contamination du lait sont nombreuses et variées elles comprennent l'eau, le sol, le personnel dans l'équipement laitier, (tableau 4)

Tableau 4 les différentes sources de contamination du lait (Frank& Hassan., 2002)

<u>Sources</u>	Genres
Personnel	<i>Coliformes, Selmonella, Entérocooccus, Staphylococcus</i>
Air	<i>Streptococcus, Micrococcus, Corynebactérium, Bacillus</i> Levures et Moisissures.
Interieur du pis	<i>Streptococcus, Micrococcus, Corynebactérium</i>
Exterieur du pis	<i>Micrococcus, Staphylococcus, Entérocooccus, Bacillus</i>
Fèces	<i>Eschérichia, Staphylococcus, Listéria, Mycobactérium</i> <i>Selmonella</i>
Appareil de traite	<i>Micrococcus, Streptococcus, Bacillus, Coliformes</i> <i>Clostridium, Bacillus, klebsiella</i>
Litières	<i>Clostridium, Bacillus, Pseudomonas, Mycobactérium</i>
Sol	Levure et Moisissures.
Alimentation	<i>Clostridium, Listéria, Bacillus, Bactérie lactiques</i>
Eau	<i>Coliformes, Pseudomonas, Corynebactérium, Alcaligenes</i>

Il existe d'autres sources de contaminations qui peuvent influencer la qualité du lait pasteurisé surtout le lait obtenue à partir d'une poudre.

II-1-1-Contaminations par la poudre de lait :

Fournie est protégée de la contamination en eau avant utilisation, le nombre de micro-organismes présents augmente généralement au cours du stockage, bien que le nombre de spores peut rester constant. Les producteurs de la poudre, ne prennent pas en charge la croissance des micro-organismes, le contenu microbiologique varie selon l'utilisation ultérieure de la poudre. Pour cette raison, les organismes gouvernementaux et les laboratoires ont développé des limites microbiologiques ou des spécifications qui s'appliquent à certains groupes de micro-organismes qui peuvent être présents dans le lait en poudre. Ces spécifications peuvent concerner les apports des matières premières à la qualité du lait et l'hygiène lors de la fabrication et du stockage. **(Augustin&al., 2003)**.

II-1-2-Contamination à partir des équipements :

Elle est souvent caractérisée par la formation des biofilms laitiers qui sont dominés par différentes bactéries. La formation de ces biofilms sur les équipements peut entraîner de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques dues à la détérioration des aliments et à la dépréciation des équipements. **(Flint et al., 1997)**. Les micro-organismes dans les biofilms catalysent les réactions chimiques et biologiques provoquant la corrosion des métaux dans les tuyauteries et les réservoirs, et ils peuvent réduire l'efficacité de transfert de chaleur s'ils deviennent suffisamment épais. **(Simoès et al., 2009)**. Selon **(Petrus et al., 2009)** il y a d'autres facteurs qui peuvent influencer la durée de vie du lait pasteurisé :

- La qualité de la matière première.
- La température /temps.
- Microorganismes résistants à la pasteurisation.
- Présence et l'activité des contaminants de post- pasteurisation.
- Le système d'emballage et stockage après pasteurisation à des températures qui a le plus grand impact sur la stabilité du produit.

II-1-3La flore de Contamination du lait :

Les bactéries lactiques et les bactéries psychotropes sont sensibles à la chaleur et leurs populations sont réduites dans le lait pasteurisé. La microflore survivante se compose principalement de bactéries sporulantes, de microcoques et de lactobacilles. **(Frank & Hassan, 2002)**.

Synthèse bibliographique/ Qualité microbiologique du lait pasteurisé

- Pendant toute la durée de l'opération de pasteurisation, la température ne doit pas s'abaisser au-dessous du minimum requis par le procédé utilisé, en quelque point que ce soit de la masse de lait à traiter.
 - Des vitamines et/ou des additifs peuvent être incorporés aux laits reconstitués ou combinés, dans les conditions autorisées par la réglementation en vigueur.
 - Le lait pasteurisé doit être conservé à une température inférieure ou égale à 6°C
 - La date de péremption du lait pasteurisé conditionné est fixée, au plus, à sept (7) jours à compter de la date de fabrication. (Arrêté ., 1993).
- Tableau5 : spécifications du lait pasteurisé à la date de fabrication et à la péremption (Arrêté ., 1993 N°69).

SPECIFICATIONS	A LA DATE fabrication	A la date de péremption
Microorganismes aérobies à 30° C par millilitre (germes totaux)	30 000	200000
Coliformes à 30° C (par millilitre)	10	100
Coliformes fécaux (par millilitre)	1	1
Clostridium sulfito -réducteur à 46 °C dans 100 millilitres (spores)	---	09
Staphylococcus aureus (par millilitre)	1	10
Salmonelles dans 250 millilitres	absence	absence
Phosphatase	Très négatif	Très négatif
Acidité en grammes d'acide lactique	---	1,4 à 1,8
Stabilité à l'ébullition	---	stable
Analyse sensorielle	---	sans défaut

Chapitre III

Les bacilles thermophiles
dans le lait pasteurisé

I-Généralité :

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 saveurs. (Burgess et al., 2010)

I-1-1 Les Bacille thermophiles :

I-1-1-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 et 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 et al., 2010)

-Les thermophiles obligatoires :

Peuvent croître seulement à des températures élevées (environ 40-68 °C) et comprennent *Anoxybacillus Flavithermus* et *Geobacillus* spp.

-Les thermophiles facultatifs

Appartiennent au genre *Bacillus* et ont tendance à croître à des températures à la fois mésophiles et thermophiles, selon la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus coagulans licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans*. (Burgess et al;2010)

I-1-2-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 exemple des *Bacillus Stearotherophilus* dans le nouveau genre *Geobacillus* et *Bacillus Flavothermus* à été reclassé autant que *Anoxybacillus Flavithermus*. (Nazina et al., 2001).

I-1-3-Les caractéristiques spécifiques de certain Bacille thermophiles

-*Anoxybacillus Flavithermus* : Décrit comme :

- Un thermophile anaérobie facultatif
- Mobile
- Endospores terminale.
- 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 et al., 2010).

-Le genre *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).

II-Sporulation des bacilles thermophiles :

II-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 des bacilles thermophiles sont caractérisés par la formation rapide de spores. Le processus de sporulation est supposé être similaire à celui des bacilles mésophiles comme *Bacillus Ceureus*, *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Coagulant*. (Burgess et al., 2010).

II-2-Formation des spores

La sporulation est un processus complexe, divisé en une série d'étapes qui est considéré comme étant très similaires entre aérobies 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 et 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 importants pour le développement d'une spore mature et peut être impliqué dans l'activation du processus de formation de spores. (Burgess et 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 (105-107 spores/ml) dans 12-18h. (Burgess., et al., 2010).

II-3-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 auraient contribué à l'ensemble de la résistance des spores de *Bacillus*, notamment de leur faible teneur en eau, l'imperméabilité de la membrane interne, la couche de spores, le peptidoglycane. (Burgess et al., 2010).

Etude expérimentale
Matériels et méthodes

Matériels et méthodes :

L'objectif de notre étude est de mettre en évidence la présence de bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé (recombiné et de vache) et de déterminer le rôle qu'ils peuvent jouer dans la dégradation de la qualité du lait pasteurisé produit dans une laiterie de la région de Tlemcen et la diminution de sa durée de vie.



Figure (3) : Les sites des prélèvements.

(A) : Pasteuriseurs (échangeur thermique) (B) : Robinet de la première section de lactoduc

I -Prélèvements

Six échantillons ont été prélevés durant le mois de Mai à partir de différents lots laits pasteurisés constitués comme suit :

- Le lait pasteurisé recombinaé à partir de pasteurisateurs (L.P.P).
- le lait pasteurisé recombinaé en sachet (L.P.R.).
- le lait de vache pasteurisé en sachet(L.P.V).

10ml du lait pasteurisé en sachet (L.R.I et L.V.I) est incubé à 55°C et pendant 24h ,puis analysé à l'issue de ce délai.

I-1-Transport des échantillons :

Les prélèvements sont transportés dans une glacière (<4°C) analysé rapidement après leurs réceptions au laboratoire.

I -2-Traitement des échantillons :

I -2-1-préparation des dilutions décimales :

- **Les échantillons du lait du pasteurisateur**

Une fois l'échantillon au laboratoire, près du bec bunsen, on ouvre le flacon stérile qui contient le lait à partir du pasteurisateur et on prend 1ml de l'échantillon par pipette gradué et on le verse dans des tubes en verre stérile qui contiennent 9ml du TSE. Puis on réalise des dilutions décimales jusqu'à la dilution 10^{-3} .

- **Les échantillons du lait pasteurisé en sachet :**

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

- **Les échantillons du lait pasteurisé incubé à 55 ° C à 24h :**

Après 24h d'incubation le lait étant déjà coagulé, on procède à une agitation au vortex des tubes pour liquéfier le gel et réaliser des dilutions décimales.

I -2-2-Ensemencement :

L'ensemencement des bacilles thermophiles s'effectue en surface sur le milieu (Trypticase Soja –agar) coulé dans des boites de pétri. Grâce à des micropipettes de 100 on dépose 0.1ml de la solution mère et de chaque dilution dans les boites de pétri préparée qui contient le milieu. On utilise des pipettes pasteurs en forme un râteau pour étaler uniformément cet inoculum sur la gélose. Les boites seront incubées à 55 °C pendant 24-48h.

I-3-Identification :

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.

I-3-1-Caractères culturaux :

✚ Aspect macroscopique :

Cet aspect permet d'effectuer une première caractérisation, sur la base des caractères culturaux : La taille, la forme des colonies, l'aspect des contours, et la couleur.

I-3-2-Morphologie cellulaire :

✚ Coloration de Gram :

Tous les isolats des bacilles thermophiles sont soumis à la coloration de Gram sur de frottis Préparé à partir d'une culture jeune.

-recouvrir le frottis de violet de gentiane oxalaté : Laisser agir une minute.

Verser du lugol et laisser agir une minute ; rincer à l'eau.

-décolorer à l'alcool à 95°C, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau.

-Recolorer par la fushine pendant une minute puis rincer à l'eau.

-sécher le frottis sur un papier verger puis l'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion grossissements x100. Les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries Gram négative se colorent en rose.

✚ -Recherche des spores :

La coloration au violet de gentiane de cultures âgée de plus de 48H, permet l'observation de la morphologie cellulaire et la présence ou l'absence de la spore. Sur un frottis bactérien correctement fixé à la chaleur on fait couler la solution de violet de gentiane après un temps de réaction d'une minute, on rince abondamment à l'eau. Puis le frottis bactérien est séché par du papier Joseph ensuite l'observation au microscope au grossissement x100. Les spores apparaissent comme un vide réfringent à l'intérieur de la cellule.

✚ Test de catalase :

Avec l'anse de platine bien stérilisé on prend une colonie et on la dépose sur une lame bien dégraissée ensuite on ajoute quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

Le dégagement d'oxygène se traduit par effervescence (résultat positif), l'absence d'effervescence est un résultat négatif.

I-4-Conservation des souches :

Les souches isolées des bacilles thermophiles sont conservées dans des tubes à essai contenant de la (TSA) incliné.les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par des stries, puis incubées à 55°C pendant 24h.ensuite laisser sporulé pendant 3jours, pour être conservés à 4°C.

II-Mise en évidence des tests biochimiques :

II-1-La galerie API 20E :

La galerie API 20E est inoculée selon les directives du guides de L'API système (suspension bactérienne à partir des cultures jeune de 24h), puis incubé à 37°C 24-48h.



Figure 4 : Photo d'une Galerie non ensemencé

✚ La lecture de la galerie :

La première lecture se fait à 24h puis les galeries sont réincubé, après 48h la lecture se fait par observation de la galerie et ajout des réactifs adéquats pour certain tests réactifs.

II-2-Détermination des activités enzymatiques :

✚ Activité protéolytique :

La recherche de l'activité protéolytique est utile pour l'identification des *Bacillus* pour mettre en évidence les espèces qui peuvent hydrolyser la caséine. Elle est effectué sur une gélose au lait, dont la composition est donnée en annexe, ensemencée par une seule strie pour chaque souche à testé ensuite incubé à 55°C pendant 24h. Les zones d'éclaircissement du milieu autour des colonies traduisent un résultat positif, l'absence de la zone exprime par un résultat négatif.

✚ Ativité lipolytique :

Elle est réalisée sur milieu TSA à base de tween 80, après préparation et autoclavage il est réparti en boites de pétri pour la solidification puis ensemencé en une seules strie pour chaque souche .l'incubation se fait à 55°C pendant 24h. L'apparition d'un halo opaque autour des colonies exprime la présence d'une estérase.

✚ **Activité amylolytique :**

La recherche des amylases se fait sur une gélose à base d'amidon. Elle permet de mettre en évidence la dégradation de ce polysaccharide par les espèces amylolytiques comme Bacillus, ensemencement se fait en points ou par une seule strie des souches à tester ensuite incubé à 55°C pendant 24H.

Détermination du potentiel de formation de biofilms 96 puits:

La capacité des souches des bacilles thermophile à former le biofilm est testée par la méthode de microplaque de titration 96 puits selon la technique (d'Auger et al., 2009).

III-Formation de biofilm dans les microplaques de titration :(96 puits)

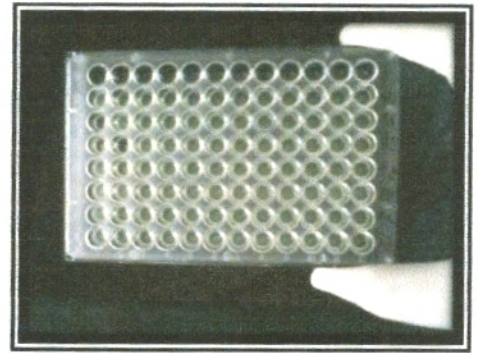
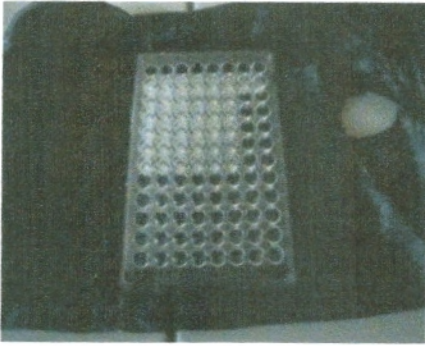
Formation de biofilm est réalisé dans deux milieux de culture : Le milieu TSB et le lait écrémé. Dans les puits des microplaques de titration 96 puits stériles, 100ul de TSB ou de lait écrémé et 80 µl de suspension bactérienne préparé dans l'eau physiologique est ajusté à une DO (densité optique) de 0.6-0.8 sont introduit a la première rangée constitue est remplie par le milieu non ensemencé et constitue le témoin.

Les plaques sont incubée à différentes températures 30°C, 42°C, 55°C. Pendant 24h.

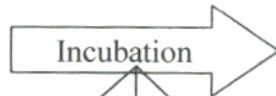
III-1-Evaluation du biofilm :

Après le temps d'incubation, les biofilms formée sur la surface des puits subissent les traitements suivants :

- Les plaques sont d'abord vidés avec la micropipette.
- Rinçage à l'EDS trois fois pour éliminer les cellules non adhérentes.
- Laisser sécher 10 à 15 min.
- Remplir les puits avec 200 ul de cristal violet à 0.5% qui joue un rôle dans la révélation et la fixation de biofilm.
- Le temps de coloration est 20 min.
- Rinçage à l'EDS 3 fois.
- Séchage des plaques en position renversé.
- La lecture des plaques
- Avant la mesure de la DO la spectrophotométrie munis d'un lecteur de microplaque 630nm les puits sont remplis avec une solution dissolvante constituée d'éthanol et d'acide acétique glacial dilué dans de l'eau distillé. (**composition en annexe**).



Lait+suspension bactérienne



TSB+suspension bactérienne

30 °C

42 °C

55 °C

Lecture après 24h
d'incubation

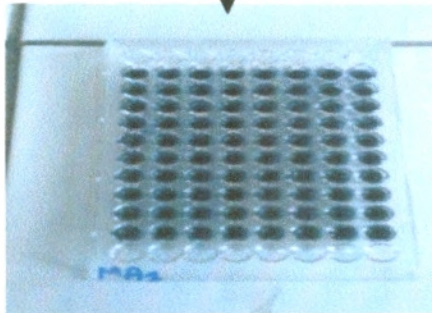


Figure 5: Formation de biofilm par techniques des microplaques de titration 96
uits

Etudes expérimentale
Résultats et discussions

Résultat et discussion :

L'origine des souches de l'isolement des bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé sont mentionnés dans le tableau ci-dessous : **(tableau 6) : Origines des souches**

Souche	Origine
Souche1	Lait pasteurisé recombéné incubé(L.P.R.I)
Souche2	Lait pasteurisé à partir de pasteurisateur
Souche3	Lait pasteurisé du mélange (L.P.M)
Souche4	Lait pasteurisé recombéné
Souche5	Lait pasteurisé de vache
Souche6	Lait pasteurisé à partir de pasteurisateurs
Souche7	Lait pasteurisé du mélange
Souche8	Lait pasteurisé de vache incubé
Souche9	Lait pasteurisé recombéné
Souche10	Lait pasteurisé incubé

1-Détermination des caractéristiques phénotypiques :

1-1-Caractéristiques culturaux :

L'aspect macroscopique montre des colonies différente qui forme de grosse colonies envahissantes et irrégulières (dentelés), légèrement convexes, ainsi des colonies moyennes à bord circulaire crémeuse. **(Figure 6).**

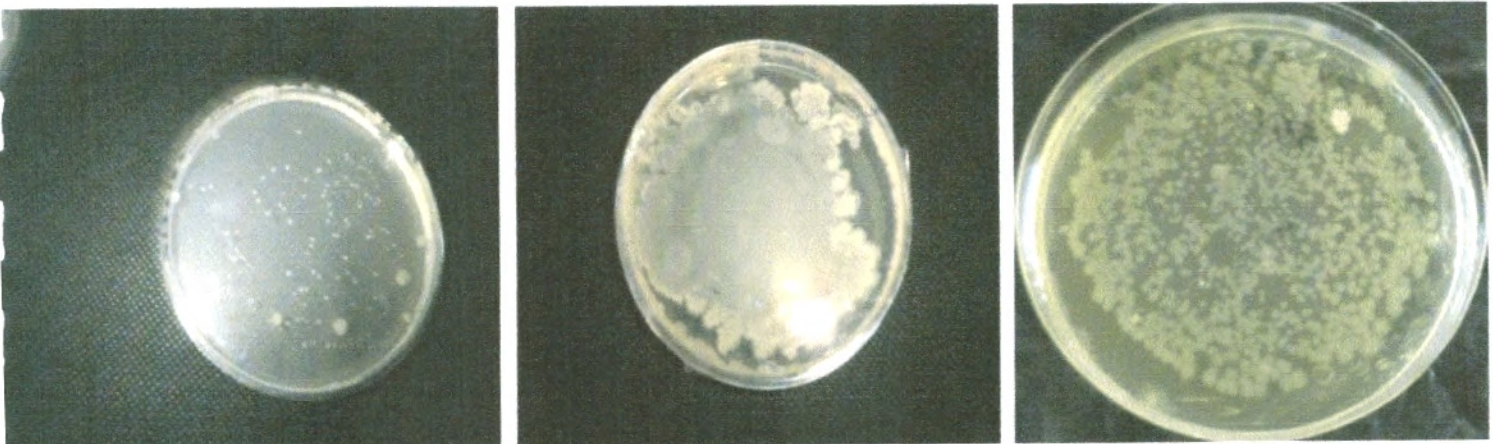


Figure 6 : Aspect des colonies sur TSA

1-2-Caractères morphologiques :

- ✚ La coloration de Gram à montré que les 10 souches sont des bacilles à Gram positif, isolés ou arrangées en chaine ou en chainette selon les souches. **(figure 07)**

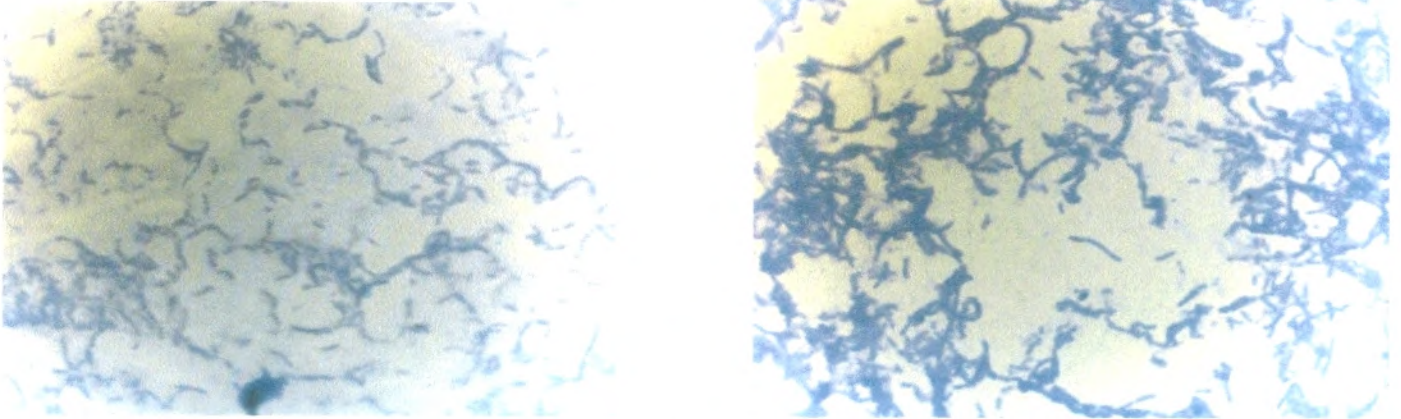


Figure 7: Observation au microscope optique de frottis bactérien après coloration de Gram (X100).

- ✚ L'observation des cellules fixées après coloration par violet de gentiane, montre également que les cellules se présentent sous forme d'un vide coloré à l'intérieur de la cellule. **(Figure 08)**

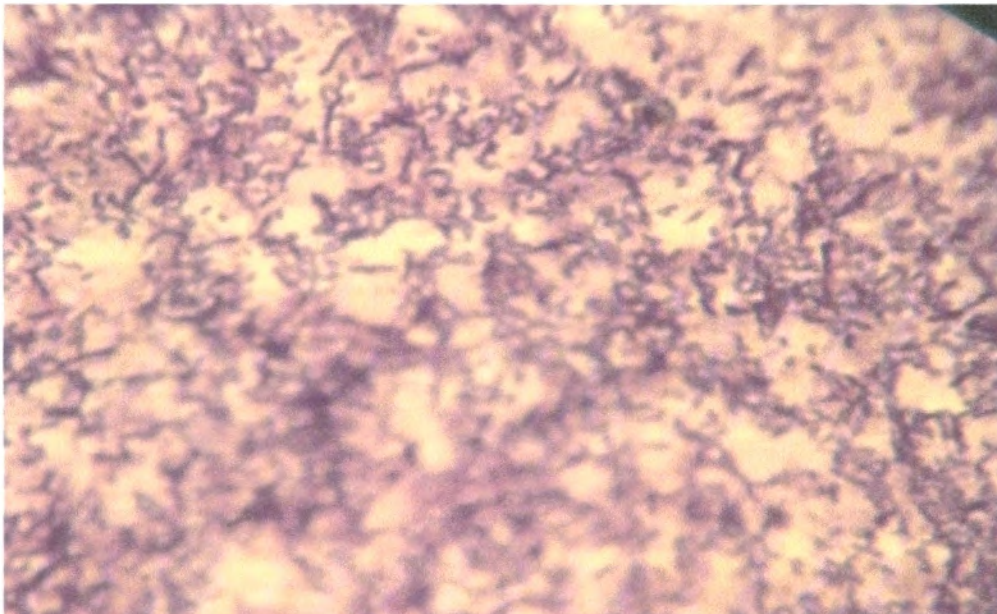


Figure 8: Observation au microscope optique de la spore après coloration de violet de gentiane (X 100).

II-Mise en évidence des tests biochimiques :

II-1-Recherche de la catalase :

Toutes les souches isolées à partir de TSA sont catalase + (**figure 9**).



Figure 9 : Photo d'une souche catalase positif

II-1-1-Détermination du biotype :

Les tests biochimiques ont été réalisés par l'utilisation de la galerie API 20 E, les résultats de l'identification des souches de bacilles thermophiles sont mentionnés dans le **tableau 7**

Tableau 07 : Détermination des profils biochimiques des souches par galeries API 20 E.

souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	catalase
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
S3	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
S4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
S5	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
S6	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
S7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
S9	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
S10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

D'après les résultats du **tableau 7** mentionné on remarque que la majorité des souches possèdent la β -galactosidase, arginine Dihydrolase et la gélatinase, et se répartissent dans 8 biotype (**tableau 8**). 4 souches peuvent utiliser le citrate comme source de carbone par contre l'absence lysine Décarboxylase, ornithine Décarboxylase et tryptophane Désaminase et l'uréase à l'exception de la souche 3 qui possède l'uréase.

Tous les isolats sont capables de réduire les nitrate 1 et 2 et de dégrader le Glucose, ainsi quelques sucres qui se diffèrent d'une souche à l'autre. 4 souche ont la capacité de produire l'acétoïne. Les souches 5 et 6 et forment un biotype identique c'est-à-dire les même caractères biochimiques.



Figure 10 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 5-6.



Figure 11 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 1

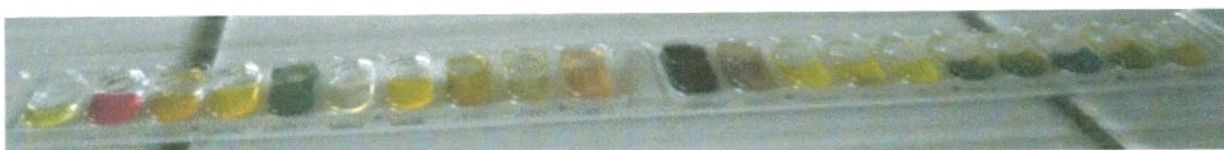


Figure 12 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 7

Tableau 8 : Les différents biotypes et orientation de l'identification taxonomique des bacilles thermophiles.

Biotypes	Nombre de souche	Orientation par Api web
Biotype 1	S5,S6	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus megaterium</i>
Biotype 2	S1	<i>Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis</i> <i>Bacillus firmus</i> <i>Bacillus sphaericus/fusiformis/badius</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
Biotype 3	S2	<i>Bacillus Smithii.</i> <i>Geobacillus thermoglucosidiasus</i> <i>Brevibacillus agri</i> <i>Bacillus firmus</i>
Biotype4	S3	<i>Bacillus lentus</i> <i>Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis</i> <i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i>
Biotypes5	S4	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus firmus</i> <i>Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
Biotype6	S7	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus Pimulus</i>
Biotype 7	S8	<i>Bacillus lentus</i> <i>Geobacillus thermoglucosidiasus</i> <i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i>
Biotype8	S9	<i>Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis</i> <i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i>

II-2-Mise en évidence des enzymes extracellulaires :

La présence de ces activités hydrolytiques a été réalisée en utilisant les substrats, caséine, tween 80, amidon. La production d'activités enzymatiques (protéolytique, lipolytique, amylolytique) a été observée chez la majorité des isolats.

✚ L'activité protéolytique se traduit par une zone d'éclaircissement.



Figure 13 : Activité protéolytiques des souches sur gélose au lait.

L'activité lipolytique se traduit par une zone un halo d'opacification. (Bertoldo et Antranikian, 2001)



Figure 14 : Activité lipolytique des souches sur gélose au Tween 80.

- ✦ L'ajoute de lugol après 24h se traduit par une zone d'éclaircissement autour des colonies



Figure 15 : Activité amylolytique des souches sur gélose à l'amidon.

Tableau 9 : Comparaison des activités enzymatiques des souches de bacilles thermophiles

	Caséine	Tween 80	Amidon
Souche1	+	+	+
Souche2	-	+	+
Souche3	+	+	+
Souche4	+	+	-
Souche5	+	+	+
Souche6	+	+	+
Souche7	+	+	-
Souche8	+	+	-
Souche9	+	+	-
Souche10	+	+	-

Toutes les souches produisent des lipases et des protéases à l'exception d'une souche qui n'a pas de protéases (-) par contre 4 souches se sont révélées amylases (-).

Ces enzymes se sont des enzymes de dégradation des protéines, des glucides, et des lipides provoquent des altérations qui se traduisent par des défaut de goût et de saveur (Malek et al., 2012).

III-Détermination du potentiel de formation de biofilm :

L'observation des microplaques à l'œil nu après coloration au cristal violet à montrer une coloration intense des parois des puits des microplaques se qui traduit une production importante de biofilm.

La mesure des D.O à confirmé ces résultats pour certain souche on indiquant que la D.O peut être supérieur à 2.5, On retenant la valeur 0.5 comme valeur seuil (Auger et al 2009).

Il est possible de définir 4 classes :

- Classe 1 → $DO < 0.5$ → Faiblement producteurs de biofilm
- Classe 2 → $0.5 < DO < 1.5$ → Moyennement producteurs de biofilm
- Classe 3 → $1.5 < DO < 2.5$ → Fortement producteurs de biofilm.
- Classe 4 → $DO > 2.5$ → Hyper.

🚩 Sur TSB :

Les résultats correspondant sont repartis dans les Figure (16, 17,18, 19,20, 21).

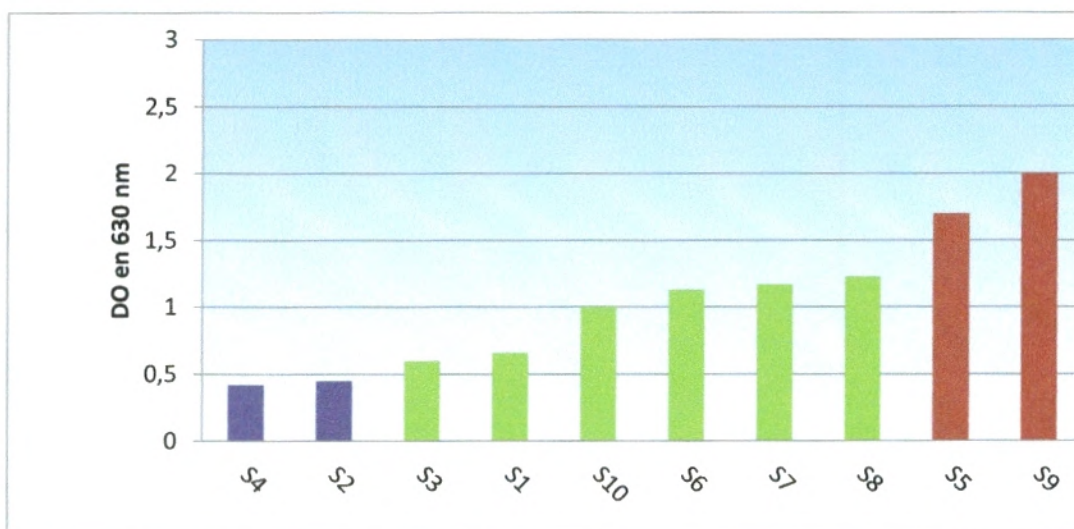


Figure 16 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 30°C

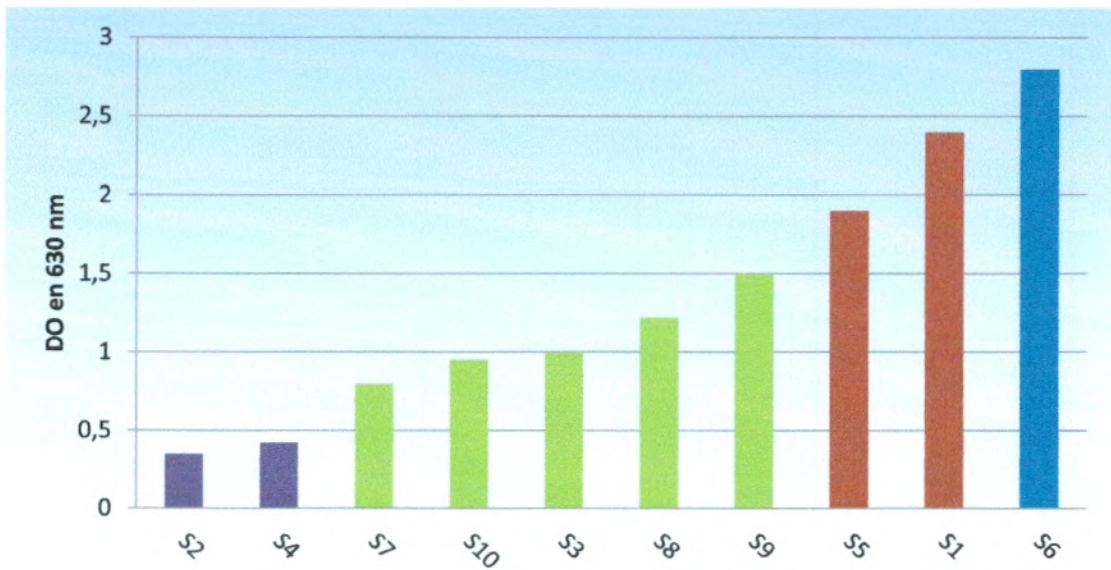


Figure 17 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 42°C

A 30 : Seul 2 souches (S2,S4) ont montré des valeurs inférieures à 0.5 et sont donc considérées comme faiblement productrices de biofilm. 7 souches (S3,S1,S10,S6,S7,S8,S5) ont montré des DO inférieures à 1.5, elles sont considérées comme productrices moyennes de biofilm. 2 souches (S5, S9) ont montré une valeur supérieure à 1 et donc elles sont fortement productrices de biofilm.

A 42 °C : Les mêmes souches S2 et S4 présentent des DO inférieures à 0.5 et sont donc faiblement productrices de biofilm, 5 souches (S7,S10, S3,S8,S9) ont montré une formation de biofilm moyenne, par contre S6 et S1 ont présenté une augmentation considérable de leur pouvoir d'adhésion.

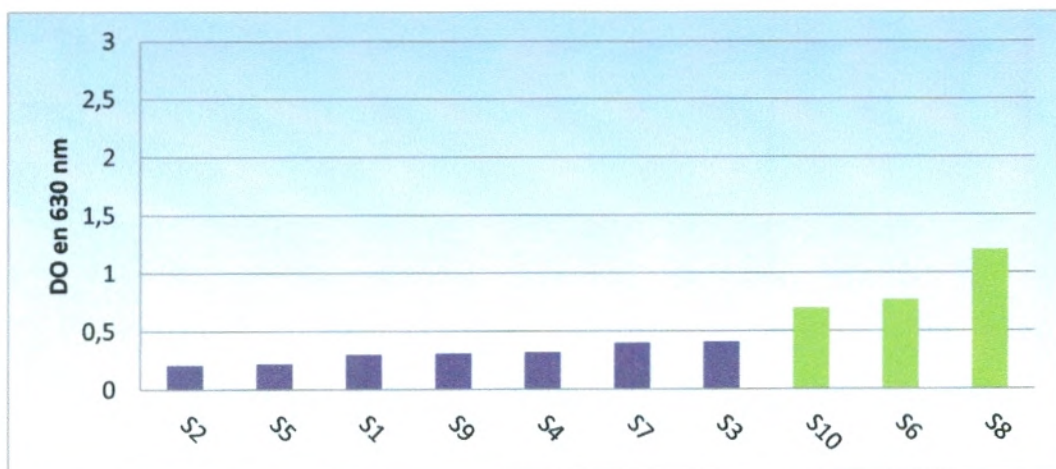


Figure 18 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 55°C

A 55 °C : La majorité des souches montrent des DO inférieure 0.5, la production de biofilm chez la S6 à diminuer avec une DO 0.77 par contre la souche S8 à augmenter sa production de biofilm.

➤ Sur lait écrémé :

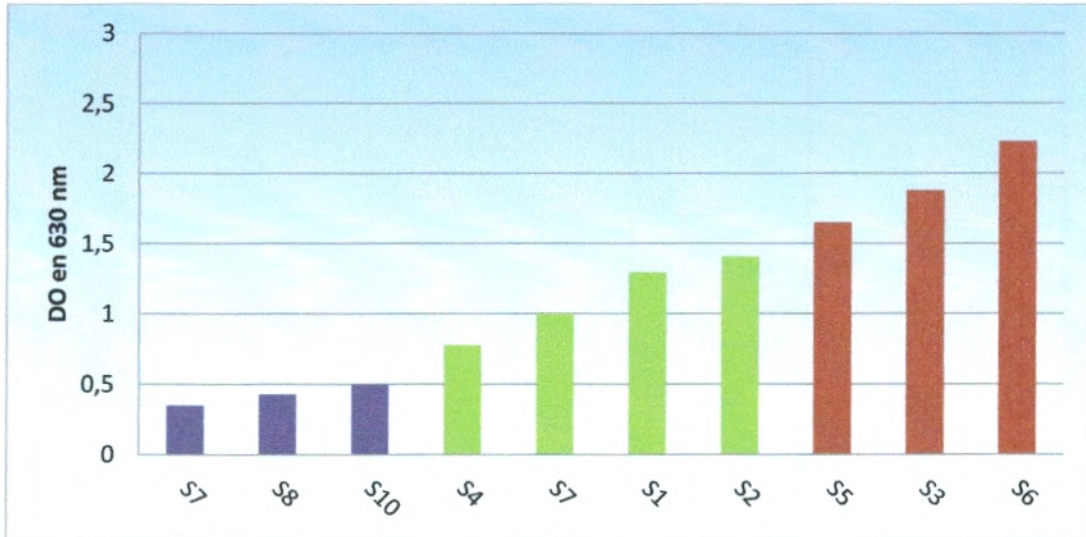


Figure 19 : Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé à 30°C

D’après les résultats obtenus de la Figure les souches se répartissent en 3 classes :

A-0.5 : 3souches sont faiblement productrice de biofilm, 4 souche sont moyennement productrice de biofilm, 3 souche présente une bonne formation de biofilm.

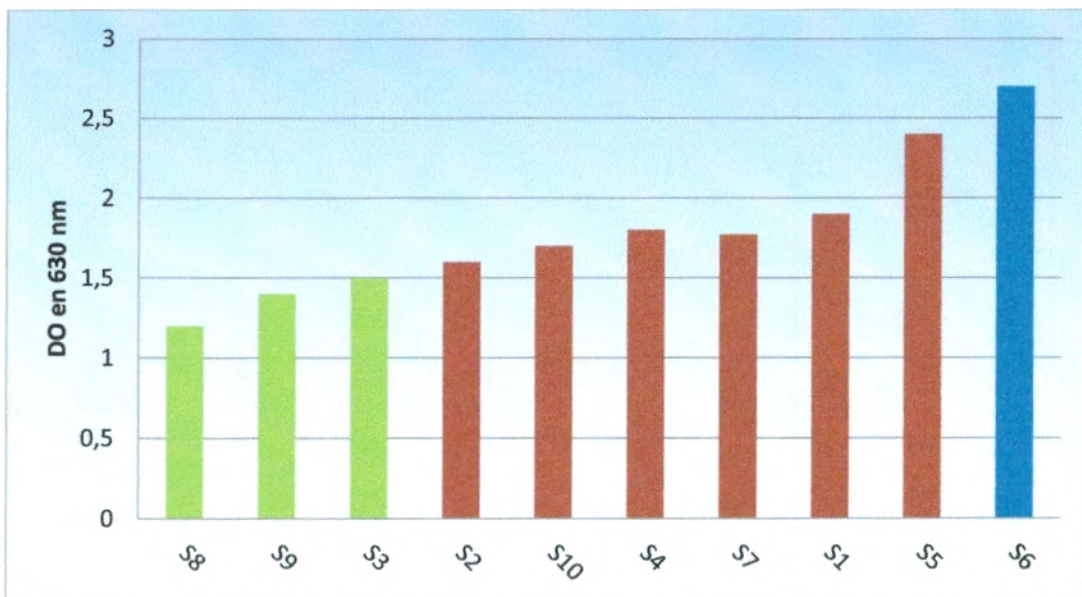


Figure 20 : Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé à 42°C

Ces souches représentent une bonne production de biofilm à cette température elles sont fortement productrice de biofilm, la souche 6 est hyper fortement de biofilm..

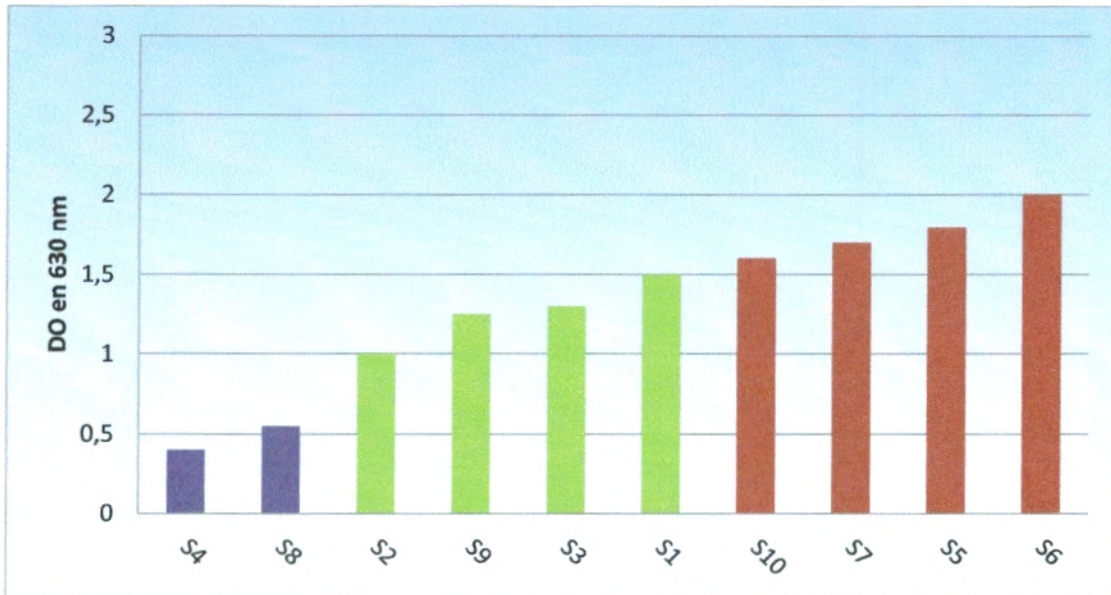


Figure 21 : Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé 55°C

La température provoque une augmentation de pouvoir d'adhésion bactérienne par l'augmentation de l'hydrophobicité de sa surface (**Boutaleb et al . 2007**)

Les résultats représenté dans les figures sont conformes avec ceux de qui ont montré qu'un manque en éléments nutritives d'un milieu à l'autre conduit à une diminution de la formation de biofilm c'est-à-dire le pouvoir d'adhésion de formation de biofilm est influencé par la composition de milieu de culture ceci explique les résultats différent du lait écrémé au TSB.

Conclusion générale

Conclusion générale:

Dans cette étude, l'isolement des souches de bactéries thermophiles à partir du lait pasteurisé a montré un niveau de contamination remarquable. Cela pourrait être attribué à des conditions de procédures de stockages, un mauvais nettoyage et désinfection utilisés, qui aboutissent à la contamination du produit fini en diminuant sa durée de vie.

La caractérisation a montré que les bactéries thermophiles isolées sont identifiées des bacilles à Gram positif, formant des bâtonnets capable de sporuler possédant la catalase, tandis que les tests biochimiques diffèrent d'une souche à l'autre. La mise en évidence des activités enzymatiques a montré que la majorité des souches capable de produire des enzymes extracellulaires (amylase, protéase, lipase). Et d'après la technique des microplaques de titration les souches ont montré différentes capacités de formation de biofilm. (Faible, moyenne forte).

Enfin pour prévenir contre la contamination il faut appliquer les règles d'hygiène et de fabrication en contrôlant la qualité microbiologique de la matière première. Aussi que l'amélioration du système de nettoyage en place (CIP) des équipements laitiers.

Perspectives :

Pour nos perspectives de recherches au futur :

- ✚ L'étude phylogénétique des souches par des techniques moléculaires.
- ✚ Identification taxonomique (PCR-séquençage)
- ✚ Le traçage des souches pour identifier les souches de contamination importantes
- ✚ Une meilleure caractérisation des souches notamment par l'étude de leur propriété d'adhésion et de formation de biofilm.

Références bibliographiques

Références bibliographique

- 1- **Aggad.H Mahouzi F, Ammar YA, Kihal M., (2009).** Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien *Revue Méd. Vét.*, 160, 12, 590-595.
- 2-**Ammar Boularak, (2005).** Guide des déterminations analytiques des laits et produits laitiers, Direction Général du contrôle Economiques Et de la Répression des Fraudes.Direction des laboratoires d'Essais et d'analyse de la qualité p 5.
- 3-**Anderson M, Hinds P, Hurditt S, Miller P, McGrowder D, Alexander-Lindo R (2011).** The microbial content of unexpired pasteurized milk from selected supermarkets in a developing country. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 205-211.
- 4-**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.
- 5-**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 nonpathogenic strains of the Bacille cereus group.*American society for microbiology.* 3:6661-6618.
- 6-**Augustin M A, Clarke P T, Craven H., (2003).** Characteristics of Milk Powders Elsevier Science Ltd.4703.
- 7-**Bertoldo C., Antranikian G. (2001).** Amylolytic enzymes from-hyperthermophiles. *Methods., Enzymol.*, 330:269-289.In **Gomri A, (2012).** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermals terrestres de l'Est Algérien, Université Mentouri-Constantine, Institut de la Nutrition,de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), département de Biotechnologie alimentaire.
- 8-**Betsey Pitts, Martin A. Hamilton, Nicholas Zilver, Philip S. Stewart., (2003).** A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods* 54: 269– 276.
- 9-**Boutaleb N., (2007)** Thèse. Etude de la formation de biofilm sur les surfaces de matériaux couramment utilisé dans les canalisations d'eau potable. Université de Bretagne-sud.
- 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-**Duyvesteyn W S, Shimoni E, Labuza TP., (2001).** Determination of the End of Shelf Life for Milk Using Weibull Hazard Method Food Science and Technology Volume 34, Issue 3 page:143-148. 7-

12-**De Vos P., Garrity G-M., Jones D., Krieg N-R., Ludwig W., Rainey F-A., Schleifer K-H. and Whitman W-B., (2009).** Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition., Volume Three, The Firmicutes. Springer, New York, USA.

13-**Flint B, Brooks JD., (1997):**Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of controle 54:81-97.

14-**Frank, J.F, Hassan, AN., (2002).** Microorganisms associated with milk. in thèse : analyse du microbiote du lait par les méthodes moléculaires.Département des sciences des aliments et de nutrition faculté des science de l'agriculture et de la l'alimentation université laval Quebec.

15-**Kaan Tekinsen K, Elmali M, Ulukanli Z., (2007).** Microbiological Quality of UHT Milk Consumed in Turkey. Journal of Food Safety, Vol.7, p. 45-48.

16-**Jean-Christan M'boya, Cécile Broutin, Philippe Dudez, (2001).**Le lait pasteurisé. GRE-Agridoc : un réseau d'information et de documentation financé par ministère français des affaires étrangères p-4-5.

17-**Madigan M.T. and Martino J.M., 2006.** Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA.

18-**Malek F., B.Moussa-Boudjemaa., F.Khaouani-yousfi., A.Kalai and M. Kihel.,(2012) .** Microflora of biofilm on algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. African Journal of Microbiology Research 6, 3863-3844.

19-**Merigaud JP, Lemoine T, Aguer D, Gillis JC, Jouanneau F, Koubbi L, Lepecheur E, Madiot T., (2009).** spécification technique de l'achat public laits et produits laitiers Groupes d'étude des marches de restaurations collective et de nutrition (GEM RCN).

20-**Meunier-Goddik L, Sandra S. (2002).** Liquid Milk Products / Pasteurized Milk. Encyclopedia of Dairy Sciences. Amsterdam: Academic Press 3, 1627-1632.

21-**Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., (2001).** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzonensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius* and *Geobacillus thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51.

22-**Ould Mustapha, A., N'diyae D., Ould Kory B., (2012).** Etude de la qualité du lait pasteurisé des industries laitières situées à Nouakchott (Mauritanie) *Sciences du vivant Biologie*. Editions Mersenne : Volume 4 N°120804 ISSN 2111 – 4706.

23- **Petrus R., Loiola C., Silva C., Oliveira C., (2007).** Microbiological and Sensory Stability of Pasteurized Milk in Brazil. *Chemical engineering transactions* Volume 17, 2009.

24-**Ranieri ML, Huck JR, Sonnen M, Barbano DM, Boor KJ., (2009).** High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 92(10): 4823-4832.

25-**Schmidt VSJ, Kaufmann V Kulozik, U, Scherer S, Wenning M., (2012).** Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*. 154: 1–9.

26 -**Siddappa V, Nanjegowda DK, Viswanath P ., (2012).** Occurrence of aflatoxin M1 in some samples of UHT, raw & pasteurized milk from Indian states of Karnataka and Tamilnadu. *Food and Chemical Toxicology* 50: 4158–4162

27 -**Smithwell N. ; Kailasapathy K ., (1995).** Psychrotrophic bacteria in pasteurised milk : problems with shelf life *Australian journal of dairy technology* 50: p28-31.

28-**Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ., (2010).** A review of current and emergent biofilm control. strategies. *Food Sci. Technol.*, 43: 573-583.

29- **Simon M, AP Hansen., (2001).** Effect of Various Dairy Packaging Materials on the Shelf Life and Flavor of UHT Milk. Journal of Dairy Science Vol. 84, No. 4.

30-**Strahm W., Eberhard P., (2010).** Technologies du lait prêt à la consommation, Agroscope Liebefeld-Posieux ALP. ISSN 1661-0814. p12.

31-**Tomasula P M, Kozempel M F, Konstance R P, Gregg D , Boettcher S. Baxt B, Rodriguez L., (2004).** Thermal Inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus in Milk Using High Temperature, Short-Time Pasteurization. J. Dairy Sci. 90:3202–3211.

32-**Vandercammen M., (2011).** quel Lait choisir Crioc centre de recherche et d'information des organisation de consommateurs.015-11.p1-3.

Annexes

➤ **Trypticase soja agar (TSA)**

poudre déshydraté	40g
Eau distillée	1000 ml

➤ **Tryptone-sel-eau (TSE)**

Eau distillée	1000 ml
Nacl	8.5g
Tryptone	1g

➤ **Trypticase soja bouillon (TSB)**

poudre déshydraté	30g
Eau distillée.	1000 ml

➤ **Eau physiologique**

Eau distillée	1000ml
Nacl	1g

➤ **Solution dissolvante**

Ethanol	200 ml
Acide acétique glacial	50 ml
Eau distillé	250 ml

➤ **Gélose a l'amidon (recherche d'amylase)**

amidon	5g
L'eau distillée	50 ml
Gélose nutritive	500 ml

➤ **Milk agar (recherche de protéase)**

Poudre de lait	5 g
Eau distillée	50 ml

Stérilisé à 120°C pendant 30 minutes ⇒ 1

Agar	2 g
Eau distillée	50 ml

Stérilisé à 120°C pendant 30 minutes ⇒ 2

-mélanger 1+2 et couler dans des boites de pétrie.

➤ **Gélose au Tween(activité lipolytique)**

Milieu TSA	200ml
Tween	80 gouttes

➤ **Cristal violet :**

Cristal de violet	2 g
Eau distillé	100ml

➤ **Milieu lait écrémé :**

Poudre du lait écrémé	50g
Eau distillé	500ml