

# THESE

Présentée Devant

L'UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAÏD -TLEMCEN  
FACULTE DES SCIENCES - DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR D'ETAT**  
Mention : Microbiologie des aliments

Par

Boumediene MOUSSA BOUDJEMAA  
Ingénieur Agronome

Inscrit Sous le N°:	.....
Date de :	10 MARS 2015
Cod. :	1041

## Apport du système HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) et de la microbiologie prévisionnelle à la sécurité sanitaire des aliments.

Application au cas de BACILLUS CEREUS dans le lait

Jury :	Pr M. BENYOUCEF	Président
	Pr M. KIHAL	Directeur de thèse
	Pr Dj. E. HENNI	Membre
	Dr A. MOUSSAOUI	Membre
	Pr Dj. SAIDI	Membre



A ma femme.

Sans son insistance, cette thèse n'aurait pas pu  
voir le jour.

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	7
<b>RESUME</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>RESUME EN ARABE</b> .....	10
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	
1. Présentation de l'étude.....	11
2. Objet de l'étude.....	12
<b>1<sup>ère</sup> Partie : DONNEES BIBILIOGRAPHIQUES</b>	
<b>I. La méthode HACCP</b> .....	16
I. 1. Introduction.....	16
I. 2. Historique.....	16
I. 3. Les principes du HACCP.....	17
I. 4. Mise en œuvre du plan HACCP.....	19
I. 5. Le système HACCP et le risque alimentaire.....	23
I. 6. Le système HACCP et les systèmes d'assurance qualité.....	24
I. 7. Le HACCP et le commerce international .....	25
<b>II. La microbiologie prévisionnelle</b> .....	27
II. 1. Introduction.....	27
II. 2. Concept et Historique.....	27
II.3. Les différents types de modèles utilisés en microbiologie prévisionnelle .....	28
II.4. La démarche de modélisation.....	29
II. 5. Classes de modèles.....	29
II. 6. Modélisation de la cinétique d'inactivation.....	34
II.7. Application de la modélisation microbiologie alimentaire .....	36
II. 8. Microbiologie prévisionnelle et HACCP.....	36



<b>III. <i>Bacillus cereus</i></b> .....	38
III. 1. Principales caractéristiques de <i>Bacillus cereus</i> .....	38
III. 2. <i>Bacillus cereus</i> : sporulation et germination.....	41
III. 3. La pathogénéicité de <i>Bacillus cereus</i> .....	42
III. 3. 1. Les infections gastro-intestinales .....	42
III. 3. 1. 1. Le syndrome diarrhéique et l'enterotoxine .....	42
III. 3. 1. 2. Le syndrome émétique et la toxine émétisante .....	43
III. 3. 2. Les infections non gastro-intestinales .....	44
III. 4. <i>Bacillus cereus</i> et l'industrie laitière.....	46

## **2<sup>ème</sup> Partie : MATERIEL ET METHODES**

<b>I. Les analyses microbiologiques</b> .....	47
I.1. Evaluation de la contamination microbienne du lait .....	47
I. 1. 1. Le lait à la sortie de la mamelle.....	47
I. 1. 2. Le lait à la sortie de la machine à traire .....	47
I. 1. 3. Le lait à la réception à l'unité .....	47
I. 1. 4. Le lait avant pasteurisation .....	47
I. 1. 5. Le lait après conditionnement .....	47
I. 2. Evaluation des différentes sources de contamination.....	48
I. 2. 1. La peau des mamelles.....	48
I. 2. 2. La machine à traire.....	48
I. 2. 3. La cuve de stockage .....	48
I. 2. 4. La litière.....	48
I. 2. 5. L'ambiance des étables.....	48
I. 3. Transport et préparation des échantillons.....	48
I. 4. Les différentes flores microbiennes dénombrées .....	48
I. 4. 1. la flore totale.....	49
I. 4. 2. la flore thermorésistante .....	49
I. 4. 3. la flore psychrotrophe.....	49
I. 4. 4. <i>Bacillus cereus</i> .....	49



I. 5. Identification des Souches de <i>Bacillus cereus</i> .....	51
I. 5. 1. Isolement des souches.....	51
I. 5. 2. Conservation des souches.....	51
I. 5. 3. Les tests utilisés pour l'identification des souches de <i>Bacillus cereus</i> .....	51
<b>II. Etude de l'effet des facteurs environnementaux sur la croissance de <i>Bacillus cereus</i></b> .....	<b>53</b>
II. 1. Description des conditions de culture.....	53
II. 1. 1. Milieux de base.....	53
II.1. 2. Description de facteurs étudiés. ....	53
II.1. 2. 1. Température. ....	54
II.1.2. 2. pH .....	54
II.1. 2. 3. Aw.....	55
II. 2. Méthodologie .....	55
II. 2. 1. Préparation des suspensions de spores. ....	55
II. 2. 2. Préparation des milieux de base. ....	55
II. 2. 3 Inoculation.....	56
II. 2. 4. Evaluation de la population microbienne.....	56
II. .3. Modélisation de croissance de <i>Bacillus cereus</i> .....	56
II. 3. 1. Modélisation de croissance de <i>Bacillus cereus</i> par un modèle primaire.. ....	56
II. 3. 2. Modélisation des taux de croissance par un modèle secondaire .....	56
II. 3. 3. Modélisation de l'effet de 3 facteurs environnementaux sur la croissance.....	57
II. 3. 4. Méthode d'ajustement.....	57
<b>III. Etude de l'effet des facteurs environnementaux sur la thermorésistance de <i>Bacillus cereus</i></b> .....	<b>57</b>
III.1. Description de facteurs étudiés. ....	58
III. 2. Détermination de la Thermorésistance. ....	58
III. 3. Incubation et dénombrement des survivants.....	58
III. 4. Calcul de D et Z.....	58
III. 5. Modélisation de la thermorésistance de <i>Bacillus cereus</i> .....	59



IV. Les logiciels utilisés.....	60
---------------------------------	----

### **3<sup>ème</sup> Partie : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>I. Résultats des analyses microbiologiques .....</b>	<b>62</b>
I.1. Evaluation de la contamination microbienne du lait .....	62
I. 1. 1. La flore totale.....	62
I. 1. 2. La flore psychrotrophe .....	63
I. 1. 3. La flore thermorésistante.....	63
I. 1. 4. <u>Bacillus cereus</u> .....	65
I. 1. 5. Discussion des résultats relatifs à <u>Bacillus cereus</u> .....	66
I. 1. 6. Le analyses microbiologiques du lait cru : conclusion.....	70
I. 2. Résultats et discussion des analyses microbiologiques du lait au niveau de la laiterie...	71
<b>II. Mise en place de la démarche HACCP au niveau des fermes.....</b>	<b>73</b>
II. 1. Audit sanitaire des fermes.....	78
II. 2. Définition du champ d'étude et Constitution de l'équipe HACCP .....	78
II. 3. Description du produit .....	79
II. 4. Identification de l'utilisation attendue du produit.....	79
II. 5. Construction du diagramme de fabrication.....	81
II. 6. Analyse des dangers.....	85
II. 7. Détermination des CCP.....	94
II. 8. Etablissement des limites critiques, système de surveillance et actions correctives.....	97
<b>III. Application de la méthode HACCP Au complexe laitier Mansourah pour la production du lait pasteurisé.....</b>	<b>105</b>
III.1. L'audit qualité préliminaire.....	105
III.2. Proposition d'un plan HACCP.....	109
III. 2. 1. Définition du champ d'étude et Constitution de l'équipe HACCP.....	109
III.2. 2. Description du produit .....	109
III. 2. 3. Identification de l'utilisation attendue du produit.....	114
III. 2. 4. Elaboration du diagramme de fabrication.....	115
III. 2. 5. Analyse des dangers.....	118
III 2. 6. Identification des CCP.....	122



III. 2. 7. Etablissement des limites Critiques.....	122
III. 2. 8. Etablissement d'un système de surveillance.....	122
III. 2. 9. Etablissement d'un plan d'actions correctives.....	122
III. 2. 10. Vérifications.....	122
III. 2. 11. Revue du système HACCP.....	123
III. 3. Discussion : les limites d'application du système HACCP dans la filière lait.....	127
<b>IV. Application de la microbiologie prévisionnelle à l'étude de croissance</b>	
<b>de <i>B. cereus</i></b> .....	131
IV. 1. Modélisation de croissance de <i>Bacillus cereus</i> par le modèle de Gompertz .....	131
IV. 2. Paramètres de croissance de <i>B. cereus</i> selon les données du logiciel PMP.....	137
IV. 3. Description de l'effet de la température sur le taux de croissance de <i>B. cereus</i> .....	146
IV. 4. Description de l'effet de la température, du pH et de l'activité de l'eau.....	147
IV. 5. Discussion générale.....	149
<b>V. Résultats et discussion d l'étude de la thermorésistance de <i>B. cereus</i></b> .....	154
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	162
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	165
<b>ANNEXES</b> .....	193

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé.

Le Professeur Mabrouk KIHAL, Directeur du laboratoire de Microbiologie appliquée de l'Université d'Es-Senia – Oran, pour avoir accepté, de diriger cette thèse ainsi que pour son inconditionnelle confiance. Son accueil toujours simple et sympathique a été pour moi une source d'encouragement.

## RESUME

L'objectif de ce travail consiste en l'application des principes du système HACCP et de la microbiologie prévisionnelle à l'amélioration de la sécurité sanitaire des aliments. Pour ce faire l'étude a été appliquée au danger « *Bacillus cereus* » dans le lait cru et pasteurisé.

La première partie a porté sur l'évaluation de l'incidence de la flore de *Bacillus cereus* dans le lait cru et la recherche des principales sources de contamination. Les échantillons de laits provenant de fermes de l'Ouest algérien ont été analysés. Les résultats obtenus montrent que l'incidence de *Bacillus cereus* dans le lait cru est élevée.

Un plan HACCP a été conçu pour son application aux fermes et montrer son impact sur le niveau de contamination du lait cru par les spores de *Bacillus cereus*. Au vu des résultats, les conditions préalables à l'installation d'une telle démarche ne sont pas réunies. Si l'apport des principes du système HACCP à la sécurité alimentaire est reconnu, sa mise en œuvre pratique dans l'environnement laitier étudié ici reste difficile et dépend de beaucoup de contraintes. Le même constat a été observé au niveau du complexe laitier Mansourah de Tlemcen. Il faut d'abord mettre en place les préalables à cet outil de gestion en particulier, les bonnes pratiques de fabrication et les bonnes pratiques d'hygiène qui permettent de diminuer le nombre des CCP à maîtriser. La littérature relative à l'HACCP n'est pas adaptée à l'environnement des pays en développement comme l'Algérie.

L'apport de la microbiologie prévisionnelle est concret. Elle permet un gain de temps mais ne répond pas encore à toutes les questions des utilisateurs ; le développement rapide des bases de données comme le ComBase et des logiciels comme le Pathogen Modelling Program, le Food Micromodel et le Sym'previus permettront de rapprocher les modèles de la réalité industrielle.

**Mots clefs:** sécurité alimentaire, HACCP, microbiologie prévisionnelle, lait cru, lait pasteurisé, *Bacillus cereus*.

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé.

Le Professeur Mabrouk KIHAL, Directeur du laboratoire de Microbiologie appliquée de l'Université d'Es-Senia – Oran, pour avoir accepté, de diriger cette thèse ainsi que pour son inconditionnelle confiance. Son accueil toujours simple et sympathique a été pour moi une source d'encouragement.

Le Professeur Olivier CERF de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort (France) à qui revient l'idée de ce travail. Il m'a encouragé et conseillé tout au long de ce travail.

Le Professeur Joséfa GONZALEZ directrice adjointe du Département d'Hygiène et de Technologie des Aliments de l'Université de Léon (Espagne) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant une année. Elle m'a énormément aidée.

Les membres du Département d'Hygiène et de Technologie des Aliments de l'Université de Léon (Espagne) : Mercedes LOPEZ, Maria-Eugenia TORNADIJO Javier MATEO et José Maria FRESNO dont la collaboration technique m'a été précieuse.

Le Professeur Mohammed BENYOUCEF qui me fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

Le Professeur Djamel Ed-Dine HENNI et le Professeur Djamel SAIDI pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de faire partie du jury et pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé.

Le Docteur Abdallah MOUSSAOUI, pour l'amitié qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Mes étudiants pour avoir pris en charge une partie des expériences.

Mes beaux-parents, sans qui rien n'aurait été possible



## ABSTRACT

The objective of this work consists of the application of the principles of system HACCP and predictive microbiology to the improvement of the food safety. With this intention the study was applied to the danger *Bacillus cereus* in raw and pasteurized milk.

The first part related to the evaluation of the incidence of *Bacillus cereus* in raw milk and seeks its principal sources of contamination. The milk samples coming from farms located in the West of Algeria were analyzed. The results obtained show that the incidence of *Bacillus cereus* in raw milk is high.

A HACCP plan was conceived to the firm and to show its impact to the level of contamination of the raw milk by the spores of *Bacillus cereus*. Within sight of the results, the prerequisites to the installation of such a step are not met. If the contribution of the principles of system HACCP to food safety is obvious, its practical implementation in the dairy environment remains difficult and depends on many constraints. The same report was observed with the dairy complex "Mansourah" de Tlemcen. It is initially necessary to think of setting up the preconditions to this tool in particular, Good Manufacturing Practice and Good Hygiene Practice who allow decreasing the number of the CCP to be controlled.

During the last ten years, much work was published relating to the HACCP. The majority of these publications are not adapted to the conditions of the developing countries like Algeria.

The contribution of predictive microbiology is concrete. It allows a saving of time but does not answer yet all the questions of the users; the fast development of the data bases like Combase and of the software like Pathogen Modelling Program, Food Micromodel and Sym'previus will make it possible to bring closer the models to industrial reality.

**Key words:** Food safety, HACCP, predictive microbiology, raw milk, pasteurised milk, *Bacillus cereus*.

## ملخص

إن الهدف من هذا العمل هو تطبيق مبادئ منهجية Hazard Analysis Critical Control Points التي يمكن ترجمتها إلى " تحليل المخاطر الحساسة للتحكم فيها" و كذا منهجية الميكروبيولوجيا التنبؤية (Predictive Microbiology) لضمان الأمن الصحي للأغذية و لغرض تقييمها طبقت الدراسة على خطر *Bacillus cereus* في إنتاج الحليب الطازج و المبستر.

المرحلة الأولى من الدراسة اهتمت بتقييم مدى التلوث الميكروبي بصفة عامة و ب *Bacillus cereus* بصفة خاصة لمادة الحليب في الوسط المزرعي.

النتائج المتوصل إليها بينت أن درجة تلوث الحليب ببكتيريا *Bacillus cereus* لكن تطبيقها مرتفعة لعدم توفر شروط النظافة الدنيا. نفس الشيء يقال بالنسبة لمصنع الحليب حيث أن تحليل حالته الصحية أوضحت نقص في النظافة.

إن تطبيق HACCP في هذه الحالة صعب و المشكل لا يكمن في المنهجية ذاتها إنما يكمن في شروط تطبيقها و استعمالها. حيث أن الوسط الذي درس هنا ليس مهياً لمثل هذه المناهج التي تحتاج إلى أرضية مهياة تشمل الطرق الحسنة في الإنتاج و النظافة ( GMP و GHP ).

في الأخير تجدر الإشارة إلى أن المراجع العلمية التي تتحدث عن HACCP لا تتلاءم و أوضاع البلدان السائرة في طريق النمو كالجزائر التي تحتاج لتعميم قواعد النظافة.

إن أهمية الميكروبيولوجيا التنبؤية واقع و حقيقة فهي تسمح بربح الوقت و لكنها في الوقت الحالي لا تستجيب لكل متطلبات مستعمليها. في المستقبل إن التطور السريع للقواعد المعلوماتية مثل Pathogen Modeling Program و Food Micromodel و Sym'Previus و Combase وغيرها سيسمح بتقريب الميكروبيولوجيا التنبؤية من عالم الصناعة الغذائية.

# INTRODUCTION GENERALE

## 1. Présentation de l'étude

La sécurité alimentaire demeure la préoccupation majeure des pouvoirs publics et des consommateurs. Les maladies d'origines alimentaires sont en fait très nombreuses. Selon l'OMS (1997), pas moins de 163 millions de cas de toxi-infections alimentaires par an sont recensés, d'après cette organisation, il ressort de certaines enquêtes que les toxi-infections alimentaires sont peut-être 300 à 350 fois plus nombreuses que ne l'indique le nombre des cas signalés. Des centaines de millions de personnes dans le monde souffrent de maladies provoquées par la contamination des aliments parmi lesquels le lait et les produits laitiers. Les pays en développement sont les plus touchés. Les quelque 1,5 milliard d'épisodes de diarrhée observés chaque année chez les enfants de moins de cinq ans et provoquant plus de 3 millions de décès donnent une idée de l'ampleur du problème. Par ailleurs, on estime que 70% des épisodes diarrhéiques chez les enfants sont d'origine alimentaire et 20 à 50% des 4000 millions de personnes qui voyagent chaque année souffrent des maladies d'origine alimentaire (OMS, 1997).

Le coût social et économique de ces épidémies est toujours élevé. Ce coût élevé explique le poids important que ces épidémies représentent dans une démarche de santé publique (Nortermans, 1999).

Face à la recrudescence des intoxications alimentaires (FAO, 2003), l'industrie agro-alimentaire doit étudier et contrôler le développement bactérien pour assurer la sécurité microbiologique des aliments. Des traitements physiques ou chimiques sont appliqués aux aliments pour détruire le plus grand nombre de bactéries pathogènes présentes dans l'aliment ou inhiber leur développement.

En dépit d'immenses efforts en faveur de la qualité hygiénique des produits, les toxi-infections alimentaires collectives se succèdent et ont ébranlé la confiance des citoyens dans la capacité de l'industrie alimentaire et des autorités à garantir leur sécurité alimentaire. Les consommateurs sont devenus plus exigeants. Ils préfèrent une alimentation sans risque, de qualité variée et riche en produits frais.

L'évolution des modes de conservation a joué un rôle fondamental dans l'amélioration de la maîtrise des risques. Le 19<sup>ème</sup> siècle a été marqué par la pasteurisation, qui permet notamment de lutter contre les maladies transmises par le lait. Le début du 20<sup>ème</sup> siècle



s'accompagne, quant à lui, d'énormes progrès dans le domaine de la physique et de la mise au point de systèmes de réfrigération de plus en plus performants. Aujourd'hui, la chaîne du froid, représente un mode de conservation efficace pour la plupart des produits périssables.

## 2. Objet de l'étude

La salubrité des aliments occupe une place de plus en plus importante dans la santé publique. La cinquante-troisième session de l'Assemblée mondiale de la Santé en l'an 2000 a reconnu que la salubrité des aliments était une priorité pour l'OMS.

Les maladies diarrhéiques, dont la plupart ont pour origine la consommation d'aliments ou d'eaux pollués, sont responsables de la mort de millions de personnes. Les toxi-infections alimentaires, comme les listérioses, les salmonelloses, les yersinioses, le botulisme et les mycotoxicoses, peuvent provoquer malformations foetales, arriération mentale, avortements, dommages organiques, arthrites réactionnelles, paralysie et cancer.

Les éléments qui peuvent rendre un produit alimentaire toxique sont nombreux mais la plupart des maladies d'origine alimentaire sont dues à des microorganismes. Aujourd'hui il apparaît que le risque microbiologique est le plus difficile à maîtriser.

Les toxi-infections alimentaires collectives successives et parfois spectaculaires ont ébranlé la confiance des citoyens dans la capacité de l'industrie alimentaire et des autorités à garantir leur sécurité alimentaire. Le consommateur est devenu plus exigeant. Face à cette recrudescence, l'industrie agro-alimentaire doit étudier et contrôler le développement bactérien pour assurer la sécurité microbiologique des aliments. Parmi les aliments, Les produits laitiers sont préparés et consommés partout dans le monde aussi bien par les enfants, les personnes âgées que les personnes immunodéprimées qui représentent un groupe à risque. Les bactéries sporogènes aérobies représentent un problème certain dans le processus de mise à la consommation de ces produits car leurs spores peuvent survivre à de nombreux traitements. Les organismes pathogènes qui peuvent être associés aux produits laitiers comme les salmonelles, les *yersinia*, les staphylocoques et plus récemment *Listeria monocytogenes*, représentent un risque potentiel en industrie laitière.

A côté de ces bactéries, les genres *Bacillus* et *Clostridium* peuvent induire la formation de spores lorsque les facteurs nutritionnels deviennent limités ou l'environnement devient stressant. En général, les spores sont résistantes aux traitements de la pasteurisation. Dans certains cas, elles peuvent être également activées par de tels traitements et peuvent causer la détérioration du produit ou être à l'origine de problèmes sanitaires après leur germination.



*Bacillus cereus* est un micro-organisme sporogène pathogène opportuniste. Il est, depuis longtemps, connu comme un contaminant habituel du lait ; son activité qui se manifeste dans la détérioration de la crème est familière à beaucoup de monde. La présence de *Bacillus cereus* dans le lait pasteurisé et dans les produits laitiers peut résulter du chauffage insuffisant et/ou d'une recontamination après la pasteurisation par la germination des spores activées thermiquement, qui peuvent causer des infections ou des intoxications plus ou moins sévères par la production de toxines. Il est donc important de connaître l'effet des conditions environnementales sur le comportement des spores de *Bacillus cereus*.

Les maladies dues à *Bacillus cereus* sont citées régulièrement dans les relevés épidémiologiques annuels de part le monde, en moyenne à raison d'un foyer annuel, parmi plusieurs centaines de foyer dont l'immense majorité est due à *Salmonella* et à *Staphylococcus* (Pan et al., 1997). *Bacillus cereus* est considéré à tort comme un responsable mineur de toxi-infections. En fait, ce microorganisme provoque des syndromes d'une forte similitude avec d'autres maladies alimentaires plus fréquentes et qui sont dues à *Clostridium perfringens* et à *Staphylococcus aureus*. Un certain nombre de foyers dus à *Bacillus cereus* passent donc inaperçus. De plus, et contrairement à ces bactéries *Bacillus cereus* ne fait pas partie des bactéries recherchées en routine, il interviendrait très certainement pour une bonne part dans les cas déclarés comme étant d'origine inconnue.

Actuellement, on constate un besoin d'augmenter la durée des produits laitiers pasteurisés tout en préservant la sécurité du consommateur. D'après Ravanis et Lewis (1995), les facteurs qui influencent la qualité microbiologique du lait pasteurisé sont les suivants : la qualité du lait cru, le traitement thermique appliqué, la contamination après pasteurisation et la température de stockage du lait pasteurisé. L'application du système HACCP pourrait aider à maîtriser la qualité des trois derniers facteurs. En effet, l'inspection du produit final ne pouvant fournir une telle garantie, la sécurité et la qualité reposent de plus en plus sur la démarche HACCP qui vise à maîtriser systématiquement l'incidence microbiologique de tout ce qui, dans le processus de mise à la consommation, peut contribuer à la destruction ou à la multiplication des contaminants.

Cette démarche est facilitée par la connaissance du devenir des micro-organismes en fonction d'un certain nombre de facteurs : c'est le domaine de la microbiologie prévisionnelle. La prévision se réalise par l'utilisation de modèles, c'est à dire d'un système établissant une correspondance entre un ensemble de conditions et une cinétique d'évolution de la population microbienne significative. La connaissance des caractéristiques de la



population initiale et des conditions dans lesquelles elle est placée, permet alors de prévoir son évolution pendant la durée de vie du produit.

Appliquée au lait, la microbiologie prévisionnelle permet alors de prévoir sa durée de vie. En respectant une hygiène rigoureuse limitant la contamination initiale, l'application d'une réfrigération précoce et rapide permet d'augmenter la durée de conservation du lait, en retardant les phénomènes d'altération microbienne tout en laissant apparaître les qualités organoleptiques recherchées.

McKellar et Lu (2003) rapportent que la microbiologie prévisionnelle est un sujet d'actualité qui a fait l'objet de divers articles de synthèse, d'ouvrages et de numéros spéciaux de revues internationales.

Le présent travail est une étude globale relative à l'application des principes du système HACCP et de la microbiologie prévisionnelle à l'amélioration de la sécurité sanitaire des aliments : une approche relativement nouvelle en Algérie. L'objectif, ici, reste la maîtrise de la qualité microbiologique et hygiénique du lait cru et pasteurisé produit dans l'Ouest algérien. En particulier l'incidence de la flore de *Bacillus cereus*.

En Algérie, la production laitière annuelle avoisine 1,7 milliard de litres parmi lesquels seuls moins de 100 millions sont collectés pour être transformés au niveau du secteur industriel. Le reste est destiné à l'autoconsommation ou au marché informel. Ces dernières années, les autorités algériennes ont lancé un ambitieux programme de développement de la production laitière locale incluant des mesures d'incitation à l'amélioration de la qualité du lait cru et des conditions de sa collecte (Bencharif, 2001). Le taux d'intégration du lait cru local en industrie laitière reste encore faible. Pour la wilaya de Tlemcen, ce taux a été de 20% environ ces dernières années (tableau n°1)



**Tableau N°1 : Evolution du cheptel bovin et de la production laitière dans la wilaya de Tlemcen de 1994 à 2003 (source : direction des services agricoles de Tlemcen)**

Année	Total Bovins	Total Vaches laitières	lait produit (milliers de litres)	lait collecté (milliers de litres)	Taux d'intégration en industrie (%)
1994	24180	15150	23910	4182	17,49
1995	22480	13500	25856	7742	29,94
1996	19220	11400	24902	8973	35,91
1997	18370	10500	21675	7685	35,45
1998	18940	11100	21252	5093	23,96
1999	23600	11500	25600	5983	23,37
2000	23200	11520	27000	7164	26,53
2001	27500	16550	39400	7282	18,48
2002	25200	15500	33980	7160	21,07
2003	26700	15720	36000	6085	16,90



# **I. La Méthode HACCP :**

## **I.1. Introduction**

Le système HACCP, (Hazard Analysis Critical Control Point), en français « Analyse des dangers-points critiques pour leur maîtrise » est un système qui définit, évalue et maîtrise les dangers qui menacent la salubrité des aliments. Un danger selon le système HACCP est défini comme un agent biologique, chimique ou physique ou état de l'aliment ayant potentiellement un effet nocif sur la santé. Un point critique pour la maîtrise (CCP) est le stade auquel une surveillance peut être exercée et est essentielle pour prévenir ou éliminer un danger menaçant la salubrité de l'aliment ou le ramener à un niveau acceptable (Codex Alimentarius, 1997). Le système HACCP est en fait une démarche préventive, spécifique permettant d'assurer la qualité et la sécurité des denrées alimentaires dans le cadre d'une démarche qualité globale (Ehiri et al., 1995). Le système garantit une gestion efficace de la salubrité des aliments, il recherche les dangers puis prévoit des contrôles pour veiller à ce que le produit ne soit pas nuisible à la santé du consommateur.

## **I.2. Historique**

Le HACCP n'est pas un nouveau concept, les premiers articles scientifiques traitant du sujet datent du début des années 1970 (Bauman, 1974). A l'origine, le concept du HACCP a été développé en 1959 comme un système de sécurité microbiologique par la société Pillsbury, la National Aeronautics and Space Administration (NASA, Etats-Unis) et les laboratoires de l'armée américaine, au tout début du programme américain de missions spatiales habitées, parce qu'il était vital d'assurer l'hygiène alimentaire des astronautes (Hartmann, 1997). A cette époque la plupart des systèmes de qualité et de sécurité alimentaire étaient basés sur le contrôle du produit fini.

En 1969 le système est approuvé par le comité de l'hygiène alimentaire du codex alimentarius (CAC/RCP 1-1969) révisée en 1993 puis en 1997 (Mortimore, 1998)

En 1985, le sous-comité des critères microbiologiques des aliments de l'académie nationale américaine des sciences l'a approuvé (MCMeeKin et Ross, 2002)

En 1989, cette même société savante a publié pour la première fois « HACCP principles for food production »

En 1991 a eu lieu le premier stage de formation sur le système HACCP en France. Il fût l'œuvre de l'association Asept



En 1993, Le système HACCP a été introduit en Algérie suite à un accord-programme de coopération algéro-canadien d'amélioration de la sécurité microbiologique des aliments. Il a été confié côté algérien au centre algérien du contrôle de la qualité et de l'emballage (CACQE). Pour des raisons diversement appréciées, ce programme n'a pas eu les retombées escomptées.

A partir de la fin des années 1990, le système est devenu quasiment incontournable. Même, l'organisation mondiale de normalisation (ISO) lui a consacré une norme ( la future norme ISO 22000 ).

### **I.3. Les Principes du HACCP**

A la base, le système HACCP repose sur le principe fondamental selon lequel les risques pour la salubrité des aliments peuvent être soit éliminés, soit réduits au minimum grâce à la prévention au stade de la production plutôt que par l'inspection des produits finis. Son objectif est de prévenir les risques le plus tôt possible dans la chaîne alimentaire (Khandke et Mayes, 1998).

Le HACCP est systématique et implique nécessairement trois éléments de base (Jouve, 1993)

- L'identification et l'analyse des dangers : points à maîtriser. (**1<sup>ère</sup> phase**): Consiste à acquérir une connaissance parfaite du produit, des conditions dans lesquelles il est fabriqué ou obtenu, et de la façon dont il est utilisé par le consommateur ;
- La maîtrise des étapes où ces risques sont critiques. (**2<sup>ème</sup> phase**): Elle est la phase clé de la méthode, qui lui donne son nom et sa raison d'être : Elle consiste à analyser les dangers, et à définir les points critiques, ainsi que les limites admissibles pour ceux-ci dans le contexte de l'étude du danger ;
- La surveillance et l'évaluation des mesures préventives mises en place. (**3<sup>ème</sup> phase**): Enfin, elle permet de situer l'utilisation de la méthode HACCP dans l'ensemble des actions d'Assurance Qualité de l'entreprise, en mettant en œuvre une vérification, une documentation et une adaptation permanente du système.

Conformément aux recommandations du Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 1997), le HACCP repose sur sept principes (tableau N°2) qui définissent comment établir, réaliser et assurer le suivi du plan HACCP pour l'opération à étudier. Le découpage formel du HACCP en 7 principes n'est pas une norme et on trouvera dans la littérature des descriptions de la méthode présentant des segmentations différentes.



Tableau N°2 : Les principes du système HACCP (selon le Codex Alimentarius, 1997)

<u>Principe 1</u>	<i>Procéder à l'analyse des dangers</i> : Identifier les dangers éventuels associés à la production alimentaire à tous ses stades, évaluer leur probabilité d'apparition (risque) et identifier les mesures préventives nécessaires à leur maîtrise.
<u>Principe 2</u>	<i>Déterminer des points Critiques pour la maîtrise (CCP)</i> : les points, procédures ou étapes opérationnels qui peuvent être contrôlés pour éliminer les dangers ou minimiser leur probabilité d'apparition.
<u>Principe 3</u>	<i>Etablir les limites critiques pour les mesures préventives associées à chaque CCP</i> : Les limites Critiques doivent impliquer la prise en compte d'un paramètre mesurable et doivent être retenues comme la tolérance absolue pour les CCP.
<u>Principe 4</u>	<i>Etablir les exigences de surveillance des CCP</i> et établir les procédures à partir des résultats de la surveillance pour ajuster le procès et maintenir la maîtrise. L'équipe HACCP doit spécifier l'exigence de surveillance pour la gestion des CCP et ce conformément avec les limites critiques ce qui implique de décrire les actions de surveillance spécifiques accompagnées de la fréquence et de la responsabilité.
<u>Principe 5</u>	<i>Etablir des actions correctives</i> à appliquer quand la surveillance indique une déviation par rapport à la limite critique établie. Des procédures d'actions correctives et les responsabilités pour leur mise en application nécessitent d'être spécifiées. Ceci inclut des actions visant à retrouver la maîtrise du processus et des actions de traitement des produits manufacturés lorsque le processus est hors de contrôle.
<u>Principe 6</u>	<i>Etablir les procédures de vérification</i> du bon fonctionnement du système HACCP. Des procédures de vérification doivent être développées pour la maintenance du système HACCP et pour s'assurer qu'il continue de fonctionner efficacement.
<u>Principe 7</u>	<i>Etablir des procédures d'enregistrement</i> efficaces



#### **I. 4. Mise en œuvre pratique du HACCP**

Selon les directives élaborées par le Comité de l'hygiène alimentaire de la Commission du Codex Alimentarius, la méthode recommandée pour la mise en œuvre d'un programme HACCP passe par le déroulement d'une série de 13 étapes correspondant à un plan de travail (Figure N°1).

##### **Etape 1 : La Constitution de l'équipe HACCP**

Une équipe multidisciplinaire composée de représentants des départements de la production, des installations sanitaires, de la maîtrise de la qualité et de la microbiologie alimentaire. Chaque membre de l'équipe est chargé de segments spécifiques de la chaîne alimentaire devant être couverts par le système HACCP et oeuvrer au développement du système décrit à partir de l'étape 2. La direction doit accorder un appui total à cette équipe.

##### **Etape 2 : La description du produit**

Après avoir défini le champ de l'étude, le travail de l'équipe commence par la description du produit pour lequel le plan HACCP va être élaboré. Cette description doit être complète et couvrir la composition du produit, sa structure, ses conditions de transformation, son conditionnement, ses conditions de stockage et de distribution, sa durée de conservation et son mode d'emploi.

##### **Etape 3 : Détermination de l'utilisation prévue du produit**

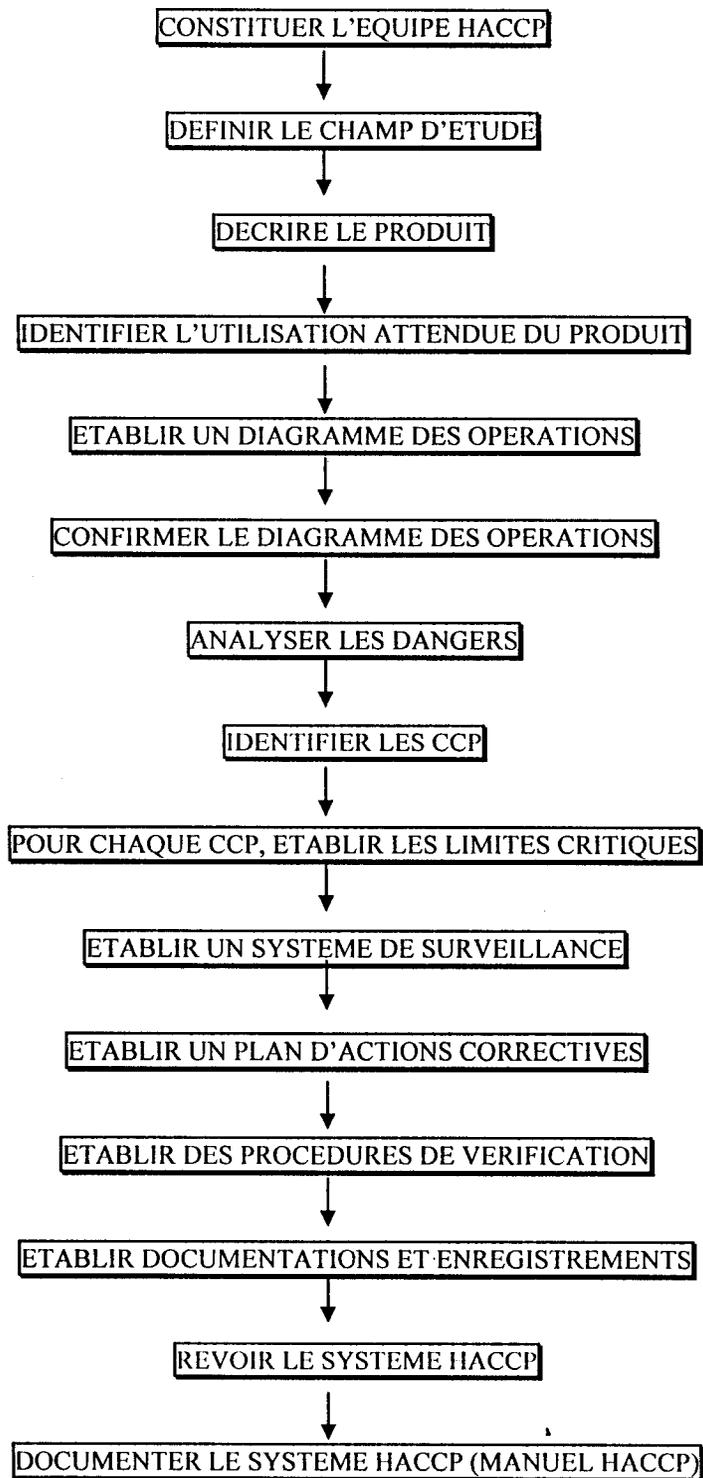
Il faut identifier l'utilisation prévue du produit par l'utilisateur final ou le consommateur. Le lieu de vente du produit et son groupe cible doivent être définis (par ex. restaurants de Collectivités, maisons de retraite, hôpitaux, etc.).

##### **Etape 4 : Établissement d'un diagramme des opérations**

On examine de près le produit/processus et on établit un diagramme des opérations sur lequel s'appuiera l'étude HACCP. Quel que soit le format choisi, on étudiera toutes les étapes du processus – y compris les retards pendant ou entre les étapes, entre la réception de la matière première et le placement du produit fini sur le marché – dans l'ordre. On les présente sous forme de diagramme détaillé assorti de suffisamment de données techniques. Dans le diagramme, on peut également refléter le mouvement des matières premières, des produits, des déchets, les locaux de travail, la disposition de l'équipement, le stockage des produits et leur distribution, et les mouvements ou rotations d'employés (Panicello et Quantic, 1998).



Figure N°1 : Séquence logique d'application du système HACCP  
(Codex Alimentarius, 1997)



### **Etape 5 : Confirmation in situ du diagramme des opérations**

L'équipe HACCP devrait comparer en permanence le déroulement des activités au diagramme des opérations et, le cas échéant, modifier ce dernier.

### **Etape 6 : Conduite d'une analyse de dangers**

Dans l'analyse des dangers, trois étapes sont importantes (Bariller, 1996) : à l'aide du diagramme des opérations, l'équipe doit dresser la liste des dangers – biologiques, chimiques ou physiques – auxquels on peut raisonnablement s'attendre à chacune des étapes du processus et les causes associées. Evaluer le risque et enfin décrire les mesures préventives qu'il convient de prendre pour maîtriser les dangers.

### **Etape 7 : Détermination des points critiques pour la maîtrise**

Pour cela, le codex alimentarius recommande d'utiliser l'arbre de décision avec des réponses de type "oui" ou "non" pour déterminer les CCP (Figure N°2).

### **Etape 8 : Choix des seuils critiques pour chaque CCP**

Des seuils critiques pour chaque CCP doivent être déterminés. Ces seuils sont généralement calculés à partir des spécifications énoncées dans la législation d'un pays relative à l'alimentation ou dans les normes nationales ou internationales (par exemple, les niveaux d'humidité dans le lait en poudre, ou les seuils de pH et de chlore dans l'eau potable). Lorsque les limites ne sont pas tirées des normes réglementaires ou des directives existantes et valables pour les bonnes pratiques en matière de fabrication, l'équipe HACCP devrait se prononcer sur la validité de telles limites par rapport à la maîtrise des risques et aux points critiques pour la maîtrise identifiée.

### **Etape 9 : Mise en place d'un système de surveillance pour chaque CCP**

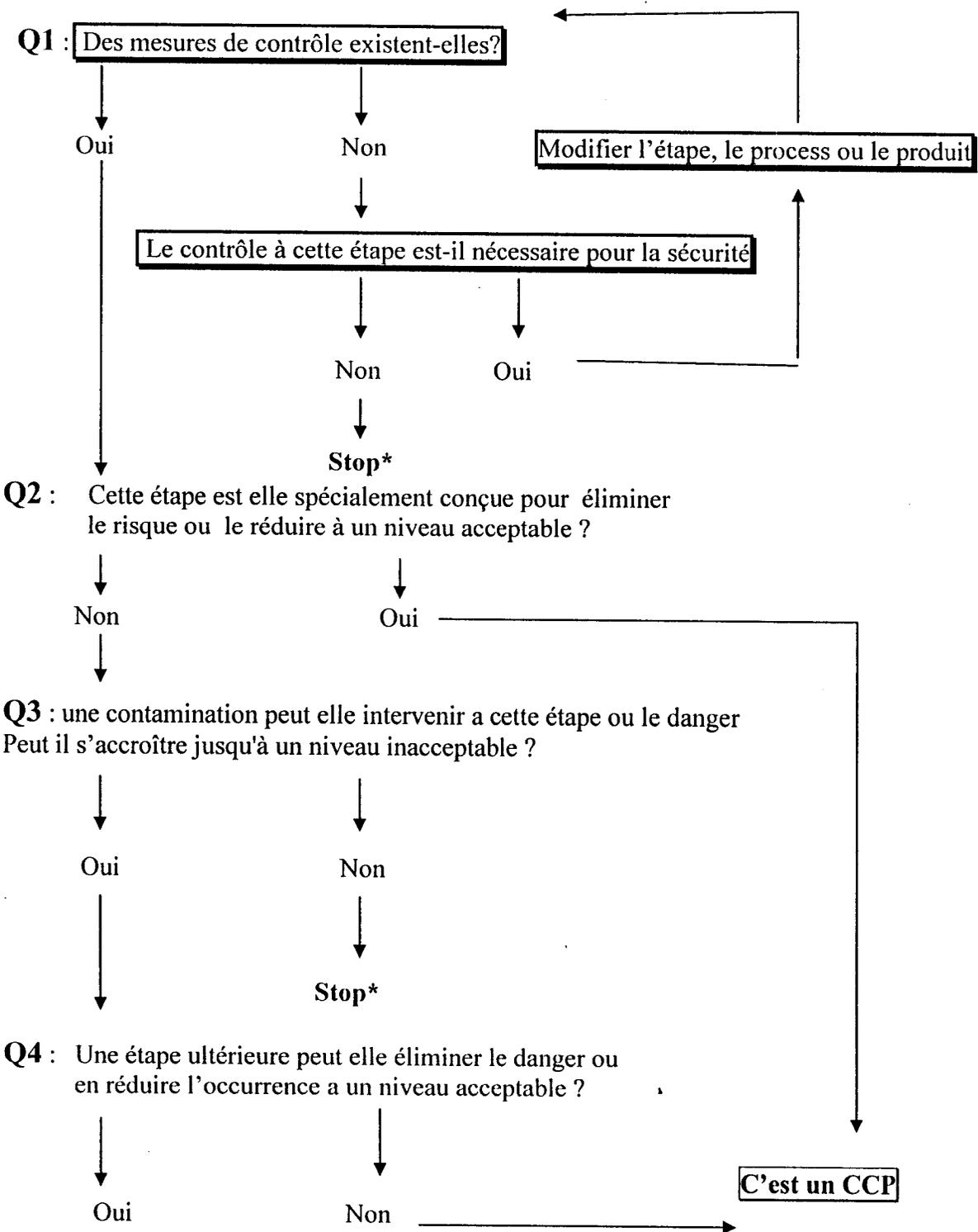
La surveillance est la mesure ou l'observation d'un CCP entreprise pour déterminer la conformité par rapport aux seuils critiques. Les procédures de surveillance doivent permettre de déterminer, s'il y a lieu, la perte de maîtrise au CCP (par exemple une maîtrise insuffisante de la température susceptible d'engendrer des erreurs dans le fonctionnement d'une unité de pasteurisation dans une fabrique de produits laitiers). La surveillance des CCP doit être effectuée rapidement, car il s'agit par la suite d'un processus linéaire.

D'après, Mortimore et Wallace, (1998), le programme d'observation ou de mesure doit indiquer de façon adéquate et pour chaque point critique : qui va se charger de la surveillance et du contrôle ; quand la surveillance et le contrôle vont avoir lieu et comment la surveillance et le contrôle vont être effectués.



Tous les relevés et comptes rendus résultant de la surveillance des CCP doivent être signés par la (ou les) personne(s) chargée(s) des opérations de surveillance.

**Figure N°2 : Exemple d'un arbre de décision permettant de déterminer les CCP**  
(Codex Alimentarius, 1997)



\* L'étape n'est pas un CCP, passer à l'étape suivante ou au danger suivant



### **Etape 10 : Prise des mesures correctives**

L'équipe HACCP doit adopter des mesures correctives et les documenter dans le plan HACCP pour chaque CCP, afin que les écarts puissent être corrigés le cas échéant. Ces mesures correctives devraient inclure :

- L'identification adéquate de la (ou des) personne(s) responsable(s) de la mise en œuvre d'une mesure corrective ;
- Les mesures nécessaires pour corriger l'écart constaté ;
- Les mesures à prendre au sujet des produits manufacturés en dehors de la période de maîtrise du processus
- Des comptes rendus écrits des mesures prises.

Les mesures doivent permettre de vérifier, par exemple, que les CCP sont bel et bien maîtrisés, que l'on a remédié aux procédures ou aux conditions à l'origine de la perte de maîtrise, et que les aliments affectés ont été éliminés en toute sécurité.

### **Etape 11 : Application des procédures de vérification**

Une procédure de vérification doit être conçue pour veiller à ce que le système HACCP fonctionne correctement. La procédure devrait inclure la fréquence de vérification, cette dernière devant être dirigée par un responsable indépendant. La vérification peut inclure notamment des méthodes d'audit, d'échantillonnage et d'analyse aléatoires.

### **Etape 12 : Constitution des dossiers et tenue des registres**

Le système du HACCP doit pouvoir s'appuyer sur un système efficace et précis de dossiers et de registres. Par exemple, l'analyse des dangers et la détermination des CCP et de leurs seuils (y compris les révisions, s'il y a lieu) doivent être documentés, sous forme par exemple de registres de surveillance des CCP ou de registres sur les écarts détectés et les mesures correctives adoptées pour y remédier (Khandke et Mayes, 1998).

### **Etape 13 : Vérification continue du système HACCP**

Une fois que le système HACCP a été introduit, il devient nécessaire de maintenir son efficacité. Il est recommandé de nommer un manager et lui conférer la responsabilité du HACCP (en tant que coordinateur HACCP par exemple).

## **1.5. Le système HACCP et le risque alimentaire**

Le risque alimentaire nécessite d'être perçu à tous les stades de la chaîne alimentaire or le système HACCP peut être utilisé tout au long de la chaîne alimentaire, de la production au consommateur final. L'intégration aux plans HACCP de modèles d'analyse de risque offre



des moyens pour considérer la chaîne alimentaire comme un continuum et relier ainsi les opérations de production des aliments à des objectifs de santé publique (Easter et al, 1994). Outre le renforcement de la salubrité des aliments, les avantages comprennent une meilleure utilisation des ressources et une solution plus opportune aux problèmes qui se posent en santé publique (Buchanan et Whiting, 1998). De plus, l'application du système HACCP peut aider les services réglementaires dans leur tâche d'inspection et favoriser le commerce international en renforçant la confiance à l'égard de la salubrité des aliments.

### **I.6. Le système HACCP et les systèmes d'assurance qualité**

L'application du système HACCP est compatible avec la mise en oeuvre des systèmes de gestion de la qualité, tels que ceux mentionnés dans les normes de la série ISO 9000. Le HACCP est le système approprié pour assurer de la salubrité des aliments à l'intérieur de ces systèmes. Les exigences du système d'assurance qualité, en matière de formation, d'audit interne et de revue de la direction, garantissent l'efficacité des opérations et des mesures du système du HACCP via un audit interne (Yacout et al, 1998).

L'approche du HACCP et le système de gestion de la qualité ISO 9000 sont complémentaires. La famille de normes ISO 9000 est par nature générale; elle a été mise au point pour aider les organismes de tous types et de toutes tailles à mettre en oeuvre et à faire fonctionner un système de gestion de la qualité. De nombreuses entreprises, qu'elles soient petites ou grandes, dans le monde entier, qui transforment et/ou conditionnent des produits alimentaires, ont mis en oeuvre ISO 9000 et obtenu la certification par tierce partie. Ces entreprises peuvent également utiliser le HACCP ou des systèmes similaires dans le cadre de leur système d'assurance de la qualité. Certaines entreprises ont recours à la fois à ISO 9000 et au HACCP dans le cadre d'un système intégré de gestion de la qualité et de la salubrité des aliments. ISO 9000 se concentre sur les besoins et les attentes du client; or l'une des attentes principales du client est la salubrité des aliments.

Les sept principes du HACCP peuvent être intégrés aux exigences d'ISO 9001:2000). Lors de la préparation de la documentation pour ISO 9001 (par exemple le manuel qualité, les procédures relatives au système qualité, les instructions de travail, les plans qualité), le principe 7 du HACCP, demande de constituer un dossier dans lequel figureront toutes les procédures et tous les relevés pour veiller à ce que les critères relatifs aux aspects de salubrité des aliments soient intégrés dès le stade de la documentation.

Au moment de définir les exigences relevant de la responsabilité de la direction (par exemple la politique qualité, les objectifs en matière de qualité, la planification, l'orientation



client, la communication, la responsabilité et la compétence), les exigences du principe 1 (procéder à une analyse des risques), du principe 2 (déterminer les points critiques pour la maîtrise) et du principe 4 (mettre en place un système de surveillance permettant de maîtriser les CCP) sont mis en jeu (ITC, 2002).

Lorsqu'il s'agit de gérer les ressources pour ISO 9000 (par exemple les ressources humaines, l'infrastructure, le cadre de travail, et autres services), il faut mettre à disposition les ressources nécessaires pour prévenir les risques (principe 1 du HACCP) et pour maîtriser les CCP (principe 4). Dans les processus de réalisation des produits (par exemple, la planification, l'identification et l'examen des exigences du client, la conception et le développement, l'achat et le contrôle des opérations), plusieurs principes HACCP peuvent être intégrés. Ces derniers doivent inclure le principe 1 (identification des risques), le principe 2 (détermination des CCP) et le principe 4 (mise en place d'un système de surveillance permettant de maîtriser les CCP).

Pour les activités de mesure, d'analyse et d'amélioration des processus d'ISO 9000, vous on se peut se référer au principe 3 du HACCP (fixer des seuils critiques), au principe 4 (mettre en place un système de surveillance permettant de maîtriser les CCP), au principe 5 (déterminer des mesures correctives) et au principe 6 (appliquer une procédure de vérification du bon fonctionnement).

### **1.7. Le HACCP et le commerce international**

Dans le cadre du commerce international, le HACCP permet d'obtenir des avantages sur le plan interne, comme la réduction du risque de fabriquer et de vendre des produits dangereux, ce qui suscite la confiance du consommateur dans les produits vendus. Ensuite, dans de nombreux pays, les autorités chargées de la réglementation alimentaire ont inclus ou vont inclure, le HACCP dans leur réglementation relative à l'alimentation. En mettant en oeuvre le HACCP, l'entreprise a plus de chances de succès en tant qu'exportateur vers ces pays. Selon ITC, (2002) voici quelques exemples :

Au Royaume-Uni, le *Food Safety Act* de 1990 (la loi sur la salubrité des aliments) et le *Food Hygiene Inspection Codes of Practice* (le code de conduite pour l'inspection de l'hygiène alimentaire) incluent tous deux le HACCP.

Le Canada a développé le *Food Safety Enhancement Programme* - FSEP (Programme de renforcement de la salubrité des aliments) afin d'encourager, la mise en place de procédures fondées sur le HACCP dans tous les établissements agréés du secteur de l'agriculture et de la transformation des aliments.

Le *Australian Quarantine and Inspection Service* (AQIS) a mis au point un nouveau système d'inspection connu sous le nom de *Food Hazard Control System* - FHCS, (Système de maîtrise des risques alimentaires).



Aux États-Unis, le *Center for Food Safety and Applied Nutrition* (Centre pour la salubrité des aliments et la nutrition appliquée) a recommandé que la FDA encourage, puis impose l'application du HACCP à l'ensemble de l'industrie alimentaire. La FDA a révisé son Code de l'alimentation en 1993, afin de le rendre compatible avec les concepts HACCP. Le règlement HACCP de la FDA relatif aux poissons et produits de la pêche produits et commercialisés aux États-Unis est entré en vigueur en décembre 1997.

Au sein de l'Union européenne, la Directive No. 93/43/CEE du Conseil, du 14 juin 1993 relative à l'hygiène des denrées alimentaires, exige de l'industrie alimentaire qu'elle mette au point des systèmes s'inspirant du HACCP pour garantir la salubrité des aliments. Cette Directive suggère en outre que les États membres puissent développer des codes de conduite pour les industries spécifiquement alimentaires et adopter EN 29000 (l'équivalent européen de la série ISO 9000) pour mettre en oeuvre les règles générales d'hygiène et les directives relatives aux bonnes pratiques en matière d'hygiène. La Décision de la Commission européenne du 20 mai 1994 (94/356/CE) préconise la mise au point d'un système d'"autocontrôle" pour la production et la vente des produits de la pêche dans les pays de l'Union européenne.

La certification par tierce partie à titre facultatif, prévue par le HACCP, existe dans plusieurs pays européens ainsi qu'en Australie, en Nouvelle-Zélande, au Brésil et en Inde. Elle commence également à être appliquée dans certains pays d'Amérique latine, au Moyen-Orient et en Asie du Sud.



## II. La microbiologie prévisionnelle

### II. 1. Introduction :

La microbiologie prévisionnelle fait appel à la fois à des connaissances sur la physiologie des cellules microbiennes dans l'environnement auquel elles sont soumises et à une approche de simulation numérique qui sous entend la prise en compte de critères et une pratique en accord avec les contraintes liées à cette technique. Les effets des facteurs environnementaux spécifiques au produit, sont déterminés habituellement à partir d'une croissance expérimentale. De ce fait il sera plus juste de parler, d'utilisation à visée prévisionnelle d'une microbiologie quantitative par simulation numérique. (Breand et al, 1998)

Le comportement des populations microbiennes dans les aliments (croissance, survie, mort, etc.) dépend des propriétés de l'aliment (composition,  $A_w$ , pH, etc.) ainsi que des conditions environnementales (transport, manipulations traitements, stockage, etc.). L'effet de ces facteurs peut être prédit par des modèles mathématiques. Le propre propos d'un modèle est de représenter de forme simplifiée mais précise un ensemble de données observées décrivant un phénomène et exprimées en langage mathématique (Brown et Rothery, 1993 ; Witzgies, 1996). Dans le cas de la modélisation de la croissance microbienne par exemple, le modèle s'emploie pour décrire le comportement des microorganismes dans des conditions environnementales différentes. Il est préférable de considérer qu'un modèle décrit le processus connu ou non générateur des données restant pour autant l'expression mathématique d'une hypothèse.

En microbiologie prévisionnelle, on part de l'hypothèse que le comportement d'un microorganisme dans des conditions environnantes données est reproductible. Dans ces conditions, il est donc possible de prédire le comportement d'un microorganisme dans le futur sur la base des données observées dans le passé (Ross et McMeekin, 1994)

### II. 2. Concept et Historique :

Un domaine de la microbiologie alimentaire est apparu dans les deux dernières décennies pour être connu sous le nom de microbiologie prévisionnelle (Predictive Microbiology). Depuis cette date, des centaines d'articles ont été publiés mentionnant le mot clef « microbiologie prévisionnelle » et différents projets de recherche développent une approche quantitative de la microbiologie alimentaire (Baranyi, 2002) et le nombre ne cesse d'augmenter.



Le concept de microbiologie prévisionnelle, comme étude de la croissance microbienne dans les aliments, a déjà été suggéré dans les années trente à travers l'expression microbiologie alimentaire prévisionnelle (Predictive Food Microbiology), cependant ses applications pratiques ne se sont matérialisées que dans les années quatre-vingt quand on se rendit compte que le contrôle microbiologique classique à posteriori était cher et d'application peu efficace.

Dans le premier ouvrage entièrement consacré au sujet édité en 1993 (McMeekin et al, 1993), la microbiologie prévisionnelle a été définie comme une science quantitative qui permet à des utilisateurs d'évaluer objectivement l'effet des traitements, des processus et des opérations de stockage et de distribution sur la qualité et la sécurité microbiologique des aliments. Plus tard ces mêmes auteurs ont revu cette définition en utilisant l'expression Ecologie microbienne quantitative des aliments (Quantitative Microbial Ecology of food). Il s'agit là d'une description plus générique. Le livre le plus récent traitant du sujet (McKellar et Lu, 2003) met plus l'accent sur la nécessité de décrire la réponse des microorganismes à l'environnement alimentaire par des modèles mathématiques. L'évolution de la microbiologie prévisionnelle en tant que science de plus en plus exacte est bien illustrée par cette insistance sur les modèles mathématiques dans sa définition (McMeekin, 2003). D'après Ross et al, (1995), cette expression est quelque peu inadéquate, l'écologie microbienne quantitative des aliments sied mieux à la description du sujet mais à ce jour le concept de microbiologie prévisionnelle est largement utilisé (McMeekin et Ross, 2002 ; Malakar et al, 2003).

Le concept microbiologie prévisionnelle est la somme des connaissances relative à la réponse des microorganismes aux conditions environnementales permettant une évaluation objective de l'effet des opérations de traitement, de distribution et de stockage sur la qualité et la sécurité microbienne des aliments. Les modèles prévisionnels décrivent généralement la croissance, la survie ou la destruction de microorganismes pathogènes ce qui implique des connaissances sur le comportement des microorganismes (McMeekin et al, 2002) et sur les propriétés physiques, chimiques et microbiologiques de l'aliment (Elliot, 1996).

### **II.3. Les différents types de modèles utilisés en microbiologie prévisionnelle**

On distingue deux types de modèles : les modèles empiriques et les modèles mécanistiques.

Les modèles empiriques décrivent simplement des données observées employant l'expression mathématique qui s'y ajuste le mieux (Pin, 2002). La plupart des modèles publiés appartiennent à cette catégorie.

Les modèles mécanistiques partent de bases théoriques relatives au processus générant les dites données. Certains auteurs pensent que ces derniers modèles sont plus satisfaisants intellectuellement (Cole et al, 1991, Baranyi et Roberts 1995 ; Rosso *et al.* 1995).

Les modèles sont nombreux, mais la tendance est de privilégier les modèles dont les paramètres ont une signification biologique simple, compréhensible par le biologiste. En effet, pour décrire les phases de croissance des populations microbiennes (latence, croissance et saturation), les microbiologistes utilisent classiquement des paramètres comme le taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ), le temps de latence (*lag*), l'inoculum ( $x_0$ ) et la densité maximale de population ( $x_{max}$ ).

#### II. 4. La démarche de modélisation

Le processus de modélisation comprend les étapes suivantes (Pin, 1998):

1. Définition des facteurs pris en compte et de la gamme d'étude
2. Planification de l'expérimentation
3. Collecte de données expérimentales
4. Modélisation proprement dite : ajustement d'équations mathématiques aux données expérimentales.

#### II. 5. Classes de modèles

Il existe trois classes de modèles :

##### 1- Les modèles primaires :

Les modèles primaires relient la concentration microbienne  $C$  au temps  $t$  :  $C = f(t ; \theta)$  où  $\theta$  représente les paramètres du modèle  
Le modèle le plus simple reste le modèle exponentiel qui suppose que le taux de croissance est constant.

$$(N = N_0 e^{\mu t})$$

Des modèles plus complexes permettent de décrire de façon continue les phases de croissance. De nombreux auteurs utilisent pour cela l'équation de Gompertz (1825). Les principaux modèles utilisés sont ceux de Gompertz, Baranyi et Monod.

##### 2- Les modèles secondaires :

Ce sont des équations qui relient les paramètres caractéristiques de la croissance (phase de latence et vitesse de croissance exponentielle) aux facteurs étudiés (températures,

pH, Aw, etc.). Les modèles les plus développés sont les modèles polynomiaux (modèle de Buchanan), les modèles en racine carrée (modèle de Zwietering) et les modèles dérivés de l'équation d'Arrhenius (modèle de Davey).

3- **Les modèles tertiaires** : ce sont des logiciels dans lesquels sont incorporés un certain nombre de modèles secondaires. Les deux modèles tertiaires les plus développés sont le " Food Micromodel " et le " Pathogen Modelling Program ".

Dans les tableau N°3 et N°4, sont cités quelques modèles primaires, secondaires et tertiaires décrivant la croissance des microorganismes et leurs fonctions.

**Tableau N°3** : Quelques modèles primaires, secondaires et tertiaires (d'après McDonald., 1999)

Modèles primaires	Modèles secondaires	Modèles tertiaires
-Fonction de Gompertz <sup>1</sup>	-Modèle de Belehradek (modèle de racine carrée) <sup>10</sup>	-Pathogen modelling program(PMP) <sup>18</sup> .
-Gompertz modifié <sup>2</sup>	-Modèle de Ratkowsky (modèle de racine carrée) <sup>11</sup>	-Food MicroModel <sup>19</sup> .
-Modèle logistique <sup>3</sup>	-Modèle d'Arrhenius <sup>12</sup>	-Predictor growth <sup>20</sup> .
-Modèle de Baranyi <sup>4</sup>	-Modèle d'Arrhenius modifié (Davey et Schoolfield) <sup>13</sup> .	Sym'previus <sup>21</sup>
-Modèle de premier ordre de Monod <sup>5</sup>	-Modèles de probabilités <sup>14</sup>	
-Modèle de Whiting et Cygnarowics <sup>7</sup>	-Valeur de Z <sup>15</sup> .	
-Modèle d'inactivation thermique (valeur de D) <sup>8</sup>	-Modèle polynomial où la réponse de surface <sup>16</sup> .	
-Modèle linéaire à 3 phases <sup>9</sup>	-Modèle de Williams-Landel Ferry <sup>17</sup> .	

1,Jeffries et Brian (1984),Gibson et al (1987); 2, Zwietering et al (1990); 3, Jason (1983), Einarsson et Ericksson(1986);4,Baranyi et al (1993a);5,Monod(1949);6,Houtsma et al (1996); 7,Brennan et al (1990); 8,Whiting et Cygnarowicz Povost (1992); 9,Buchanan et al (1997) , Garthright (1997) ; 10 , Belehradek (1930) ; 11, Ratkowsky et al (1982) ; 12,Arrhenius (1889), Labuza et Riboh (1982) ; 13,Davey (1989a,1993a), Schoolfield et al (1981) ; 14,Hauschild (1982) ; 15,Brennan et al (1990) ; 16,Draper (1988), Gibson et al (1988) ; 17,Williams et al (1955), Schaffner (1995) ; 18,Buchanan (1991) ; 19, McClure et al (1994b) ; 20, Neumeyer (1994), Neumeyer et al (1997a) et 21, Carlin et al, 2000.

Tableau N°4 : Principaux modèles décrivant la croissance des microorganismes et leurs fonctions.

Modèles	Fonctions
Buchanan (1919)	$b = B \exp(\mu kt)$
Monod (1949)	$N = N_0 2^{\frac{t}{G}}$
Gompertz modifié	$\ln \frac{N}{N_0} = \ln \frac{N_{\max}}{N_0} \left\{ \exp \left( \frac{\mu_{\max}}{\ln \frac{N_{\max}}{N_0}} e^{(\text{lag}-t)+1} \right) \right\}$
Logistique modifié	$\ln \frac{N(t)}{N_0} = \frac{\ln \frac{N_{\max}}{N_0}}{1 + \exp \left\{ \frac{4 \mu_{\max}}{\ln \frac{N_{\max}}{N_0}} (\text{lag} - t + 2) \right\}}$
Baranyi et de Rosso (1993):	$N(t) = \frac{N_{\max}}{1 + \left( \frac{N_{\max}}{N_0} - 1 \right) \left( \exp(-\mu_{\max} t + A(t)) \right)}$
	$A(t) = \frac{\mu_{\max}}{\rho_a} \left\{ 1 + \left( \exp(-\rho_a \text{lag}) \right) \ln \left\{ \frac{1 + \left( \exp(-\rho_a (t - \text{lag})) \right)}{1 + \left( \exp(\rho_a \text{lag}) \right)} \right\} \right\}$
Baranyi et Roberts (1994)	$y = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \ln \left\{ 1 + \frac{\left( \exp(\mu_{\max} A(t)) - 1 \right)}{\left( \exp(y_{\max} - y_0) \right)} \right\}$
	Où $A(t) = t + \frac{1}{y_{\max}} \ln \left\{ \left( \exp(\mu_{\max}) \right) \left( 1 - \exp(-h) \right) + \left( \exp(-h) \right) \right\}$
Buchanan et al (1996)	$\log N = \begin{cases} \log N_0 + K_0 t & \text{si } t < \text{lag} \\ (\log N_0 + K_0 \text{lag}) + K(t - \text{lag}) & \text{si } \text{lag} \leq t < \text{dc} \\ (\log N_0 + K_0 \text{lag}) + K(\text{dc} - \text{lag}) & \text{si } t \geq \text{dc} \end{cases}$

Tableau N°4 (suite) : Principaux modèles décrivant la croissance des microorganismes et leurs fonctions.

Arrhenius		$K = K_0 \left( \exp \left( \frac{E_a}{RT} \right) \right)$
Schoolfield		$K(t) = \frac{K_{25} \frac{T}{298} \left\{ \exp \left( \frac{\Delta H_A}{R} \left( \frac{1}{298} - \frac{1}{T} \right) \right) \right\}}{1 + \left\{ \exp \left[ \frac{\Delta H_L}{R} \left( \frac{1}{T_{1/2}^L} - \frac{1}{T} \right) \right] \right\} + \left\{ \exp \left( \frac{\Delta H_H}{R} \left( \frac{1}{T_{1/2}^H} - \frac{1}{T} \right) \right) \right\}}$
Ratkowsky		$\sqrt{K} = b(T - T_{min})$
Zwietering		$\sqrt{K} = b(T - T_{min}) \{ 1 - [\exp(c(T - T_{max}))] \}$
Ratkowsky modifié pour $\mu_{max}$		$\mu_{max} = [b_3(T - T_{min})]^2 \{ 1 - [\exp(c_3(T - T_{max}))] \}$
Ratkowsky modifié pour lag		$\ln(lag) = \ln \{ [b_2(T - T_{min}) (1 - \exp(c_2(T - T_{max}))) ]^2 \}$
Zwietering et al	Où	$\mu_{max} = \mu_{opt} \gamma(pH) \gamma(T)$ $\gamma(pH) = \left\{ \frac{(pH - pH_{min}) [1 - \exp(c_2(pH - pH_{max}))]}{(pH_{opt} - pH_{min}) [1 - \exp(c_2(pH_{opt} - pH_{max}))]} \right\}^2$
	ET	$\gamma(T) = \left\{ \frac{(T - T_{min}) [1 - \exp(c_3(T - T_{max}))]}{(T_{opt} - T_{min}) [1 - \exp(c_3(T_{opt} - T_{max}))]} \right\}^2$
Température et pH cardinaux (CTPM) de Rosso et al 1994	Où	$\mu_{max}(T, pH) = CTPM(T, pH) = \mu_{opt} \tau(T) \rho(pH)$ $\tau(T) = \frac{(T - T_{max}) (T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min}) [(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)]}$
	Et	$\rho(pH) = \frac{(pH - pH_{min})(pH - pH_{max})}{(pH - pH_{min})(pH - pH_{max}) - (pH - pH_{opt})^2}$
McMeekin et al (1992)		$\sqrt{K} = b(T - T_{min}) \sqrt{(Aw - Aw_{min})} \sqrt{(pH - pH_{min})}$
polynomial		$\ln(g) = p_1 + p_2 X_1 + p_3 X_2 + p_4 X_3 + p_5 X_4 + p_6 X_1 X_2 + p_7 X_1 X_3 + p_8 X_1 X_4 + p_9 X_2 X_3 + p_{10} X_2 X_4 + p_{11} X_3 X_4 + p_{12} X_1^2 + p_{13} X_2^2 + p_{14} X_3^2 + p_{15} X_4^2 + \epsilon$

## II. 6. La modélisation des courbes de survie

L'inactivation des microorganismes, quelque soit le moyen utilisé, est caractérisée par des courbes de survie, qui se présentent généralement sous quatre formes; (voir figure 3), courbe linéaire « A », courbe avec épaulement (avec phase de latence) « B », courbe avec traînée (courbes biphasiques) « C et D », courbes sigmoïdales « E et F » (Xiong et al, 1999).

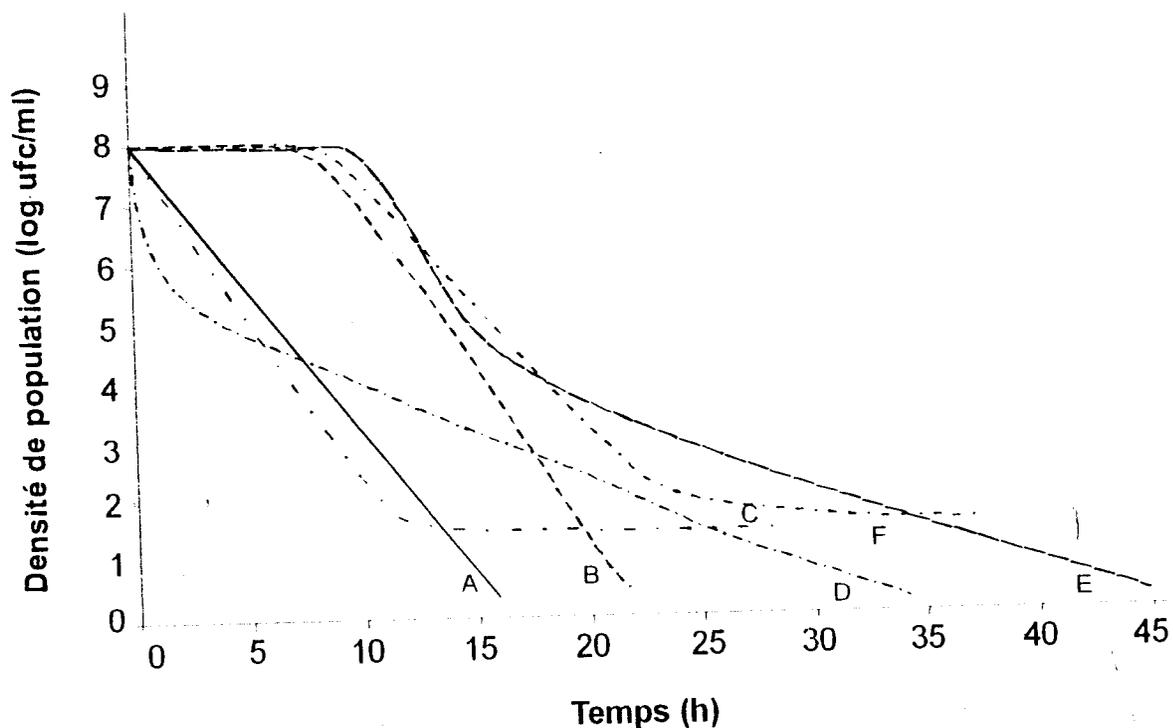


Figure N° 3 : Représentation graphique des six types de courbes de survie (d'après, Xiong et al, 1999)

Pour modéliser ces courbes de survie linéaires ou non linéaires, plusieurs approches ont été proposées (Peleg, 2000 ; Peleg et cole, 1998). La forme standard et classique de la décroissance d'une population microbienne en milieu non renouvelé a été établie par des phases qui sont représentées dans la figure N°2 (Delignette-Muller, 1995 ; Charles-Bajard, 1996 ; Bréand, 1998).

1) Phase de latence à la mortalité; c'est une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance à proprement parler.

2) Phase d'accélération de la décroissance: appelée également phase de décroissance maximale. La pente de cette droite, lorsque la concentration bactérienne est exprimée en coordonnées semi-logarithmiques, correspond au taux de décroissance  $\frac{dy}{dt}$  qui représente la vitesse maximale  $K_{\max}$  (1/ mn).

$$K_{\max} = \frac{y_1 - y_2}{t_2 - t_1}$$

3) Phase de décroissance quasi exponentielle.

4) Phase de freinage: appelée aussi phase de ralentissement de la décroissance. Elle se caractérise par une diminution du taux de décroissance.

5) Phase stationnaire: où l'effectif bactérien est constant. Elle est considérée comme de latence à la décroissance.

6) Phase d'accélération de la croissance.

7) Phase de croissance exponentielle.

Les principaux modèles mathématiques qui décrivent les différents types de courbes de survie sont donnés par le tableau N°5.

Tableau N°5 : Principaux modèles décrivant les courbes de survie (D'après Xiong et al, 1999)

Modèle	Formule mathématique	Courbes ajustées par le modèle	Références
Cinétique de premier ordre	$N(t) = N_0 e^{-kt}$ où $\text{Log} \frac{N(t)}{N_0} = \frac{-t}{D}$	A	(Chick, 1908)
Cerf	$\frac{N(t)}{N_0} = fe^{-k_1 t} + (1-f)e^{-k_2 t}$	A, C, D	(Cerf, 1977)
	Pour les courbes de survie linéaire: $\frac{N(t)}{N_0} = \frac{2}{1+e^{bt}}$	A	
	Pour les courbes de survie avec épaulement (phase de latence) $\log \frac{N(t)}{N_0} = \log(1+e^{b_1 t}) - \log(1+e^{\frac{b_2 t}{2}})$	B	(Kamau et al, 1990)
	Pour les courbes de survie biphasiques $\log \frac{N(t)}{N_0} = \log\left(\frac{2f}{1+e^{b_1 t}} + \frac{2(1-f)}{1+e^{b_2 t}}\right)$	A, C, D	
Whiting-Buchanan	$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log\left(\frac{f(1+e^{-b_1 t \log})}{1+e^{-b_1(t-t \log)}} + \frac{(1-f)(1+e^{-b_2 t \log})}{1+e^{-b_2(t-t \log)}}\right)$	A, B, C, D, E, F	(Whiting and Buchanan, 1992)
Gompertz	Equation modifiée de Gompertz $\text{Log}(t) = A - Ce^{-B(t/M)}$	A, C, E	Bhaduri et al (1991) Linton et al (1995) Linton et al (1996)
Cole	$\text{Log} N(t) = \alpha + \frac{\varpi - \alpha}{1 + e^{4\alpha(\tau - \log t)/(\varpi - \alpha)}}$	B, C, E	Cole et al (1993)
Buchanan	$\text{Log} N(t) = \begin{cases} \text{Log} N_0 & (t \leq t \log) \\ \text{Log} N_0 \frac{t-t \log}{t} & (t > t \log) \end{cases}$	A, B	Buchanan et al (1993)
Membre	$\text{Log} N(t) = (1 + \text{Lag} N_0) e^{-\lambda t}$	B	Membre et al (1997)

## II. 7. Application de la modélisation en microbiologie alimentaire

Dans les années 80, Muis et Phillips, établirent des tables de probabilités basées sur le taux de croissance des bactéries psychrotrophes dans le lait pour prédire le temps où la microflore atteint le nombre de  $10^6$  ufc/ml dans le lait cru et ce pour différentes charges initiales en microorganismes (Muis et Phillips, 1984 ; Phillips et Griffiths, 1990). La distribution du temps de génération apparent fut calculée pour la flore autochtone du lait cru obtenu à partir des tanks de garde des fermes à différentes températures en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Temps de génération apparent} = \frac{0,301 \times \text{temps de stockage}}{\log \text{Nombre}_{\text{final}} - \log N_{\text{initial}}}$$

Cette approche est un outil de management fort bien utile aux personnels des laiteries : Elle permet également d'améliorer les conditions de stockage avant sa transformation dans les laiteries (Griffiths, 1994). Il s'agit là d'un des nombreux exemples d'application de la microbiologie prévisionnelle en industrie alimentaire.

Par ailleurs, la modélisation de la croissance microbienne constitue une étape clé de l'analyse des risques en microbiologie alimentaire. On peut estimer si le développement d'un microorganisme donné est possible dans un aliment connaissant les conditions environnementales lors de la fabrication de cet aliment (Notermans et al, 1995). La modélisation apporte ainsi son aide dans l'estimation des risques associés aux germes pathogènes (Buchanan et Whitting, 1996)

## II.8. Microbiologie prévisionnelle et HACCP

La modélisation est également très utile lors de la mise en place d'un plan HACCP. Elle permet d'identifier les CCP et de fixer les limites critiques à ne pas dépasser pour certains facteurs tels que la température et le pH (Baker, 1995)  
Evaluer la densité bactérienne dans l'aliment au moment de sa consommation (Zwietering et al, 1996)

La modélisation permet de disposer de réponses en un délai relativement court et à moindre coût. Le temps nécessaire pour le développement de nouveaux produits est ainsi considérablement réduit. Les challenge tests peuvent alors être évités. En fait la microbiologie

prévisionnelle est, en partie le produit des efforts de chercheurs travaillant dans le domaine des challenge tests.

La microbiologie prévisionnelle permet de :

- Déterminer la durée limite de consommation d'un aliment (Gauchy, 1993 ; McMeekinet al, 1993)
- Evaluer les conséquences d'un écart aux conditions du processus de fabrication (Ross et Mc Meekin, 1994)
- Tester l'influence de nouveaux procédés de fabrication sur le développement ou l'élimination des microorganismes. (McMeekinet al, 1993)
- Optimiser les chaînes de fabrication et de distribution (McMeekinet Rosss, 1996)

La microbiologie prévisionnelle peut également être appliquée à la production de toxines, la détermination des dates limites de consommation, la croissance des germes pathogènes et à la destruction des microorganismes. Le tableau N°6 permet de voir la relation entre le système HACCP et la microbiologie prévisionnelle.

**Tableau N°6 : HACCP et microbiologie prévisionnelle (D'après McMeekin et al, 1993)**

<b>HACCP</b>	<b>Microbiologie prévisionnelle</b>
Identification des dangers potentiels et estimation de leur sévérité aux différentes étapes du process	Identification des microorganismes concernés
Identification des points critiques de maîtrise (CCP) dont les mesures de contrôle doivent être implémentés.	Développement et compréhension de l'écologie du microorganisme pour une meilleure identification des sources et des probabilités de contamination
Détermination des critères de maîtrise et des méthodes	Comparaison des informations avec les spécifications de maîtrise prédéterminées
Etablissement des procédures de monitoring des mesures de corrections	Incorporation d'informations disponibles au système de monitoring indiquant la prolifération microbienne

### III. Bacillus cereus

#### III. 1. Principales caractéristiques de *Bacillus cereus*

Le genre *Bacillus*, dont fait partie *Bacillus cereus*, appartient à la vaste famille des Bacillaceae, comprenant plus de 60 espèces (Priest, 1983). Il se distingue des autres représentants de la famille par sa morphologie et son type respiratoire (Claus et Berkeley, 1986). Le Bergy's Manuel (Claus et Berkeley, 1986) décrit le genre *Bacillus* en tant que Gram positif aérobie ou anaérobie facultatif, sporogène. Ce genre apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique que phénotypique.

Traditionnellement, les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en trois groupes selon la morphologie de la spore et du sporange (Drobiniewski, 1993) :

Le groupe 1 : est constitué des bacilles à Gram positifs, présentant une spore centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde, ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé en deux sous-groupes :

Le sous-groupe 1A auquel appartient *Bacillus cereus* est constitué des bacilles d'un diamètre  $>1\mu\text{m}$  et contenant des inclusions de poly-bêta -hydroxybutyrate. Ce sous groupe comporte six espèces qui sont *Bacillus cereus*, également connu comme *Bacillus medusa* et *Bacillus endorhytoms* bien que *Bacillus cereus* reste la dénomination admise (Buda, 2002), *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoïdes* (Turnbull et al, 1990), *B. pseudomycoïdes* (Nakamura, 1998) et *B. weihenstephanensis* (Lechner et al, 1998).

La différenciation entre *Bacillus cereus* et les espèces proches est difficile à cause des similitudes dans les propriétés phénotypiques et génotypiques (Ash et al, 1991 ; Drobiniewski, 1993 ; Carlson et al, 1996 ; Kotiranta, 2000). Il a été rapporté la similitude de plus de 99% de séquences de structure primaire de l'ARN 16S parmi *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoïdes*, *B. thuringiensis* (Carlson et al, 1996 ; Kotiranta 2000, Hansen et al, 2002). Cette proximité est montrée dans le tableau N°7.

Il existe cependant certaines caractéristiques distinctes d'espèces : l'absence des cristaux d'entérotoxine  $\delta$  (pour *B. thuringiensis*), la mobilité et l'activité hémolytique (pour *B. mycoïdes*) et la croissance au-dessous de 7°C (pour *B. weihenstephanensis*). *B. pseudomycoïdes* est un groupe qu'on peut distinguer de *Bacillus cereus* et *B. mycoïdes* par sa composition en acides gras (Nahumara, 1998 ; Hansen, 2002).

**Tableau N°8 :** Les principaux caractères bactériologiques permettant de différencier les espèces du genre *Bacillus cereus*. (Hsieh et al, 1999, Hansen, 2002).

	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. thuringiensis</i>
Aspect des colonies sur gélose au sang non incubée en présence de CO <sub>2</sub>	Colonies en tête de méduse	Colonies blanches	Colonies rhizoïdes	Colonies blanches ou grisâtres
Hémolyse sur gélose au sang de mouton en 24 heures	-	+	Faiblement positive	+
Mobilité	-	+	-	+
Présence d'un corps parasporal	-	-	-	+
Sensibilité à la pénicilline	++*	-	-	-
Lyse par le phage gamma	+	-	-	-

\*Environ 3% des souches de *Bacillus anthracis* résistent à la pénicilline

Plusieurs souches de *B. thuringiensis*, *B. mycoides* et *B. weihenstephanensis* possèdent des gènes et produisent des entérotoxines semblables à celles de *Bacillus cereus* (Hsieh et al, 1999, Hansen, 2002).

Malgré ces grandes similitudes, les quatre espèces sont toujours considérées comme des espèces distinctes (Claus et Berkeley, 1986 ; Ash et al ,1991 ; Priest, 1993, Nokamura et Jackson, 1995 ; Te Giffel ,1998).

L'observation microscopique d'une culture de *Bacillus cereus* met en évidence des bacilles rectilignes (ou presque rectilignes), à extrémités carrées ou arrondies, de grande taille de 3 à 5 µm de largeur, 1 à 2 µm de diamètre (Claus et Berkeley, 1986, Nguyen-The, 1998 ; Christiansson, 1998).

Elles produisent un pigment de couleur rouge à rose (Afnor, 1995). Elles sont caractérisées aussi par la production de lécithinase ou la réaction de lecithovitelline bien que quelques souches ne la produisent pas (Fermanian, 1993).

*Bacillus cereus* est un germe ubiquitaire de l'environnement dont l'habitat principal est le sol où il jouerait un rôle dans le cycle du carbone et d'azote (Joffin et Dominique Etienne, 2002) ; il se trouve aussi dans la poussière, sur la matière végétale, dans l'air, dans l'eau de mer et l'eau douce et dans la rizosphère (Labots et al, 1965 ; Noris et al, 1981 ; Te Giffel et al, 1995 ; Christiansson et al, 1999 ; Deulpech, 2000). On en trouve également dans les aliments et même dans les produits stérilisés alimentaires ou médicamenteux (Ternstöm et al, 1993 ; Griffiths et Phillips, 1990)

*Bacillus cereus* peut être un hôte éphémère de l'intestin, reflétant ainsi le régime de la personne (Gilbert et Parry, 1977). Turnbull et Kramer, (1985) ont trouvé que 20 à 43 % d'échantillons de selles d'enfants et d'adultes sains contiennent *Bacillus cereus*.

Les conditions limites pour la croissance de *Bacillus cereus* figurent dans le tableau N°8

**Tableau N°8:** Les conditions limites pour la croissance de *Bacillus cereus*

Paramètres	Les valeurs	Références
pH min	4,3	Vaisan, et al, 1990 ; Meer et al, 1991 ; Dufresne et al, 1995 ; Buda, 2001
pH max	9,3	Dickson, 2001 ; Pradhaan et al, 1985
% NaCl max	18	Goepfert et al, 1972 ; Reed, 1994 ;
Températures cardinales	4°C, 32 – 40°C, 50°C	Johnson, 1984 ; FDA, 1998
Aw	0,912	

Les facteurs ayant un effet inhibiteur prouvé sur la croissance de *Bacillus cereus* sont la nisine, l'acide sorbique, le sorbate de sodium, et le corvacrole (Ultee et al, 1997 ; Irene, 2001).

### III. 2. *Bacillus cereus* : sporulation et germination

Le fait que *Bacillus cereus* soit une bactérie sporulée peut expliquer sa large dissémination. Lorsque les conditions deviennent défavorables, *Bacillus cereus*, produit une endospore ovale possédant une fine paroi. Elle n'est pas déformante, apparaît en position centrale ou paracentrale et ne gonfle pas le sporangium (Te Giffel et al, 1997).

Andersson et al, (1995), rapportent que les spores de *Bacillus cereus* sont très adhésives à différentes surfaces. Cette adhésion des spores est essentiellement due à trois caractères : l'hydrophobicité, la faible charge de la surface et la morphologie de la spore. Les spores de *Bacillus cereus* Selon Mayr et al. (1999), la spore possède des propriétés comme la thermorésistance, la résistance aux agents physiques tels que les rayons UV, X, et les ultrapressions et aux agents chimiques (agents antiseptiques, désinfectants). Ces propriétés expliquent leur présence dans les processus de production alimentaire et la difficulté de leur contrôle (Dufresne et al, 1995, Andersson et al, 1995).

Selon Mayer et al. (1995), la germination des spores est un stade de grande importance. En effet, lorsque la spore est placée dans les conditions favorables de croissance, elle subit une série de transformations progressives pour devenir une nouvelle cellule végétative. Bergère (1995) et Meyr et al (1999) rapportent que le processus de germination comprend trois stades :

- 1 - L'activation : La spore, pour germer, doit être activée par un agent capable de léser la tunique sporale afin de lever la dormance.
- 2 - L'initiation : La germination ne débutera ensuite qu'en présence de conditions favorables d'hydratation et de métabolites effecteurs comme l'alanine, l'adénosine ou les ions inorganiques comme le  $Mg^{2+}$  qui pénètrent à travers la tunique endommagée et déclenchent un processus autolytique (Bergère, 1993).
- 3 - Excroissance : L'altération du cortex et des téguments externes fait émerger une nouvelle cellule végétative comprenant le protoplasme sporal entouré de sa paroi.

le taux de germination dépend des souches, du traitement thermique, de la nature du milieu ( température, pH,  $A_w$ , forces ioniques, inhibiteurs) et des conditions dans lesquelles

les spores sont obtenues, stockées et activées (Andersson et Rönner, 1998 , Bergère, 1993 ; Te Giffel, 1995).

La germination peut être induite par certains acides aminés (L- alanine), ribosides, et les sucres mais elle est souvent atteinte plus rapidement et complètement dans les milieux complexes (Te Giffel et al ; 1995).

La cellule issue de la germination devra mettre en place des procédés de réparation réalisés par des protéines particulières. Les processus de réparation et d'adaptation peuvent se traduire par un délai, ou phase de latence plus ou moins long avant le début de la multiplication cellulaire qu'il est important de connaître.

### **III. 3. La pathogénicité de *Bacillus cereus***

L'association possible de *Bacillus cereus* à des cas d'intoxications alimentaires est connue depuis fort-longtemps. Cependant, ce n'est que depuis les années cinquante que la bactérie fut reconnue comme un agent d'intoxication alimentaire à la suite d' enquêtes effectuées sur des foyers de plusieurs centaines de cas (Kramer et Gilbert, 1989 ; Shinagawa, 1993 ; Dufrenne et al, 1994 ; Gasaluk et al, 1996 ; Granum,1997 ; Pan et al, 1997 ).

*Bacillus cereus* est en fait l'agent de deux syndromes d'intoxications alimentaires : un syndrome dit diarrhéique et un syndrome dit émétique. Il peut être également impliqué dans des infections non alimentaires dues à des facteurs de virulence tels que l'hémolysine I et II, la phospholipase C (Turnbull, 1986 ; Kramer et Gilbert ,1989 ; Aluni, 2002).

#### **III. 3. 1. Les Infections gastro-intestinales :**

##### **III. 3. 1. 1. Le syndrome diarrhéique et l'entérotoxine**

Le syndrome diarrhéique est dû à une entérotoxine qui peut être soit performée dans l'aliment, soit produite dans l'intestin grêle mais il résulterait surtout de l'ingestion de cellule de *Bacillus cereus*, à une dose infectieuse de  $5.10^4$  à  $10^{11}$  spores ou cellule végétative et la production de toxine dans le tube digestif (Granum et Lund ,1997). Une diarrhée aqueuse abondante, accompagnée de douleurs et des crampes abdominales qui apparaissent de 8 à 16 h (10h en moyenne) après l'ingestion de l'aliment contaminé, et plus rarement des vomissements et de fièvres (Gältz et Dickson, 2002). Les symptômes disparaissent environ 12 heures après, sans accompagnement thérapeutiques (Dufrenne et al ,1994).

L'entérotoxine de *Bacillus cereus* est une protéine instable et son activité est réduite après 1 à 2 jours à 32°C et après une semaine à 4°C. Elle est complètement inactivée par le

chauffage à 56°C pendant 5 min. Elle est sensible à la trypsine et à la pronase (Spira et Goepfert, 1975). Cette toxine, cytotoxique et dermonécrotique (Agata et al, 1995), est proche de celle de *Clostridium perfringens*, elle cause l'intoxication 8 à 16 heures après la prise de l'aliment provoquant une diarrhée et l'accumulation liquide de la boucle ileïque ligaturée des animaux. Elle est mortelle pour les souris (Granum, 1997 ; Notermans et Batt, 1998) et induit un retour de l'absorption liquide (de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) au niveau des cellules (Kramer et Gilbert, 1989).

Parmi les nombreux facteurs de virulence de *Bacillus cereus* on trouve l'hémolysine BL (HBL) qui est une toxine bien caractérisée (Beecher et Wong, 2000). Elle est constituée de trois composants obligatoires : B d'un PM = 35 kDa et deux composants lytiques L1 et L2 (36 et 45 kDa) (Beecher et Wong, 2000). L'hémolysine exige les trois composants pour son activité hémolytique, cytotoxique, dermonécrotique et la perméabilité vasculaire aussi bien que l'accumulation liquide dans la boucle ileïque ligaturés de lapin (Griffiths et Scharft, H., 2002).

La caractérisation de l'hémolysine BL mène à son implication dans la pathogénie de l'endophthalmitis de *Bacillus cereus* (Beecher et Macmillon, 1991 ; Beecher et al, 1995).

L'entérotoxine non hémolytiques (Nhe) : est un autre complexe à plusieurs composants protéiques : Nhe A à un PM = 45 kDa, la protéine Nhe B à un PM = 39 kDa et la protéine de 105 kDa qui est impliquée dans plusieurs intoxications alimentaires (Granum et Lund, 1996 ; Granum et al, 1999) ;

### **III. 3. 1. 2. Le syndrome émétique et la toxine émétisante**

Le syndrome émétique est généralement associé aux aliments farineux et est provoqué par une toxine émétique proche de l'entérotoxine staphylococcique appelée superantigène provoquant une diarrhée 1 à 5 heures après le repas (Agata et al, 1995 ; Sutra et al, 1998). L'intoxication est caractérisée par des nausées et des vomissements, souvent accompagnés de diarrhée, bien que ce ne soit pas le symptôme principal, et des douleurs abdominales (Granum, 1994 ; Gältz et Dickson ; 2002). Aucun traitement médical n'est généralement requis (Dufrenne et al, 1994).

La toxine émétique des souches de *Bacillus cereus* a été isolée et avérée pour être structurellement liée à la valinomycine. Elle est également appelée Cereulide et parfois facteur de vomissement dont l'analyse structurale a indiqué que c'était un dodécadipeptide cyclique à un PM moins de 1000 kDa. Elle est extrêmement stable à 121°C, elle tolère des

valeurs de pH extrême entre 1 et 11 et elle est résistante à la trypsine et à la pepsine (Shinagawa et al, 1996).

Il existe des cas d'intoxication où coexistent les symptômes diarrhéiques et émétiques. Ils sont attribués soit à une souche produisant les deux types de toxines, soit à des intoxications causées par plusieurs souches (Granum, 1997). Le tableau N°9 représente les différences entre les toxines diarrhéiques et les toxines émétiques.

### III. 3. 2. Les infections non-gastro-intestinales :

*Bacillus cereus* est également responsable d'infections systémiques opportunistes et locales liées particulièrement aux patients, aux nouveaux-nés, aux toxicomanes, aux patients immunodéprimés, présentant de blessures ou des cathéters traumatiques ou chirurgicaux (Trunbull et al, 1979 ; Drobniewski, 1993 ; Bailey et Scott, 1994). Des infections potentiellement graves ont été décrites chez les immunodéprimés. Ces infections se manifestent généralement par une bactériémie, septicémie, nécrose, pneumonie, ou une combinaison de ces dernières (Kramer et Gilbert, 1989 ; Khavari et al, 1993 ; Bailey et Scott, 1994). Les infections invasives peuvent également se produire chez les patients présentant une immunité intacte (Kramer et Gilbert, 1989). Les infections peuvent se produire également après traitement traumatologique-chirurgical, elles peuvent occasionnellement stimuler la gangrène de gaz (Turnbull et Kramer, 1983 ; Kramer et Gilbert, 1989 ; Andersson et al, 1991)

Les infections systémiques dues à *Bacillus cereus* sont rares. Des infections post-opératoires, post-traumatiques et des brûlures causées par *Bacillus cereus* sont associées à la production d'un facteur de perméabilité vasculaire HBL (Turnbull et al, 1979 ; Kemmerly et Pankey, 1993).

Les alcoolismes, les abus de drogues intraveineuses et les maladies abaissant la réponse immunitaire sont considérées comme des facteurs prédisposant à l'ostéomyélite due à *Bacillus cereus* (Schiker et al, 1994). *Bacillus cereus* est un des micro-organismes les plus importants trouvés dans l'infection oculaire grave: kératite, l'endophtalmite et panophtalmitis (Drobniewski et al, 1993). L'hémolysine HBL a été suggérée pour être un facteur de virulence dans l'endophtalmite de *Bacillus cereus* dans laquelle le détachement et la nécrose rétinienne sont souvent la cause de la perte permanente de la vue (Beecher et al, 1995 ; Alfaro et al, 1996).

Tableau N°9 : Comparaison entre les toxines de *Bacillus cereus* (Granum, 1997)

Propriété	Toxine diarrhéique	Toxine émétique
Nature	Protéine ~ 40 kDa	Peptide ~5 kDa
Stabilité	stable à 45°C, 5min Instable à 56°C, 5min	Stable à 126°C, 90 min
pH	Plus stable pH 4-11	Stable pH 2- 11
Enzymes	Sensible à la pronase, et à la trypsine	Résistante à la pepsine, trypsine
Stockage	Instable	Stable
Production dans les aliments	Quelquefois exécutés	Exécutés
Production	Fin de la phase exponentielle	Stationnaire
Activité sur		
singe	Diarrhée dans 1 à 3h	Vomissement dans 1 à 5h
boucle iléique	+ (aussi nécrotique)	-
perméabilité de la peau	+	-
Souris	Létale	?
Culture cellulaire	Cytotoxique	?
Antigénique	+	-
Action	Tissu endommagé	?
	Perméabilité altérée	?
	Cyclase d'adenyl	?

Les bactériémies sont dans la plupart des cas passagères et inoffensives, mais peuvent, de temps en temps, causer des infections sérieuses. En prédisposant des facteurs pour l'endocardite de *Bacillus cereus* (Steen et al, 1992).

Deux cas de méningites post-opératoires chez les patients de neurochirurgie dus à la contamination du linge de l'hôpital par *Bacillus cereus* ont été rapportés (Barrie et al, 1992).

### III. 4. *Bacillus cereus* et l'industrie laitière

*Bacillus cereus* avant d'être reconnu comme un agent d'intoxications alimentaire, était déjà connu comme un agent d'altération des denrées alimentaires.

En industrie laitière, les microorganismes sporogènes, sont particulièrement importants car ils déterminent la qualité de conservation du lait pasteurisé et d'autres produits laitiers. Parmi ces microorganismes, *Bacillus cereus* est connu pour être associé à l'apparition de défauts des laits et des produits laitiers comme les odeurs indésirables, la coagulation douce et la bitty cream (Anderson et al, 1995 ; Van Heddeghem et Vaemynck, 1993).

Le lait cru serait considéré comme la principale source de *Bacillus cereus* rencontré dans le lait pasteurisé (Griffiths et Phillips, 1990 ; Crielly *et al*, 1994) Selon Slaghuis et al, (1997), Crielly et al, (1994), la présence des spores de *Bacillus cereus* sont en quantités allant de 10 spores/ml jusqu'à des milliers de spores /ml de lait cru, mais les niveaux habituellement rencontrés vont de 10 à 100 spores /ml

*Bacillus cereus* peut développer une activité lipolytique (due à des phospholipides et une lécithine). Cette activité enzymatique est à l'origine en particulier d'altération des produits laitiers : caillage du lait et la saveur amère due à l'hydrolyse de la caséine et la formation des peptides le plus souvent ; des odeurs désagréables.

Il est clair que *Bacillus cereus* est l'un des organismes les plus difficiles à contrôler parce qu'il est impossible de supprimer *Bacillus cereus* dans tous les échantillons du lait. La pasteurisation est insuffisante pour détruire tous les spores tandis que ce traitement thermique élimine la compétition d'autres bactéries présentes à l'état végétatif (Niall, 1998 ; Andersson et al, 1995).

## **I. Les analyses microbiologiques**

Les analyses microbiologiques ont porté sur 476 échantillons comprenant : le lait prélevé directement de la mamelle, le lait prélevé directement à la sortie de la machine à traire, le lait prélevé à l'arrivée à l'unité, le lait prélevé avant la pasteurisation, le lait prélevé après conditionnement, la peau des mamelles, la machine à traire, la paroi interne de la cuve de stockage au niveau des fermes et l'ambiance des lieux de traite.

Les analyses ont concerné le dénombrement des flores suivantes : la flore totale, la flore psychrotrophe, la flore thermorésistante et *Bacillus cereus*

### **I.1. Evaluation de la contamination microbienne du lait**

#### **I.1.1. Le lait à la sortie de la mamelle**

Les échantillons ont été collectés à partir de douze fermes situées dans les wilayas de Ain-Temouchent et Tlemcen (Ouest d'Algérie) durant une période de deux années 2000 et 2001. Le pis de la vache est nettoyé à l'eau javellisée moyennant une lavette propre et séché. Après élimination des premiers jets dans un récipient contenant un antiseptique, on a recueilli 100 ml de lait environ directement dans un flacon stérile (Richard, 1981).

La traite est opérée manuellement après un lavage minutieux des mains du trayeur.

#### **I.1.2. Le lait à la sortie de la machine à traire**

Le prélèvement du lait a été effectué à la fin de la traite directement du bidon de récolte de la machine à traire. Pour cela, le flacon stérile est débouché et son col flambé. Il est rempli directement avec 250 ml de lait à partir du bidon. Enfin, le col est de nouveau flambé et refermé.

#### **I.1.3. Le lait arrivé à l'unité**

Le prélèvement s'est effectué à partir du lait de mélange au moment de la réception à l'unité à raison de 250 ml par échantillon.

#### **I.1.4. Le lait avant pasteurisation**

Des échantillons de 100ml de lait sont prélevés à partir du bac de lancement du pasteurisateur

#### **I.1.5. Le lait après conditionnement**

Des sachets de lait sont prélevés à la sortie des conditionneuses.

## **I. 2. Evaluation des différentes sources de contamination :**

### **I. 2. 1. La peau des mamelles :**

Un carré de 5 cm de côté est tracé et découpé dans une plaque en plastique. La plaque est apposée sur la mamelle et un écouvillon stérile est passé dans la surface délimitée par le carré, puis trempé dans un tube contenant le diluant. Le tube est alors refermé et agité.

### **I. 2. 2. la machine à traire :**

Nous avons effectué les mêmes opérations que celles utilisées pour la peau des mamelles, sauf que l'écouvillon est passé sur la machine à traire au niveau des gobelets, juste avant la traite

### **I. 2. 3. La cuve de stockage (tank) :**

Les mêmes opérations précédentes en passant l'écouvillon sur l'intérieur de la cuve de stockage du lait à la ferme

### **I. 2. 4. la litière :**

Quelques brins de litière de l'étable sont prélevés et trempés dans le tube contenant le bouillon nutritif. Ensuite on l'agite et on le retire avant de refermer le tube.

### **I. 2. 5. L'ambiance de l'étable :**

Pour le contrôle de l'ambiance, nous avons utilisé une technique simple : deux boîtes de Pétri contenant le milieu MOSSEL solide complet sont ouvertes pendant un temps donné dans le bâtiment où s'effectue la traite.

Nous avons laissé les boîtes de Pétri ouvertes durant les temps suivants : 30 sec, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min et 15 min

## **I. 3. Transport et préparation des échantillons**

Les échantillons sont mis dans une glacière et transportés au laboratoire pour être analysés ou conservés au réfrigérateur pendant une période maximale de 16 heures avant l'analyse.

Des dilutions décimales dans la solution de Ringer diluée au quart stérile ou dans le tryptone sel eau (PSS) ont été préparées.

## **I. 4. Les différentes flores microbiennes dénombrées**

### **I. 4. 1. Dénombrement de la flore totale**

Le dénombrement s'effectue après ensemencement en profondeur dans des boîtes de Pétri, d'un (01) ml pour les 3 dilutions décimales ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) de chaque échantillon (2 boîtes/dilution) sur lequel on coule environ 15 ml de milieu de culture liquéfié : PCA (Plate Count Agar). On incube à 37°C pendant 48h.

#### I. 4. 2. Dénombrement de la flore psychrotrophe

Les psychrotrophes sont dénombrés après ensemencement en profondeur en utilisant les dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  coulés avec le milieu de culture PCA. On incube à 7°C pendant au moins 20 jours (Piton et Richard, 1983)

#### I. 4. 3. Dénombrement de la flore thermorésistante

On prélève aseptiquement environ 5ml de lait convenablement agité qu'on introduit dans un tube à essai stérile. Le tube est alors porté au bain-marie à 80°C pendant 10mn (Te Giffel et al, 1996a). Le niveau d'eau dans ce dernier doit être supérieur à celui du lait dans le tube à partir duquel les dilutions seront préparées. L'ensemencement a lieu en profondeur avec le milieu PCA. On incube à 37°C pendant 48h.

#### I. 4. 4. Dénombrement des spores de *Bacillus cereus* :

##### Le traitement thermique des échantillons:

Dans le but de dénombrer les spores de *Bacillus cereus*, le tubes contenant 10 ml de la première dilution de chaque échantillon subit un traitement thermique dans un bain-marie à 80°C pendant 10 min (Griffiths et Phillips, 1990 ; Stadhouders *et al*, 1992 ; Slaghuis *et al*, 1997 ; Te Giffel et al, 1995b). Les tubes sont ensuite plongés dans un mélange d'eau et de glace. L'étape de l'activation thermique a été appliquée dans les 5 minutes suivant l'homogénéisation dont le but d'empêcher la germination des spores durant la préparation de l'échantillon (Te Giffel et al, 1995a)

Les échantillons d'ambiance n'ont subi aucun traitement.

##### Préparation des dilutions décimales :

Des dilutions décimales de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  ont été préparées en transférant à chaque fois 1ml de l'échantillon homogénéisé dans 9 ml de solution peptone sel (Biokar).

##### Dénombrement proprement dit de *Bacillus cereus* :

La méthode utilisée pour le dénombrement de *B. cereus* est une méthode de routine : il s'agit de la méthode AFNOR XP V08-058, proche de la méthode de référence ISO 7932 (1996), le mode de confirmation des colonies caractéristiques de *B. cereus* y est plus simple.

Le milieu utilisé est le milieu MYP agar (Merck) (Mossel et al, 1967). Deux boîtes par dilution sontensemencées et incubées à 30°C pendant 24 heures ou éventuellement pendant 24 autres heures supplémentaires (Te Giffel *et al*, 1996).

De chaque boîte contenant entre 15 et 150 colonies, trois colonies présumées de *B. cereus* : de couleur rose, grandes et entourées d'une zone blanche (Christiansson, 1998) sont prélevées pour confirmation selon la méthode de routine citée précédemment. Des suspensions en eau physiologique sont alors préparées à partir de chaque colonie prélevée pour subir les tests de confirmation suivants : La coloration de Gram et la mobilité par observation microscopique, la production de lécithinase : observée par l'apparition d'une zone blanche autour des colonies de *Bacillus cereus* due à l'action d'hydrolyse du jaune d'œuf par la lécithinase et le test d'hémolyse réalisé comme suit :

A la surface d'une boîte de Pétri contenant la gélose au sang, on ensemence les inocula prélevés des suspensions en eau physiologique en stries parallèles. Les boîtes sont alors incubées à 30°C pendant 18 à 24h. Après incubation, à la surface des géloses au sang, les stries des bactéries hémolytiques apparaissent entourées d'une zone claire d'hémolyse et parfois les colonies sont de couleur verdâtre.

#### Expression des résultats :

Au niveau des boîtes : on détermine le nombre de *Bacillus cereus* à partir du nombre de colonies caractéristiques multiplié par la proportion de *Bacillus cereus* confirmées.

Le nombre de *Bacillus cereus* par ml d'échantillon est alors exprimé par la formule suivante :

$$N = \Sigma a/v * 1,1 * d,$$

Avec  $\Sigma a$  = la somme des nombres des colonies de *Bacillus cereus* confirmées sur les deux dilutions successives retenues.

$d$  : le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

$v$  : le volume d'échantillon étalé sur chaque boîte.

## **I. 5. Identification des souches de *Bacillus cereus***

### **I. 5. 1. Isolement des souches:**

D'une boîte on prélève un maximum de cinq colonies bien isolées. Après observation microscopique et confirmation de la forme bacillaire d'une colonie, celle-ci est transférée dans un tube à essai contenant le milieu MOSSEL liquide de base. Le tube est agité le tube pour disperser la colonie dans le milieu. Enfin, on incube les tubes à 30°C pendant 18h.

### **I. 5. 2. Conservation en milieu solide incliné :**

Nous avons réalisé la conservation de *Bacillus cereus* en utilisant le milieu MOSSEL solide de base en tubes inclinés. Dans les conditions stériles nous avons prélevé une goutte du tube enrichi, puis effectué un ensemencement en stries en remontant tout au long de la surface de la gélose. On incube à 30°C pendant 18h les tubes inclinés et pour leur conservation, ces tubes sont stockés à 4°C pendant six mois maximum, car après ce délai on effectuera un repiquage.

Plus de 800 tubes à gélose inclinée ont ainsi été conservés.

### **I. 5. 3. les tests utilisés pour l'identification des souches de *Bacillus cereus*:**

L'identification des souches isolées a été réalisée par l'examen de 23 tests morphologiques et biochimiques. Ces tests sont :

- L'examen microscopique à l'état frais et après coloration de Gram
- Le test de la lécithinase : recherchée sur le milieu de Mossel. L'éclaircissement du jaune d'œuf autour des colonies et un précipité en halo traduit la dégradation de la lécithine.
- La recherche des Hémolysines : Elles sont mises en évidence par culture sur gélose au sang. (Norme XP V 08-058)
- Réaction au rouge de méthyle : Après 24 à 48 h d'incubation sur milieu de Clark et Lubs, 2ml de culture sont placées dans un tube à hémolyse au contact de quelques gouttes de rouge de méthyle. Le réactif reste rouge lorsque le pH est inférieur à 5, ce qui traduit une production d'acide. Dans le cas contraire, il vire au jaune.
- Réaction de Vosges Proskauer

A partir de la même culture utilisée pour le test RM, on prend 1ml qu'on place dans un tube à hémolyse. On ajoute 0.5ml de réactif à l'alpha naphthol et 1ml de soude à 16%. Après agitation et un délai de 10mn, une coloration rose traduit la formation de l'acétoïne.

- Dégradation de la gélatine : Une gélatine nutritive est ensemencée par piqûre centrale. Après une incubation de 48h à 2 semaines à 30°C, le tube est observé : la persistance d'une liquéfaction même à basse température indique la liquéfaction de la gélatine.
- Hydrolyse de la caséine : Une boîte de Pétri contenant une gélose au lait est ensemencée par touches, puis incubée 24h à 30°C. L'hydrolyse de la caséine est mise en évidence par la clarification du milieu.
- Formation d'indole : Mise en évidence par le réactif de Kovacs après culture de 24H sur milieu Indole-Nitrite. La présence d'indole se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge en surface.
- Hydrolyse de l'amidon : Mise en évidence sur gélose nutritive ordinaire contenant 1% d'amidon soluble coulée en boîte de Pétri et ensemencée par touches. La dégradation de l'amidon est révélée par la vaporisation d'une solution d'iode N/10 qui fait virer au bleu le milieu amylicé sauf dans la zone d'hydrolyse.
- La recherche de la Bêta-Galactosidase : Une colonie est mise en suspension dans 0.5ml d'eau physiologique. Les cellules sont lysées par une goutte de toluène. Un disque imprégné d'ONPG est ajouté. Une coloration jaune apparaissant après trois heures d'incubation à 37°C traduit la présence d'une Bêta- galactosidase.
- La lysine décarboxylase (LDC) : 3 à 4 gouttes d'une suspension dense de culture de *Bacillus cereus* sont ajoutées à 2ml du milieu de Moeller + Lysine de couleur initiale violette (indicateur coloré : pourpre de Bromocrésol). Après 24h d'incubation à 30°C, une clarification du milieu traduit la présence d'une lysine-Décarboxylase.
- L'arginine dihydrolase : la même technique utilisée pour la mise en évidence de la LDC est utilisée ici avec le remplacement de la lysine par l'arginine.
- Le teste de la catalase : Mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame et une goutte de culture y est répartie : un dégagement gazeux traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase.
- Le teste de l'oxydase: Un disque « oxydase » est placé sur une lame et imbibé d'une goutte d'eau. Une colonie de la culture est déposée à sa surface. Une coloration rose se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive.
- Le teste de l'uréase : 2 ml du milieu Urée-indole (de couleur orange rougeâtre), sont ensemencés par une colonie bactérienne. Une alcalinisation du milieu se traduit par une

coloration rose, et une acidification se traduit par une coloration jaune. Si le milieu reste inchangé le test est dit variable.

- La fermentation des sucres:

Nous avons utilisé la galerie classique pour la fermentation de huit sucres (Glucose, Fructose, Saccharose, Arabinose, Galactose, Xylose, Lactose et Maltose). Pour cela, une gélose semi-solide pour fermentation des sucres a été utilisée : la gélose pour fermentation au bleu de Bromothymol. Elle est répartie dans des tubes à essais, à raison de 7-8ml du milieu par tube. Avant ensemencement, 1ml d'une solution de sucre à 5 ou 10% stérilisée par filtration sur filtre millipore 0.45  $\mu\text{m}$  est ajoutée aseptiquement au milieu en surfusion. Chaque tube est ensemencé à l'aide d'une anse puis incubé à 30°C pendant 24h.

La couleur initiale du milieu est bleue, avec la fermentation, l'indicateur vire au jaune. Si un dégagement de gaz accompagne la fermentation, des bulles d'air se forment dans la gélose.

## **II. Etude de l'effet de la température, du pH et de l' $a_w$ sur la croissance de *Bacillus cereus***

### **II. 1. Description des conditions de culture :**

#### **II. 1. 1. Milieux de base :**

Les cinétiques de croissance de *Bacillus cereus* ont été réalisées dans le bouillon nutritif et dans le lait.

Les cinétiques de croissance ont été suivies par mesure de la densité optique. Pour cela nous avons utilisé un spectrophotomètre modèle « Jenway 6300 à cuve, à la longueur d'onde de 610nm. Afin de convertir les valeurs de DO en log N (UFC/ml), une courbe d'étalonnage a été réalisée comme suit : A chaque lecture de la DO, un ensemencement est effectué en parallèle sur la gélose nutritive. Le dénombrement des boîtes des Pétri a lieu après 24h à 48h d'incubation à 30°C

Pour le suivi de la croissance de *Bacillus cereus* dans le lait, les dénombrements ont été effectués par culture sur la gélose nutritive (Lopez et al, 1996).

#### **II. 1. 2. Description des facteurs étudiés**

Sur la base des données bibliographiques, trois facteurs environnementaux ont été étudiés : la température, le pH et l' $a_w$ . Il s'agit de facteurs majeurs qui ont une

signification biologique sur la croissance et la multiplication des microorganismes dans les aliments.

La détermination de la gamme des valeurs pour chaque facteur, a été guidée par les caractéristiques de *Bacillus cereus* et par l'intérêt de l'application de ces facteurs dans le domaine de l'industrie alimentaire.

### **II. 1. 2. 1. La Température :**

*Bacillus cereus* est une bactérie mésophile, et thermorésistante. Certaines souches sont psychrotrophes ; pour ces raisons, Les températures maximales optimales et minimales ont été recherchées.

Pour déterminer les températures minimales de croissance, les souches ont été cultivées sur bouillon nutritif à 30°C pendant 20 h, 0,05 ml de la culture ont été transférés dans un tube contenant 10 ml de bouillon préalablement refroidit dans un mélange d'eau et de glace. Pour chaque souche 3 tubes ont été utilisés. Les tubes ont été portés à la température de 12°C. Après 21 jours d'incubation les tubes ont été examinés en vue de vérifier la présence d'un trouble microbien. A partir de chaque tube présentant un trouble, 0,05 ml ont été transférés dans des tubes contenant du bouillon nutritif frais et incubés à 10°C La même expérience est répétée à 8°C, 6°C et à 4°C (Dufrenne et al, 1994).

Pour déterminer les températures maximales de croissance, les souches ont été cultivées sur bouillon nutritif à 30°C pendant 20 h, 0,05 ml de la culture ont été transférés dans un tube contenant 10 ml de bouillon préalablement refroidit dans un mélange d'eau et de glace. Pour chaque souche 3 tubes ont été utilisés. Les tubes ont été portés à la température de 44°C. Après 24h d'incubation les tubes ont été examinés en vue de vérifier la présence d'un trouble microbien. A partir de chaque tube présentant un trouble, 0,05 ml ont été transférés dans des tubes contenant du bouillon nutritif frais et incubés à 44 °C La même expérience est répétée à 46°C, 48°C et à 50°C (Dufrenne et al, 1994).

Les cinétiques de croissance ont été étudiées, quand à elles, à 30 et 10°C

### **II. 1. 2. 2. Le pH :**

La gamme du pH choisi est de 4.5, 5.5, 6.5 et 7.5 Le pH est ajusté par addition de HCL 0.1N ou de NaOH 0.1N avant la stérilisation du milieu.

### II. 1. 2. 3. L' $a_w$ :

L'activité de l'eau par l'ajout de NaCl à des concentrations différentes et choisies : 0.5%, 2.5%, 4.5% et 7%. L'équivalence NaCl-  $a_w$  est estimée par la formule de l'ERCC (USA)

## II. 2. Méthodologie :

### II. 2. 1. Préparation des suspensions de spores

La préparation de la suspension sporale a été réalisée selon la méthode décrite par Mazas et al. (1995). Une colonie de *Bacillus cereus* est ensemencée dans un tube contenant 9ml de bouillon nutritif et incubée à 30°C pendant 24h. 1ml de la suspension cellulaire formée est alors ensemencé dans un deuxième tube de bouillon nutritif. Après 24 heures d'incubation à 30 °C, deux boîtes de Pétri contenant la GN sont ensemencées en stries à. Les boîtes sont portées à l'étuve à 30°C pendant 24 h. Une colonie isolée est prélevée et ensemencée dans un tube de BN qui est incubé 24 heures à 30°C.

Après l'incubation, un volume de 0,5 ml du bouillon enrichi est réparti en surface de chacune des cinq boîtes de Pétri ou flacons de Roux) renfermant la gélose nutritive fortifiée (gélose nutritive additionnée de 1 ppm  $Mn^{2+}$ ). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 3 à 5 jours (Gonzalez et al, 1999).

Quand un voile de colonies apparaît en surface des boîtes de Pétri, celles-ci sont inondées par une solution tampon phosphate (tampon Sorénson) stérile et froide. A l'aide d'une pipette Pasteur en forme L, la surface de chacune des boîtes est raclée.

La suspension sporale obtenue (des 5 boîtes) est récupérée dans un Becher stérile. Et centrifugée à 600g pendant 5 minutes, le surnageant stérilement récupéré est soumis à une deuxième centrifugation à 2500g pendant 15 - 20 minutes.

Le culot récupéré est suspendu dans un volume de tampon Sorenson égal au volume du surnageant jeté, après une bonne agitation, une deuxième centrifugation à 2500g pendant 15 - 20 minutes est effectuée.

Le culot formé est récupéré avec le tampon phosphate. La suspension sporale ainsi obtenue est répartie en tubes à hémolyse stériles qui sont conservés à 4 °C.

La numération des spores de *B. cereus* dans la suspension est effectuée par la cellule de Thoma. Celle-ci renferme environ  $10^8$  spores / ml.

### II. 2. 2. Préparation des milieux :

Les cinétiques de croissance ont été étudiées, à 30 et 10°C

Le bouillon nutritif préparé est partagé dans 4 fioles de 500 ml à raison de 120 ml par fiole. A chaque fiole, on ajoute la concentration en NaCl désirée (0.5%, 2.5%, 5% et 7.5%) en prenant en compte la composition du milieu en NaCl qui est de 0.5%. Chaque milieu est, à son tour, partagé dans 4 autres fioles à raison de 80ml dans chaque fiole. Le pH est ajusté à la valeur voulue (4.5, 5, 5.5, 6 et 7) par l'addition du HCl ou NaOH. Ces milieux sont alors stérilisés.

La figure N°7 illustre la relation entre les 3 facteurs environnementaux.

### II. 2. 3. Inoculation :

Chaque fiole estensemencée à partir de la souche préalablement enrichie. La quantité de l'inoculum doit être fixée au départ à une DO de 0, 02. Enfin chaque série de fioles sera incubée aux températures étudiées 30°C et 10°C

### II. 2. 4. Evaluation de la population microbienne :

La croissance de *Bacillus cereus* est suivie par la mesure de la DO. Pour les séries des fioles incubées à 30°C. La DO est mesurée toutes les 2 heures pendant une période de 12h ou 14h suivie d'une lecture à 24 h et une dernière lecture à 48h.

Pour la série des fioles incubées à 10 °C, la DO est mesurée chaque jour pendant une période de 22 jours.

## II. 3. Modélisation de la croissance de *Bacillus cereus*:

Les courbes obtenues ont été utilisées pour modéliser l'effet de la température, du pH et de la teneur en sel sur la croissance de *Bacillus cereus*.

### II. 3. 1. Modélisation de croissance de *Bacillus cereus* par un modèle primaire :

Le modèle de Gompertz (Zwietering, ,1990) a été utilisé. Son équation s'écrit :

$$\log N = A + C \{ \exp \{ - \exp \{ -B(t - M) \} \} \}$$

A partir de ce modèle, on définit les paramètres suivants :

$$\text{Le temps de latence : } LAG = M - \left( \frac{1}{B} \right), \text{ le taux de croissance : } EGR = \frac{BC}{e}$$

La densité de population maximale :  $MPD = A + C$ , le temps de génération :  $GT = \frac{\ln 2e}{BC}$

### II. 3. 2. Modélisation du taux de croissance de *Bacillus cereus*:

Comme modèle secondaire, on a choisi le modèle de Ratkowsky :

$$\mu_{\max} = \left[ b_3 (T - T_{\min}) \right]^2 \left\{ 1 - \left[ \exp \left( c_3 (T - T_{\max}) \right) \right] \right\}$$

Où

$b_3$  est une constante de Ratkowsky exprimé en  $^{\circ}\text{C}^{-1}\text{h}^{-0.5}$ ,  $T_{\min}$  est la température minimale de croissance (en  $^{\circ}\text{C}$ ),  $c_3$  est une constante exprimé en  $^{\circ}\text{C}$  et  $T_{\max}$  est la température maximale de croissance (en  $^{\circ}\text{C}$ ).

### II. 3. 3. Modélisation de l'effet combiné de 3 facteurs sur les paramètres de croissance de *Bacillus cereus* :

L'influence de 3 facteurs environnementaux (l'empérature, pH et Aw) sur les paramètres de croissance ( $\mu_{\max}$  et lag) est modélisée par des équations quadratiques polynomiales (surfaces de réponse), dont les deux formules s'écrivent :

$$\text{Ln}(\mu_{\max}) = c_1 + c_2 \text{ pH} + c_3 \text{ Aw} + c_4 \text{ T} + c_5 \text{ pH Aw} + c_6 \text{ pH T} + c_7 \text{ Aw T} + c_8 \text{ pH}^2 + c_9 \text{ Aw}^2 + c_{10} \text{ T}^2$$

$$\text{Ln}(\text{lag}) = c_1' + c_2' \text{ pH} + c_3' \text{ Aw} + c_4' \text{ T} + c_5' \text{ pH Aw} + c_6' \text{ pH T} + c_7' \text{ Aw T} + c_8' \text{ pH}^2 + c_9' \text{ Aw}^2 + c_{10}' \text{ T}^2$$

Où

$C_i$  ( $i=1 \dots 10, 1' \dots 10'$ ) sont des constantes, T est la température, pH est la teneur en acidité et Aw est la teneur en NaCl.

### 3. 3. 4. Méthode d'ajustement :

Pour ajuster les données obtenues, le critère des moindres carrés ordinaire a été appliqué ; il s'agit de minimiser la somme des écarts.

$$SCE = \sum \left[ \log N_t^{obs} - \log N_t^{cal} \right]^2$$

Le coefficient de corrélation (coefficient de détermination ajusté) a également été utilisé.

$$R^2 = 1 - \frac{SCE(\text{résiduelle})}{SCE(\text{total})} \frac{n-1}{n-p}$$

Où n la taille du jeu de données et p le nombre de paramètres du modèle.

## III. ETUDE DE LA THERMORÉSISTANCE DE *Bacillus cereus*

### III. 1. Préparation des suspensions de spores

Quatre souches ont été étudiées deux souches locales BALC1 et BALC2 et deux souches de référence la ATCC 4342 et la ATCC 7004 de la collection américaine de cultures types (ATCC) ont été employées. Des suspensions de spore ont été obtenues comme cité

précédemment. Des colonies de 24 heures de cultures ont été isolées dans l'agar nutritif (Difco,) et cultivé en bouillon nutritif (Biolife,) pour 24 h à 30°C pour BALC1 et BALC2, 35°C pour 7004 et 40°C pour 4342 (Gonzalez et al, 1999).

### III. 2. Détermination de la thermorésistance

Des traitements thermiques sur un éventail des températures (82-108°C) ont été exécutés dans le thermorésistomètre de TR-sc (voir annexe N°3) muni d'un pHmètre avec compensation automatique de la température et une électrode d'Ingold 465, qui peut mesurer le pH avec une exactitude d'unité du  $\pm 0,01$  de pH aux températures de jusqu' à 130°C (Condon et al, 1993). La suspension de spore (0,2 ml) a été inoculée dans 400 ml des milieux suivants: (a) Le tampon de McIlvaine (phosphate disodique/acide citrique) à pH 7,0 et 5,2 préparé comme indiqué par Mc Kenzie et Dawson (1969); (b) extrait de carotte à son pH normal (5,2) et acidifié à pH 4,5 et 4,0 avec les acides acétique, ascorbique, chlorhydrique, citrique, lactique et malique. L'acidification des milieux a été effectuée à l'intérieur de la chambre du thermorésistomètre, quand la température de traitement thermique avait été atteinte. L'extrait de carottes de la variété Nantaise calibre moyen a été obtenu par le chauffage à 121°C pendant 20 minutes de 500 g de carottes fraîches, lavées, épluchées et coupées en tranches en 850 ml d'eau distillée et les morceaux de carottes sont enlevées après l'ébullition. L'extrait a été stérilisé alors à 121°C pendant 15 minutes. Après préparation, l'extrait a été stocké congelé jusqu'à son utilisation. La même série d'extrait de carotte a été employée pour toutes les expériences dans cette étude. Avant chaque expérience, des parties de l'extrait de carotte congelées ont été décongelées pendant 18 à 24 h à 4°C.

### III. 3. Incubation et dénombrement des survivants

À intervalles appropriés, des échantillons de 0,25 ml sont pris du milieu de chauffage et ont été placés directement sur des boîtes de Pétri Avec de la gélose nutritive. Le nombre de spores survivants a été déterminé après incubation à 30°C pendant 24 h au moyen d'un compteur de colonies automatique (AMS Protos, R-U) (voir annexe N°4) selon les caractéristiques décrites par Ibarz et al (1991).

Pour évaluer l'effet de l'extrait de carotte dans le milieu de recouvrement sur la capacité de recouvrement et la thermorésistance apparente des spores, deux milieux de recouvrement ont été préparés comme suit: 1 litre d'extrait de carotte, obtenu comme précédemment décrit, a été complété avec 23 g de gélose nutritive ou avec 10 g d'agar bactériologique. Le pH de ces milieux après la stérilisation à l'autoclave était de  $5.20 \pm 0.1$ .

### III. 4. Calcul des valeurs D et de Z

Les valeurs D (durée en minutes nécessaire permettant une réduction décimale du nombre de spores traitées à une température 'T' donnée) ont été estimées à partir des pentes des parties droites des courbes de survie (log du nombre de survivants vs temps). Des valeurs de D<sub>96</sub> ont été obtenues en triple et comparées en utilisant le test T de Student (Steel et Torrie, 1960a).

Les valeurs Z (le nombre de degrés Celsius permettant une réduction décimale de D) ont été déterminées à partir des pentes des courbes de destruction thermique (log D vs température). La comparaison statistique des valeurs Z a été effectuée par l'essai d'homogénéité (Steel et Torrie, 1960b).

### III. 5. Modélisation de la cinétique d'inactivation de *Bacillus cereus*.

#### III. 5. 1. les modèles primaires

##### III. 5. 1. 1. Modèle de Chick (1908)

$$\log \left[ \frac{N(t)}{N_0} \right] = - \frac{t}{D}; t \geq 0$$

Où D est le temps de réduction décimale.

Cette équation peut également être intégrée pour obtenir une expression plus connue pour la réduction des populations microbiennes:

$$\ln \left[ \frac{N(t)}{N_0} \right] = -Kt$$

##### III. 5. 1. 2. Modèle de Gompertz modifié

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = Ce^{-e^{BM}} - Ce^{-e^{-B(t-M)}}$$

B = le taux de décroissance d'une population microbienne

C = la densité maximale détruite

M = le temps où la culture atteint le taux de de croissance maximal.

#### III. 5. 2. Modélisation du taux de décroissance maximale.

Le modèle de la thermorésistance a été utilisé

$$\text{Log} \frac{D}{D_R} = -\frac{(T - T_R)}{Z}$$

Log D= log décimal du temps de réduction décimale

Log D<sub>R</sub>= log décimal du temps de réduction décimale à T<sub>R</sub>

Z= Valeur d'inactivation thermique

### III. 5. 3. Modélisation de l'effet combiné des facteurs (température, pH et A<sub>w</sub>)

L'influence des trois facteurs étudiés est modélisée par le modèle de Mafart (Mafart et Leguerinel, 1998 ; Gaillard et al 1998)

$$\text{Log}D = \text{Log}D^* - \left(\frac{1}{Z_T}\right)(T - T^*) - \left(\frac{1}{Z_{pH}^2}\right)(pH - pH^*)^2 - \left(\frac{1}{Z_{a_w}}\right)(a_w - 1)$$

Où : LogD\*= log temps de réduction décimale à T\* et pH\*

T\* = température de référence

pH\* = pH de référence

a<sub>w</sub> = activité de l'eau

Z<sub>T</sub>= élévation de la température pour une réduction décimale de D

Z<sub>pH</sub> = variation entre pH et pH\* nécessaire pour une réduction décimale de D

## IV. LES LOGICIELS UTILISES

Pour modéliser nos données expérimentales à des modèles choisis, nous avons utilisé les logiciels Graphpad Prism 3.0, le Pathogen modelling program 6.1, (ERCC, USDA USA) et le Food Micromodel (IFR, UK)

## I. RESULTATS DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DU LAIT

Le tableau N° 10 montre les résultats de dénombrement des flores totale, psychrotrophe et thermorésistante pour le lait cru prélevé au niveau des douze fermes étudiées et au niveau du quai de réception de la laiterie de tlemcen.

Tableau N° 10 : Résultats des analyses microbiologiques du lait cru l'Ouest algérien.

Flore	Lait	Mamelle (N=192)	Machine à Traire (N=190)	Réception usine (N=148)
Flore totale	Minimum	$9,92.10^3$	$2,00.10^6$	$4,88.10^5$
	Moyenne	$1,19.10^4$	$2,02.10^6$	$1,65.10^6$
	Maximum	$1,38.10^5$	$3,00.10^7$	$2,79.10^8$
Flore Psychrotrophe	Minimum	$7,20.10^2$	$2,25.10^4$	$2,62.10^3$
	Moyenne	$2,4.10^4$	$6,80.10^4$	$2,97.10^4$
	Maximum	$4,73.10^4$	$1,14.10^5$	$3,90.10^5$
Flore Thermorésistante	Minimum	$2,95.10^3$	$7,00.10^3$	$2,33.10^3$
	Moyenne	$1,17.10^4$	$2,26.10^4$	$1,30.10^4$
	Maximum	$8,40.10^4$	$8,92.10^4$	$1,90.10^4$

### I. 1. 1. La flore totale :

On remarque que le lait cru, quelque soit son origine, contient en moyenne plus de  $10^6$  germes totaux/mL. Pour les échantillons de lait prélevé de la mamelle, le taux de contamination avoisine en général  $10^6$  ufc/ml. Le taux de contamination moyen du lait à partir de la machine à traire est très élevé, il dépasse  $10^7$  ufc/ml avec des valeurs extrêmes égales ou supérieures à  $3,00.10^7$  ufc/ml notées pour deux fermes en raison de prélèvements effectués pendant une période pluviale. Ces résultats élevés se confirment au niveau du lait arrivé à l'unité avec plus de  $10^8$  ufc/mL. On remarque donc une augmentation progressive du taux de contamination par les germes totaux du lait cru tout au long de sa production à la ferme jusqu'à son arrivé à l'unité

### I. 1. 2. La flore psychrotrophe :

Pour la flore psychrotrophe, les résultats obtenus au niveau des fermes étudiées pour les prélèvements du lait effectués directement de la mamelle sont compris entre  $2,00 \cdot 10^3$  et  $5,77 \cdot 10^4$  ufc/mL, alors que pour le lait à partir de la machine à traire le taux de contamination est plus élevé et compris entre  $6,80 \cdot 10^4$  et plus de  $10^5$  germes psychrotrophes/ml. En distinguant les résultats obtenus pour le lait de la mamelle au niveau de chaque ferme, les taux étaient inférieurs à  $10^4$  ufc/mL pour deux fermes alors qu'ils étaient supérieurs à  $10^4$  ufc/ml pour les autres fermes restantes. Cependant, pour le lait à partir de la machine à traire, on note une moyenne inférieure à  $10^5$  ufc/mL un maximum de  $3,00 \cdot 10^5$  ufc/mL. En arrivant à l'unité, le lait renferme également des taux avoisinant et même dépassant  $3,00 \cdot 10^5$  ufc/mL.

D'après ces résultats, on remarque, comme pour la flore totale, une augmentation de la contamination du lait cru par les germes psychrotrophes durant sa chaîne de production jusqu'à son arrivé à l'unité.

### I. 1. 3. La flore thermorésistante :

Les taux de contamination en flore thermorésistante est élevé pour les deux origines (lait de mamelles et de la machine à traire) au niveau des fermes avec plus de  $10^4$  ufc/mL, alors que les deux fermes B et D enregistrent un taux inférieur à  $10^4$  ufc/mL. Par ailleurs on remarque que le lait de la ferme C renferme environ deux fois plus de germes thermorésistants que celui de la ferme A. Le taux de la flore thermorésistante du lait au niveau des fermes varie en général entre  $3,17 \cdot 10^3$  et  $4,20 \cdot 10^4$  ufc/mL. De façon générale, ces résultats sont proches des prélèvements effectués au niveau du lait de l'unité avec une moyenne de  $1,30 \cdot 10^4$  ufc/mL. On peut en déduire que la flore thermorésistante n'a subi qu'un développement microbien limité lors des étapes de production du lait cru.

Le seuil de  $10^6$  à  $10^7$  germes totaux/mL de lait à partir duquel on commence à détecter une altération de sa qualité organoleptique (Richard, 1981) a été atteint dans la présente étude pour le lait prélevé directement de la mamelle et a été même dépassé pour le lait de la machine à traire. Richard (1981) et Piton et richard (1982) trouvèrent dans leur étude que la teneur initiale du lait est de  $5 \cdot 10^4$  ufc/mL en moyenne et que le seuil d'altération n'est atteint qu'après une conservation de 4 jours à 4-5°C.

Il est possible d'établir pour chaque groupe microbien un seuil approximatif à ne pas dépasser initialement dans le lait, pour qu'après conservation, ce dernier contienne moins de  $10^6$  ufc/mL. En appliquant ce raisonnement, Richard (1983) considère que le seuil limite pour la flore psychrotrophe initiale doit être de 2000 ufc/ml. Dans notre cas, seuls trois prélèvements ont donné des résultats inférieurs à ce seuil, alors que les valeurs moyennes de toutes les fermes en étaient supérieures.

Les résultats obtenus pour le dénombrement de la flore totale et psychrotrophe du lait au niveau des fermes montre une contamination élevée survenant au cours de la traite. Les causes sont la non-élimination des premiers jets. L'apport de la peau des mamelles du à la présence de nombreuses crevasses sur les trayons et au mauvais nettoyage des mamelles.

Le taux de contamination augmente après passage du lait par la machine à traire ; Il y a plusieurs causes à cela : le mauvais nettoyage de la machine à traire, utilisant des détergents alcalins avec une eau froide favorisant le développement des micro-organismes, défaut d'étanchéité de l'installation ainsi qu'une contamination provenant de certaines parties de l'installation étrangères au circuit du lait comme le circuit de vide par exemple (Chatelin et richard, 1983).

De nombreuses espèces microbiennes sont capables de se multiplier dans le tank à basse température. Cette multiplication de la flore psychrotrophe, en plus de l'apport du tank lui même, et de la croissance microbienne pendant les premières heures de stockage peut expliquer le taux élevé de la flore totale et la flore psychrotrophe au niveau du lait de l'unité. En plus, l'augmentation de la flore totale qui ne croit pas à basse température peut être expliqué par l'ajout d'un lait d'une nouvelle traite au lait précédemment conservé, provoquant une élévation de la température.

Connaissant l'influence importante des germes thermorésistants du lait cru sur la qualité de conservation du lait pasteurisé, (Ravanis et Lewis, 1995), il est donc nécessaire de réduire son nombre initialement au maximum. Selon Mourgues *et al* (1983), le seuil maximum à respecter pour le lait pasteurisé est de 30000ufc/mL car dépassé cette limite, l'altération peut survenir. Ces auteurs ont montré qu'un lait cru contenant  $10^4$  ufc/mL a une durée de conservation de 12 jours à 6°C après pasteurisation pour atteindre 30000ufc/ml et 23 jours avant le défaut de goût. Le lait analysé dans le cadre de cette étude se situe à la limite de ce seuil. Curieusement, la flore thermorésistante augmente peu entre la mamelle et la laiterie.

#### I. 1. 4. *Bacillus cereus*

L'incidence et la distribution du nombre de *Bacillus cereus* dans les échantillons de lait prélevé directement de la mamelle, des machines à traire et des cuve de stockage du lait à la ferme sont donnés par le tableau N°11.

**Tableau N°11 : Incidence et niveaux de contamination de *Bacillus cereus* dans le lait cru de l'Ouest algérien**

Origine des échantillons	Bacillus cereus /ml	négatif	10-100	101-1000	1001-10000	10001-100000	>100000	total
Mamelle	N	146	14	21	6	5	0	192
	(%)	(76,04)	(7,29)	(10,94)	(3,13)	(2,60)	(0,00)	(100)
Machine à traire	N	140	27	7	9	5	2	190
	(%)	(73,68)	(14,21)	(3,68)	(4,74)	(2,63)	(1,04)	(100)
Réception laiterie	N	127	11	2	5	3	0	148
	(%)	(85,82)	(7,43)	(1,35)	(3,38)	(2,03)	(0,00)	(100)

Ces résultats montrent que 23,96% (46 sur 192) des échantillons de lait prélevés à la sortie de la mamelle sont contaminés par *Bacillus cereus*, le taux de contamination à ce niveau varie de  $10$  à  $2 \cdot 10^4$  ufc/ml. L'incidence de contamination à la sortie de la machine à traire ne subit pas d'augmentation significative Elle est de 26,32%. Cependant le niveau maximum atteint dépasse  $10^6$  ufc/ml. Paradoxalement, l'incidence a été moindre pour le lait de grand mélange prélevé au niveau du quai de réception du complexe laitier. Celle-ci a été de 14,19 % avec un niveau maximum de contamination noté inférieur à  $10^5$  ufc/ml.

Le niveau de contamination du lait cru par *Bacillus cereus* montre que moins de 3% des échantillons sont contaminés par un nombre dépassant le seuil de  $10^4$  spores/ml, et 1% des échantillons prélevés de la machine à traire sont contaminés par *Bacillus cereus* à un taux supérieur à  $10^5$  spores/ml

Concernant les sources de contamination, l'incidence est plus élevée, elle dépasse 50% pour le cas de la paroi interne de la machine à traire et la litière de l'étable. La peau des mamelles et les cuves ont été trouvées contaminées presque une fois sur trois.

### I. 1. 5. Discussion des résultats relatifs à *Bacillus cereus*

Presque tous les auteurs travaillant sur l'isolement, la détection et l'énumération de *Bacillus cereus* dans les aliments suivent les mêmes procédures, et utilisent la gélose sélective MYP agar de Mossel (, Mossel et al, 1967 ; Van Netten and Kramer , 1992). Dans le lait cru, l'incidence et le taux de contamination par *Bacillus cereus* est généralement faible. Dans ce travail, l'incidence trouvée est également faible puisqu'elle était inférieure à 25%, cependant, des échantillons ont été trouvés fortement contaminés. Le seuil limite pour un lait destiné à la consommation a été fixé à  $10^3$  *Bacillus cereus*/mL car au delà de ce seuil ce germe est considéré potentiellement comme un micro-organisme pathogène pouvant produire des entérotoxines. A  $10^4$  *Bacillus cereus*/mL, le lait est considéré comme impropre à la consommation (Christiansson et al, 1999) En plus du lait pasteurisé, cette limite doit s'appliquer également pour le lait cru car ce dernier est souvent utilisé pour l'autoconsommation. En tenant compte de la croissance de *Bacillus cereus* dans le lait et afin de ne pas dépasser le seuil légal, la teneur initiale du lait cru en *Bacillus cereus* doit être minimale. Ahmed *et al* (1983), ont trouvé que le taux de contamination du lait cru ne dépasse pas 100 *Bacillus cereus*/ml.

Selon Te Giffel *et al* (1995a), la litière contient généralement un grand nombre de spores de *Bacillus cereus*, elle-même due a une contamination supplémentaire par les fèces et le sol qui constituent les sources majeurs de contamination au niveau de la ferme. Ces résultats sont confirmés dans notre étude d'après ces résultats, la présence permanente de la litière au moment de la traite représente danger pour la qualité du lait ;

En ce qui concerne la machine à traire, Van Heddegham et Vlaemynck (1993), rapportent que 25% des machines à traire examinées contenaient  $10^3$  à  $10^4$  *Bacillus cereus*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans ce travail. Aussi, il existe une influence saisonnière sur la présence de *Bacillus cereus* dans les équipements du lait car la croissance de ce germe est favorisée par une température ambiante élevée (Van Heddegham et Vlaemynck, 1993)

Les conditions environnantes (ambiance) jouent un rôle important dans la contamination du lait cru par *Bacillus cereus* durant la traite. Selon Van Heddegham et Vlaemynck (1993), cette contamination peut emprunter plusieurs voies : soit par un contact direct de l'air environnant avec le lait, soit par un contact indirect avec le matériel laitier comme par exemple : le passage de l'air par les gobelets trayeurs avant leur placement.

Enfin, au moment de la conservation du lait, une contamination supplémentaire peut survenir en raison d'un apport du tank lui même dû à un mauvais nettoyage et d'une

température de conservation dépassant 4°C. Malgré l'apport minime du tank, il ne faut pas le négliger car *Bacillus cereus* compte des souches psychrotrophes.

Dans les fermes que nous avons étudiées 80% du bétail souffre de mammite chroniques et souvent sub-cliniques, or des études rapportent que lorsque la vache souffre de mammite, le nombre des bactéries augmente dans le lait, considérablement et le lait peut contenir plus de  $10^6$  ufc/ml. Ce sont surtout les bactéries des genres *Staphylococcus* et *Streptococcus* qui en sont les principaux responsables mais d'autres bactéries parmi lesquels *Bacillus cereus* peuvent aussi se trouver en grand nombre (Bramely et Mckinnon, 1990 ; Driensson et Van Den Beng, 1992). Cela pourrait expliquer les résultats obtenus pour le lait d'une des fermes concernées. Après que les vaches aient subi un traitement à base d'antibiotiques, nous avons constaté une diminution très sensible du nombre de *Bacillus cereus* jusqu'à son absence dans les échantillons prélevés durant les semaines qui ont suivi le traitement. Deux mois plus tard, le nombre de *Bacillus cereus* recommençait à augmenter dans le lait de cette même ferme.

Nous n'avons pas étudié l'effet saisonnal sur l'occurrence de *Bacillus cereus*, néanmoins nous avons constaté que les échantillons prélevés dans la période d'automne (octobre à Décembre) sont les plus contaminés. Le taux maximum relevé a été de  $2.10^4$  ufc/ml de lait. Comme il a été observé par Christiansson et al (1999), les résultats obtenus indiquent que les facteurs relatifs au climat et particulièrement l'humidité du sol après une période de pluie, joue un rôle important dans la contamination du lait par *Bacillus cereus* durant le parage ou la pâture. L'effet saisonnal sur la contamination du lait par *Bacillus cereus* a été relevé par plusieurs auteurs (Griffiths, 1992, Phillips et Griffiths, 1986 ; Slaghuis et al, 1997)

Helmy *et al* (1984) ont détecté *Bacillus cereus* dans 70% des échantillons de lait cru égyptien avec un taux de contamination allant jusqu'à  $10^6$  spores/ml. Christiansson (1997) a trouvé un taux de contamination du lait cru dans les cuves de stockage variant de 200 à 300 spores / ml à l'exception de certaines fermes où le nombre trouvé était supérieur à  $10^3$  spores de *Bacillus cereus* /ml. Te Giffel (1997) a trouvé que 36 % d'échantillons de lait cru analysés contiennent *Bacillus cereus*, alors que Slaghuis *et al* (1997) n'ont trouvé que 5% d'échantillons contenant un nombre de spores de *Bacillus cereus* supérieur à 200 spores/ ml sur 288 échantillons du lait cru stocké dans des cuves. Enroth et al (2000) ont également trouvé un nombre bas d'échantillons de lait cru contaminés par *Bacillus cereus* avec un taux inférieur à 350 ufc/ml.

Notermans *et al* (1997) ont clairement indiqué que *Bacillus cereus* présent dans le lait peut constituer un risque pour la consommation et que la dose limite tolérable est de  $10^4$  *Bacillus cereus*/ml. A ce taux *Bacillus cereus* est potentiellement dangereux.

*Bacillus cereus* peut être introduit dans le lait à partir d'une variété de sources de contamination pendant la production, la manipulation et le traitement. La source de contamination qui revient le plus dans la littérature est le sol. Dans le Tableau N°12 : figurent l'incidence et les niveaux de contamination par *Bacillus cereus* dans les différentes sources de contamination dans les fermes étudiées

**Tableau N°12 : Incidence et niveaux de contamination par *Bacillus cereus* dans les différentes sources de contamination étudiées.**

Echantillons	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons positifs	Incidence (%)	Niveau de contamination
Peau de mamelle	189	53	28,04	$10$ à $10^3$ ufc/25 cm <sup>2</sup>
Paroi interne machine à traire	130	69	53,08	$10$ à $10^5$ ufc/25 cm <sup>2</sup>
Paroi interne Cuves à lait	151	40	26,49	$10$ à $10^4$ ufc/25 cm <sup>2</sup>
Litière de l'étable	192	101	52,60	$10$ à $10^7$ ufc/g
Ambiance de l'étable	190	63	33,16	$10$ à $10^2$ ufc/boite

La présence des spores dans le sol dépend de divers facteurs comme l'irrigation, la fertilisation, la saison et le climat (Watanabe et Hayano, 1995 ; Von Stetten et al, 1999). Le taux de présence des spores de *Bacillus cereus* dans le sol est généralement élevé : entre  $10^3$  et  $10^7$  spores/g (McKinnon et Pettifer, 1993 ; Te Giffel et al, 1995b ; Slaghuis et al, 1997).

L'air, l'eau, la litière, l'alimentation, le pâturage, la mamelle, les excréments des vaches et les équipements de la traite sont généralement cités comme sources de contamination du lait dans lesquels *Bacillus cereus* ferait partie de la flore dominante (Andersson et al, 1995 ; Felske et al, 1998, Griffiths et Phillips, 1990, , Te Giffel et al, 1995b, Te Giffel, 1997 ; Van Heddghem et Vlaemynck, 1993 ; Walker, 1988).

Les résultats de ce travail sont comparables à ceux décrits par Slaghuis et al (1997) qui ont montré la présence de *Bacillus cereus* dans 41 des 78 échantillons de litière. Te Giffel (1997) a trouvé que les principales sources de contamination étaient le sol ( $10^3$  à  $10^7$  ufc/g) et les fèces ( $<10$ - $10^4$  ufc/g). Ceux-ci souilleront la mamelle ayant pour résultat la contamination du lait cru. Mckinnon et Pettifer (1993) ont trouvé que le nombre de spores de *Bacillus cereus* dans le sol est de  $10^3$  à  $10^7$  ufc/g et dans l'herbe était de  $10^3$  à  $10^5$  ufc/g. Christiansson et al (1999) ont trouvé un nombre moyen de spores dans le sol de 1450 spores/g..

Herlin et Andersson (1996) ont trouvé des souches identiques ou presque identiques dans le sol, le lait des vaches et les cuves de stockage du lait. Quelques isolats du fumier étaient également semblables à ceux du lait et du sol.

Te Giffel et al, (1995) ont trouvé que l'herbe, l'ensilage, le concentré et les fèces pouvaient contenir plus de  $10^4$  ufc/g. Ces mêmes auteurs ont montré également que la litière utilisée contient de temps en temps des nombres importants de spores dépassant  $10^4$ /g. Slaghuis et al (1997) ont trouvé que l'extérieur de la mamelle pouvait être une source importante de contamination. Des résidus de fèces peuvent rester sur la mamelle si celle-ci n'est pas bien nettoyée.

Christiansson et al (1999) ont trouvé *Bacillus cereus* dans l'air avec un taux de 100 ufc/m<sup>3</sup> considérant ainsi l'air comme une source peu importante de contamination.

La salle et l'équipement de traite peuvent également avoir des conséquences sur la contamination du lait cru (Austin et Bergeron, 1995, Te Giffel, 1997, Slaghuis, et al, 1997, Enröth, 1999). Dans notre étude, toutes les fermes procèdent à la traite mécanique mais huit fermes ne disposent pas de salle de traite appropriée. Pour toutes les fermes, les machines à traites sont lavées après chaque traite puis rincées à l'eau javellisée à l'exception d'une ferme qui utilise un détergent « biocide ». Rönner et Husmark (1992) et Andersson et al (1997) ont montré que le processus de nettoyage n'élimine qu'une partie de la population des spores présente à la surface de la cuve en acier inoxydable. Il est connu que les spores ont la capacité de s'y adhérer. Te Giffel et al (1996) ont montré que 35% d'échantillons prélevés à partir des cuves de collecte et de stockage contiennent *Bacillus cereus*.

L'observation des causes de contamination laisse suggérer que l'absence de bonnes pratiques d'hygiène manifeste en est la principale. Le niveau de propreté constaté dans les étables ne répond guère aux normes d'hygiène.

Le nettoyage des machines à traire au niveau des fermes étudiées s'effectue toujours avec de l'eau javellisée, alors que les méthodes de nettoyage se développent. Un rinçage de la

machine à traire avec une eau froide directement après la traite, suivi d'un traitement acide et alcalin à chaud suivi d'un rinçage serait mieux adapté. (Richard, 1985)

Dans les fermes étudiées, le trayeur se soucie peu de son hygiène vestimentaire et corporelle, et les premiers jets de laits ne sont pas toujours éliminés au niveau de certaines fermes. Ces jets sont toujours fortement contaminés et constituent un véritable danger.

Il faut également noter le manque de formation zootechnique ou même agronomique pour tous les éleveurs, mais surtout le manque de professionnalisme noté chez la plupart des personnes ayant une relation avec la production du lait cru à la ferme.

#### **I. 1. 6. Les analyses microbiologiques du lait cru : Conclusion**

Les résultats obtenus concernant l'incidence de *Bacillus cereus* dans le lait cru et dans l'environnement fermier soulignent le manque d'hygiène constaté tout au long de la chaîne de production. Les souches de *Bacillus cereus* ont été isolées de toutes les sources de contamination examinées avec un taux qui diffère d'une source à l'autre. La maîtrise de *Bacillus cereus* dans le lait cru doit donc passer avant tout par un contrôle minutieux des sources de contamination.

Afin de satisfaire aux exigences actuelles en matière de qualité bactériologique du lait cru, les méthodes d'élevage au niveau des fermes spécialisées dans la production laitière doivent être revues et développées pour minimiser au maximum les risques de contamination.

Plusieurs insuffisances ont été constatées au niveau de la disposition, de l'architecture et de l'utilisation des bâtiments. L'étable fait parfois office de salle de traite, ce qui est fortement déconseillé du point de vue hygiénique. Les systèmes d'évacuation des eaux usées au niveau de l'étable sont inefficaces voire inexistantes. Les allées ne sont pas empierrées. Le stockage de bouses se fait dehors ou dans des salles assez proches de l'étable ou du lieu de stockage de fourrage et aliments concentrés.

La disposition et l'architecture de certains bâtiments est à revoir complètement afin d'éviter que les contaminations extérieures n'atteignent la salle de traite et ne contaminent le lait. Des distances de sécurité séparant les différents bâtiments au niveau d'une même ferme doivent être respectés. Dans tous les cas, des salles de traite conformes aux normes d'hygiène doivent être réalisées.

De plus, il serait souhaitable de remplacer la machine à traire par un système lactoduc conçu pour éviter tout contact du lait avec l'extérieur et pour respecter la chaîne de froid, afin d'éviter les multiplications de la flore totale et psychrotrophe.

Sachant que le nombre des germes thermorésistants du lait cru conditionne la durée de conservation du lait pasteurisé (Franklin, 1970, Ravanis et Lewis, 1995), il serait judicieux de lier le prix du lait à sa qualité bactériologique sinon dans un premier temps, le complexe laitier se doit de refuser les laits fortement contaminés.

## **I. 2. Résultats et discussion des analyses microbiologiques du lait au niveau du complexe laitier**

### **I. 2. 1. Les Résultats**

Les résultats des analyses microbiologiques du lait au niveau du complexe laitier (voir en annexe) montrent la présence d'une importante charge microbienne (germes totaux, flore thermorésistante et *Bacillus cereus*) et ceci à toutes les phases du diagramme des opérations (des matières premières au transport du produit fini).

Un lait destiné à la pasteurisation ne doit pas contenir plus de  $2 \cdot 10^6$  germes/ml. Le taux anormalement élevé de la flore total dans le produit fini (de  $10^4$  à  $10^6$  ufc/ml) alors qu'il n'est permis que  $3 \cdot 10^3$  germes/ml au maximum. Cette importante charge microbienne dans le produit fini, malgré l'application d'un barème de traitement thermique sévère ( $85^\circ\text{C} / 2\text{mn}$ ), est révélateur d'une insuffisance de maîtrise des bonnes pratiques d'hygiène et des règles de BPF qui conditionnent le travail au sein d'une industrie agro-alimentaire.

La contamination est importante tout au long du process de fabrication du lait pasteurisé. Le pasteurisateur n'est pas dans un état de fonctionnement optimum (pannes fréquentes, étanchéité non assurée, barème imprécis), Les conditions de réception du lait cru constituent un facteur d'apport de contamination microbienne importante car elles s'effectuent manuellement à l'extérieur de l'atelier au détriment des règles d'hygiène. La mauvaise hygiène corporelle et vestimentaire du personnel et l'état du matériel en général vieux, usés. Les canalisations comportent de nombreux points de fuites.

Le contrôle de l'ambiance effectué, en disposant des boîtes de Pétri sur les tanks de lait avant pasteurisation et celui du lait pasteurisé avant conditionnement (souvent ouverts) et au niveau de la conditionneuse, prouve en effet, que la contamination aéroportée est importante. Cela implique que les tanks font l'objet d'une contamination par l'air ambiant.

La présence d'insectes qui pénètrent dans les tanks car attirés par les produits laitiers participent également à la contamination du produit.

L'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection NEP (CIP) n'est pas assurée. L'équipement est mal entretenu et souvent en panne. La durée du nettoyage et les concentrations des solutions (acide et base) ainsi que la température de l'eau ne sont pas maîtrisées.

La contamination post-pasteurisation, surtout au moment du conditionnement, est avérée et importante. La prolifération microbienne dans le produit à ce niveau est principalement due à l'état des conditionneuses, au dispositif de traitement UV défaillant, à l'inexistence d'un plan de nettoyage et désinfection, aux mauvaises conditions de stockage du film plastique qui sert d'emballage et surtout au non respect des consignes de froid tout au long de la chaîne de fabrication du produit, (la température se situe entre 10 et 15°C tout au long du process)

La détermination de certains paramètres physico-chimiques peut aider à prévoir son devenir sur le plan microbiologique. Ces analyses sont rapides et simples et réduisent sensiblement le temps d'attente du lait avant pasteurisation. Elle permet également la mise en vente immédiate du lait pasteurisé conditionné sans attendre les résultats d'analyses microbiologiques qui ont pour inconvénient d'être lourdes.

D'une manière générale les résultats des analyses physico-chimiques sont à la limite de l'acceptable. A la lumière de ces résultats il apparaît que la contamination du produit a lieu même après la pasteurisation.

## II. Mise en place de la démarche HACCP au niveau des fermes

### II. 1. Audit sanitaire des fermes

Sur les douze fermes ayant fait l'objet de l'étude, Trois fermes situées dans la région de Tlemcen, jugées représentatives, ont été sélectionnées pour l'application du système HACCP. L'étape d'audit a été effectuée sans un référentiel reconnu au niveau international.

Nous nous sommes inspirés d'un check-list de contrôle des producteurs de lait cru du gouvernement Canadien. La première étape de notre étude a consisté à évaluer le degré de conformité des fermes en matière des pratiques d'hygiène. Des informations concernant ces fermes sont données sur le tableau N°13.

**Tableau N°13 : Fiches techniques des fermes étudiées**

Exploitations	Ferme A	Ferme B	Ferme C
Statut juridique	EURL filiale ONCV.	Ferme privée	EAC
Effectif :	1 Directeur	1 gérant	
	1 Ingénieur	1 technicien	02 gérants
	1 technicien	1 vétérinaire	06 ouvriers
	4Ouvriers laitiers dont 1 trayeur	4 ouvriers	
Situation géographique	Saf-Saf.	Ain El Hadjar	Taâounia
Limitation : Nord/Sud/Est/Ouest	Emielle/Ain-Fezza/Sidi- El-Abdli/ Chetouane	Ferme Boukhalfa / Ferme Bouhadjar / RN 02 / Ferme Brixi	Ferme Abd el Djabbar / Ferme Bouchenafa / Ferme Benazza / Ferme Boukhalfa et RN
Réseau de distribution	GIPLAIT	GIPLAIT	GIPLAIT
Collecte	Camion GIPLAIT Dimanche, mardi	Quotidiennement (en camion réfrigéré privé de la ferme)	Dimanche, Mardi et Jeudi
Surface totale de la ferme	1097 hectares	37 hectares	59 hectares
Surface de l'étable	840 m <sup>2</sup>	500 m <sup>2</sup>	220 m <sup>2</sup>

Tableau N°13 (suite) : Fiches techniques des fermes étudiées

<b>Production :</b>	Agricole et laitière	Agricole et laitière	Agricole et laitière
<b>Nombre de têtes par catégorie d'âge :</b>	30 vaches laitières	41 vaches laitières	18 vaches laitières
	27 veaux et velles	3 veaux et velles	14 veaux et velles
	7 vaches tarées	7 vaches tarées	1 taureau
	3 taureaux	2 taureaux	
<b>Race (s)</b>	Holshtein pie noir	Holstein pie noire Française Holstein pie noire Allemande Montbéliarde	Holstein Hollande pie noir
<b>Elevage : type de stabulation</b>	Entravée	Libre	Libre avec parcage
<b>Alimentation</b>	Fourrage vert et sec Concentré VL	Fourrage vert et sec Concentré VL	Fourrage vert et sec Concentré VL
<b>Horaire de traite</b>	Matin : 2h 30mn / Soir : 14h 30mn	Matin : 6h / Soir : 16h	Matin : 5h / Soir : 17h
<b>Production journalière moyenne / vache</b>	10 litres/jour/vache.	14 litres/jour/vache	10 litres/jour/vache

Les résultats de l'inspection sanitaire des trois fermes retenues sont synthétisés dans le tableau N° 14.

La disposition, l'architecture et l'utilisation des bâtiments, présentent plusieurs insuffisances dont les plus importantes sont :

A l'exception de la ferme C, l'étable fait office également de salle de traite, ce qui est fortement déconseillé du point de vue hygiénique. Les systèmes d'évacuation des eaux usées au niveau de l'étable ne sont pas entretenues et laisse stagner l'eau pendant de longues durées. Comme les étables ne disposent pas d'assez de bouches d'aération et de fenêtres, il y règne toujours une odeur nauséabonde.

Les bouses sont stockées dans les environs immédiats de l'étable, ou de la salle de stockage des fourrages et aliments concentrés et les allées entre les différents locaux de la ferme ne sont pas empierrées.

Le niveau de propreté constaté dans les étables ne répond pas en général aux règles d'hygiène admises afin d'éviter toute contamination extérieure du lait cru à la ferme.

L'insuffisance du nettoyage des machines à traire qui s'effectue toujours avec de l'eau javellisée, alors que les méthodes de nettoyage sont de plus en plus développées et mieux adaptées. Après le rinçage de la machine à traire avec une eau froide directement après la traite, aucun traitement acide ni alcalin à chaud n'est pratiqué.

Le trayeur se soucie peu du respect de l'hygiène vestimentaire et corporelle, notamment le nettoyage et la désinfection de ses mains avant la traite. Les premiers jets ne sont pas toujours éliminés. Ces jets sont fortement contaminés et constituent un véritable danger en augmentant considérablement la flore initiale du lait cru. Le mauvais nettoyage des mamelles -parfois même son inexistence- entraîne un surplus de contamination par la peau des trayons.

Il faut noter le manque d'informations et de professionnalisme pour certains éleveurs, mais surtout le manque de motivation chez la plupart des personnes ayant une relation avec la production du lait cru à la ferme que nous avons rencontrées.

Les résultats concernant *Bacillus cereus* que nous avons obtenus dans les échantillons de lait cru et dans son environnement soulignent ce manquement aux règles d'hygiène constaté au niveau des fermes visitées. La maîtrise de la contamination microbienne en général et de *Bacillus cereus* en particulier passe par un respect rigoureux des bonnes pratiques d'élevage et des bonnes pratiques d'hygiène dans les fermes.

Tableau N°14 : Résultats de l'inspection sanitaires des fermes étudiées

ETAPES	CAUSES DU DANGER	FERME MODELE	FERME A	FERME B	FERME C
MAIN D'ŒUVRE	Formation du personnel	-Stages	+	-	-
		-Pratique ou expérience quotidienne	+	+	+
Hygiène du trayeur	-consignes au remplaçant	-tablier + hygiène vestimentaire	+	-	-
		-nettoyage des mains	+	-	-
Disponibilité pendant la traite	-nombre de trayeur /vache	1/10 VL	1/37 VL	2/14 VL	1/8 VL T.mécanique 1/2-3VL T.manuelle
	-disponibilité du trayeur	+++	++	++	++
METHODES					
-Introduction des vaches laitières	-Calmement	+	VL en stabulation permanente	+	+
-Elimination des premiers jets		+	+	+	+ou-
Nettoyage trayons	-nettoyage avant chaque traite	+	+	+	+
	-nettoyage avec eau	+	+	+	+
	-nettoyage avec eau javellisée	+	+ou-	+ou-	+ou-
	-nettoyage avec eau savonneuse	+	-	-	-
	-nettoyage bien fait	+	+	-	-
	-ustensils de net	lavette	éponge	mains	Mains
-Essuyage des trayons		+	-	-	-
-Filtre de la machine à traire	-présent	+			
	-propre	+			

Tableau N°14 (suite et fin) : Résultats de l'inspection sanitaires des fermes étudiées

-tank	-suivre méthode de nettoyage -température -thermostat fonctionnel	+ 4°C +	Eau javellisé+ISIS 0-5°C + (2 tanks)	Eau javellisée	Eau+ISIS Basse température -
<b>MILIEU</b>					
-Propreté de l'étable	-présence de bouses pendant la traite -nettoyage de l'étable	- +++	+ changement litière	+ après traite du soir	+ 1 fois/semaine
-Parcours accès	-empierré -propre	+ +	- +ou-sale	- +ou-sale	- +ou-sale
-Salle de traite	-Etat des lieux : propreté	+	+	+	+
	-aération	+	+	-	- + 1
	-lavage du quai au jet d'eau	+	- mais + en été	-	fois/semaine
	-souillures pendant la traite	-	+(bouses et litière)	+ou- (bouses)	+(bouses)
	-sol terre propre	+	+ou- sale	+ou- sale	ou- sale
-propreté des murs	+	+ou- sale	+ou- sale	-	
-humidité aux murs	-	-	-	+	+
-température de la salle			température saisonnale	température saisonnale	température saisonnale

## II. 2. Délimitation de l'étude et constitution de l'équipe :

Cette étude HACCP prend en compte uniquement le danger microbiologique. Cet aspect de la sécurité sanitaire est fondamental de toute production laitière. L'étude met l'accent autant que faire ce peut sur *B. cereus* au cours de la production du lait cru de vache à la ferme. Le danger consiste en la contamination du lait cru par cette bactérie. Il s'agit de la détecter lors des différentes étapes de la préparation de la traite jusqu'au transfert du lait à l'unité.

Au niveau de chaque ferme, l'équipe HACCP est constituée des membres suivants :

- Le responsable de la ferme, ou l'ingénieur ou le vétérinaire le cas échéant
- L'ouvrier responsable de la traite
- Le responsable de l'étude assisté de deux stagiaires

### II. 3. Description du produit :

En 1909 le congrès international de la répression des fraudes a défini le lait destiné à l'alimentation humaine comme suit : Le lait est le 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. Cette définition a été reprise par la législation algérienne à travers l'article 3 de l'arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécification et la présentation de certains laits de consommation (voir en annexe 3)

La F.I.L (fédération internationale du lait) (1983) définit le lait comme étant : le produit de la sécrétion mammaire normale, obtenu par une ou plusieurs traite, sans aucune addition ou soustraction.

Par convention (en Algérie par réglementation article 4 de l'arrêté interministériel sus-mentionné) - la dénomination « Lait » sans précision de l'espèce est réservée au lait de vache, tout autre lait doit être suivi de l'espèce dont il provient (lait de brebis, lait de femme, etc.)

Certains laits sont impropres à la consommation humaine

- 1) Lait provenant d'animaux malades.
- 2) Lait coloré, malpropre ou malodorant.
- 3) Le lait contenant du colostrum (lait provenant d'une traite opérée moins de 7 jours après la mise bas.
- 4) Le lait provenant d'animaux mal nourris et manifestement surmenés.
- 5) Le lait contenant des antiseptiques ou des antibiotiques.
- 6) Le lait coagulant à l'ébullition.
- 7) Le lait dont le nombre de leucocytes dépasse un certain seuil (nombre > à 500 000 cellules/ml).

La dénomination « Lait cru » est réservée au lait n'ayant pas été soumis à un traitement thermique.

Une fiche descriptive du produit « lait cru » est représentée dans le tableau N°15.

### II. 4. Utilisation du produit :

L'utilisation du lait cru de ferme peut suivre 2 voies différentes (Tableau N°16) :

Il peut être consommé directement ou transféré à la laiterie pour être transformé en divers produits : Lait pasteurisé ; Laits fermentés (leben, yaourts...etc) ; Beurre ; Différents fromages.

**Tableau N° 15 : Fiche descriptive du lait cru**

<p>ETUDE HACCP</p> <p><b>TITRE : Production de lait cru</b></p>	<p align="center"><b>Formulaire 01</b></p>
<p align="center"><b>DESCRIPTION DU LAIT CRU</b></p>	
<p><b>Produit étudié</b> : Lait cru de vache  <b>Temps de conservation</b> : 48h maximum à la ferme  <b>Température de conservation</b> : &lt; 6°C</p> <p><b>Caractères organoleptiques :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Couleur : Blanc mat à Blanc jaunâtre</li> <li>• Odeur : faible</li> <li>• Saveur : agréable</li> <li>• Consistance : homogène.</li> </ul> <p><b>Caractères physiques :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pH (20°C) : 6.5 à 6.7</li> <li>• Acidité titrable : 15 à 18°D</li> <li>• Densité : 1.028 à 1.036</li> <li>• Température de congélation : - 0.51 à - 0.55°C</li> </ul> <p><b>Caractères physico-chimiques :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Matière grasse : 34g/l</li> <li>• Stabilité à l'ébullition : stable.</li> </ul> <p><b>Caractères microbiologiques :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Germes totaux : maximum 2.10<sup>6</sup> ufc/mL</li> <li>• Germes pathogènes : absence</li> <li>• Salmonelles : absence</li> </ul> <p><b>Valeur énergétique</b> : 64 Kilocalories par 100g .</p>	



**Tableau N°16 : Fiche représentative de l'utilisation attendue du lait cru**

ETUDE HACCP		Formulaire 02
<b>TITRE : Production de lait cru</b>		
IDENTIFICATION DE L'UTILISATION ATTENDUE DU PRODUIT		
Nom du produit : Lait cru de vache		
<p><b>Durée de vie préconisée :</b> 48h maximum.</p>	<p><b>Durée utilisation consommateur :</b> 72h maximum après traitement thermique ou ébullition</p>	
<p><b>Instruction conservation recommandée :</b> Garder à une température inférieure ou égale à 6°C.</p>	<p><b>Modalités conservation :</b> A la ferme : Conservation à une température max 4°C. Réception à la laiterie : max 6°C <b>Modalités conservation consommateur :</b> la chaîne de froid continue</p>	
<p><b>Instruction mode emploi Annoncé :</b> Consommation après ébullition ou traitement thermique. Ne pas consommer cru</p>	<p><b>Mode emploi prévisible :</b> Autoconsommation à l'état cru</p>	
<p><b>Population ciblée par le produit :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Enfants ;</li> <li>- Adultes ;</li> <li>- Femmes enceintes.</li> </ul>	<p><b>Autres consommateurs potentiels :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Personnes de 3<sup>ème</sup> âge ;</li> <li>- Nourrissons.</li> </ul>	

**5- Construction du diagramme de fabrication**

Le diagramme de production du lait cru que nous avons élaboré sert de base à la présente étude HACCP. Nous l'avons construit de manière à ce qu'il soit une représentation précise couvrant toutes les étapes allant de l'entrée des vaches laitières jusqu'à l'arrivée du lait à l'unité.

La Commission du Codex Alimentarius stipule que lors de l'application du système HACCP à une opération donnée, il convient d'étudier les étapes antérieures et postérieures à l'opération en question. Partant de ce principe, nous avons élargi notre champ d'étude aux procédures de nettoyage, car il s'agit avant tout d'un travail préventif.

Ce travail a aboutit au diagramme théorique suivant (figure N° 4).

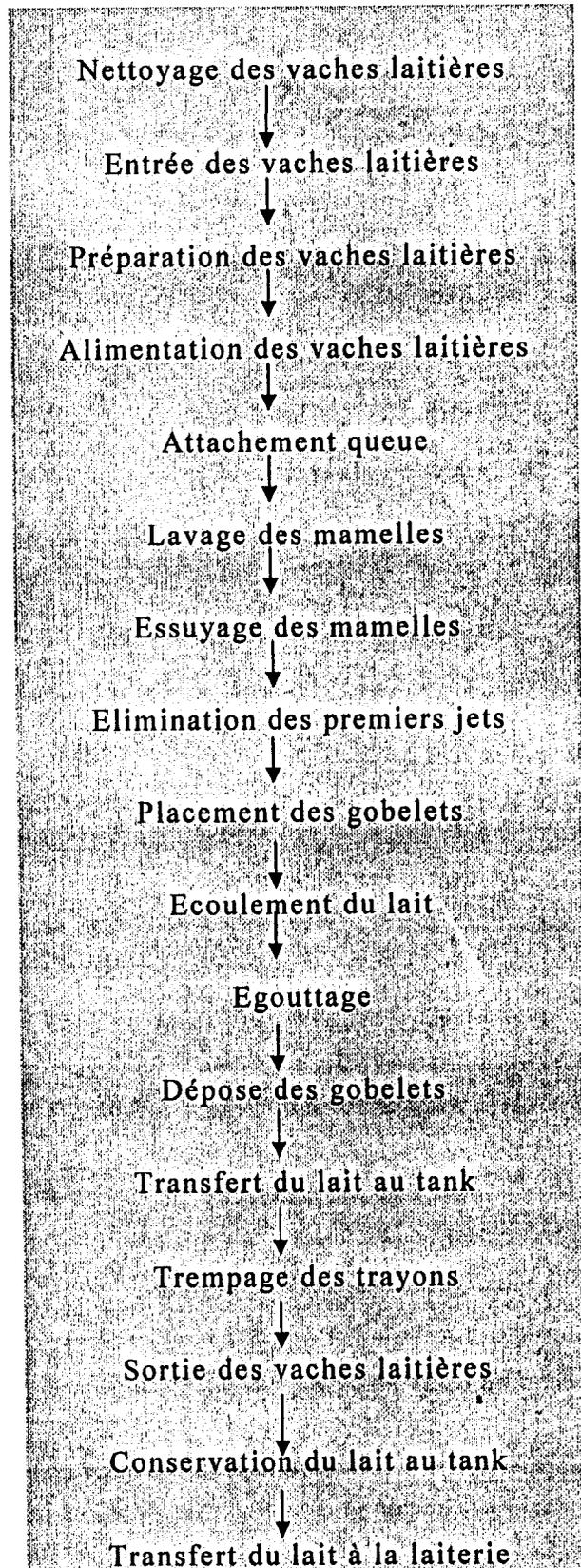


Figure N° 4 : Diagramme théorique de la production du lait cru

La qualité du lait cru exige que des précautions minutieuses soient prises principalement au moment de la traite. Avant leur entrée en salle de traite, les vaches sont lavées et brossées quotidiennement d'abord avec une brosse dure ensuite une autre douce, L'entrée des vaches laitières en salle de traite se fera calmement et disposées à leur place habituelle, puis attachées . La queue sera également immobilisée par un serre queue en évitant tout geste stressant pour l'animal. Ces opérations sont effectuées sans l'intervention du trayeur.

La distribution des concentrés est faite dans une aire d'attente intégrée à la salle de traite.

Le lavage de la mamelle agit comme un stimulus et permet de limiter les risques de contamination du lait par les germes se trouvant dans les souillures collées sur le pis.

Un bon lavage doit être effectué avec une eau savonneuse propre et renouvelée, dont le dosage en antiseptique ne doit pas irriter les mamelles. Le lavage est suivi obligatoirement d'un essuyage afin d'éviter que les ruissellements des souillures diluées ne passent dans les manchons trayeurs. Cet essuyage doit être effectué avec une serviette propre en un mouvement remontant. Les premiers jets sont impérativement éliminés dans un récipient propre.

Dès que la vache est préparée, il convient de poser rapidement les gobelets trayeurs. Une traite pour être efficace doit être rapide, complète et faite à heures fixes. La présence du trayeur est exigée pour le bon déroulement de cette étape. L'écoulement du lait doit s'effectuer par gravité vers le bocal de réception, sans insufflation d'air. Le lait juste issu de la mamelle de l'animal est considéré comme pratiquement aseptique, mais le premier contact avec l'extérieur de la mamelle, l'air ambiant ou le matériel de traite entraîne une contamination plus ou moins importante. Une traite bien faite avec une machine bien réglée et des vaches laitières bien stimulées, laisse entre 0 et 3% de lait riche en matière grasse pouvant être récupéré à l'égouttage. Lorsque le lait ne coule plus, il suffit de masser et de relever la mamelle d'une main et d'opérer une légère traction sur les gobelets de l'autre pour que les derniers jets d'égouttage soient obtenus.

La salle de traite est nettoyée après chaque traite. Il consiste en un brossage complet avec utilisation de détergent et un nettoyage au jet d'eau. Le choix des revêtements de murs et de sols est essentiel pour un nettoyage rapide et efficace, Deux fois par an, la salle de traite est désinfectée. Le matériel de traite doit être de conception hygiénique.. Si cette opération est supprimée dès la première lactation, les vaches laitières s'y habituent très bien mais cela entraîne une contamination des quantités restantes de lait au niveau de la mamelle. Après la traite, les gobelets trayeurs sont décrochés de la mamelle puis déposés sur leur portoir dans le but de les maintenir propres pour la prochaine vache laitière. Le transfert du lait dans les bidons de la machine à traire, doit s'effectuer immédiatement après chaque dépose des gobelets. La température de la cuve de stockage doit être de 4°C. Le refroidissement du lait permet un

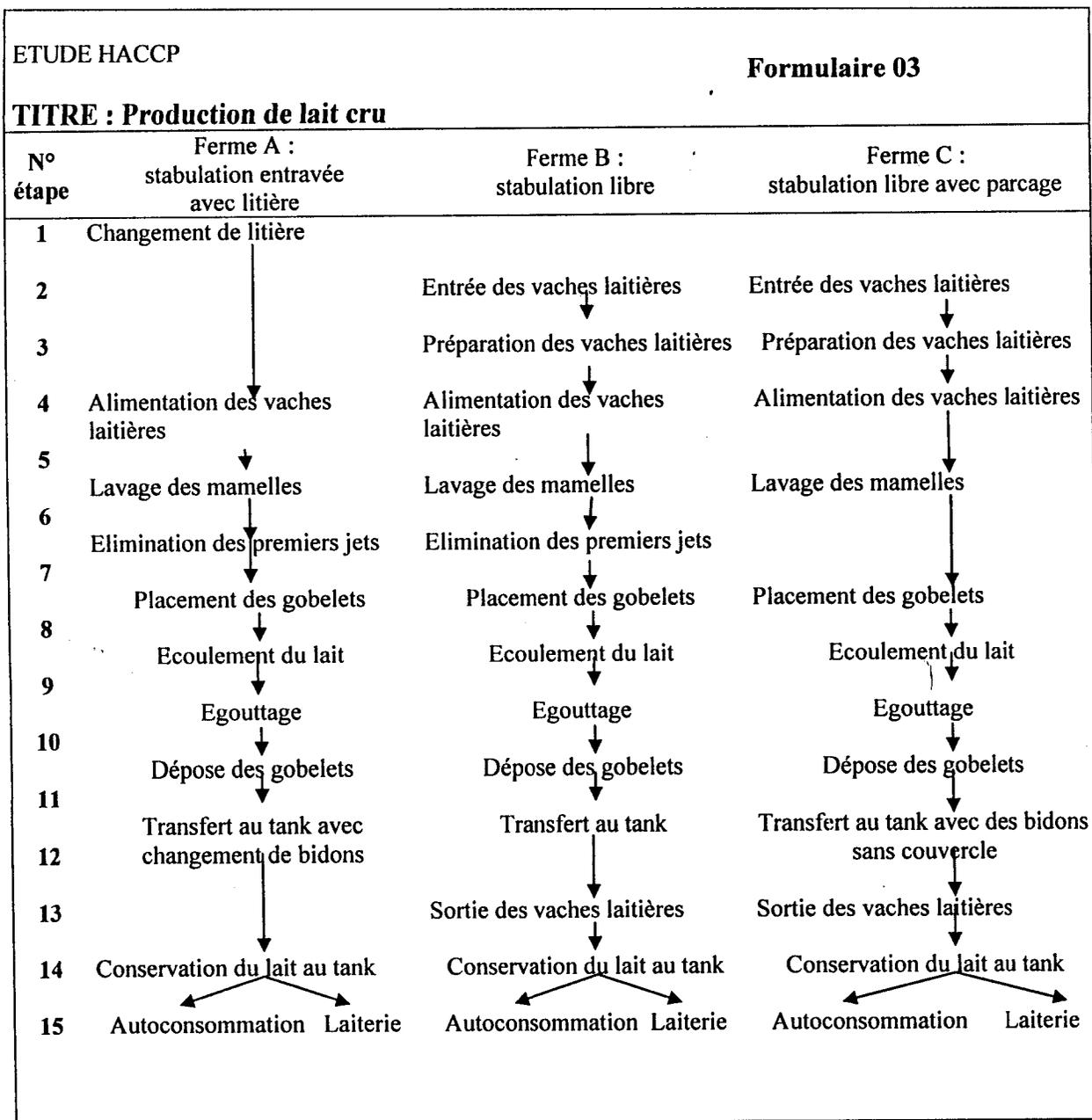
ramassage tous les deux jours. Cette température doit être homogène. Une agitation modérée du lait évite une remontée des globules gras. Le nettoyage du tank doit s'effectuer après chaque transfert de lait à la laiterie. Diverses méthodes peuvent être appliquées par brossage avec une solution alcaline chlorée chaude ou à l'aide d'un programmeur utilisant des solutions chaudes ou froides de produits détergents (Richard et al, 1981)

La sortie des vaches laitières doit être rapide mais pas brusque. En obéissant à la règle de la marche en avant..

Lors du transport du lait, les chocs doivent être évités au maximum pour ne pas entraîner de dégradations due à la lipolyse et la protéolyse. La chaîne de froid doit être ininterrompue : les camions-citernes étant réfrigérés et le lait n'est jamais au contact de l'air ambiant. Le chargement et le déchargement s'effectuent par tuyauterie.

Nous avons confirmé les opérations de production au niveau de chaque ferme en les comparant au diagramme de production théorique établi. La vérification passe par une modification pour certaines étapes et même des informations complémentaires qui s'avéraient inexactes. Les diagrammes de production confirmés pour chaque ferme sont donnés par le Tableau N°17.

Tableau N°17 : Diagrammes confirmés au niveau des fermes



### 6. Analyse des dangers

Lors de cette étude, le danger que nous avons traité est la contamination du lait cru par *Bacillus cereus*. En respectant le champ de l'étude, nous avons établi une liste des causes d'apparition de ce danger comprenant les sources de contamination qui lui sont propre, et dont l'élimination ou la réduction à des niveaux acceptables est essentielle au regard de l'innocuité du produit lait cru tableau N° 16

Les mesures préventives que nous avons établies correspondent aux actions et aux activités requises afin de prévenir l'apparition du danger ou de réduire son impacte à un niveau acceptable (Tableau N°18). Plus d'une mesure préventive peut être nécessaire pour maîtriser un danger donné, et plusieurs dangers peuvent être maîtrisé par une même mesure préventive.

**Tableau N° 18 : Tableau d'analyse des dangers et mesures préventives relatives au lait cru.**

ETUDE HACCP ANALYSE DES DANGERS ET MESURES PREVENTIVES TITRE : Production de lait cru				Formulaire 04
Etapas de production		Dangers identifiés	Causes des dangers	Mesures préventives
Nettoyage étable		Contamination par la litière.	- Pas de changement de litière avant la traite. - Changement incorrect et incomplet de la litière. - Changement avec une litière déjà contaminée.	- L'élimination totale de la litière est la recommandation primordiale. - Changement complet de litière avant chaque traite avec un lavage et curage à grande eau du quai. - Stocker la litière dans un entrepos à l'abri des contaminants.
Aération		1-Contamination par l'ambiance surchargée en micro-organismes. 2-Elargissement du champ de contamination.	1-Pas suffisamment de bouches d'aération. -Température élevée favorable à la croissance des micro-organismes. 2-Présence de courants d'air. -Fenêtres sans fermetures. -Adhésion des spores aux différentes surfaces.	1-Présence de bouches d'aération suffisantes. 2-Eviter les courants d'air. -Présence de fenêtres avec fermeture.
Elimination des sur-contaminants		1-Contamination par les animaux sauvages. 2-Contamination par les insectes (mouches). 3-Contamination par les animaux domestiques.	1-Présence des macro-nuisibles et des rongeurs. 2-Agacement des VL constituant une ambiance stressante et accentuant les mouvements de queue. -Insectes considérés comme vecteur de transmission des germes. 3-Présence de chiens, poules...etc	1-Compagne de dératisation efficace. 2-Pose de treillage fin aux ouvertures. -Enlèvement régulier de fumier. -Eloignement des dépôts de fumier et lisier. -Nettoyage permanent des stalles, mangeoire, auge...etc -Lutte chimique. 3-Attachement ou éloignement des animaux au moment de la traite.

Tableau N° 18 suite : Tableau d'analyse des dangers et mesures préventives relatives au lait cru.

Nettoyage des VL (Brossage)	1-L'ambiance contaminée lors du brossage constituant une source de contamination. 2-Contamination par les VL elles même.	1-Brossage effectué en salle de traite.  2-Pas de brossage ou très rarement. -Brossage rapide et mal fait. -Brosse sale ou usée.	1-Brossage effectué en dehors du lieu de traite (aire d'attente).  2-Brossage bien fait quotidiennement ; -Brosse bien propre. -Brosse renouvelée en cas d'usure.
Entrée des VL	1-Contamination par l'air ambiant -Contamination par les saletés dues aux frottements des vaches. 2-Contamination par <i>B.cereus</i> du sol.	1-Entrée des VL précipitamment.  2-Parcours accès non-empierré. -Parcours accès sale.	1-Entrée des VL calmement sans perturbations.  2-Parcours accès empierré et nettoyé.
Préparation des VL  Disposition des VL	-Contamination du trayeur	-Contact direct du trayeur avec la vache.	-La disposition se fait par une autre personne que le trayeur. -Si la disposition est faite par le trayeur, le changement de tenue et le lavage soigneux des mains sont obligatoires.
Attachement des VL	1-Contamination du trayeur  2-Contamination par l'ambiance	1-Contact direct du trayeur avec la vache.  2-Présence d'animaux domestiques au cours de la traite.	1-Attachement effectué par une autre personne que le trayeur. -Si c'est le trayeur, changement de tenue et lavage soigneux des mains. 2-Eloignement et attachement des animaux domestiques.

**Tableau N° 18 suite : Tableau d'analyse des dangers et mesures préventives relatives au lait cru.**

Alimentation	-Contamination par l'ambiance	-Aliments déjà contaminés par les spores de <i>B.cereus</i> .	-Assurer l'innocuité de l'aliment. -Alimentation dans une aire d'attente.
Attachement queue	-Contamination de l'atmosphère environnante.	-Mouvements de queue de l'animal.	-Attachement par une tierce personne ou utilisation d'un dispositif spécifique : « serre queue ».
Nettoyage mamelles Nettoyage du trayeur	-Contamination par le trayeur.	1-Trayeur malade. 2-Tenue vestimentaire contaminée. 3-Mains du trayeur non ou mal nettoyées. 4-Mains du trayeur recontaminées et non renettoyées.	1-Visite médicale. 2-Tenue vestimentaire propre et facile à désinfecter. 3-Lavage soigneux des mains. 4-Eviter les gestes non contrôlés : contact avec la vache, toucher aux ustensiles de travail contaminés...etc
	1-Contamination directe du lait par les mamelles. 2-Contamination indirecte du lait par les ustensiles de nettoyage.	1-Pas de lavage. -Lavage rapide et mal fait. -Lavage à la main. 2-Pas de lavette. -Lavette unique. -Lavettes multiples et lavées dans la même eau de rinçage. -Lavette mal ou non désinfectée. -Texture de la lavette non-spécifique qui contribue à la contamination. -Pas d'eau de trempage pour les lavettes entre les traites. 3-Eau de lavage sans désinfectant. -Eau de lavage non-changée. -Eau de lavage contaminée initialement. -Réceptient sale.	1-Lavage correct et efficace. -Lavage effectué avant chaque traite. 2-Lavettes multiples. -Lavettes avec texture appropriée pour le nettoyage. -Eau de trempage des lavettes utilisée entre les traites et contenant un désinfectant.
Lavage des mamelles	3-Contamination indirecte du lait par l'eau de lavage des mamelles.		3-Eau de lavage désinfectante renouvelée pour chaque vache (eau de javel à 2%). -Eau de lavage propre et non contaminée initialement.

**Tableau N° 18 suite : Tableau d'analyse des dangers et mesures préventives relatives au lait cru**

Essuyage des mamelles	1-Contamination du lait par les gouttes d'eau ruisselante. -Apparition de gerçures constituant un lieu de colonisation. 2-Contamination indirecte par les mamelles.	1-Pas d'essuyage. 2-Torchon d'essuyage sale. -Torchon d'essuyage unique pour toutes les VL.	1-Technique d'essuyage efficace. 2-Torchon propre et absorbant pour chaque vache.
Elimination des premiers jets			
Nettoyage des mains du trayeur	-Contamination par le trayeur.	-Non ou mal nettoyées. -Recontaminés par gestes non-contrôlés.	-Mains trayeur propres et renétoyées au besoin.
Récupération des premiers jets	1-Contamination microbienne par les premiers jets du lait. 2-Contamination par l'ambiance.	1-Pas d'élimination des premiers jets qui sont très contaminés. 2-Pas de récipient d'où élimination par terre (source de contamination). -Récipient sale.	1-Elimination des premiers jets obligatoirement. 2-Elimination des premiers jets dans un récipient propre contenant un antiseptique..
Vérification de l'aspect du lait			
Placement gobelets Lavage des mains du trayeur	-Contamination par B.cereus responsable de mammites.	-vache atteinte de mammites.	-Vérification et dépistage de mammites.
Placement des gobelets	-Contamination par les mains du trayeur.	-Mains mal ou non nettoyées. -Mains recontaminées par des gestes non-contrôlés.	-Mains propres relavées au besoin.
	1-Contamination par les gobelets. 2-Recontamination des mamelles.	1-Gobelets non ou mal nettoyés. -Gobelets mal placés. -Gobelets non nettoyés après chute. 2-Attente prolongée entre lavage des mamelles et placement gobelets	1-Gobelets propres après lavage correct. -Placement correct des gobelets trayeurs. -Gobelets renétoyés après chute. 2-Placement des gobelets directement après le lavage des mamelles.

**Tableau N° 18 suite : Tableau d'analyse des dangers et mesures préventives relatives au lait cru**

Ecoulement du lait	<p>1-Contamination par le matériel de traite.</p> <p>2-Contamination par les dépôts de matière grasses des parois.</p> <p>3-Contamination due aux chutes des faisceaux.</p>	<p>1-Méthode de nettoyage de la machine à traire non recommandée.</p> <p>-Bidon récolte de la machine à traire mal ou non nettoyé.</p> <p>-Filtre défectueux</p> <p>-Machine à traire en mauvais état.</p> <p>2-Coagulation des dépôts due au rinçage de la machine à traire avec de l'eau chaude à la fin de la traite.</p> <p>3-Trayeur non présent pendant la traite.</p>	<p>1-Matériel de traite lavé avec méthode efficace.</p> <p>-Matériel de traite gardé à l'abri des contaminations.</p> <p>-Pièces de la machine à traire vérifiées et renouvelées.</p> <p>2-Rinçage de la machine à traire à l'eau froide directement après la fin de traite.</p> <p>3-Présence du trayeur tout au long de la traite</p>
Ecoulement du lait (suite)	<p>4-Contamination par les faces.</p> <p>5-Contamination par l'ambiance de la salle de traite.</p>	<p>4-Déjection des VL pendant la traite.</p> <p>5-Pas de lavage au jet d'eau.</p> <p>-Pas d'utilisation de détergents.</p> <p>-Pas de nettoyage fréquent.</p> <p>-Mauvais nettoyage.</p> <p>-Stagnation des eaux usées et mauvaises odeurs.</p>	<p>4-Ecoulement des eaux bien réalisé pour l'évacuation des faces.</p> <p>-Ambiance non stressante pour éviter les excès de bouses.</p> <p>5-Méthode de nettoyage efficace au jet d'eau et un désinfectant.</p> <p>-Revêtement du sol et des murs pour un nettoyage facile et efficace.</p> <p>-Bonne et rapide évacuation d'eau.</p>
Egouttage	-Constitution de lait de rétention très contaminé.	-Contamination ascendante du lait restant.	-Effectuer l'égouttage obligatoirement sans sur-traite.
Dépose des gobelets	-Contamination par les gobelets trayeurs.	-Dépose des gobelets par terre ou dans un endroit sale.	-Dépose des gobelets sur leur portoir.

Tableau N° 18 suite : Tableau d'analyse des dangers et mesures préventives relatives au lait cru

Transfert du lait au tank	1-Multiplication bactérienne.	1-Lait gardé à température ambiante jusqu'à la fin de la traite. -Temps de transport au tank très long.	1-Lait de chaque vache transporté immédiatement au tank.  2-Bidon récolte = bidon de transport. -Bidon récolte propre. 3-Bidon récolte avec couvercle et garder toujours fermé.
Trempage des trayons	2-Contamination par le matériel de traite. 3-Contamination par l'ambiance.  -Apparition de gerçures favorisant la colonisation des trayons par les germes.	2-Bidons récolte différents des bidons de transfert au tank. 3-Bidon récolte non couvert.	1-Effectuer le trempage avec une eau tiède après chaque traite. -Remplacer le trempage par un produit gras plus un cicatrisant. 2-Nettoyage des mamelles sans agresser la peau. 3-Empierrement des chemins.
Sortie des VL	-Contamination de l'ambiance.	-Sortie des VL précipitamment.	-Sortie des VL calmement de la salle de traite.

**Tableau N° 18 suite et fin : Tableau d'analyse des dangers et mesures préventives relatives au lait cru**

<p>Conservation du lait au tank</p>	<p>1-Contamination par le tank.</p> <p>2- Une surcontamination du lait.</p> <p>3-Contamination par l'ambiance.</p> <p>4-Prolifération bactérienne jusqu'à l'altération.</p>	<p>1-Méthode de nettoyage non recommandée et non efficace.</p> <p>-Rinçage rapide sans brossage (spores de <i>B.cereus</i> adhérent aux parois).</p> <p>-Utilisation de solutions détergentes non appropriées.</p> <p>-Pas de nettoyage après chaque transfert du lait à l'unité.</p> <p>2-Ajout d'un lait très contaminé au lait précédemment conservé.</p> <p>-Immersion de mains, d'objets, ou de récipients contaminés.</p> <p>3-Ouvertures répétées du tank.</p> <p>4-Thermostat défectueux.</p> <p>-Système de refroidissement défectueux ou mal réglé.</p> <p>-Temps de conservation au tank dépassant la limite.</p>	<p>1-Nettoyage du tank avec une méthode efficace après chaque transfert de lait.</p> <p>2-Ne pas ajouter un lait suspect au lait précédemment conservé.</p> <p>-Interdiction d'immerger un objet contaminé.</p> <p>3-Minimiser les ouvertures du tank au maximum.</p> <p>4-Thermostat fonctionnel suppléé obligatoirement d'un thermomètre.</p> <p>-La limite du temps de conservation doit être respectée.</p>
<p>Transfert du lait à la laiterie</p>	<p>-Prolifération bactérienne jusqu'à l'altération.</p>	<p>1- Transfert lent.</p> <p>2-Augmentation de la température du lait au cours du transfert.</p>	<p>1-Utilisation de camion citerne refroidisseur propre.</p> <p>2-Lait toujours gardé à basse température.</p> <p>3- transfert à l'abri de l'air</p>

## 7. Détermination des CCP

La détermination des CCP dans le cadre du système HACCP, est généralement basée sur l'arbre de décision proposé par le codex alimentarius (figure N° 15 ) (Mortimore et Wallace, 1998). L'application de l'arbre de décision, nécessite le bon sens pour éviter, dans la mesure du possible, d'avoir des points de contrôle inutiles tout au long du processus de fabrication. Il se peut que des dangers à une étape où le contrôle est nécessaire pour des motifs de sécurité et qu'aucune mesure de prévention n'a été adoptée pour cette étape, oblige à modifier le processus à cette étape-là, ou à une étape précédente ou suivante, afin d'y inclure une mesure de prévention.

Les questions de cet arbre doivent être posées successivement pour toutes les étapes de la production du lait cru à la ferme afin de déterminer si l'étape considérée constitue un CCP pour le danger « contamination par *B.cereus* ».

Les 11 CCP que nous avons identifiés tout au long de la production du lait cru à la ferme, sont représentés dans le tableau N° 19.

Les procédures de nettoyage sont appliquées afin de prévenir la contamination du lait cru. Par contre, si celui-ci arrive à être contaminé par *B.cereus*, il n'existe aucune étape ultérieure permettant d'éliminer la présence de ce danger ou de réduire son occurrence à un niveau acceptable, ce qui constitue le point faible dans cette production.

Tableau N°19 : Identification des CCP

ETUDE HACCP : Production de lait cru IDENTIFICATION DES CCP						Formulaire 05
Etapes de production	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP	Commentaires
Nettoyage de l'étable (Changement de litière)	O	O	O		CCP	Le changement de la litière est spécifiquement conçu pour éliminer le danger. Afin de prévenir totalement ce danger, l'élimination complète de la litière est recommandée tout au long de la production du lait à la ferme.
1-Nettoyage des VL (Brossage)	O	O	O		CCP	Le brossage est conçu pour réduire le danger à un niveau acceptable.
2-Entrée des VL	O	O	N	O		Cette étape n'est pas conçue pour éliminer le danger. Le nettoyage peut le faire ultérieurement.
3-Préparation des VL	O	O	N	O		La disposition et l'attachement des VL peuvent apporter un danger mais qui sera éliminé ultérieurement par les étapes de nettoyage.
4-Alimentation	O	O	N	N		L'alimentation n'est pas conçue pour éliminer le danger.
5-Attachement de la queue	O	O	O		CCP	Le danger résultant des mouvements de queue peut être éliminé par l'utilisation d'un serre-queue.
6-Nettoyage mamelles -Hygiène corporelle du trayeur	O	O	O		CCP	-Le nettoyage complet du trayeur, y compris les mains, est destiné spécifiquement à éliminer ou à réduire le danger. Si le danger n'est pas maîtrisé aucune étape ultérieure ne pourra l'éliminer.
-Lavage des mamelles	O	O	O		CCP	-Même remarque.
7-Essuyage des mamelles	O	O	O		CCP	-Même remarque.

Tableau N°19 suite : Identification des CCP

8-Elimination des premiers jets	O	O	O		CCP	-Cette étape permet d'éliminer les premiers jets qui sont très contaminés, et donc de supprimer ou de réduire le danger à un niveau acceptable.
9-Placement des gobelets	O	O	N	N		Au niveau de cette étape, la contamination ne peut pas augmenter jusqu'à un niveau inacceptable.
10-Ecoulement du lait	O	O	N	O	CCP	-Le danger introduit dans le lait lors de cette étape ne peut être corrigé ultérieurement.
11-Egouttage	O	O	N	N		Au niveau de l'étape égouttage, la contamination du lait ne peut pas augmenter jusqu'à un niveau inacceptable.
12-Dépose des gobelets	O	O	N	N		Même remarque que pour l'étape précédente
13-Transfert du lait au tank	O	O	N	O	CCP	Un danger introduit lors du transfert du lait au tank ne peut être corrigé ultérieurement.
14-Trempage des trayons	O	O	N	N		La contamination ne peut pas intervenir ou augmenter jusqu'à un niveau inacceptable lors du trempage des trayons.
15-Sortie des VL de la salle de traite	O	O	N	O		Le danger de contamination identifié lors de la sortie des VL peut être éliminé ou réduit par un nettoyage de la VL et de la salle de traite avant la prochaine traite.
16-Conservation du lait au tank	O	O	O		CCP	Un refroidissement inadéquat peut entraîner une multiplication bactérienne très importante rendant impossible toute tentative de correction.
17-Transfert du lait à l'unité	O	O	N	O	CCP	Tout danger survenu lors du transfert du lait à l'unité est difficile à éliminer ultérieurement.

## 8. Etablissement des limites critiques, système de surveillance et actions correctives

Les limites critiques doivent être précisées pour chaque CCP. Il s'agit d'établir un critère de référence, c'est à dire une zone limite, entre un produit sûr et non sûr.

Les critères de maîtrise doivent être autant que possibles des données chiffrables et mesurables en temps réel : la température, le pH, la concentration en sel, la maîtrise des procédés de nettoyage et de désinfection. Des paramètres sensoriels tels que l'aspect visuel, l'odeur, le goût, la texture etc. peuvent également être utilisés.

Comme il est représenté dans le tableau N°20, un CCP peut avoir une seule limite critique ou un intervalle supérieur et inférieur selon le critère de maîtrise considéré.

Le système de surveillance que nous avons établi correspond à la mesure ou à l'observation programmée d'un CCP par référence à ses limites critiques. Cette surveillance n'est pas continue. Le nombre et la fréquence des opérations de surveillance tient compte de l'environnement et des limites techniques et organisationnelles des fermes. Le plan de surveillance proposé, devrait être suffisant pour permettre de détecter rapidement toute perte de maîtrise du CCP afin qu'il soit procédé aux actions correctives avant qu'il ne devienne nécessaire de rejeter le lait.

Les actions correctives établies sont spécifiquement prévues pour chaque CCP de façon à pouvoir réagir aux écarts lorsqu'ils surviennent (Tableau N°18). Ce tableau de maîtrise représente l'ensemble des mesures et des décisions à prendre, afin de maîtriser le problème de la contamination microbienne en général et de *Bacillus cereus* en particulier dans le lait cru dans le contexte des fermes étudiées.

Après avoir établi les formulaires de base du système HACCP, une vérification de conformité et d'efficacité de ce système, avec les concernés (responsables des fermes) et in situ, doit être effectuée avant d'être enregistrée et validée.

La réussite de ce système repose essentiellement sur la volonté de mettre les moyens (Locaux, matériel, méthode) en œuvre. La disponibilité et la motivation des responsables en particulier mais aussi de toute personne impliquée dans ce travail au niveau de la ferme est une condition primordiale pour la mise en pratique de la démarche HACCP.

Tableau N°20 : Tableau de maîtrise HACCP pour le lait cru

ETUDE HACCP							Formulaire 06
TITRE : Production de lait cru							Actions correctives
Etapas de production	Dangers	Mesures préventives	CCP	Limites critiques	Surveillance		
					Procédure	Fréquence	
Nettoyage de l'étable	-Contamination par la litière.	-Elimination totale de la litière.	1	-Eliminer la litière ½ heure au minimum avant la traite.	-Contrôle bactériologique	-Hebdo-madaire	-Elimination de la litière de la salle de traite .
	-Contamination par l'ambiance.	-Présence de bouches d'aération suffisantes.		-Circulation de l'air sans courants d'air. -minimum une fois par an.	-Contrôle de la température	-Quotidien	-Travaux de réparation et de réfection. -Eliminer les animaux nuisibles.
	-Présence de sur-contaminants.	-Une campagne de dératisation efficace.		-Pour toutes les ouvertures.	-Contrôle par des professionnels nuisibles	-8 contrôles par an	-Changement de treillage.
		-Pose de treillages fins aux ouvertures. -Enlèvement régulier de fumier.		-2 fois/jour avant chaque traite. -2 fois/jour après chaque traite.	-Contrôle visuel	-Hebdo-madaire -Bi-quotidien	-Modification de la procédure
		-Nettoyage des stalles, mangeoires ... -Eloignement des dépôts de fumier. -Attachement ou éloignement des animaux domestiques.		-Distance réglementaire.	-Contrôle visuel	-Avant chaque traite	-Eloignement des animaux domestiques

Tableau N°20 suite : Tableau de maîtrise HACCP pour le lait cru

1-Nettoyage des VL	-Contamination par l'ambiance -Contamination par les VL	-Brossage effectué en dehors du lieu de traite -Brossage bien fait -Brosse bien propre -Brosse renouvelée en cas d'usure	2	-Quotidiennement avant la traite -2 à 3 mn par VL -Désinfectée après chaque utilisation -Brosse en bon état.	-Contrôle bactériologique de l'ambiance -Contrôle visuel -Contôle bactériologique -Contrôle bactériologique -Contrôle visuel	-Hebdo-madaire -Quotidien -Mensuel -Hebdo-madaire -Quotidien	-Brossage dans une aire d'attente -Renetteroyer
2-Entrée des VL	-Contamination par l'ambiance -Contamination par B.cereus du sol	-Entrée des VL calmement et sans perturbations. -Parcours accès empierré et nettoyé.					
3-Préparation des VL	-Contamination du trayeur -Contamination par l'ambiance	-La disposition et l'attachement des VL se fait par une autre personne que le trayeur -Eloignement et attachement des animaux domestiques.					
4-Alimentation	-Contamination par l'ambiance	-Assurer l'incuité de l'aliment -Alimentation dans une aire d'attente					

Tableau N°20 suite : Tableau de maîtrise HACCP pour le lait cru

5-Attachement de la queue	-Contamination par l'ambiance	-Utilisation d'un serre queue	3	-Lors de chaque traite -Absence de B.cereus	-Contrôle visuel -Contrôle bactériologique de l'ambiance	-Quotidien -Hebdomadaire	-Remettre le serre queue
6-Nettoyage des mamelles							
Nettoyage du trayeur	Contamination par le trayeur	Visites médicales -Tenue vestimentaire propre et facile à désinfecter	4	1 fois par mois et en cas d'apparition de symptômes -Nettoyage et désinfection après chaque traite	Suivi médical -Appréciation visuelle	1 fois par mois -Quotidienne	Mise à l'écart de personnes malades -Mise à l'écart de personne n'ayant une tenue réglementaire et propre -Lavage immédiat des mains
Lavage des mamelles	-Contamination directe du lait par les mamelles -Contamination indirecte du lait par les ustensiles de nettoyage	-Lavage soigneux des mains -Lavage efficace -Lavettes multiples -Eau de trempage avec désinfectant -Lavettes avec texture appropriée -Eau de lavage renouvelée -Eau de lavage propre	5	-Avant la traite et entre chaque traite -Avant chaque traite -Lavette propre pour chaque VL -Utilisé entre les traites -Texture : éponge -Pour chaque VL -Non contaminée initialement -Eau de javel à 2%	-Contrôle visuel -Contrôle visuel -Contrôle bactériologique	-Tout au long de la traite -Avant chaque traite -Chaque 15 jours	-Refaire le lavage soigneusement
	-Contamination indirecte par l'eau de lavage des mamelles	-Eau de lavage avec désinfectant			-Contrôle de la solution de nettoyage	-Revoir la concentration de la solution	

Tableau N°20 suite : Tableau de maîtrise HACCP pour le lait cru

7-Essuyage des mamelles	-Contamination par les gouttes d'eau ruisselantes -Apparition de gerçures	-Technique d'essuyage efficace	6	-Essuyage obligatoire  -Absence de gerçures	-Contrôle visuel  -Contrôle visuel	-Après essuyage  -Quotidien	-Refaire l'essuyage  -Adapter un procédé de nettoyage -Trempage obligatoire
	-Contamination indirecte par les mamelles	-Torçons d'essuyage multiples -Torçon d'essuyage absorbant		-Torçon unique et propre pour chaque VL -Texture en coton	-Suivie de l'utilisation des torçons	-Pour chaque VL	-Renettoyer la mamelle
8-Elimination des premiers jets	-Contamination microbienne par les premiers jets -Contamination par l'ambiance	-Elimination des premiers jets -Elimination des jets dans un récipient	7	-Obligatoirement avant le placement des gobelets  -Propre et contenant un antiseptique	-Contrôle visuel  -Contrôle bactériologique du lait	-Chaque traite -Hebdo-madaire	-Jeter le lait de la VL malade -Revoir la stratégie mammites -Jeter tous le lait mélangé en cas de doute
9-Placement des gobelets	-Contamination par les gobelets -Recontamination des mamelles	-Gobelets propres -Placement correct des gobelets -Placement des gobelets après lavage des mamelles					

Tableau N°20 suite : Tableau de maîtrise HACCP pour le lait cru

10-Ecoulement du lait	-Contamination par le matériel de traite	8	-Eau froide	-Contrôle visuel	-Quotidien	-Arrêter la traite et refaire le nettoyage -Lait contaminé jeté -Revoir la méthode de nettoyage
	-Rinçage avant de commencer le nettoyage -méthode de nettoyage efficace		-Après chaque traite -Absence de saletés -Absence de B.cereus	-Contrôle visuel	-Quotidien	
	-Matériel de traite en bon état		-Pièces en bon état et nettoyés -Filtre intact et propre	-Contrôle bactériologique -Démontage de la machine à traire et contrôle visuel avec nettoyage.	-Hebdo-madaire -Trimestriel	-Remplacer immédiatement toute pièce défectueuse -Appeler le technicien machine à traire -Changement de filtre -Renettoyage des faisceaux
	-Contamination due à la chute des faisceaux -Contamination par l'ambiance de la salle de traite		-Permanente et obligatoire.	-Appréciation visuelle	-Tout au long de la traite	
			-Après chaque traite -Matériel de nettoyage propre -Absence de B.cereus	-Contrôle visuel -Contrôle du matériel -Contrôle bactériologique de l'ambiance -Contrôle visuel et à l'aide d'un appareil	-Quotidien -Hebdo-madaire -Mensuel	-Revoir la méthode de nettoyage
			-Absence d'humidité	-Contrôle visuel et à l'aide d'un appareil -Vérification par le thermomètre -Contrôle bactériologique	-Quotidien	-Bonne aération
			-Température ne dépassant pas 18°C -Absence d'air confiné		-Quotidien	
					-Hebdo-	

	-Contamination par les feces	-Ecoulement des eaux usées bien réalisé -Ambiance non stressante	-Trou d'évacuation avec un large diamètre -Evacuation rapide -Pas de bruits anormaux ou forts -Pas de coups pour les VL	de l'ambiance -Vérification des évacuations	madaïre -Quotidien	-Déboucher immédiatement -Refaire l'installation des évacuations.
11-Egouttage	-Constitution d'un lait de rétention contaminé	-Effectuer l'égouttage				
12-Dépose des gobelets	-Contamination par les gobelets trayeurs	-Dépose des gobelets sur leur portoir.				
13-Transfert du lait au tank	-Multiplication bactérienne  -Contamination par le matériel de traite -Contamination par l'ambiance	-Transport au tank de chaque lait de deux VL traite en même temps  -Pas de changement de bidon pour le transport -Bidon récolte gardé fermé	9 -Immédiatement  -Moins de 100 B.cereus/mL -Matériel propre et désinfecté -Couvercle obligatoire	-Vérification du transport  -Contrôle bactériologique -Contrôle visuel -Contrôle bactériologique -Inspection visuelle	-Après chaque lait de deux VL  -Hebdo-madaïre -Quotidien -Hebdo-madaïre -Tout au long du transfert	-Jeter le lait  -Renettoyer le matériel de traite -Remettre le couvercle
14-Trempe des trayons	-Apparition de gerçures	-Trempe efficace -Empierrement des chemins				
15-Sortie des VL	-Contamination de l'ambiance	-Sortie des VL calmement				

Tableau N°20 suite et fin : Tableau de maîtrise HACCP pour le lait cru

<p>Conservation du lait au tank</p>	<p>-Contamination par le tank  Contamination par l'ambiance -Prolifération bactérienne jusqu'à altération</p>	<p>10</p>	<p>-Rinçage avant le nettoyage -Méthode de nettoyage efficace  Eviter d'ouvrir le tank -Thermostat fonctionnel suppléé d'un thermomètre  -Respect de la limite établie pour le temps de conservation</p>	<p>-Eau froide  -Tank propre avant la dépose du lait  -Brosse propre et non usée  -Minimiser au maximum  -Température inférieure à 4°C  -&gt;10<sup>3</sup>B.cereus/mL -Conservation maximum 48 heures -pH stable -Acidité : 15-18°D</p>	<p>-Contrôle visuel  -Contrôle visuel -Contrôle bactériologique -Contrôle visuel  -Surveillance de la température -Vérifier le fonctionnement du thermomètre et du thermostat -Contrôle bactériologique -inspection  -Suivi du pH -Contrôle de l'acidité</p>	<p>-Quotidien  -Quotidien -Hebdo-madaire -Quotidien  -en continue  -Chaque jour  -Hebdo-madaire  -Toutes les 2heures</p>	<p>-Revoir la méthode de nettoyage  -Changement de brosse  -Rejet du lait</p>
<p>17-Transfert du lait à l'unité</p>	<p>-Prolifération bactérienne jusqu'à altération</p>	<p>11</p>	<p>-Utilisation de camions citernes  -Lait toujours gardé à basse température</p>	<p>-Transport à vitesse réduite -Aucun contact du lait avec l'air -&gt;10<sup>3</sup> B.cereus/mL  -Température &gt;4°C</p>	<p>-Respect de la vitesse limite -Contrôle des tuyaux -Contrôle bactériologique -Contrôle de la température dans le camion citerne</p>	<p>-au long du trajet -A chaque chargement -chaque réception -A chaque chargement</p>	<p>-Rejet du lait</p>

### **III. Application du système HACCP à l'atelier de production de lait pasteurisé Laiterie Mansourah de Tlemcen**

Cette partie de l'étude a pour but de voir comment un système qui fait l'unanimité quant à son efficacité dans le domaine de la sécurité des aliments peut s'avérer sans apport significatif quand l'environnement ou les pré-requis ne sont pas réunis. A titre d'illustration nous avons essayé de proposer à la direction de la laiterie de Mansourah – Tlemcen un plan qualité basé sur le système HACCP articulé en ses différentes étapes en tenant compte des résultats du diagnostic qualité.

Actuellement, on constate un besoin d'augmenter la durée des produits laitiers pasteurisés tout en préservant la sécurité du consommateur. D'après Ravanis et Lewis (1995), les facteurs qui influencent microbiologique du lait pasteurisé sont les suivants : la qualité du lait cru, le traitement thermique appliqué, la contamination après pasteurisation, la température de stockage du lait pasteurisé. L'application du système HACCP pourrait aider à maîtriser la qualité des trois derniers facteurs.

#### **III. 1. L'audit qualité préliminaire**

La première étape consiste à évaluer le degré de conformité de l'atelier aux exigences en matière d'hygiène. Il s'agit d'un audit de départ qui conditionne l'élaboration et la mise en place du système HACCP. Cet audit comporte une inspection sanitaire conduite suivant le guide d'inspection des établissements laitiers réalisé par le centre algérien du contrôle de qualité et de l'emballage avec la collaboration du gouvernement canadien. Le guide d'inspection permet d'évaluer les BPF et les BPH. L'inspection donne lieu à une notation de l'atelier audité qui détermine les mesures et les délais nécessaires pour maîtriser ces insuffisances.

Les points de démerites alloués sont basés sur l'importance du risque de contamination. Les risques sont classés en faible, moyen, élevé et critique et les points y afférant sont de 1, 10, 30 et 100 points (Cacque, 1994)

Les résultats d'inspection sont reportés sur le tableau N°21. La notation finale après sommation des unités de démerite est de 1580. Cette note permet de classer l'atelier dans la catégorie C avec un taux de conformité de 47,33%. La dégradation parfois importante des locaux (peinture écaillée, carrelage fissuré, glaces brisées) représente un risque majeur de contamination. Ces dégradations rendent difficiles et inefficaces les opérations de nettoyage.

L'atelier est exigu, mal aéré et mal éclairé. Les conditions de travail ne sont pas confortables. L'équipement ne bénéficie pas de maintenance préventive ni de fiche de vie et l'état général des

Certains automatismes conçus pour assurer la sécurité de la chaîne sont opérés de façon manuelles peu efficace car dépendant du degré de concentration de l'opérateur et de sa compétence.

Les bonnes pratiques d'hygiène ne sont pas toujours respectées. Les infractions qui sont les plus remarquées sont celles relatives au port de tenues non réglementaires et aux déplacements fréquent et inutiles. Certains opérateurs sont insuffisamment qualifiés.

**Tableau N°21 suite et fin : Audit de l'atelier de production de lait pasteurisé Laiterie Mansourah – Tlemcen (d'après le guide d'inspection des établissements laitiers (CACQE, 1994)**

<b>Organisation de l'usine</b> -déplacement du personnel et matériel - affichages obligatoires -contrôle des personnes étrangères -programme de santé	10 10 10 10	Incontrôlé Absent Pas toujours effectué Non fréquent
<b>Assurance qualité</b> -inspection des matières premières -analyse du produit fini -analyse des points critiques -programme de la qualité de l'eau -programme d'hygiène -registre des traitements thermiques -programme de formation des employés -protocole de rappel -programme d'entretien des équipements	20 20 30 30 30 30 30 30 30	Inexistant au niveau de l'unité Analyse incomplète Incomplète Pas de programme défini Non défini Inexistant Incomplet Inexistant inexistant
<b>Aires extérieures</b> -disposition des ordures -évacuation des eaux usées et déchets  -hygiène et nettoyage	10 10  10	Inadéquate Dégradation des bouches d'évacuation Dégagement des mauvaises odeurs Mal effectués
<b>TOTAL CLASSEMENT</b>	<b>1580</b>	<b>catégorie C</b>
		<b>Surveillance intensive</b>

### III. 2. Proposition d'un plan HACCP pour la laiterie

#### III. 2. 1. Constitution de l'équipe HACCP et définition du champ de l'étude.

L'équipe de travail est constituée des membres suivants : le responsable qualité de la laiterie : responsable de l'équipe, le responsable de la production, le promoteur de l'études assurant la coordination et le secrétariat et des étudiants stagiaires. L'équipe s'est réunie et a délimité le champ de l'étude. L'étude couvre l'atelier de pasteurisation et le produit ciblé est le lait de vache pasteurisé. Elle prend en compte uniquement le danger microbiologique en général et *Bacillus cereus* en particulier. Les formulaires relatifs à ces deux points sont donnés par le tableau N°20

#### III. 2. 2. Description du produit

La fiabilité de ces informations est essentielle pour le bon déroulement de l'étude, les données relatives au produit fini, aux matières premières et aux produits intermédiaires sont synthétisées sous forme de formulaires voir les tableaux 23, 24, 25 et 26

Tableau N°22 : Fiche de lancement de l'étude HACCP

ETUDE HACCP	Formulaire : LP 001
TITRE : ligne de lait pasteurisé	
<b>Champ d'études :</b> toutes les étapes des opérations de la fabrication du lait pasteurisé : du stockage des matières premières au transport en vue de la commercialisation <b>Objectifs visés :</b> Identifier les dangers microbiologiques, les points critiques, les mesures préventives, les actions correctives pour garantir la sécurité et la valeur d'usage du produit.	
Constitution de l'équipe :	
Nom :	Fonction : Responsable qualité      Animateur Désigné :
Nom :	Fonction : Responsable de la production
Nom :	Fonction : Responsable projet coordinateur
Nom(s) :	Fonction : Elèves ingénieurs biologistes stagiaires
Date Début Analyse HACCP	
Date Fin Analyse HACCP :	

**Tableau N°23 : fiche descriptive de l'eau de process**

ETUDE HACCP	Formulaire : LP 002
TITRE : Ligne lait de vache pasteurisé	
<b>Descriptif Matière Premières : Eau de process</b>	
Nom : Eau de process	
Stockage : bache d'eaux reliées au réseau algérienne des eaux	
Traitement : adoucissement, décontamination	
<b>Caractéristiques microbiologiques :</b>	
-flore totale a 22°C.....	< 10 <sup>2</sup> / ml
-flore totale a 37°C.....	abs / ml
-coliformes.....	< 10 / 100 ml
-coliformes fécaux.....	Abs / 100 ml
-streptocoques D.....	abs / 50 ml
-spores d'anaérobies sulfito-réducteurs.....	Abs / ml
<b>caractéristiques physico-chimiques :</b>	
-Dureté totale (caco ).....	max 100mg / ml
-Chlorures (Cl).....	Max 100mg / ml
-Sulfates (SO4).....	Max 100mg / ml
-Nitrates (NO3).....	Max 45mg / ml
-Calcium (Ca).....	max 75mg / ml
-Magnésium (Mg).....	30-150mg / ml
-Solides totaux.....	max 500mg / ml
-Odeur.....	sans défaut
-Goût.....	sans défaut
-pH.....	7.0 - 8.0



**Tableau N°24 : Fiche descriptive du lait avant pasteurisation**

ETUDE HACCP	Formulaire: LP 002
TITRE : Ligne lait de vache pasteurisé	
Descriptif produit intermédiaire : lait avant pasteurisation	
Nom : lait avant pasteurisation	
Traitement : réfrigération	
Stockage : tank 15000 litres	
-température : 4-6°C	
-Consommation : process continu 10.000 l/h	
-acidité : 16 – 17°D	
Critère microbiologique Nombre de germes thermorésistants <math>10^3</math>ufc/ml	

**Tableau N° 25 : Fiche descriptive du lait pasteurisé avant conditionnement**

ETUDE HACCP	Formulaire : LP 003
TITRE : Ligne lait de vache pasteurisé	
Descriptif produits intermédiaires : lait pasteurisé non conditionné	
Nom : lait de vache pasteurisé	
Traitement : pasteurisation - réfrigération	
Stockage : tank 15000 litres	
-Température : 4-6°C	
-Durée d'attente avant conditionnement : 6 heures max.	
-Acidité : 17 – 18°D	



**Tableau N°26 : fiche descriptive du lait de vache pasteurisé en sachet de 1 litre**

<b>Etude HACCP</b>	<b>Formulaire LP 04</b>
<b>Titre : Ligne lait de vache pasteurisé</b>	
<b>Descriptif produit fini : sachet de lait de vache pasteurisé</b>	
<p>Nom : lait de vache pasteurisé</p> <p>Description : sachet de 1 litre</p> <p>Emballage : polyéthylène</p> <p>Traitement : pasteurisation - réfrigération</p> <p>Transport et Stockage : 4-6°C</p> <p>DLC : 72 heures</p> <p>Composition :</p> <p>-matière grasse : 28 g/l</p> <p>-E.S.T : 135 g/l</p> <p>caractéristiques microbiologiques :</p> <p>-flore totale a 30°C.....30000 /ml</p> <p>-coliformes a 30°C.....10 /ml</p> <p>-coliformes fécaux..... 1 /ml</p> <p>-clostridium sulfito-réducteurs..... abs /ml</p> <p>-staphylococcus aureus..... 1 /ml</p> <p>salmonella.....abs /ml</p> <p>caractéristiques physico-chimiques :</p> <p>-Densité.....1030 – 1032</p> <p>-acidité.....16 – 18°D</p> <p>-E.S.T.....130 g/l</p>	



### III. 2. 3. Identification de l'utilisation prévue du produit fini

Le lait pasteurisé doit être stocké à une température inférieure à 6°C depuis la pasteurisation jusqu'à sa consommation. Dans la réalité cette chaîne de froid est inexistante. A l'unité même les capacités de froid ne permettent pas d'atteindre la température de 4°C. Le transport ne s'effectue qu'exceptionnellement dans des camions frigorifiques. Au niveau des points de ventes la situation est la même : le stockage sous froid reste l'exception. Chez le consommateur, le sachet de lait est soit consommé directement soit il subit un traitement thermique qui peut aller d'un simple réchauffage jusqu'à l'ébullition.

Les quantités qui ne sont pas utilisées sont stockées au réfrigérateur ou au congélateur.

Les informations recueillies sont données dans la fiche du tableau N°27.

**Tableau N°27 : Identification de l'utilisation attendue du sachet de lait pasteurisé**

ETUDE HACCP		Formulaire LP 06	
<b>TITRE : ligne de lait pasteurisé</b>			
<b>Identification de l'utilisation attendue du produit</b>			
<b>Nom du produit : lait de vache pasteurisé</b>			
Durée de vie préconisée : 72 heures		Durée utilisation consommateur : 24 heures maxima	
Instruction conservation recommandée : Garder 4 – 6°C		Modalités conservation distributeurs 4-6°C respect de la chaîne de froid modalités conservation consommateurs : A T°C ambiante, au réfrigérateur ou au congélateur	
Instruction mode d'emploi annoncé : Aucune		Mode d'emploi prévisible : Consommer frais ou après chauffage Consommer en une ou plusieurs prise	
Population ciblée par le produit : Tout consommateur excepté les nourrissons		Autres consommateurs potentiels : Nourrissons et malades et personnes âgées	

### III. 2. 4. Etablissement du diagramme des opérations de fabrication et sa vérification in situ

Le diagramme élaboré doit être le fruit des informations reçues concernant, le bon déroulement des opérations pour la fabrication du lait pasteurisé selon les normes internationales. Les étapes doivent permettre l'obtention d'un produit standard quelque soient le lieu et le temps en utilisant les mêmes ressources (matières premières, ingrédients, équipements et BPF...). Il s'agit donc d'un diagramme théorique des opérations : de la matière première au transport du produit fini qu'il faut vérifier sur site. Ce diagramme est représenté par la figure N°5.

Le diagramme des opérations étant établi il faut le vérifier sur place dans la laiterie pendant les heures de travail.

Après comparaison avec le diagramme des opérations existant dans la laiterie on constate l'absence systématique de certaines étapes, l'annulation d'autres et un non respect des bonnes pratiques de fabrication.

1. Stockage des matières premières : La température de conservation du lait cru n'est jamais de 4°C. La température dans les tanks de garde ou de lancement, est souvent comprise entre 10-15°C. La standardisation du lait n'est pas effectuée.

-L'étape de dégazage du lait n'est pas effectuée à cause d'une panne du dégazeur.

-Les Tanks toujours à moitié ouverts après le N.E.P et même quand ils contiennent du lait.

-Le barème de pasteurisation trop sévère, 85°C durée 2 minutes.

-fonctionnement non satisfaisant de la remplisseuse conditionneuse. Le lait des sachets mal soudés est récupéré dans un bac ouvert, ce lait est recyclé et pasteurisé de nouveau.

La comparaison entre ces deux diagrammes de opérations nous permet d'apporter des modifications sur le diagramme rencontré sur place et ses informations faciliteront l'étape d'analyse des dangers.

Après sa fabrication le lait pasteurisé conditionné dans des sachets de 1 litre est chargé dans des camions de distributeurs privés en vue de sa commercialisation.

À la fin de chaque cycle de fabrication, tous les équipements sont nettoyés et désinfectés. En fait le nettoyage et la désinfection font partie intégrante des processus de la fabrication d'un produit alimentaire et présente en moyenne près de 20% du fonctionnement d'une entreprise agroalimentaire. Un nettoyage et une désinfection mal effectués sont source de contamination biologique et physique du produit fini sans possibilité ultérieure de correction. À ce titre il constitue un point critique qu'il faut prendre en charge.

Le nettoyage en place NEP ou CIP (Cleaning in Place) est un système de lavage automatique des équipements et certains matériels impliqués dans le processus de fabrication du produit désiré (voir tableau N°28). Les instructions de travail sont introduites dans un système automatique et autonome qui effectue les tâches pour une meilleure efficacité.

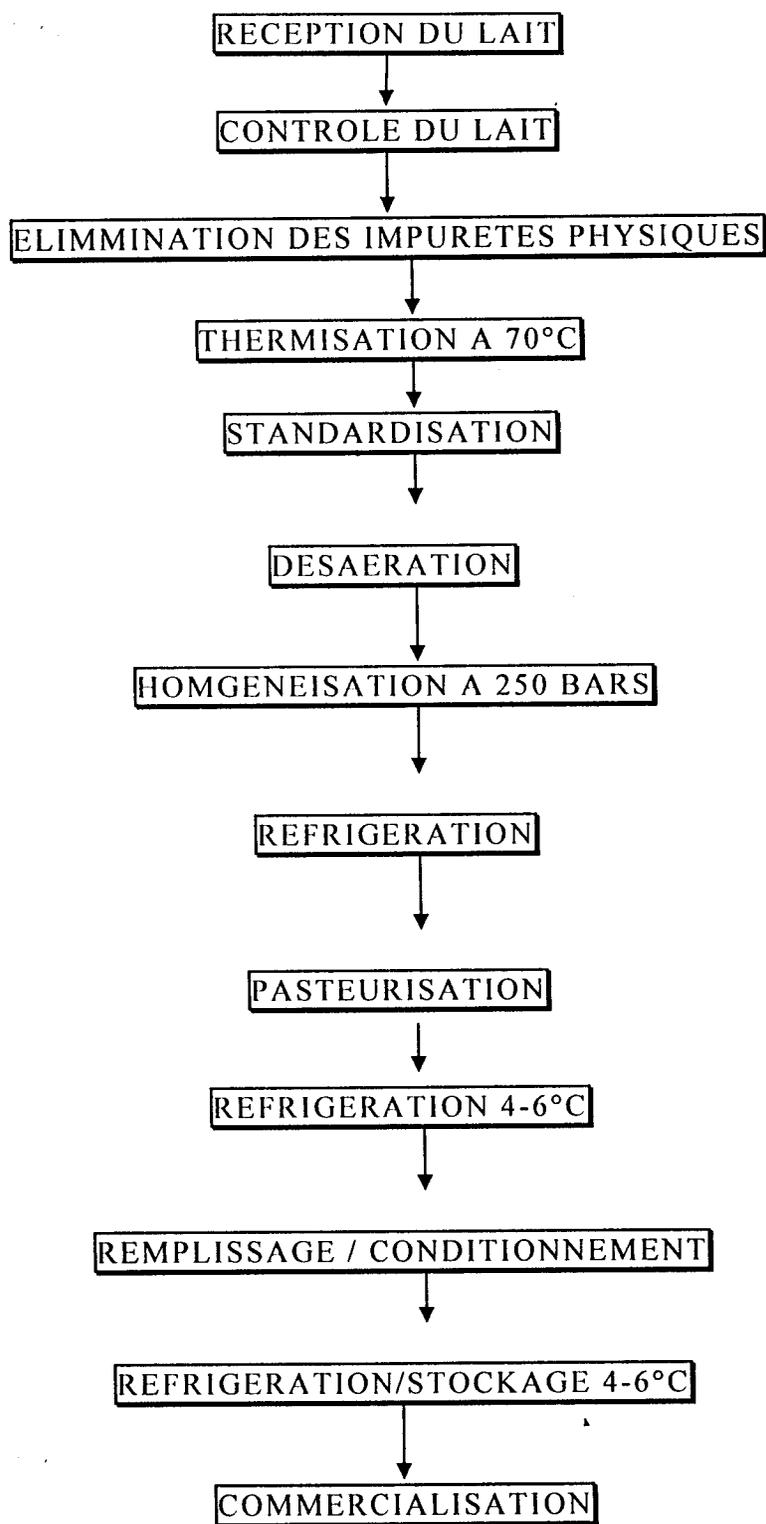
Le C.I.P comprend les étapes suivantes :

1. Pré rinçage avec de l'eau en circuit ouvert pour éliminer les restes de lait et des impuretés au niveau de la tuyauterie et des tanks. Durée 2 minutes environ
2. Phase basique Une solution de soude, 1.5 % et à 80°C est mise en circulation dans les équipements pendant 10 minutes
3. Rinçage à l'eau pour éliminer la soude pendant 2 minutes.
4. Phase acide : Une solution d'acide nitrique à 0.7% a une température de 60-65°C est mise en circuit pendant 10 minutes.
5. Rinçage final avec de l'eau potable pour éliminer l'acide pendant 3 minutes.
6. Stérilisation à l'eau chaude pendant 10 minutes.

Tableau N°28 : Système de nettoyage des équipements de l'atelier de lait pasteurisé.

EQUIPEMENTS	SYSTEME DE NETTOYAGE
<i>Echangeur à plaques</i>	C.I.P
<i>Tank de garde</i> (12000litres), muni d'une pompe centrifugeuse.	C.I.P
<i>Filtres</i> en acier inoxydable	Manuel
<i>Dégazeur</i> (10.000 l/h)	
<i>Homogénéisateur</i> haute pression (250 bar), capacité (30.000 l/h) faces internes en acier inoxydable	C.I.P C.I.P
<i>Pasteurisateur</i> : Echangeur à plaques à deux circuits (lait et eau chaude) et un autre (lait et eau glacée) 10.000litres / h	Hors C.I.P
<i>Remplisseuse-conditionneuse</i> Prepac à deux têtes de remplissage synchronisées. (sachets de 1 litre)	C.I.P

Figure N°6 : Séquence logique du diagramme de fabrication du lait pasteurisé



### III. 2. 5. Analyse des dangers

Le process de fabrication étant défini, il s'agit à présent de constituer un schéma de vie du lait pasteurisé et établir les risques bactériologiques possibles à chaque étape.

La meilleure manière de définir ces risques est d'utiliser le diagramme de causes effets (Diagramme d'Ishikawa) la méthode des 5 M, on s'intéresse à toutes les causes pouvant provoquer un danger et les rechercher ainsi parmi : Le Matériel, Le Milieu, Les Matières premières, La Méthode et La Main d'œuvre

Cette analyse permet d'identifier les dangers microbiologiques liés à chaque étape du process ainsi que leurs causes. A chaque danger, on associe une ou plusieurs actions préventives afin de l'éliminer ou le réduire. Les dangers identifiés ont de deux types ceux liés à une contamination et ceux liés à une multiplication microbienne. La contamination microbienne des matières premières, produits intermédiaires ou produit fini. Le tableau N°26 résume les éléments et facteurs qui sont à l'origine de cette contamination. Ce tableau définit les causes du danger et donne une idée sur les actions à prendre pour éviter ou minimiser ce danger, on définit ensuite le type de contrôle (visuel, bactériologique, enregistrements..) et l'option de maîtrise pour éviter le danger.

Les mesures préventives suggérées pour la maîtrise du danger sont essentiellement relatives au respect des bonnes pratiques de fabrication et des bonnes pratiques d'hygiène

Tableau N°29. Analyse des dangers pour l'atelier Lait pasteurisé

ETUDE HACCP		ANALYSE DES DANGERS					
Titre Ligne de lait pasteurisé		Matériel	Milieu	Méthode	Main D'oeuvre	Contrôle	Option de maîtrise
ETAPES	Produit						
1. stockage des lait cru	Altération microbienne, altération de la qualité sensorielle		Locaux dégradés, exigus, mauvais éclairage et mauvaise aération			Bactériologiques et physico-chimiques	Entretien régulier des locaux et des équipements
2. Filtration		Encrassement des filtres, contamination	Contamination par l'air de l'ambiance	Consignes de préchauffage mal effectuées	Déplacements incessants	Décrassage des filtres. Déplacements des ouvriers. Respect des conditions de travail.	Nettoyage et désinfection des locaux, tanks et équipement
3. Thermisation		Contamination par l'échangeur à plaques					Vérification régulière des filtres
4. Homogénéisation		Contamination par l'homogénéisateur Mal nettoyé	Présence d'insectes et des oiseaux Contamination par l'air de l'ambiance			Contrôle de la machine Décrassage des plaques	Vérification régulière des plaques
5. Refroidissement	Croissance microbienne	Contamination par le matériel, et les tanks	Même cause que précédente étape	Température et temps de refroidissement, élevée			Opération de nettoyage et désinfection
6. pasteurisation	Persistance d'un taux élevé de microorganisme	Encrassement des plaques, Contamination	Contamination	Non respect du barème de pasteurisation		Barème et temps de refroidissement, fermeture des tanks de stockage	Nettoyage et désinfection des locaux et maintenance des équipements
						Barème temps / température 85°C/2s	Contrôle du nettoyage et

7. refroidissement / stockage	Croissance microbienne et montée de l'acidité	aéroportée des les tanks mal nettoyés et ouvert	par l'air	Non respect du la T° de refroidissement	Temps de Stockage max 6h Et T° de stockage : 4 – 6°C	désinfection et maintenance
8. Remplissage et conditionnement	Contaminé et mal conditionné	Contamination par le matériel, conditionneuse mal nettoyée Contamination par l'emballage	T° de stockage élevée	Temps de stockage long	Contrôle visuel de l'emballage, Vérification des tubes UV, Contrôle des opérations de nettoyage et désinfection	Nettoyage et entretien des locaux et équipements, et désinfection, refroidissement rapide
9. recyclage du lait mal conditionné	Croissance microbienne Prolifération microbienne Même cause	Contamination élevée dans le bac de récupération Contamination par les caisses		Non respect des règles d'hygiène, Long temps d'attente avant pasteurisation	Contrôle de opérations de nettoyage Inspection et mise a l'écart des caisses endommagées	Maîtrise des conditions d'hygiène et nettoyage des locaux et équipements Fermetures des tanks après CIP Nettoyage et désinfection après chaque opération de la conditionneuse, des locaux. Stockage de l'emballage dans des bonnes

<p>10. mise en caisse et stockage</p> <p>11. Livraison - transport</p>							<p>conditions. Maintenir les conditionneuses fermées</p> <p>Formation et sensibilisation du personnel.</p> <p>Lavage des caisses et stockage a 4 – 6°C</p> <p>Respect de la chaîne de froid durant le transport a T° 4 – 6°C</p>
--	--	--	--	--	--	--	--

### **III. 2. 6. Identification des CCP**

Les CCP sont des points clés du système et leur maîtrise permet d'assurer la sécurité alimentaire. Un CCP n'est valable que s'il existe des paramètres quantifiables pour assurer sa maîtrise (temps, température, pH, examen visuel...). Pour répertorier les CCP avec précision et avoir une idée plus juste de leur détermination nous avons utilisé le système de cotation (on a retenu un ICr = 15 comme plus petite valeur pour désigner un CCP en relation avec l'arbre de décision. Figure 1

### **III. 2. 7. Etablissement des limites critiques pour chaque CCP.**

Il est nécessaire de définir pour chaque CCP identifié les valeurs permettant d'assurer sa maîtrise. Ces limites correspondent à des paramètres que l'on peut mesurer, (température, pH...), ces limites séparent un produit sain et un produit en voie de dégradation. Compte tenu des erreurs des mesures et de temps de réponse, nous avons fixé des valeurs plus strictes que les valeurs critique connues afin que le processus reste sous contrôle entre le moment où l'anomalie est détectée et le temps de déclencher les actions correctives.

### **III. 2. 8. Etablissement d'un système de surveillance.**

On a défini une méthode de surveillance pour les paramètres, microbiologiques et suivi des températures et du plan d'hygiène et entretien. En donnant les procédures et leurs fréquences.

### **III. 2. 9. Etablissement des actions correctives.**

Les actions correctives sont prises dans le cas où on s'écarte des limites critiques malgré le système de surveillance. Ces actions visent à rétablir la maîtrise et à définir le devenir des produits non-conformes. Les trois étapes précédentes sont synthétisées sous la forme d'un tableau généralement nommé tableau de maîtrise HACCP (voir le tableau N°30).

### **III. 2. 10. Vérification**

La sécurité microbiologique et la qualité organoleptique du produit doivent être vérifiées périodiquement par des analyses microbiologiques et physico-chimiques dès la réception de la matière première, en passant par les produits intermédiaires et le produit fini.

La vérification est réalisée deux fois par an par un laboratoire externe et devrait porter sur tous les analyses possibles. L'ensemble des documents concernant les méthodes de surveillance (fiches de contrôle, instructions de travail) sont référencés et accessibles à toutes les personnes responsables du contrôle. Les instructions de travail précisent qui doit contrôler et de quelle manière. Elles peuvent contenir des tableaux, rappelant les limites critiques, méthode de travail (organisation..) ou encore le mode de fonctionnement d'un appareillage (programmation)

Enfin une fois par an la laiterie devrait faire l'objet d'un audit des toutes les activités pour la fabrication du lait pasteurisé pour vérifier l'efficacité du système HACCP.

Tous ces vérifications et actions correctives seront enregistrées et incluses dans le manuel HACCP de l'entreprise.

### **III. 2. 11. Revue du système HACCP et formation**

Ces derniers points sont essentiels pour la pérennité du système HACCP.

Le système doit être revu en entier au moins une fois par année. La revue se basera sur les rapports des audits externes et internes et concernera la production, les contrôles, les actions correctives et les vérifications.

La formation du personnel reste un élément capital pour le bon fonctionnement de toute entreprise, en effet ce qui fait la force d'une entreprise bien plus que les capitaux dont elle dispose, c'est la qualité des ces hommes et l'esprit d'équipe qui les animent. Il est indispensable de donner des formations appropriées aux personnels, par l'organisation de stages de formations, d'ateliers, de conférences débats.

La documentation relative à toutes ces étapes sera incluse dans le manuel HACCP, cependant celui-ci n'est pas figé ; Il doit évoluer en fonction des situations rencontrées, ce qui exige une attention continue. Les documents ne sont que des lignes directrices.

Tableau N° 30 : Tableau de maîtrise HACCP

ETUDE HACCP		Tableau de maîtrise des CCP				Formulaire LP08
TITRE : ligne de lait recombinaé pasteurisé						
ETAPES	CCP	DANGER	MESURES PREVENTIVES	LIMITES CRITIQUES	SURVEILLANCE	ACTIONS CORRECTIVES
7. Réfroidissement avant pasteurisation	1	Prolifération microbienne	<p>Refroidissement rapide 4°C.</p> <p>Réduire le temps avant pasteurisation.</p> <p>Fermeture des tanks, nettoyage et entretien des locaux, accès réservé au personnel de l'atelier</p>	<p>T° &lt; 7°C</p> <p>Acidité 17 – 18°D</p> <p>Locaux propres et en bon état</p>	<p>Contrôle des T° et acidité sur les tank chaque 30</p> <p>Analyses physico-chimiques</p> <p>Contrôle visuel quotidien.</p> <p>Contrôle bactériologique hebdomadaire.</p> <p>Contrôle des solutions de nettoyage, avant et après chaque production et avant nettoyage.</p> <p>Contrôle des paramètres du CIP sur tableau de bord</p>	<p>Respect du barème temps/ température de pasteurisation</p> <p>Travaux de réparation et de réflexion</p> <p>Revoir le nettoyage : Concentration des solutions, la T° et le temps de contact</p>
		Contamination par le matériel	<p>Contrôle des opérations du CIP</p>	<p>Matériel propre et désinfecté</p>		
8. pasteurisation	2	Persistance d'un taux élevé de microorganismes	<p>Vérification des barèmes de pasteurisation temps/température</p>	<p>Barème optimum de pasteurisation 85°C / 2 SEC</p>	<p>Contrôle visuel en continu du thermographe</p>	<p>Recyclage du lait insuffisamment pasteurisé</p>

°C	Contrôle de la T° chaque 30 mn	et rég
en bon	Contrôle visuel des caisses a la réception	Mise end
°C	Vérification a chaque chargement de la T° des camions frigorifiques	Revo entre

			Entretien régulier du pasteurisateur Qualité du lait cru Cahier de charge strict	plaque en bon état	Décrassage régulier des plaques (trimestriel)	
9. Refroidissement / stockage	3	Mêmes dangers que l'étape 7	Mêmes mesures que l'étape 7	T° < 7°C Acidité 18-19°D Temps de stockage maximum 6h	Suivi chaque 30 sec du compteur de T° et du suivi de l'acidité	Recyclage du produit
10. Remplissage conditionnement	4	Contamination par le matériel  Contamination par l'emballage	contrôle des procédures de nettoyage  conformité de l'emballage emballage stérile	Désinfection du matériel  Tube de traitement UV fonctionnel Intégrité de l'emballage	Contrôle des paramètres CIP ? avant et après chaque production Contrôle visuel avant placement. Contrôle visuel en continu	Revoir le nettoyage ou le refaire  Mise à l'écart des emballages endommagés Remplacement des tubes défectueux
11. Recyclage	5	Contamination massive par l'ambiance  Prolifération microbienne Contamination par	Nettoyage et entretien efficace des locaux. Contrôle des opérations de nettoyage Réduire le temps d'attente dans le bac Hygiène et santé du personnel. Formation et sensibilisation	locaux propres et en bon état  stockage 30sec acidité 20-22°D  bonne hygiène corporelle et vestimentaire	Contrôle visuel quotidien. Contrôle bactériologique hebdomadaire de l'ambiance Suivi de l'acidité avant pasteurisation Contrôle visuel quotidien de l'hygiène corporelle et vestimentaire	Revoir le nettoyage Entretien des locaux  Rejet du produit  Mise à l'écart des personnes malades

### III. 4. Discussion : Les limites d'application du système HACCP dans la filière lait

L'exigence de produits alimentaires sûrs est d'une importance centrale dans le secteur des industries agroalimentaires. La Commission du Codex Alimentarius des Nations Unies offre à cet égard aux gouvernements, à l'industrie et aux consommateurs un code international relatif aux principes généraux de l'hygiène alimentaire. Ce code suit la chaîne du produit alimentaire de la production primaire jusqu'à la consommation finale, en soulignant les contrôles hygiéniques essentiels à chaque stade.

Le système HACCP a jusqu'à présent été utilisé à des fins de sécurité alimentaire en traitant essentiellement du risque microbiologique lors du traitement du lait. Une bonne application du système HACCP nécessite l'articulation de la filière production, transformation ; fabrication, conditionnement, distribution, manutention et mise à disposition du consommateur ce qui est difficile à coordonner sans l'intervention des autorités chargées de la sécurité des consommateurs. La sécurité des produits alimentaires fait intervenir des compétences plurisectorielles notamment celles de l'agriculture, de la santé et du commerce.

Le système HACCP est une démarche interne à l'entreprise dont la raison d'être est son utilisation motivée et raisonnée. Elle doit répondre à un besoin réel explicite et exprimé. Elle repose sur la participation de toutes les personnes impliquées dans l'activité concernée. Dans ce sens, sans un engagement total et formel au plus haut niveau, le système ne peut pas réussir. A la laiterie objet de l'étude, le manque de motivation est perceptible chez les employés qui appréhendent mal leur avenir professionnel. La situation de l'entreprise et son caractère de bien public laisse peu de possibilités aux dirigeants pour prendre des initiatives en ce sens.

Au sens strict de la méthode, l'absence d'un traitement destructif des microorganismes rend toutes les étapes critiques pour le lait et les produits laitiers crus. Dans ce cadre, des études appliquées à la viande (Relation entre la qualité de la matière première et celle des produits finis sur la filière haché industriel (Cartier, (1993)) ont montré que la qualité de la matière première conditionne celle des produits finis quelque soit le site de fabrication dans la mesure où les bonnes pratiques d'hygiène sont respectées selon une relation linéaire :

$$y = Ax + B$$

Avec  $y$  = contamination en entérobactéries des viandes hachées (logN/g)

$x$  = contamination en entérobactéries des carcasses (logN/cm<sup>2</sup>)

Il apparaît donc que le principal point à respecter est la qualité de la matière première. Dans le cadre d'une étude HACCP exclusivement microbiologique et dans les conditions précises

de ci-dessus, les autres risques (contaminations du produit pendant le process) sont moindres que le premier.

La méthodologie doit concerner un produit particulier sur un process particulier. Dans le cas du lait cru à la ferme le process peut être considéré comme étant unique.

A la laiterie de Tlemcen on compte plus de 700 (ce chiffre varie d'une année à l'autre) éleveurs qui livrent leur lait quotidiennement. Ce nombre fait que la quantité moyenne livrée par chaque éleveur est faible. Cela entraîne des difficultés de suivi de ces éleveurs. Les retombées négatives sur la qualité microbiologique du lait livré sont évidente.

Certaines entreprises hésitent à mettre en oeuvre un système HACCP car elles surestiment les coûts et/ou apprécient mal les avantages potentiels qu'elles peuvent tirer d'une meilleure qualité de leurs produits, d'une plus longue durée de vie ou d'une réduction des produits non conformes, etc. En fait, l'importance des coûts relatifs à la mise en oeuvre du HACCP varie largement suivant le type de produit ou de fabrication, des conditions existantes et de la manière dont le HACCP est mis en oeuvre.

Lorsque une entreprise met en oeuvre le système HACCP, il n'est pas rare qu'elle ait à apporter des modifications dans des domaines tels l'approvisionnement en matériel, et en matières, l'élimination des insectes, la restriction de l'accès aux zones de transformation, l'installation de systèmes de contrôle de la température dans les zones de transformation, si l'on juge ces mesures de prévention nécessaires lors de l'analyse des risques. Le coût total de la mise en oeuvre du HACCP dépend de l'état sanitaire et hygiénique général de l'entreprise avant la mise en oeuvre du HACCP. Il faut préciser que la mise en oeuvre du HACCP ne nécessite pas toujours d'investir dans des équipements et des procédures sophistiqués. Le principal est d'établir des Points de Contrôle Technique et de les surveiller de façon efficace. Si l'entreprise maîtrise déjà les bonnes pratiques de fabrication et les règles d'hygiène, le coût de la mise en oeuvre du HACCP ne dépendra que des coûts de formation, d'élaboration des plans et manuels HACCP, et du recrutement de consultants (si nécessaire).

Le code recommande d'adopter chaque fois que possible une approche d'amélioration de la sécurité des produits alimentaires, par un système fondé sur l'«Analyse des risques – points critiques pour leur maîtrise» (HACCP). Sur la base de ces recommandations, de nombreux points des différentes législations nationales décrivent avec précision les exigences de sécurité alimentaire. L'application du système HACCP a été généralement acceptée comme la bonne méthode pour assurer la sécurité de la production agroalimentaire. Par conséquent, le nombre de pays qui rendent obligatoire le système HACCP, en tout ou en partie, augmente.

On soulignera que les deux systèmes ne peuvent se substituer l'un à l'autre, mais sont en fait complémentaires et que leur application combinée devrait produire un système qualité hautement efficace. Cet état de fait a créé une certaine incertitude quant à la mise en oeuvre de systèmes qualité ISO 9000 dans l'agroalimentaire. Certaines entreprises ont estimé qu'elles n'avaient pas besoin de la norme ISO, les recommandations du Codex et le système HACCP devant, au moins théoriquement, garantir la qualité de leurs produits. Toutefois, ils passaient à côté du fait que la *qualité alimentaire* comprend bien plus que la *sécurité alimentaire*.

Bien entendu, sans cette exigence fondamentale qu'est la sécurité alimentaire, on ne saurait parler de qualité alimentaire, mais de nombreux autres aspects (valeur nutritionnelle, biologique ou hédonique, stabilité de la qualité donnée, etc.) sont également très importants. Par exemple, un produit alimentaire absolument sûr est invendable si son apparence et/ou son goût et/ou son odeur ne répondent pas aux attentes des clients.

### **Le système HACCP dans les pays en voie de développement**

L'application des procédures HACCP dans les pays en voie de développement a été largement recommandés (ICMSF, 1988 ; NAS, 1985 ; FAO/OMS, 1984). En dépit des réticences initiales, le système HACCP devient maintenant de plus en plus populaire dans les pays en voie de développement. Cependant nombreux sont les limites et <sup>les</sup> ~~de~~ problèmes liés à l'exécution de HACCP dans les pays en voie de développement. Ces problèmes sont selon Ropkins et Beck (2000) semblables à ceux identifiés pour les entreprises de petite et moyenne taille dans le monde occidental. D'autres limites sont reliées aux problèmes culturels ou de langue. Pour exemple, dans une étude sur les <sup>contraintes</sup> liées au développement du HACCP dans les pays en voie de développement, Jirathana (1998) a identifié un nombre des contraintes, incluant: L'éducation et la formation : souvent le personnel qualifié dans les entreprises agroalimentaires dans les pays en voie de développement manque, et ceci peut présenter des problèmes, en particulier dans l'identification de risque et la disponibilité de la documentation sur le HACCP dans la langue maternelle dans la plupart des pays en voie de développement de la langue HACCP est susceptible d'être très limitée. En conséquence, il y a une hégémonie lourde des langues étrangères (principalement anglaise)( Ropkins et Beck, 2000)

Dans ces mêmes pays, les industries agro-alimentaires manquent d'informations (statistiques nationales d'intoxication alimentaire bases de données sur le risque alimentaire, guides, etc..) requises pour se développer évaluations fiables de risque.

Dans ces pays, le système HACCP nécessitera encore un investissement continu en ressources humaines et le développement de programmes de formation pour le personnel. Pour que la mise en oeuvre du HACCP soit rentable, il est conseillé aux PME de développer les compétences de leur personnel en vue de la préparation des plans HACCP et autres procédures du

**Tableau N°31** : Les paramètres de croissance estimés par le modèle de Gompertz à la température de 30°C.

[NaCl]%	pH	Lag (h)	GT(h)	EGR	MPD	R <sup>2</sup>
0,5	4,5	8,09	2,1	0,139	3,152	0,99
	5,5	11,5	1,2	0,246	<b>8,456</b>	0,99
	6,5	2,7	0,6	0,48	6,96	0,98
	7,5	0,2	0,7	0,409	6,767	0,92
2,5	4,5	17,04	0,8	0,358	6,135	0,99
	5,5	9,04	0,6	0,479	7,549	0,99
	6,5	2,8	0,7	0,412	7,324	0,99
	7,5	1,3	0,6	0,434	7,574	0,96
4,5	4,5	<b>32,5</b>	<b>6,5</b>	<b>0,046</b>	4,853	0,99
	5,5	23,4	0,5	<b>0,591</b>	3,856	0,99
	6,5	3,8	0,7	0,396	6,646	0,99
	7,5	1,6	0,7	0,418	5,995	0,97
7	4,5	15,1	0,5	0,517	7,511	0,99
	5,5	17,4	0,9	0,326	5,634	0,99
	6,5	5,7	0,7	0,417	6,428	0,99
	7,5	1,6	0,7	0,423	4,617	0,94

**Tableau N°32** : Les paramètres de croissance estimés par le modèle de Gompertz à la Température de 10°C

[NaCl]%	pH	Lag (h)	GT(h)	EGR	MPD	R <sup>2</sup>
0,5	4,5	-	226	0,001	0,412	0,21
	5,5	-	31,1	0,009	4,317	0,96
	6,5	12,2	17,2	0,017	3,701	0,95
	7,5	54,9	31,4	0,009	4,6	0,96
2,5	4,5	-	205	0,001	0,49	0,69
	5,5	55,6	19,2	0,015	3,29	0,98
	6,5	-	24,4	0,012	4,417	0,92
	7,5	-	32,6	0,009	3,721	0,87
4,5	4,5	210,03	1,8	<b>0,166</b>	0,961	0,87
	5,5	107,4	96,7	0,003	2,357	0,98
	6,5	-	39,8	0,007	<b>5,452</b>	0,97
	7,5	75,6	20,3	0,014	4,463	0,96
7	4,5	-	<b>744</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,297</b>	0,19
	5,5	13,3	93,4	0,003	1,267	0,7
	6,5	<b>338,9</b>	11,8	0,025	4,801	0,99
	7,5	163,5	26,8	0,011	1,507	0,95

Lag = phase de latence. GT = temps de génération. EGR = taux de croissance maximal.

MPD = densité de population maximale.  $R^2$  = coefficient de corrélation

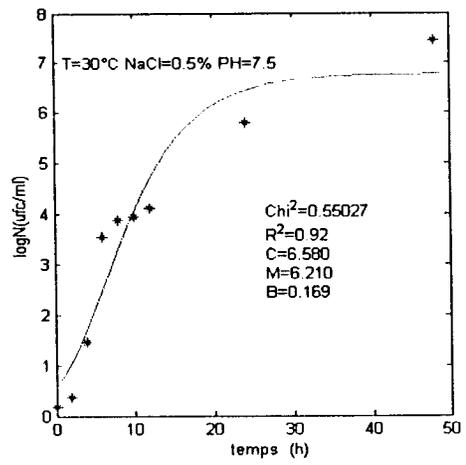
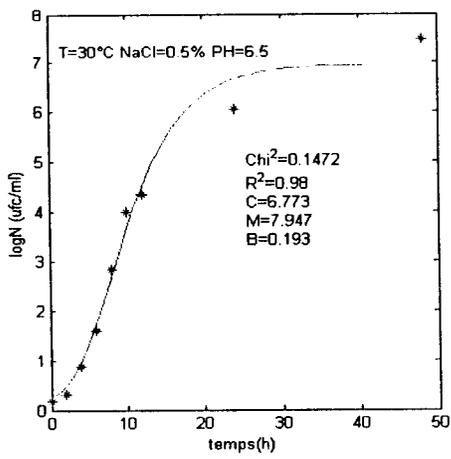
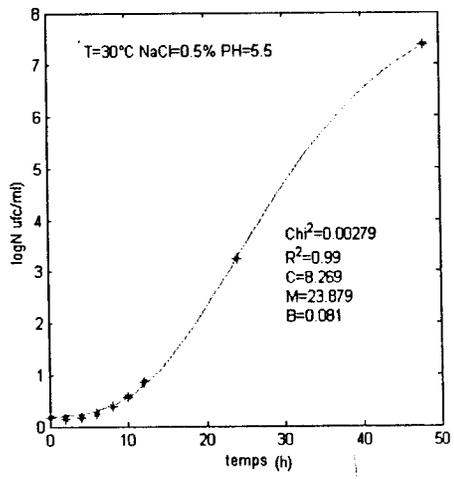
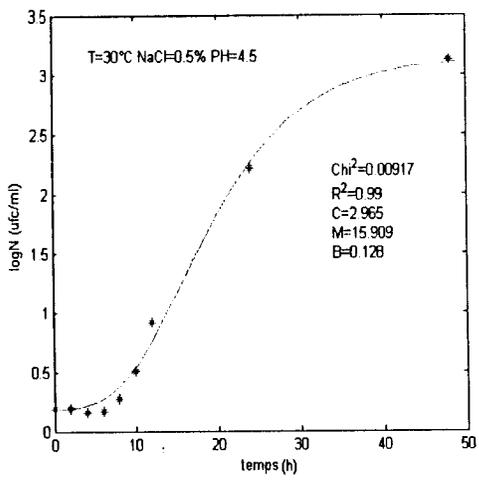


Figure N°7 : Ajustement du modèle de croissance de *Bacillus cereus* à 30°C et 0.5% en NaCl

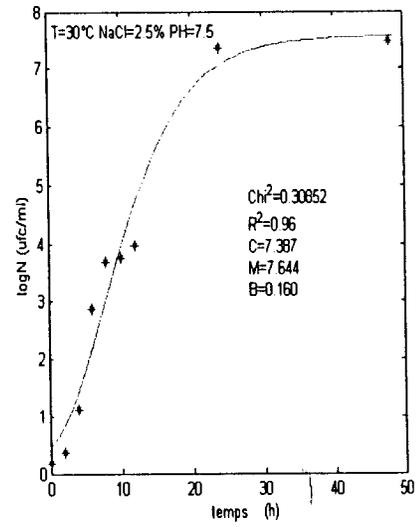
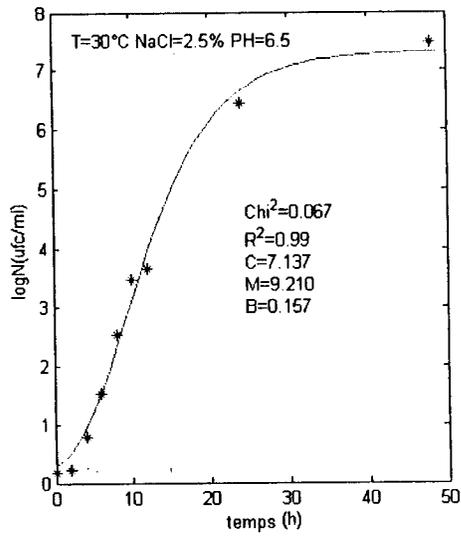
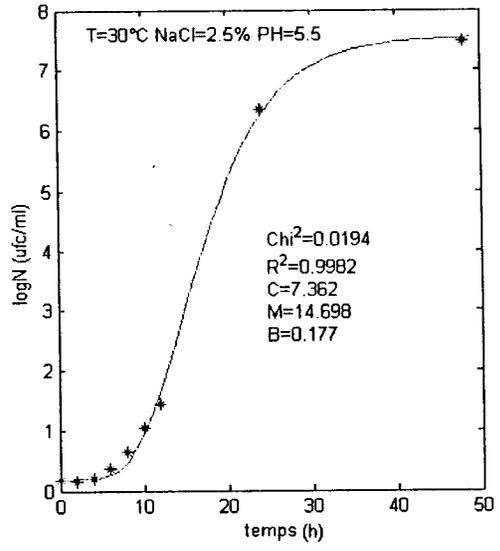
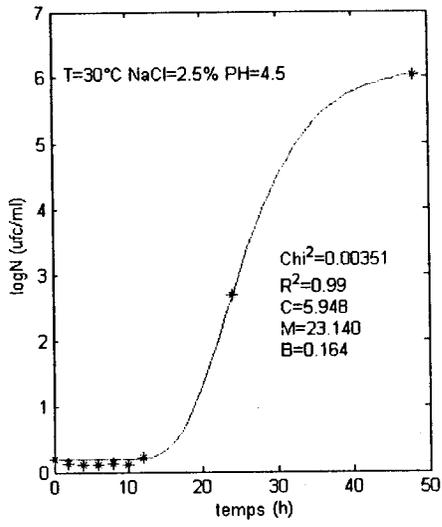


Figure N°8 : Ajustement du modèle de croissance de *Bacillus cereus* à 30°C et 2.5% en NaCl

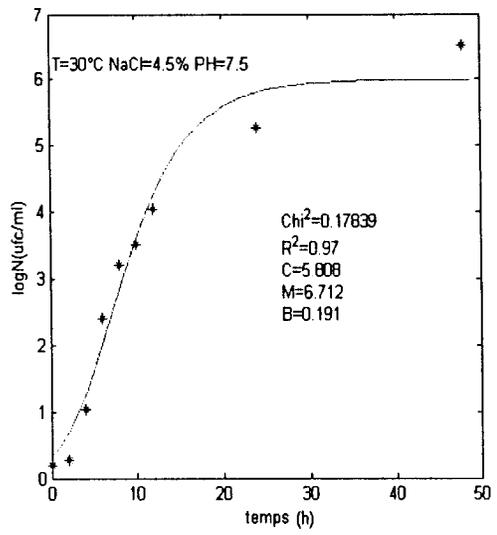
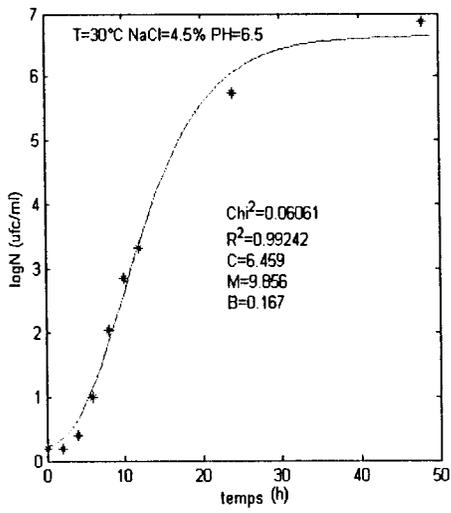
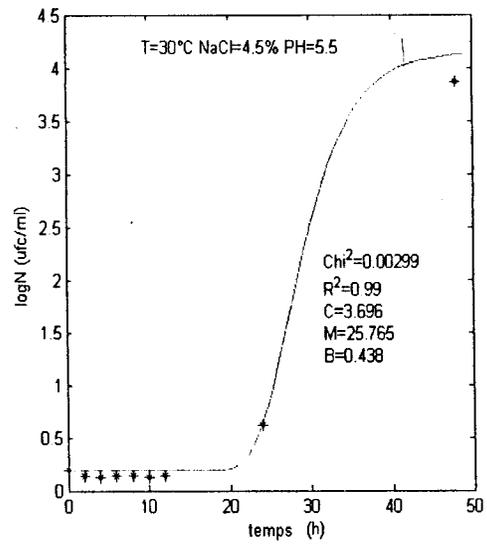
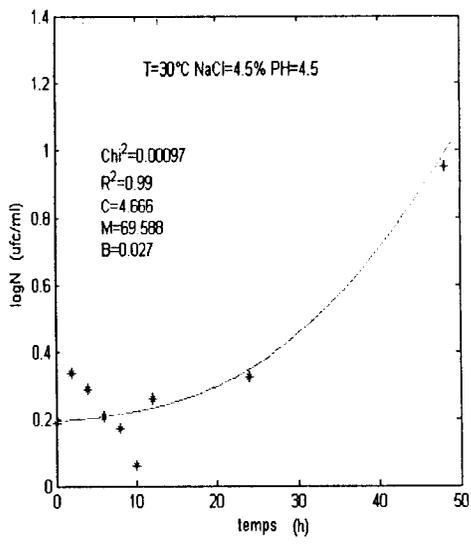


Figure N°9 : Ajustement du modèle de croissance de *Bacillus cereus* à 30°C et 4.5% en NaCl

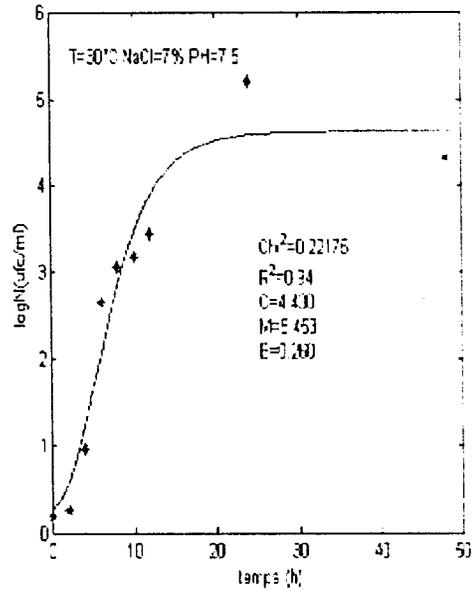
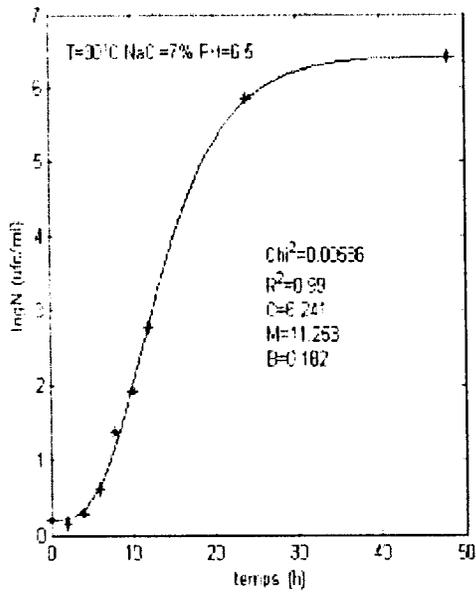
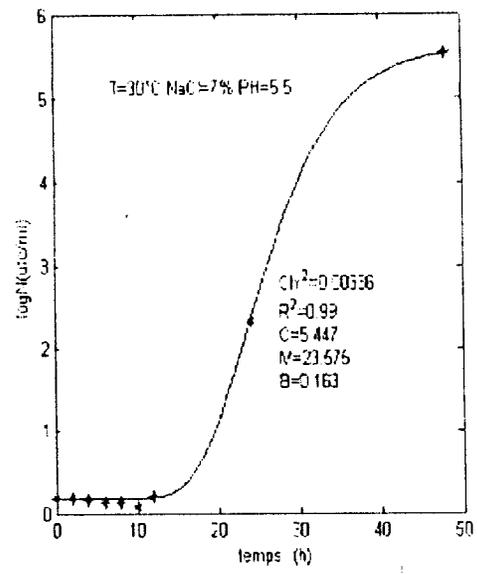
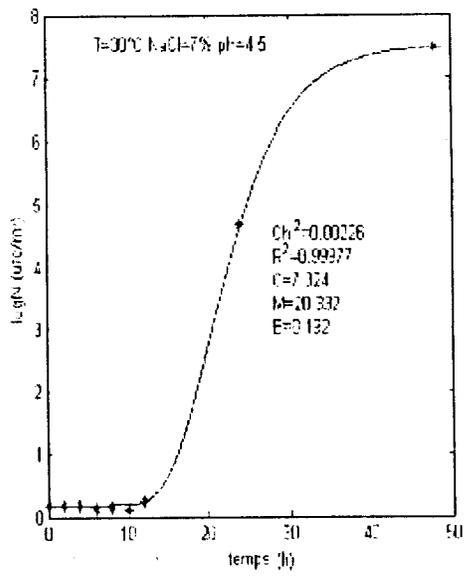


Figure N°10 : Ajustement du modèle de croissance de *Bacillus cereus* à 30°C et 7% en NaCl

#### IV. 2. Paramètres de croissance de *Bacillus cereus* selon les données du logiciel PMP6.1

Afin de comparer les paramètres de croissance estimés par le modèle de Gompertz à la température de 30°C et 10°C et aux différentes concentrations de NaCl et de pH. Nous avons utilisé les données du Pathogen Modeling Program. L'apport de ces modèles est jugé sur les limites de confiance qu'ils donnent. On discutera des limites de leur utilisation. Les tableaux N°33 et 34 dont les courbes correspondantes sont données par les figures 11, 12, et 13 donnent les paramètres de croissance estimés par le Pathogen Modeling Program pour *Bacillus cereus* cultivé dans un bouillon nutritif à la température de 30°C et 10°C et aux différentes concentrations de NaCl et de pH.

**Tableau N°33** : Les paramètres de croissance de *Bacillus cereus* estimés par le Pathogen Modeling Program à la Température de 30°C et pour les concentration de NaCL et des valeurs de pH étudiées.

[NaCl]%	pH	Lag (h)	GT(h)	TTI 5
0,5	4,7	7,1	1,0	30,3
	5,5	2,0	0,5	14,1
	6,5	1,1	0,4	9,5
	7,5	1,6	0,4	11,4
2,5	4,7	6,7	1,1	33,6
	5,5	2,5	0,7	19,5
	6,5	1,9	0,6	17,0
	7,5	3,9	0,9	26,3
4,5	4,7	10,1	0,9	30,6
	5,5	4,9	0,7	20,6
	6,5	5,1	0,7	22,9
	7,5	14,5	1,4	48,3

**Tableau N°34 :** Les paramètres de croissance de *Bacillus cereus* estimés par le Pathogen Modeling Program à la Température de 10°C et pour les concentration de NaCL et des valeurs de pH étudiées.

[NaCl]%	pH	Lag (h)	GT(h)	TTI 5(h)
0,5	4,7	-	-	-
	5,5	-	-	-
	6,5	44.4	4.0	118.2
	7,5	83.6	7.2	216.7
2,5	4,7	-	-	-
	5,5	-	-	-
	6,5	126.5	8.6	284.2
	7,5	330.3	19.7	693.2
4,5	4,7	-	-	-
	5,5	-	-	-
	6,5	569.9	12.1	791.9
	7,5	-	-	-

**Lag** = phase de latence. **GT** = temps de génération.

**TTI5** = Temps qu'il faut à la bactérie pour atteindre le seuil de  $01^5$ ufc/ml.

**Figure N°11a** : Courbes de croissance de *Bacillus cereus* à 30°C et 0.5% en NaCl  
et aux pH 4.7 et 5.5 données par le PMP



**Figure N°12a** : Courbes de croissance de *Bacillus cereus* à 30°C et 2.5% en NaCl  
et aux pH 4.7 et 5.5 données par le PMP



**Figure N°12b** : Courbes de croissance de *Bacillus cereus* à 30°C et 2.5% en NaCl  
et aux pH 6.5 et 7.5 données par le PMP



**Figure N°13a** : Courbes de croissance de *Bacillus cereus* à 30°C et 4.5% en NaCl  
et aux pH 4.7 et 5.5 données par le PMP



**Figure N°13b** : Courbes de croissance de *Bacillus cereus* à 30°C et 4.5% en NaCl  
et aux pH 6.5 et 7.5 données par le PMP



A pH 5,5, le taux de croissance enregistré est égal à  $0,479 \text{ h}^{-1}$  comme valeur maximale et  $0,358 \text{ h}^{-1}$  comme valeur minimale à pH 4,5.

La densité de population maximale égale à  $7,574 \log (\text{u/ml})$  et obtenu à pH 7,5

Sur la figure N° 11, on remarque que le temps de latence le plus élevé est égal à 32,55 h à pH 4,5 avec un temps de génération maximal (6,5 h) obtenu à la même valeur du pH. Le taux de croissance minimal est estimé à  $0,046 \text{ h}^{-1}$ , par contre le taux de croissance maximal ( $0,59 \text{ h}^{-1}$ ) est obtenu à pH 5,5. Une densité de population maximale est enregistré à pH 6,5 et elle est de l'ordre de  $6,65 \log (\text{ufc/ml})$ .

Sur la figure N° 12, En présence de 7% de sel, la phase de latence maximale (17,4 h) est obtenue à pH 5,5. Le temps de génération maximal est enregistré à ce même pH. Sa valeur minimale (0,5 h) est observée à pH 4,5. Le taux de croissance maximal est obtenu à ce même pH, il est égal à  $0,517 \text{ h}^{-1}$ . Pour la même acidité, cette vitesse de croissance engendre une densité de population maximale de l'ordre de  $7,5 \log (\text{ufc/ml})$ .

La cinétique de croissance de *Bacillus cereus* à  $30^{\circ}\text{C}$  montre que la densité de population maximale (MPD) peut atteindre des valeurs de  $8,45 \log (\text{ufc/ml})$  à pH 5,5 et 0,5% NaCl. Le taux de croissance le plus élevé est remarqué à ce même pH et pour une concentration 4.5% en NaCl et il est estimé à  $0,59 \text{ h}^{-1}$ . Sa valeur minimale ( $0,046 \text{ h}^{-1}$ ) est atteinte pour un pH égal à 4,5 et une concentration en NaCl de 4,5%. Sous ces conditions, le temps de latence calculé est de 32,5 h et le temps de génération de 6,5h.

Peters et al, (1991) ont aussi trouvé que La progression du taux de croissance de *Bacillus cereus* était rapide dans l'intervalle de température compris entre  $14$  et  $41^{\circ}\text{C}$ , à une concentration de 0,5% du NaCl et à pH 4,7

Le pH minimal de croissance de *Bacillus cereus* sur le bouillon nutritif est égal à 4,5, certains auteurs rapportent que la valeur du pH de croissance minimale de *Bacillus cereus* dans un bouillon est de 4,9. La valeur maximale étant égale à 9,3. Selon Vlaemynck et Van Heddeghem (1992), à des valeurs de pH inférieures à 4,7, les cellules végétatives meurent alors qu'elles peuvent survivre sous forme de spores.



4.2.2. Description de l'effet de la température sur le taux de croissance de *Bacillus cereus* : Comparaison du modèle de Ratkowsky et du PMP 6.1

Le modèle de Ratkowsky décrit l'effet de la température sur le taux de croissance ( $\mu_{max}$ ).

Dans cette partie on tentera de montrer que la modélisation des taux de croissance de *Bacillus cereus* en fonction des températures, varient avec les modèles utilisés. Les résultats sont donnés par le tableau N°35 :

Tableau N°35 : Estimation des paramètres du modèle de Ratkowsky.

	Paramètres	b	T <sub>min</sub>	c	T <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
NaCl=0,5%	pH=4,5	0,017	8,13	0,531	45,251	1
NaCl=0,5%	pH=5,5	0,059	14,49	1,72	44,08	0,8
NaCl=0,5%	pH=6,5	0,046	12,88	2,295	44,07	0,96
NaCl=0,5%	pH=7,5	0,03	9,1729	0,26	48,18	1
NaCl=2,5%	pH=6,5	8,41	10,96	1,67	47,62	0,63
NaCl=2,5%	pH=7,5	7,3	10,43	1,27	52,2	0,86
NaCl=4,5%	pH=6,5	0,031	9,63	2,587	44,15	0,99
NaCl=4,5%	pH=7,5	0,0301	8,645	2,3389	44,1356	0,99
NaCl=7%	pH=7,5	5,67	10,273	2,84	45,93	0,82

A partir du tableau N°35 ,on peut dire que la température minimale de croissance de *Bacillus cereus* est égale à 8,13 °C atteinte pour la combinaison [0,5% en NaCl, pH4,5] et la température maximale est d'environ 52,20 °C à [2,5% en NaCl, pH 7,5]. L'étendue de cet intervalle confirme la gamme de température de *Bacillus cereus* comprise entre 5 et 55°C rapportée par la littérature.

Ce modèle ne fournit aucune idée sur la température optimale où le taux de croissance est maximal.

La première dérivée du modèle de Ratkowsky donne un point maximum correspondant à la température optimale montrée

Jusqu'à présent, il a été constaté que le taux de croissance ne dépend que de la température (Walker et al.1990 ; Buchanan et Klavitter., 1992).



L'ajustement avec le modèle de Ratkowsky est bon ( $R^2 > 0,8$ ) à l'exception de la combinaison (2,5% NaCl, pH 6,5) avec un coefficient de corrélation  $R^2$  égale à 0,63 ce qui est montré sur le tableau N°31.

La concordance de modèle de Ratkowsky aux données expérimentales bien que bonne présente de grandes différences avec les paramètres donnés par le logiciel PMP ce qui est confirmé les résultats de Fang et al (2002) sur la modélisation de croissance de *Bacillus cereus* à différentes températures dans le bouillon nutritif et le riz. Leurs résultats montrent un coefficient de corrélation  $R^2 >$  à 0,98.

#### 4.2.3 Description de l'effet de température, pH et l'activité de l'eau ( $A_w$ ):

Les figures N°14 et 15 illustrent les surfaces de réponse de régression quadratique de l'effet du pH, NaCl et  $A_w$  sur le taux de croissance et le temps de latence dont les équations peuvent s'écrire comme suit :

$$\ln \mu_{\max} = -140.122 + 22.635 \text{ pH} + 131.201 A_w - 0.535 T - 14.186 \text{ pH } A_w + 0.0117 \text{ pH } T + 0.6911 A_w T - 0.682 \text{ pH}^2 - 22.002 A_w^2 - 0.0026 T^2$$

$$\ln \text{lag} = -14.556 + 13.305 \text{ pH} - 39.901 A_w + 0.455 T - 11.849 \text{ pH } A_w - 0.0188 \text{ pH } T - 0.495 A_w T - 0.146 \text{ pH}^2 + 56.447 A_w^2 + 0.001 T^2$$

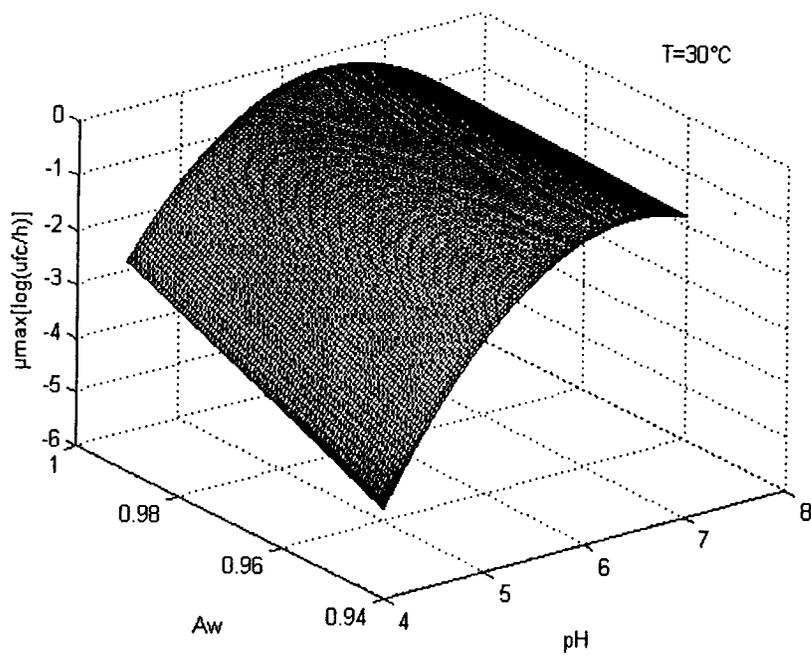


Figure N°14 : Modèle en surface de réponse montrant l'effet du pH et l'activité de l'eau ( $A_w$ ) sur le taux de croissance de *Bacillus cereus* à la température 30°C

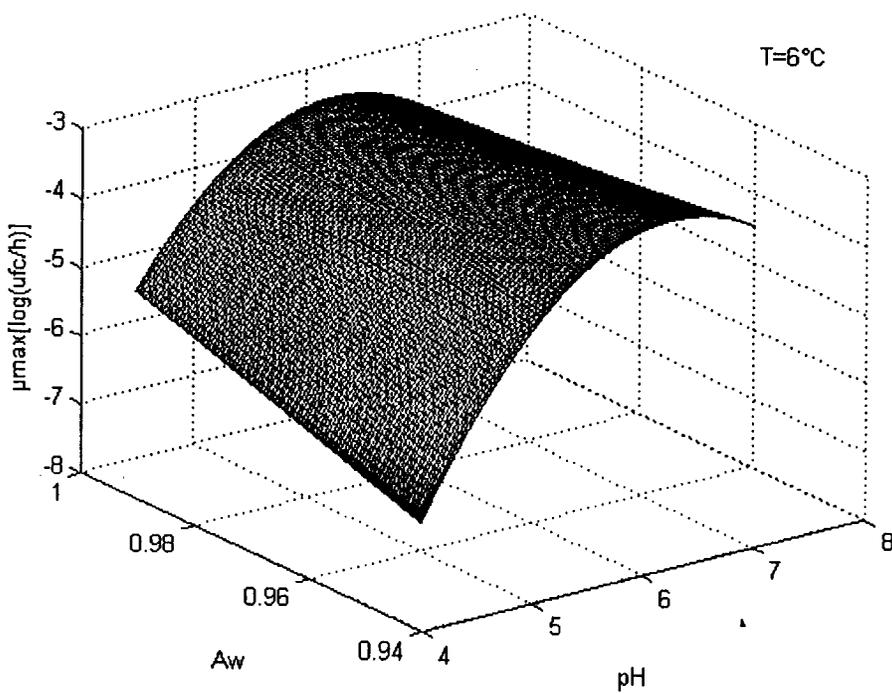


Figure N°15 : Modèle en surface de réponse montrant l'effet du pH et l'activité de l'eau ( $A_w$ ) sur le taux de croissance de *Bacillus cereus* à la température 10°C



Les surfaces de réponse dérivées à partir de l'équation quadratique montrent l'importance de l'effet de l'activité de l'eau ( $A_w$ ) avec l'interaction des autres facteurs contrôlés comme le montrent les figures N°12 et 13. quand le pH et l' $A_w$  diminuent, le taux de croissance est réduit et le temps de latence est prolongé. Des résultats similaires existent dans littérature (Chorin et al, 1997).

L'effet de la température est très marqué sur la croissance où la valeur minimale du taux de croissance augmente avec la diminution de la température jusqu'à la température optimale puis il diminue.

Buchanan et Phillips (1998) recommandent, en vue d'obtenir un bon ajustement du modèle à des jeux de données expérimentales, que les données « pas de croissance » ne soient pas prises en considération dans la modélisation de croissance.

Pour conclure l'effets de 3 facteurs environnementaux sur la croissance de *Bacillus cereus*, on peut dire que :

La diminution du pH vers 4.5, la diminution de la température et l'augmentation de NaCl de 0,5% à 7% c'est à dire la diminution de l'activité de l'eau ( $A_w$ ) de 0,99 à 0,95 provoquent la prolongation du temps de latence, l'élévation du temps de génération et l'abaissement du taux de croissance ce qui correspond à une faible densité de population maximale.

#### **IV. 4. Discussion Générale**

Deux activités de la microbiologie alimentaire peuvent être citées : La première activité est liée aux problèmes de contamination d'un produit. Il s'agit alors d'être capable de détecter une contamination, d'identifier les microbes responsables de cette contamination, de localiser l'origine de cette contamination et d'évaluer les potentialités de développement de la population contaminante dans son environnement, c'est à dire lors de la fabrication et du stockage de l'aliment. La deuxième activité consiste à mettre en place des procédés de fabrication permettant d'assurer la sécurité de l'aliment pour une durée donnée, dite durée limite de consommation. L'apport de la microbiologie prédictive par rapport à cette problématique est de permettre, pour des conditions environnementales données, l'estimation de la cinétique de ces populations et également du temps de seuil.



La microbiologie prévisionnelle serait pour certains l'outil qui rendrait inutile les manipulations visant à tester la sécurité microbiologique d'un nouveau procédé ou d'un nouveau produit.

Dans un bon modèle, les différences entre données prédites et observés devraient être normalement distribuées et l'erreur doit être indépendante du paramètre modélisé permettant ainsi son application pratique au cas étudié. Les paramètres du modèle doivent être interprétables c'est-à-dire avoir un sens biologique surtout pour estimer les valeurs initiales dans la régression non linéaire (Pin, 1998). La parcimonie et la simplicité du modèle sont fondamentales : ainsi, le modèle ne doit comprendre que le minimum de paramètres nécessaires à la compréhension du phénomène modélisé (Germe et Zwietering, 1998). Les caractéristiques des fonctions mathématiques doivent concorder avec le processus qu'on veut modéliser. Ces caractéristiques sont essentiellement relatives à la monotonie, la convexité ou la concavité, la localisation des extrémités, des points d'inflexion et des points de coupure etc.

Enfin un bon modèle doit être généralisable. Quand celui-ci est amélioré, le nouveau modèle doit contenir l'ancien.

L'étude de comportement de *Bacillus cereus* a permis de prévoir l'influence des principaux facteurs environnementaux sur la croissance de cette bactérie. L'intérêt est de définir la température et le pH limitant ou inhibant la croissance de ce germe au niveau de la ferme surtout et d'autre part, la concentration en sel qui devra être utilisée ultérieurement en industrie laitière, fromagerie par exemple.

La modélisation de croissance de *Bacillus cereus* par le modèle de Gompertz et le modèle de Ratkowsky permettent un bon ajustement aux données expérimentales mais pris l'application des logiciels met en évidence des limites de confiance assez larges d'où la nécessité de mesurer le risque d'erreur sur la sécurité du produit. Il faut, en d'autres termes, appliquer des conditions plus sévères que celles données par les modèles. Les données du PMP ont conforté l'idée qu'un  $\text{pH} \leq 4.7$  inhibe la croissance de *Bacillus cereus*. Il est aussi à remarquer la croissance faible de cette bactérie à 10°C, cependant il faut noter que certaines souches de *Bacillus cereus* sont psychrotrophes. Ces données indiquent que la réfrigération des aliments contaminés par des cellules végétatives de *Bacillus cereus* ne constitue pas une solution efficace à ce problème précis. Cette propriété nous rappelle qu'un traitement thermique adéquat avant la réfrigération est très important pour la protection de la qualité des aliments et plus particulièrement le lait.

L'apport des modèles dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels les protocoles ne sont pas des moindres ( Pinon et al., 2004)

Dans de nombreux pays, la consommation d'un aliment est considérée comme dangereuse quand une densité de *Bacillus cereus* potentiellement critique est dépassée. Ce seuil est actuellement considéré comme n'étant pas supérieur à  $10^4$ - $10^5$  ufc/g ou ml de produit.

Comme pour toute croissance de population bactérienne, cette densité est atteinte après un temps qui dépend de l'importance de la population de départ (contamination initiale ou inoculum initial), de la bactérie (temps de latence, taux de croissance), des contraintes environnementales modifiant les paramètres de croissance de la bactérie (température, acidité, teneur en eau, etc.) et enfin des variations de ces contraintes (variations de température, de pH, de teneur en eau, etc.). Les tests de vieillissement, de conservation avec contamination expérimentale (« challenge tests ») consistent à suivre le devenir de la population bactérienne à un niveau correspondant à la contamination habituelle de l'aliment en fin de production au cours du temps. Pour qu'un tel test soit réaliste, c'est-à-dire qu'il apporte une réelle information sur le comportement des bactéries, il faut que le scénario de vie de l'aliment soit connu ou approximativement connu ; le test cherchera à reproduire fidèlement le scénario de vie en particulier les variations environnementales (mais seule la température peut être réellement modulée lors de ces tests). Le temps que met la bactérie pour atteindre le seuil dangereux permet alors de fixer pour le produit la DLC. le test de vieillissement doit être répété avec divers lots de fabrication, éventuellement avec des souches différentes de la bactérie.

La microbiologie prévisionnelle par simulation numérique permet d'apporter des renseignements complémentaires ou même se substitue aux tests de vieillissement si les paramètres de base de la dynamique des populations bactériennes sont connus dans l'aliment concerné. Une étude de contamination expérimentale, selon un protocole simple, permet d'estimer ces paramètres s'ils sont inconnus. La microbiologie prévisionnelle par simulation numérique a le grand avantage de permettre de simuler des scénarios de vie des produits en quelques minutes.

Dans le cas de *Bacillus cereus*, si on applique des méthodes strictes d'hygiène on peut ramener le taux de contamination initial au-dessous de 2 ufc/ml . Ce taux initial nous permet ainsi d'assurer plus de 18 jours de conservation en toute sécurité et ceci dans des conditions d'utilisation du produit (5°C). Ce gain de conservation constitue une récompense pour les bonnes pratiques de fabrication et les bonnes pratiques d'hygiène à la fabrication. Si les



contaminations initiales étaient supérieures ou égales à 100ufc/ml et que la température de stockage est effectuée à 7°C, la DLC ne sera que de 9 jours.

Le logiciel PMP permet de calculer, en connaissant une densité observée en fin de DLC de connaître l'inoculum correspondant au départ du produit. Il est possible d'employer les données des contrôles pour calculer les inoculums en fin de production. Ceci nécessite, si l'on désire une bonne précision, une très bonne connaissance des conditions de conservation. Si l'on désire seulement un ordre de grandeur un scénario réaliste de l'évolution thermique peut être utilisé. L'inoculum initial est mieux connu du secteur industriel et il serait nécessaire d'avoir accès à ces données en fin de production.

Une approche différente, mais fondée sur les mêmes concepts, a permis de trouver, pour *L. monocytogenes*, une expression simple de la diminution de DLC, à niveau de risque constant, en cas de modification d'une variable environnementale par exemple augmentation de température, (Rosso *et al.* 1996).

### **De la Disponibilité des bases de données.**

Dans les années 90, deux principaux ensembles de données ont été produits sur des réponses bactériennes aux environnements alimentaires: c'était la base *du food MicroModel* (FMM, un paquet commercial soutenu par MAFF (ministère de pêche et de nourriture d'agriculture) et plus tard FSA (agence de normes alimentaires) au R-U; l'autre était derrière *pathogen modelling program* (PMP) du centre régional oriental de recherches (ERRC), le service agricole de recherches (ARS - USDA), aux USA.

Les bases de données du food micromodel et du PMP ont été complétés avec l'information additionnelle soumise par les chercheurs de l'ERRC, du USDA une compilation de la littérature scientifique par l'institut de la recherche alimentaire (IFR), Norwich, R-U, et avec l'appui de l'agence britannique des normes alimentaires ces données ont été maintenant unifiées dans une base de données commune connue sous le nom de *ComBase* suivant une structure développée par l'IFR. Les quatre associés ont signé une convention qui place les objectifs et l'opération à long terme du consortium de ComBase. Il s'agit donc d'une base de données libre de microbiologie alimentaire. L'ensemble de données se compose des milliers de courbes microbiennes de croissance et de survie qui sont la base pour de nombreux modèles microbiens employés par l'industrie, le milieu universitaire et les organismes de normalisation de gouvernement. La base de données de *ComBase* est une initiative internationale importante pour coordonner la collecte et la diffusion des données de



microbiologie alimentaire. Elle est maintenue par le consortium ComBase, établi à Londres depuis le 5 mai, 2003 ; Le consortium regroupe l'agence de normes alimentaires (FSA) et l'institut de la recherche alimentaire (IFR), du R-U, et du service agricole de recherches de l'USDA et de son centre régional oriental de recherches (ERCC) , Etats-Unis.



## CONCLUSION GENERALE

L'enthousiasme qu'ont montré non seulement l'industrie alimentaire mais aussi les gouvernements et les organisations internationales vis-à-vis du concept HACCP est dû à son caractère universel basé sur le bon sens. Dans certains pays, ce système a non seulement prouvé son efficacité en tant qu'outil d'assurance qualité et sécurité alimentaire mais il a été intégré de façon systématique à d'autres systèmes de management de la qualité.

Il y a maintenant plus de trente ans que le système HACCP existe malgré cela, il n'est pas encore ancré dans tous les pays principalement ceux en voie de développement comme l'Algérie. Les problèmes liés à sa mise en œuvre ne sont pas rares.

Sept principes de base ont été considérés comme essentiels pour ce système. L'application de ces principes rencontre les contraintes suivantes :

Premièrement l'environnement managérial dans lequel le système va être appliqué. Dans une entreprise, la responsabilité de mettre en place le système HACCP est généralement du ressort des cadres techniques, ceux-ci doivent obtenir le support total des premiers responsables de l'entreprise. Au lieu de cela, la réponse est généralement le scepticisme. En fait, même dans les pays développés, le système a toujours rencontré des problèmes lors de son introduction. Dans un pays comme l'Australie, il a fallu une dizaine d'années pour que le système se généralise à toute l'industrie agroalimentaire. Cela peut s'expliquer par le fait que la démarche HACCP, au contraire des systèmes de contrôle de qualité traditionnels à posteriori, exige un grand investissement de temps et d'efforts pour collecter l'information, pour améliorer sans cesse le processus de fabrication, pour améliorer la qualité des matières premières etc..

La formation au système HACCP est un autre problème. Le responsable HACCP doit maîtriser parfaitement la méthode et être capable d'animer les discussions avec les autres intervenants et non les dominer. Les petites entreprises et même certaines grandes entreprises sont obligées d'avoir recours à des experts extérieurs. Il voit en cela un surcoût ce qui freine leur ardeur.

L'équipe HACCP doit savoir identifier les dangers inhérents au produit que leur entreprise fabrique.



Avec l'hypothèse que l'entreprise arrive à mettre le système HACCP en place, la sécurité du produit ne sera pas pour autant acquise car celle-ci va de la matière première au consommateur. Cela sous entend une multitude d'intervenant. Le système ne sera efficace que s'il est appliqué à toute la filière. Cette responsabilité incombe aux autorités publiques qui à travers la réglementation doivent préciser la responsabilité de tous les intervenants dans le processus de mise à la consommation des aliments. Il faut en fait un programme national d'amélioration de la sécurité sanitaire des aliments qui aura comme charnière le système HACCP.

La microbiologie prévisionnelle présente un intérêt réel. Ce sont surtout les pays anglo-saxons qui développent cette approche pour tenter de résoudre les problèmes de sécurité alimentaire. Le principal problème réside dans l'étape de validation. Les modèles peuvent prédire une croissance plus rapide du microorganisme que celle enregistrée dans un aliment. Sur le plan sécuritaire on peut se satisfaire d'un tel état de fait mais ce risque d'être antiéconomique car il s'agit souvent de rejeter des produits qui sont sains. Il en résulte la tentation de dépasser les limites quand on sait qu'elles sont infondées.

La microbiologie prévisionnelle a devant elle bien de défis comme la complexité des produits alimentaires, les effets transitoire et de rupture de chaîne de froid et les données relative à la physiologie des microorganismes et les effet de traitements de transformation.

Le consommateur en sera le premier bénéficiaire.



- Ababouch, L.H** (1995): Assurance de la qualité en industrie halieutique. Actes Editions IAV Hassan II Rabat Maroc
- Ababouch, L.H, Bouquartacha, F.,Busta, F.F** (1994) Inhibition of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells by fatty acids and glycerol monododecanoate. *Food Microbiol.*, 11 : 327 – 336
- Adair, C., Kilsby, D.C., Whithall, P.T.**, (1989): Comparison of the Schoolfield (non linear Arrhenius) model and the square root model for predicting bacterial growth in foods. *Food Microbiol.*6:7-18.
- Adams, M.R., Little, C.L., Easter, M.C.**, (1991): Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Applied Bacteriol.*71:65-71.
- Afnor**, (1995) Norme XPV 08 –058 Microbiologie des aliments : Dénombrement de *Bacillus cereus* par comptage des colonies à 30°C. Afnor Ed. France
- Agata, N., Mori. M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I., and Isobe, M.**, (1994): A novel dodecapeptide cereulide isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells .*FEMS Microbiol. Letters* : 121: 31-34.
- Agata, N., Ohta.M., Arakawa.Y., and Mori.M.**, (1995) The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiol.*, 141, 983-988.
- Ahmed, A.A.-H., Moustafa, M.K., Marth, E.H.** (1983): Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. *J. Food Prot.* 46, 126-128
- Alexopoulous, C, Karagiannidis, A, Kritas, S.K, Boscos, C ,Georgoulakis, I.E , Kyriakis, S.C.** (2001) Field evaluation of a bioregulator containing live *Bacillus cereus* spores on health status and performance of sows and their litters. *J.Vet. Med. A* 48 :137-145.
- Andersson, A, Rönner, U.L.F.** (1998) Adhesion and removal of dormant, heat-activated ,and germinated spores of three strains of *Bacillus cereus*. *Biofilms* , 13 : 51-67.
- Andersson, A, Rönner, U.L.F. and Granum, P.E** (1995) What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.* 27: 145-155. .
- Andersson, M.** (1998) A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide inophores. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 1338-1343.
- Anonyme** (1998), Arrêté interministériel du 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires. JORADP N°35 du 27 mai 1998.



- Ash, C., Farrow, J.A., Drosch, M., Stackebrandt, E., Collins, M.D.,**(1991) Comparative analysis of *Bacillus anthracis* , *Bacillus cereus* , and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S RARN. Int.J.Sys.Bacteriol, **1**: 41: 343-346.
- Baker, D.A.** (1995). Application of modelling in HACCP plan development. Int. J. Food Microbiol. **25** : 251-261.
- Baker, J. M., Griffiths M. W.** (1993). Predictive modelling of psychrotropic *Bacillus cereus*. J. Food. Prot. **56** : 684-688.
- Baker, J.M. et Griffiths, M.W.** (1995): Evidence for increased thermostability of *Bacillus cereus* enterotoxin in milk. J. Food Prot **58**: 443-445
- Bannerjee, S.N. et Black, W. A.** (1986): Food poisoning by psychotropic bacteria growing in pasteurised milk end milk products, Dairy Food Sanit. **6**: 511 – 519.
- Baranyi, J. Roberts, T.A McClure, P.** (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. Food Microbiol. **10**:43-59.
- Baranyi, J., Roberts, T.A.** (1995). Mathematics of predictive food microbiology. Int. J. Food Microbiol.. **26**:199-218.
- Barbati, S. , Colacurci, B., Aquila, M.G.,** (1998). Investigation of *Bacillus cereus* contamination levels in Precooked Food. Microbiologie – Aliments – Nutrition, **16**, 131–133.
- Bariller, J.** (1996) Sécurité alimentaire et HACCP. In Iarpent, J.P. Microbiologie alimentaires : techniques de laboratoire Ed. Tec. et Doc. Lavoisier Paris
- Bauman, H. E.** (1974): The HACCP concept and microbiological hazard categories. Food Technology **28**, 30 - 40
- Bazin, M.J. Prosser, J.I.** (1992). Modeling microbial ecosystems. J. Appl. Bacteriol. Symposium Suppl.**73**:89s-95s.
- Becker, H., Schaller, G., Von Wiese, W., Terplan, G.** (1994). *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. Int. J. Food Microbiol. **23**, 1-15
- Beecher, D.J and Wong, C.L** (2000). Tripartite haemolysin BL : isolation and characterisation of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate. Microbiol. **146** : 1371-1380.
- Benedict, R.C. Partridge, T., Wells. D., Buchanan, R.L.,** (1993). *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics. Journal of Food Protection. **56**:211-214.
- Bergère, J.L.** (1993) Spore formation and germination of *Bacillus cereus* in milk and milk products: the spore cycle. IDF bulletin, **275** : 9-14.



- Bergère, J.L. and Cerf, O.**, (1993) Heat resistance of *Bacillus cereus* spores. IDF Bulletin, 275 : 9-14.
- Berkeley, R.C.W., Ali, N.** (1994). Classification and identification of endosporeforming bacteria. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement 76, 1-8
- Betsi, A.S., M. C., Te Giffel, R., Beumer and G. Greetandre**, (1997). Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. Int. Dairy J. 7 : 201-205 .
- Beuchat, L.R, Rocelle, M.S, Jaquette, C.B** (1997). Effects of nisin and temperature on survival, growth, and enterotoxin production *Bacillus cereus* in beef gravy. Appl. Environ. Microbiol., 63 : 1953-1958.
- Billing, E., Cuthbert, W. A.** (1958): "Bitty" cream: The occurrence and significance of *Bacillus cereus* spores in raw milk supplies. J. Appl. Bacteriol. 21, 65-78
- Blocher, J. C., and Busta, F. F.** (1983): Bacterial spore resistance to acid. *Food Technol.* 37, 87-99.
- Boschwitz, H., Gofshtein, Gandam, L., Halvorson, H. O., Keynan, A., Milner, Y.**, (1991). The possible involvement of trypsin-like enzymes in germination of spores of *Bacillus cereus* T and *Bacillus subtilis* 168. J. Gen. Microbiol. 137 :1145 -1153.
- Bradshaw, J. G., Peeler, J. T., Twedt, R. M.**, (1975). Heat resistance of ileal loop reactive *Bacillus cereus* strains isolated from commercially canned food. Appl. Microbiology 30, 943-945.
- Bramley, A. J. and Mckinnon, C. H.** (1990). The microbiology of raw milk, in Robinson.R.K. (ed) Dairy Microbiology, (2<sup>nd</sup> ed.), Vol.1, The Microbiology of Milk, Elsevier Science Publishers Ltd (UK)
- Bréand, S.**, (1998). Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température et de pH. Applications en microbiologie prévisionnelle alimentaire. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard Lyon1.
- Breidt, F., Fleming, H. P.**, (1998). Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. Appl. Environ. Microbiol... 64: 3159-3165.
- Brouillaud, A., Kobilinsky, A., Cerf, O.**, (1994). Méthode de mesure de l'efficacité des procédés de nettoyage et de désinfection des surfaces ouvertes. Le lait. 74, 79 – 88.
- Brown, K. L., and Martinez, A.** (1992): The heat resistance of spores of *Clostridium botulinum* 213B heated at 121-130°C in acidified mushroom extract. J. Food Prot. 55, 913-915.



- Brown, R. W., Scherer, R. K.** (1957). A report on two cases of acute mastitis caused by *Bacillus cereus*. *Cornell Veterinarian* **47**, 226-240
- Bryan, F. L.**, (1983): Epidemiology of milk-borne diseases. *J. Food Prot.* **46**, 637 – 649.
- Bryan, F. L., Bartleson, C. A., and Christopherson, N.** (1981). Hazard analysis, in reference to *Bacillus cereus*, of boiled and fried rice and fried rice in Cantonese style restaurants. *J. Food Prot.* **44**, 500-512.
- Buchanan, R. L.**, (1993). Predictive food microbiology. *Trends food Sci. Technol.* **4**:6-11
- Buchanan, R. L., Schultz, F. J.** (1992). Evaluation of the Oxoid BCET-RPLA kit for the detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin as compared to cell culture cytotoxicity. *J. Food Prot.* **55**, 440-443
- Buchanan, R. L., Whiting, R.C.** (1998). Risk assessment: A mean for linking HACCP plans and public health. *J. Food Prot.* **67**, 1531-1534
- Busscher, H. J.; Weerkamp, A. H.**, (1987). Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol. Reviews.* **46**, PP.165-173.
- Busta, F. F.; Ababouch, L. H.** (1987) Effect of thermal treatments in oils on bacterial spore survival. *J. Appl. Bacteriol.* **62**, 491-502.
- Busta, F.F.** (1976). Practical implication of injured microorganisms in food. *Journal of Milk and Food Technology.* **39**:138-145.
- C. A. C. Q. E.** (1994) Guide d'inspection des établissements laitiers, projet Algéro-Canadien Juin 1994.
- Callegan, M.C, Bradley, D.J Hancock, L.E, Gilmore, M.S** (1999). Role of haemolysin BL in the pathogenesis of extraintestinal *Bacillus cereus* infection assessed in an endophthalmitis model. *Infection and Immunity.* **67**, 3357-3366.
- Carlin, F, Girardin, H., Peck, M.W., Stringer, S.C., Barker, G.C, Martinez, A., Fernandez, A., Fernandez, P., Waites, W.M, Movahedi, S., Leusden, F.V, Nauta, M., Moezelaar, R., Torre, M.D., Litman, S.**, (2000). Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables : a FAIR collaborative project. *Int. J. Food Microbiol.*, **60**, 117-135.
- Carlin, F., Guinebretiere, M. H., Choma, C., Pasqualinil, R., Braconnier, A., and Nguen, The C.** (2000): Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purées. *Food Microbiol.* **17**, 153-165.

- Casadei, I.R., Hitchings, E., Archer, J., Gaze, J.E.** (2001): Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *Int. J. Food Microbiol.*, **63**, 125-134.
- Cerf, O. et Bergère, J. L.**, (1992). Heat resistance of *Bacillus cereus* spores. Bulletin of the international dairy federation. N° 275 .PP. 17-20
- Chaibi, A., Ababouch, L. H., Gouila, M. R., and Busta, F. F.**, (1998). Effect of monoglycerides on the thermal inactivation kinetics of *Bacillus cereus* F4165/75 spores. *Food Microbiology*, **15**, PP.527-537
- Champagne, C. P., Laing, R. R., Roy, D., Mafu, A. and Griffiths, M. W.** (1994). Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **34**, PP. 1-30.
- Charles-Bajard, S.**, (1996). Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de *Listeria monocytogenes* .Thèse de doctorat Université Claude Bernard Lyon 1.
- Chatelin, Y.M. et Richard, J.** (1983). Comparaison dans des conditions courantes de l'efficacité de quatre méthodes de nettoyage des machines à traire. *Le Lait*, **63**, 87-101
- Christiansson, A, Naidu, A. S, Nilsson, I, Wadström, T, and Pettersson, H.**, (1989). Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2595-2600.
- Christiansson, A.**, (1992). Enterotoxin production in milk by *Bacillus cereus*: comparaison of methods for toxin detection. Bulletin of the IDF N° 287. 54-59.
- Christiansson, A., Bertilsson, J., and Svensson, B.**, (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk. Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J. Dairy Sci.* **82**, 256-263.
- Claus, D., Berkeley, R. C. W.**,(1986). Genus *Bacillus* in Bergy's Manuel of systematic Bacteriology, Vol 2,ed .Sneath,P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M.E., Holt, J. G., pp. 1105-1139 Williams and Wilkins. . Baltimore.
- Clements, M. O., Moir, A** (1998). Role of the ger I operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinant . *Journal of Bacteriology*, **180**, 6729-6735.
- Codex Alimentarius** (1997). Hazard Analysis and Critical control points (HACCP) system and guidelines for its application. Alinorm 97/13A, Appendix II Comité du codex alimentaire commission du Codex Alimentarius.

- Coghill, D., and Juffs, H. S., (1979).** Incidence of psychrotrophic spore-forming bacteria in pasteurised milk and cream products and effect of temperature on their growth. *The Australian Journal of Dairy Technology* **73**, 150-153
- Collins, E. B. (1981):** Heat-resistant psychrotrophic microorganisms. *J. Dairy Sci*, **64**, 157-160
- Condon, S., Arrizubieta, M. J., and Sala, F. J. (1993):** Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC. Improvement of this methodology. *J. Microbiol. Meth.* **18**, 357-366.
- Corlett, D. A., (1992).** The interaction of risk assessment, predictive modelling and the operating HACCP system. Proceeding of the second Asept International conference predictive microbiology and HACCP. Asept .Ed.,16-29.
- Cornu, M., (2000).** Dynamique des populations bactériennes en culture mixte. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Coroller, L., Leguerinel, I., Mafart, P., (2001).** Effect of water activity of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *App. Environ. Microbiol.*, **67**, 317-322
- Cousin, M. A. (1982)** Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J. Food Prot.* **45**, 172-207
- Couvert, O., Leguerinel, I., and Mafart, P., (1999):** Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Microbial.* **49**, 57-62 .
- Crielly, E. M., Logan, N. A., Anderton, A., (1994).** Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *J. Appl. Bacteriol*, **77**, 256-263.
- Cromie, S. J., Sdhmidt, D., Dommett, T. W. (1989).** Effect of pasteurization and storage conditions on the microbiological, chemical and physical quality of aseptically packaged milk. *Australian J. Dairy Technol.* 25-30
- Davey K.R. (1994)** Modelling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. *Int. J. Food Microbial.* **23**, 295-303.
- Davies, F. L. (1975).** Heat resistance of *Bacillus* species. *J. Soc. Dairy Technol.*, **28**, 69-78.
- Davies, F. L. and Wilkinson, G., (1973).** Germination of spores of *Bacillus cereus* in milk and milk dialysates: effect of heat treatment. *J. Appl Bacteriol.*, **36**, 485-496.
- Davies, S. C., and Banks, J. G., (1992).** Predictive microbiology, Application to Chilled Food Microbiology. Proceeding of the second Asept International conference. Predictive Microbiology and HACCP. Asept ed., 35-42.

- Day, T. L., Tatani, S., Notermans, S., and Bennett, R. W.,** (1994). A comparison of ELISA and RPLA for detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.*, Vol 77, PP 9-13.
- Delignette-Muller, M. L.,** (1995). Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de microorganismes. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard, Lyon 1.
- Devlieghere, F., Van Belle, B., Debevere, J.,** (1999). Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat product. A predictive model. *Int. J. Food Microbiol.* **46** :57-70.
- Dickinson, J. S., Siragusa, G. R., and Wray, J. E.,** (1992). Predictive the growth of *Salmonella typhimurium* on beef by using the temperature function integration technique. *Appl Environ. Microbiol.* **58**: 3482-3487.
- Dommett, T. W.,** (1992) Spoilage of aseptically packaged pasteurised liquid dairy products by thermophilic psychrotrophs. *Food Australia*, Vol.44, PP.459-461.
- Donovan, K. O** (1985) : A selective medium for *Bacillus cereus* in milk. *J. Appl. Bacteriol.* Vol. 21, PP. 100-103.
- Donovan, K.O.,**(1959) : The occurrence of *Bacillus cereus* in milk and dairy equipment. *J. Appl. Bacteriol.*, **22**, 131-137.
- Drienssen, F. M, Van Den Berg M. G.,** (1992). Microbiological aspects of pasteurized cream. *Bulletin of the IDF*, pp. 4-10.
- Drobniewski, A.,** (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 342-338.
- Dufrenne, J., Bijwaard M., Te Giffel M., Beumer R., Notermans S.** (1995): Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. food Microbiol.*, **27**, 175-183.
- Dufrenne, J., Soentoro, P., Tatini, S., Dat, T., Notermans, S.,** (1994). Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 99-109.
- Dufrenne, J., Tatini, S., Notermans, S.,** (1993). Stability of spores of *Bacillus cereus* stored on silicagel. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 111-116
- Duynhoven, Y. T. H. P., and Wit, M. A. S.** (1997): Registration of food borne infections and intoxications examined by Municipal Health Services and Regional Inspectorates for Health Protection, 1997. *National Institute of Public Health and the Environment*, Bilthoven.
- Easter, M. C., Mortimore, S. E. and Sperber, W. H.** (1994): The role of HACCP in the management of food safety and quality. *J. Soc. Dairy Technol.* **47**, 42-43

- Ehiri, J. E., Morris, G. P. and McEwen, J. (1995):** Implementation of HACCP in food business: the way ahead. *Food Control* **6**, 334-341
- Elliott, P.H., (1996).** Predictive microbiology and HACCP. *J. Food Prot.* **59** suppl., 48-53
- Enerôth, Å, Ahrné, S., Molin, G.,(2000).** Contamination of milk with Gram –negative spoilage bacteria during filling of retail containers. *Int. J. Food Microbiol.* Vol.57, PP.99-106 .
- Enerôth, Å, Ahrné, S., Molin, G.,(1999)** Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurised milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Dairy Journal*,Vol.10, PP.325-331.
- Enröth, Å (1999),** Bacteriological hygiene in the production of pasteurised milk PhD thesis, university of Helsinki, Finland.
- Enröth, Å., Christiansson, A., Bredehaug, J., Molin, G., (1998):** Critical contamination sites in the production line of pasteurized milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *Int. Dairy Journal*, Vol. 59, 829-834.
- Faille, C., Fontaine, F., Membré, J. M. (1999) :** Factors influencing recovery of heat-injured *Bacillus thuringiensis* spores. *Statistical Approach. J. Food Sci.* **64**,
- Faille, C., Le Bret, V., Gavini, F., and Maignonnat, J. F. (1997):** Injury and lethality of heat treatment of *Bacillus cereus* spores suspended in buffer and in poultry meat. *J. Food Prot.* **60**, 544-547.
- FAO/OMS (Food and Agriculture Organisation/ Organisation Mondiale de la santé)(1984).** The role of food safety in health and developping : Rapport conjoint du comité mixte d'experts sécurité alimentaire FAO/OMS. Rapport technique N°705 OMS Geneve, Suisse.
- Felske, A. Wolterink, A. VanLis,R. Akkermans,A.D.L. (1995):** Phylogeny of the main bacterial 16s rRNA sequences in Drentse a grassland soils (The netherlands). *Appl. Environ.Microbiol.*, **64**, 871-879.
- Fermanian, C., Fremy, J. M., Claisse, M., (1994) :** Effect of temperature on the vegetative growth of type and field strains of *Bacillus cereus* .*Letters in Applied Microbiology*.Vol.19, pp. 414-418.
- Fermanian, C., Fremy, J. M., Lahellec, C,; (1993).** *Bacillus cereus* pathogencity. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. Vol.2, pp 83-134.
- Fermanian, C., Lapeyre, C., Frémy, J. M., Maurice, C., (1996).** Production of diarrhoeal toxin by selected strains of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.30 , pp.345-358.



- Fermanian, C., Wong, A. C. L.,** (2000). Improved in vitro detection of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *International of Food Microbiology*, Vol.57, PP.1-8.
- Fernández, A, Ocio, M. J., Fernández, P. S., Martínez, A.,** (2001). Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Microbiol.*, **63**, 257-264.
- Fernández, A, Salmerón, Fernández, P.S., Martínez, A.,** (1999). Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends Food Sci. Technol.*, **10**, 158-162.
- Fernández, A., Collado, J, Cunha, L.M., Ocio, M.j., Martinez, A.,** (2002). Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *Int. J. Food Microbiol.*, **77**, 147-153.
- Fernández, A., Nauta, M. Ocio, M. j., Martinez, A.,** (2001). An exposure assessment approach for *Bacillus cereus* in carrot puree .
- Fernández, A., Ocio, M. j., Fernández P. S., Rodrigo, M., Martinez, A.,** (1999). Application of nonlinear regression analysis to the estimation of kinetic parameters for two enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiol.*, **16**, 607-613.
- Fernandez, P. S., Ocio, M. J., Sanchez, T., and Martinez, A.** (1994): Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in acidified mushroom extract. *J. Food Prot.* **57**, 37-41.
- Foegeding, P. M., Berry, E. D.** (1997). Cold temperature growth of clinical and food isolates of *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* **60**, 1256-1258
- Foster, S. J. and Johnstone, K.** (1990). Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination. *Mol. Microbiol.* Vol.4, PP 137-141.
- Fox, G. E., Pechman, K. R., Woese, C. R.** (1977). Comparative cataloguing of 16S ribosomal ribonucleic acid: Molecular approach to procaryotic systematics. *International Journal Of Systematic Bacteriology* **27**, 44-57
- Francis, K. P., Mayer, R., Von Stetten, F., Stewart, G. S., Scherer, S.,** (1998). Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* group by PCR trageting of major cold shock protein genes .*Appl. Environ.Microbiol.* Vol.64., PP. 3525-3529.
- Franklin, J. G.** (1970): Spores in milk: Problems associated with U.H.T. processing. *J. Appl. Bacteriol.* **33**, 180-191.



- Gaillard, S., Leguerinel, I., Mafart, P.,** (1998). Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *J. Food Sci.*, Vol.63, N°5, PP 887-889.
- Gasaluk, P., Yokoyama, K., Kimura, T., and Sugihara, I.** (1996): The occurrence of *Bacillus cereus* in local Thai traditional foods. *J. Antibacterial Antifungal Agents (Japan)* 24, 349-356.
- Geeraerd A.H. Herremans C.H. Van Impe, J.F.** (2000): Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 185-209.
- Gilbert, R. J.** (1979). *Bacillus cereus* gastroenteritis. In *Food-borne Infections and Intoxications*, Academic Press New York 495-518
- Gilbert, R. J., Kramer, J. M.** (1984): *Bacillus cereus* enterotoxins: Present status. *Biochemical Society Transactions* 12, 198-199
- Gilbert, R. J., Turnbull, P. C. B., Parry, J. M., and Kramer, J. M.,** (1981). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: their part in food poisoning and other clinical infection. (R. C. Berkeley and Goodfellow, M., eds). *Soc.Gen. Microbiol., Spec. N° 4.* Academic Press, London. pp. 297-314.
- Gillian, F., Niall, A. L., De Vos, P.,** (1998). Revue taxonomique du genre *Bacillus*. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 13 ,(2) .
- Glätz, B. A., Goepfert, J. M.** (1976). Defined conditions for synthesis of *Bacillus cereus* enterotoxin by fermenter-grown cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 400-404
- Goepfert, J. M., Spira, W. M., and Kim, H. U.,** (1975). *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. *J. Milk Food Technol.* vol.35, pp 213-227.
- Gonzalez, I., Lopez, M., Martinez, S., Bernardo, A. et Gonzalez, J.,** (1999). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 51, 81-84.
- Gonzalez, I., Lopez, M., Martinez, S., Gonzalez, J. et Bernardo, A.,** (2002). Influence of temperature on the recovery capacity of heat-injured *Bacillus cereus* spores obtained at different temperature. *Arch. Lebensmittlhyg.* 5, 112-114.
- Gonzalez, I., Lopez, M., Mazas, M., Gonzalez, J. et Bernardo, A.** (1995): The effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 548-554..



- Gonzalez, I., Lopez, M., Mazas, M., Bernardo, A., and Martin, R.** (1996): Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of three strains of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food. Microbiol.* **31**, 341-347.
- Gonzalez, I., Lopez, M., Mazas, M., Bernardo, A., and Martin, R.** (1997): Thermal resistance of *Bacillus cereus* spores as affected by additives in the recovery medium. *J. Food Safety* **17**, 1-12.
- Gould G.W.**, (1969). Germination. In *The bacterial spore*. Gould, G.W. and Hurst, A. (eds ). Academic press, pp. 397-444.
- Granum, P. E.** (1997). *Bacillus cereus*. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville T.J. (Eds), *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington 327-336
- Granum, P. E.** (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Suppl.* **76**, 61S-66S
- Granum, P. E., Andersson, A., Gayther, C., Te Giffel, M. C., Larsen, H., Lund. T., O'Sullivan, K.**, (1996). Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Letters*, **141**, 145-149.
- Granum, P. E., Brynestad, S., Kramer, J. M.**, (1993). Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products ,food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int. J. Food Microbiol.* **17**, 269-279.
- Granum, P. E., Brynestad, S., O'Sullivan, K., Nissen, H.**, (1993). Enterotoxin from *Bacillus cereus* : production and biochemical characterization. *Neth. Milk Dairy J.*, **47**, PP.63-70.
- Griffiths, M. W.** (1990). Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. *J. Food Prot.* **53**, 790-792
- Griffiths, M. W.**, (1992). *Bacillus cereus* in liquid milk and other products. *Bulletin of the IDF N°275*, 36-39.
- Griffiths, M. W., Phillips, J. D.** (1990). Pasteurised dairy products: the constraints imposed by environmental contamination in Noriagu, J.O. and Simmons, M.S. (Eds.), *Food Contamination from Environmental sources Whey* (New York).
- Griffiths, M. W., Schraft, H.** (2002). *Bacillus cereus* food poisoning. In: Cliver, D.O. Riemann, H.P. (Eds), *Foodborne diseases*. Academic press, Amsterdam, pp 261-270



- Guirguis, A. H., Griffiths, M. W., Muir, D. D.** (1984). Spore-forming bacteria in milk. II- Effect of carbon dioxide addition on heat activation of spores of *Bacillus* species. *Milchwissenschaft* **39**, 144-146
- Guirguis, A. H., Griffiths, M. W., Muir, D. D.**, (1983). Spore-forming bacteria in milk. I- Optimisation of heat treatment for activation of spores of *Bacillus* species. *Milchwissenschaft*, **38**, 641-644
- Hammer, P., Walter, H. G.** (1996). Pathogenicity testing of heat resistant mesophilic spore-formers from UHT milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **48**, 151-161
- Hansen, B. M., Leser, T. D., Hendriksen, N. B.**, (2002). Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells .*FEMS Microbiol. Letters*, **202**, 209-213.
- Hansen, N. M., and Hendriksen, N. B.**, (2001). Detection of enterotoxin *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 185-1
- Harmon, S. M., and Kautter, D. A.** (1991): Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. *J. Food Prot.* **54**, 372-374.
- Hartmann, P.A.** (1997) The evolution of food microbiology. IN Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Mortville, T.J. (Eds), *Food Microbiology: Fundamental and frontiers*; ASM Press, Washington, D.C. pp 3-12.
- Hauge, S.** (1955). Food poisoning caused by aerobic spore-forming Bacilli. Symposium on Food Microbiology and Public Health: Paper XIII 591-595
- Heizer, A., Kohler, H. P. E., Reicheirt, P and Hamer, G.**, (1991). Utility of phenomenological models for describing temperature dependence of bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2656-2665.
- Helmy, A. Z., Abd-El-Bakey, A., Mohamed, E. I.**, (1984) : Occurrence of *Bacillus cereus* in milk and milk products in Egypt, *Zentralbl. Mikrobiol.*, **139**, 129-133.
- Holbork, R., and Andersson, J. M.**, (1980). An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Canadian J. Microbiol.* **26**, 753-759.
- Hseih, Y. M., Sheu, S. J., Chen, Y. L., and Tsen, H. Y.**, (1999). Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5436-5442.



- Husmark, U. et Rönner U.**, (1992): The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of bacillus cereus spores. *Biofilms* 5, 335-344
- Ibarz, P., Palop, A., Condon, S., and Sala, F. J.** (1991): Adaptador de un contador automático de U.F.C. al recuento de placas densamente pobladas. *XIII Congreso Nacional de Microbiología*. pp. 159, Spain.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods)** (1988). Microorganisms in foods, 4. Application of the Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) System to ensure microbiological safety and quality, Blackwell Scientific London, UK.
- In't Veld, P. H., Ritmeester, W. S., Delfgou-Van Asch, E. H. M., Dufrenne, J. B., Wernars, K., Smith, E., Van Leusden, F. M.**, (2001). Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. *Int Journal Food Microbiology*, Vol.64, PP.63-70.
- In't Veld, P. H.; Soentoro, P. S. S., Notermans, S. H. W.**, (1993). Properties of *Bacillus cereus* spores in reference materials prepared from artificially contaminated spray dried milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 20, 23-36.
- Irene, E. P., Arendonk, W. G., Mastwijk, H. C., Krommer, J., Smith, E., Moeze-laar, R.**, (2001). Sensitivity of germinating spores and corvacrol-adapted vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* to nisin and pulsed-electric-field treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1693-1699.
- ITC (International trade center)** (2002): Introduction à HACCP Bulletin de gestion de la qualité des exportations N°71 Décembre 2002 CNUCED/WTO Ed.
- Jaquette, C. B. and Beuchat, R.** (1998). Combined effects of pH, nisin, and temperature on growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.*, 61, 563-570.
- Jirathna, P.** (1998). Constraints Experienced by Developing Countries in the Development and Application of HACCP. *Food Control*, 9, 91-1001
- Johnson, K. M** (1984): *Bacillus cereus* in food-borne illness-An update. *J. Food Prot.* 47, 145-153.
- Johnson, K. M., Nelson, C. L., Busta, F. F** (1983). Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrhoeal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and in rice. *J. Food Sci.*, 51, 286-287.



- Larsen, H. D., Jorgensen, K.** (1997). The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 179-186
- Laurent, Y., Arino, S., Rosso, L.,** (1999). A quantitative approach for studying the effect of heat treatment conditions on resistance and recovery of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Microbiol.* **48**, 149-157.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Pruss, B. M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E, Stewartz, G. S., Scherer, S.,** (1998). *Bacillus weihenstephanensis* is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 21-27
- Leguerinel, I., Couvert O., Mafart, P.** (2000). Relationship between the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores and the pH and NaCl concentration of the recovery medium. *Int. J. Food Microbiol* **55**, 223-227.
- Leguerinel, I., Mafart, P.** (2001). Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Int. J. Food Microbiol* **63**, 29-34.
- Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J. A. Griffiths, M. W.** (1998). Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* **43** 159-171.
- Lin, S., Schraft, H., Griffiths, M. W.** (1997). Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus*. *J. Dairy Sci., Suppl. 1*, **80**, 109
- Logan, N. A. et Berkeley R. C. W.,** (1984). Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1871-1882.
- Logan, N. A., DE Vos, P.,** (1998). Factory and *Bacillus*. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **13**, 130-136.
- Lopez, M., Gonzalez, I., Mazas, M., Gonzalez, J. Martin, R., and Bernardo, A.** (1997): Influence of recovery conditions on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Int. J. Food Sci. Technol.* **32**, 305-311.
- Lopez, M., Gonzalez, I., Mazas, M., Gonzalez, J. Martin, R., and Bernardo, A.** (1997): Influence of recovery conditions on apparent heat resistance of *Bacillus stearo8+---thermophilus* spores. *Int. J. Food Sci. Technol.* **32**, 30-311.
- Lund, T., De Buyser, M. L., Granum, P. E.,** (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiol*, **38**, 254-261
- Lund, T., Granum, P. E.,** (1996). Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol. Letters* **141**, 151-156



- Lund, T., Granum, P. E., (1997).** Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology*. **143**, 3329-3336.
- Lund, T., Granum, P. E., (1999).** The 105-Kda protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity. *FEMS Microbiol. Letters*, **178**, 355-361.
- Lynch, D. J., and Potter, N. N. (1988):** Effects of organic acids on thermal inactivation of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus coagulans* spores in frankfurter emulsion slurry. *J. Food Prot.* **51**, 475-480.
- Mafart, P., (2000):** Taking injuries of surviving bacteria into account for optimising heat treatments. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 175-179.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel I., (2002)** On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* **72**, 107-113.
- Mafart, P., Couvert, O., Leguerinel I., (2001)** Effect of pH on the heat resistance of spores comparison of two models. *Int. J. Food Microbiol.* **63**, 51-56.
- Mafart, P., Leguerinel I. (1997):** Modelling the heat stress and the recovery of bacterial spores. *Int. J. Food Microbiol.* **37**, 131-135.
- Mahakarnchanakul, W., Beuchat, L. R., (1999a).** Effect of shift in growth temperature on tolerance of psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* to heat and sodium chloride. *J. Food Prot.* **62**, 57-64.
- Mahakarnchanakul, W., Beuchat, L. R., (1999b)** Influence of temperature shifts on survival, growth and toxin production by psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* in potatoes and chicken gravy. *Int J. Food Microbiol*, **47**, 179-187.
- Makino, S., Ito, N., Inoue, T., Miyata, S., Moriyama, R., (1994).** A spore-lytic enzyme released from *Bacillus cereus* spores during germination. *Microbiology*, Vol.140, PP 1403-1410.
- Malakar, P. K. Barker, G. C. Zwietering M. H. and van't Riet K. (2003):** Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* **84**, 263-272
- Mallidis, C. G., and Scholfield, J. (1986):** Evaluation of recovery media for heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Appl. Bacteriol.* **61**, 517-523.



- Martin, J.H., Stahly, D.P. Harper, W.J. and Gould, L.A.** (1962): Spore-forming micro-organisms in selected milk supplies. XVI International Dairy congress C (VIII:1), 295-304.
- Matar, G. M., Slieman, T. A., Nabut, N. H.,** (1996). Subtyping of *Bacillus cereus* by total cell protein patterns and arbitrary primer polymerase chain reaction. *European Journal of Epidemiology* 12, 309-314
- Mayr, R., Stetten, F. V., Francis, K. P., Scherer, S.,** (1999). Significance of psychrotolerant aerobic sporeformers in food spoilage and methodologies for their detection and identification. *Mitt.Lebnsm.Hyg.* 90, 42-61.
- Mazas, M., López, M., Gonzalez, I., Gonzalez, J., Bernardo, A. and Martin, R.** (1998): Effects of the heating medium pH on heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *J. Food Safety* 18, 25-36.
- Mazas, M., López, M., Martínez, S., Bernardo, A. and Martin, R.** (1999): Heat resistance of *Bacillus cereus* spores: effects of milk constituents and stabilizing additives. *J. Food Prot.* 62, 410-413.
- Mazas, M., Martínez, S., López, Alvarez, A.B., Martin, R.,** (1999). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores affected by the solutes used to control water activity of the heating medium. *Int. J. of Food Microbiol.* 53, 61-67.
- McDonald, K., Da-Wen S.,** (1999). Predictive Food Microbiology for the meat industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 52:1-27.
- McElroy, D. M. Jaykus, L. A. Foegeding, P. M.** (2000). Validation and analysis of modelled predictions of growth of *Bacillus cereus* in Boiled rice. *J. Food Prot.* 63, 268-272.
- McGuiggan, J.T.M., Gilmour, A., et Lawrence, L.M.** (1994): Factors influencing the recovery of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus spp.* from bulk raw milk. *J.Soc. Dairy Technol.* 47,111-116
- McKellar, R. C., Butler, G., Stanich, K.,** (1997). Modelling the influence of temperature on the recovery of *Listeria monocytogenes* from heat injury. *Food microbiol.* 14:617-62
- McKellar, R.C., and Lu, X.** (2003). *Modelling Microbial responses in foods* CRC, Boca Raton, Fla.
- McKenzie, H. A., and Dawson, R. M. C.** (1969): pH, buffers and physiological media. In: Dawson R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H. and Jones, K.M. (ed.), *Data for Chemical Research*, Oxford at the Clarendon Press (Oxford).

- Mossel, D. A. A, Koopman, M. J. and Jongerius, E.** (1967). Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbiol.* **15**, 650-653
- Mostert, J. F., Lück, H., Husmann, R. A.** (1979). Isolation, identification and practical properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. *S. Afr. J. Dairy Technol.* **11**, 125-132
- N.A.C.M.C.F.** 1994 .The role of regulatory Agencies and industry in HACCP.The national advisory committee on microbiological criteria for food .*Int .J.Food Microbiol.* **21** ,187 –195.
- Nakamura, L.K.** (1998) *Bacillus pseudomycoïdes*. *Int. J.Syst. Bacteriol*, **48**, 1031-1035.
- NAS** (National Academy of Sciences) (1985). An Evaluation of the role of Microbiological Criteria of foods and food ingredient, NAS, National Research Council, National Academy Press, Wachington, USA.
- Niall, A. L., De Vos, P. .,** 1998. *Bacillus* et industrie. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*, **13** 11-13
- Nokamura L. K et Jackson M. A.**(1995) : Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoïdes* .*Int.J.Syst.Bacteriol.***45**, 46-49.
- Notermans, S., Batt C. A.,**(1998) A risk assessment approach for food –borne *Bacillus cereus* and its toxins .*J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement.* **84**, 51-61.
- Notermans, S.** (1999) Quantitative Risk analysis. TNO Nutrition and Food Research Institute, PP.1883-1886.
- Notermans, S. and Tatini S.,** (1993) Characterization of *Bacillus cereus* in relation to toxin production. *Bulltin of the IDF N° 287*, 50-53.
- Notermans, S., Dufrenne J., Teunis P, Te Giffel M. and Peeters Weem P.,** (1997) A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk *Food Microbiol.* **14** 143-151.
- Notermans, S., Gallhoff, G., Zwietering, M. H and Mead, G. C.,** 1995. The HACCP concept: specification of criteria using quantitative risk assessment. *Food Microbiol* **12**: 81-90.
- Notermans, S., Gallhoff, G., Zwietering, M. H and Mead, G. C.,** 1995. Identification of critical control points in the HACCP system with a quantitative effect on the safety of Food. *Food Microbiology* **12**: 93-98
- Notermans, S., Nauta, M. J., Jansen. J., Jouve, J. L., Mead, G. C.,** (1998). A risk assessment approach to evaluating food safety on product surveillance .*Food Control*, **9**, 217-223.



- Ocio, M. J., Sanchez, T., Fernandez, P. S., Rodrigo, M., and Martinez, A. (1994):** Thermal characteristics of PA 3679 in the temperature range of 110-121°C as affected by the pH, type of acidulant and substrate. *Int. J. Food Microbiol.* **22**, 239-247.
- Odumeru, J. A., Toner, A. K., Muckle, C. A., Griffiths, M. W., Lynch, J. A. (1997).** Detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin in raw and pasteurized milk. *J. Food Prot.* **60**, 1391-1393
- OMS (1997):** Rapport trimestriel de Statistiques sanitaires mondiales, **50**, N, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse, 1997.
- Overcast, W.W., Atmaram, K., (1974).** The role of *Bacillus cereus* in sweet curdling of fluid milk. *J. Milk Food Technol.* **37**, 233-236
- Paidhungat, M., Ragkousi, K., Setlow, B., (2001).** Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by  $Ca^{2+}$  dipicolinate. *J. Bacteriol.* **183**, 4886-4893.
- Palop, A., Raso, J., Condon, S., and Sala, F. J. (1996):** Heat resistance of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans*: effect of sporulation temperature in foods with various acidulants. *J. Food. Prot.* **59**, 487-492.
- Palop, A., Raso, J., Pagan, R., Condon, S., and Sala, F. J. (1999):** Influence of pH on Heat resistance of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *Int. J. Food Microbiol.* **46**, 243-249.
- Pan, T. M., Wang, T. K., Lee, C. L., Chien, S. W., and Hong, C. B. (1997):** Foodborne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1260-1262.
- Panicello, P.J., Quantick, P.C.,(1998).** Application of food micromodel predictive software in the development of HACCP systems; *Food Microbiol.* **15**, 425-439
- Parry, J. M., Gilbert, R. J., (1980).** Studies on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores and growth of the organism in boiled rice. *J. Hyg. Camb.* **84**, 77-82
- Peleg M., (2000) :** Microbial survival curves – the reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 531-538
- Peleg M., Cole M.B. (1998) :** Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38**, 353-380
- Periago, P.M., Fernandez, P.S., Salmeron, M.C., Martinez, A. (1998):** Predictive model to describe the combined effect of pH and NaCl on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* **44**, 21-30.



- Raevori, M., Genigeorgis, C.,** (1975). Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. *Appl. Microbiol.* **29**, 68-73.
- Rangasamy, P.N., Iyer, M. et Roginski, H.** (1993): Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. *Australian J. Dairy Technol.* **48**, 93-95.
- Raso, J., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B.G.,** (1998): Sporulation temperature affects initiation of germination and inactivation by high hydrostatic pressure of *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.*, **85**,17-24.
- Raso, J., Góngora-Nieto, N. M., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G.,** (1998). Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.*, **44**,125-132.
- Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., McMeekin, T. A., Stokes, A. N., Chandler, R. E.,** (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.*, **154**: 1222-1226.
- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A., Ball, A.,** (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.***149**:1-5.
- Ratkowsky, D. A., Ross, T., McMeekin, T.A., Olley, J.,** (1991). Comparison of Arrhenius type and Bełehradek models for prediction of bacterial growth in food. *Jour of Applied Bacteriol.***71**: 452-459.
- Ravanis, S., Lewis, M. J.,** (1995). Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. *Letters Appl. Microbiol.*, **20**,164-167.
- Remy, T., Pierre, H., Yves, B.,** (1998). Les infections humaines à *Bacillus*. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **13** ,3-7
- Richard, J.** (1983) nature de la flore microbienne dominante et sous-dominante dans les laits crus très pollués. *Le Lait*, **63**, 148-170
- Robert, C., Benedict, T P., Wells, D., Buchanan, R. L.,** (1992). *Bacillus cereus* : Aerobic growth kinetics.
- Roberts, T. A.,** (1997). Microbial growth and survival: developments in predictive modelling. *Food Sci. Technol.* **51**, 88-90.
- Roberts, T. A., and Jarvis, B.,** (1983). Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems. In : Roberts, T.A., and Skinner, F.A. (eds) *Food Microbiology, advances and prospects*. Academic Press, NewYork.



- Rodrigo, F., Fernandez, P. S., Rodrigo, M., Ocio, M. J., and Martinez, A.** (1997): Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* heated at high temperatures in different substrates. *J. Food Prot.* **60**, 144-147.
- Rönner, U., Husmark, U.**, (1992). Adhesion of *Bacillus cereus* spores. A hazard to the dairy industry. In L.F. Melo et al, biofilms Science and Technology, Kluwer Academic Publishers., 403-406.
- Rönner, U., Husmark, U., and Henrikson, A.**, (1990). Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 550-556.
- Ropkins, K.; Beck, A.J.**, (2000). Evaluation of worldwide approaches to the use of HACCP in food control safety. *Trends Food Sci. Technol.*, **11**, 10-21
- Rosso, L.**, (1995). Modélisation et microbiologie prévisionnelle : élaboration d'un nouvel outil pour l'agroalimentaire. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard Lyon1.
- Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S and Flandrois, J. P.**, (1995). Convenient Model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 610-616.
- Rosso, T., McMeekin, T. A.**, (1994). Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 241-264.
- Rowan, N. J., Anderson, J. G.**, (1997) Maltodextrine stimulates growth of *Bacillus cereus* and synthesis of diarrhoeal enterotoxin in infant milk formulae. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1182-1184.
- Rowan, N.J ., Anderson, J. G.**, (1998). Effectiveness of cleaning and disinfection procedures on the removal of enterotoxigenic *Bacillus cereus* from infant feeding bottles. *J. Food Prot.* **61**, 196-200
- Schellekens, M., Martens, T., Roberts, T. A., Mackey, B. M., Nicolai, B. M., Van Impe, J. F., De Baerdemaeker, J.**, (1994). Computer aided microbial safety design of food process. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 1-9.
- Setlow, P.** (1983). Spore structural proteins. In J.A. Hoch, Losick R., and Sonenshein A.L., (eds) *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and Molecular Genetics. ASM press, Washigton (USA)
- Setlow, P.** (1994). Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Suppl.* **76**, 49-60
- Shahata, T. E., Collins, E. B.** (1972). Sporulation and heat resistance of psychrophilic strains of *Bacillus*. *J. Dairy Sci.* **55**, 1405-1409
- Shal, N. P.**, (1994): Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwiss.*, **49**, 432-437.



- Steel, R. G., and Torrie, J. H.** (1960a): Comparisons involving two sample means. In: R.G. Steel, and J.H. Torrie (Eds). Principles and procedures of statistics. 67-87. Mcgraw Hill Book Company: New York.
- Steel, R. G., and Torrie, J. H.** (1960b): Analysis of covariance. In: R.G. Steel, and J.H. Torrie (Eds.). Principles and procedures of statistics. Pp. 305-331. Mcgraw Hill Book Company: New York.
- Steen, M. K., Bruno-Murtha, A., Chaux, G., Lazar, H., Bernard, S., Sulis, C.,** (1992). *Bacillus cereus* endocarditis: report of a case and review. Clin. Infect. Dis. **18**, 863-867.
- Stewart, D. B.** (1975). Factors influencing the incidence of *Bacillus cereus* spores in milk. J. Soc. Dairy Technol. **28**, 80-90.
- Sutherland, A. D.** (1993). Toxin production by *Bacillus cereus* in dairy products. J. Dairy Res. **60**, 569-574
- Sutherland, A. D., Limond, A. M.,** (1993). Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*. J. Dairy Res. **60**, 575-580.
- Te Giffel, M. C., Beumer R. R., Bonestroo M. H., Rombouts F. M.** (1996a) Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in two dairy processing plants. Neth. Milk Dairy J., **50**, 479-492.
- Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Hoeckstra, J., et Rombouts, F. M.** (1995a) Germination of bacterial spores during sample preparation. Food microbiol., **12**, 327-332.
- Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Slaghuis, B. A., Rombouts, F. M.** (1995b) Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in Netherlands. Neth. Milk Dairy J., **49**, 125-138.
- TE Giffel, M. C., Beumer, R. R., Van Dam, W. F., Slaghuis, B. A., Rombouts, F. M.** (1995c). Sporocidal effect of disinfectants on *Bacillus cereus* isolated from the milk processing environment. Int. Biodeterioration & Biodegradation. **36**, 421-430
- Te Giffel, M., Beumer R.R., Granum P.E., Rombouts F.M.,** (1997) Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. Int. J. Food Microbiol. **34**, 307-318.
- Te Giffel, M.C., Beumer, R. R., Leijendekkers, S., and Rombouts, F.M.,** (1996b) Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. Food Microbiol. **13**, 53-58.



- Tejedor, W., Rodrigo, M. Martinez A.,** (2001): Modelling the combined effect of pH and temperature on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in a multicomponent food extract. *J. Food Prot.* **64**, 1631-1635
- Ternström, A., Lindberg, A.M., Lindberg, A.M., and Molin, G.,** (1993). Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *Int. J. Applied Bacteriology*, **175**, 25-34.
- Tholozan, J. L, Carlin, F., Fach, P., Ploumeyrol, M.,** (1997). Bactéries anaérobies strictes et hygiène des aliments. *Bull. Soc. Fran. Microbiol*, **12**, (1), 48-56.
- Tien Meng, N. G., Schaffner, W. D.,** (1997). Mathematical models for the effects of pH, temperature and sodium chloride on growth of *Bacillus stearothermophilus* in salty carrots. *Appl. Environ. Microbiol...* Vol 63, N°4, PP: 1237-1243.
- Turnbull P. C. B.,** (1986). *Bacillus cereus* toxins. In *Pharmacology of Bacterial Toxins* (F. Dorner and Drews, F., eds ), PP 397-448.
- Turnbull, P. C. B., Jörgensen, K., Kramer, J. M., Gilbert, R. J.,** (1979a): Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins. *American J. Clinical Nutrition*. **32**, 289-293
- Turnbull, P.C. B., Jörgensen, K., Kramer, J. M., Gilbert, R. J.,** (1979b). Properties and production characteristics of vomiting, diarrhoeal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *American J. Clinical Nutrition* **32**, 219-228
- Väisänen, O. M., Mwaishumo, N. J., Salkinoja-salonen, M. S.,** (1990). Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature and fatty acid analysis. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 130-133.
- Valero, M., Leontidis, S., Fernandez, P. S., Martinez, A., and Salmeron, M. C.** (2000): Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30°C. *Food Microbiol.* **17**, 605-612.
- Van Boekel, M. A. J.,** (1996). Statistical aspects of kinetic modelling for food science problems. *J. Food Sci.*, **61**: 477-485.
- Van Heddeghem, A., Vlaemynck, G.,** (1993 ). Sources of contamination of milk with *Bacillus cereus* on the farm and in the factory. *Bulletin of IDF*, N° **275**, 19-22.
- Van Impe, J. F., Nicolai, B. M., Schellekens, M., Martens, T. D. Baerdemaeker, J.,** (1995). Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *International Journal of Food Microbiol.* **25**: 227-249.
- Van Netten P., Kramer J. M.,** (1992). Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **17**, 85-99.



- Van Netten, P., Van de Moosdijk, A., Van Hoensel, P., Mossel, D. A. A., Perales, I.** (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 73-79
- Von Stetten, F., Mayr, R. et Sherer, S.,** (1999): Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environ. Microbiol.*, **1**, 503-515
- Walker S.J.** (1988). Major spoilage micro-organisms in milk and dairy products. *J. Soc. Dairy Technol.*, **10**, 91-92.
- Walls, I., Scott, V. N.,** (1996). Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *J. Food Prot.* **59** : 1331-1335.
- Walls, I., Scott, V.N.,** (1997). Use of predictive microbiology in microbial food safety assessment. *Int. J. Food microbiol.* **36** : 97-102.
- Walls, I., Scott, V.N., Bernard, D.T.,** (1996). Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **59**: 11-15.
- Walther, J., Lück, H.** (1978). Incidence of *Bacillus cereus* in milk powder. *South African J. Dairy Technol.* **10**, 47-50
- Watanabe, K., et Hayano, K.** (1995) : Seasonal variation of soil protease activities and their relation to proteolytic bacteria and *Bacillus* spp. In paddy field soil, *Soil Biol. Biochem.* **27**, 197-203
- Whiting, R. C. and Buchanan, R. L.,** (1994). Microbial modelling. *Food Technol.* **48**:113-120.
- Whiting, R. C.,** (1993). Modelling bacterial survival in unfavourable environments. *J. Industrial Microbiol.* **12**:240-246.
- Whiting, R. C.,** (1995). Microbial modelling in food . *Cri. Rev. Food Sci. Nutr.*, **35**, 467-494.
- Whiting, R. C., and Buchanan, R. L.,** (1992). Use of predictive microbial modelling in a HACCP program. *Proceeding of the second Asept International Conference predictive microbiology and HACCP.* Asept ed., 125-141.
- Wilkinson, G., Davies, F. L.,** (1973). Germination of spores of *Bacillus cereus* in milk and milk dialysates: effect of heat treatment. *J. Food prot.* **51**, 707-710.
- Wirtanen, G., Husmark, U., Mattila-Sandholm, T.** (1996): Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *J. Food Prot.* **59**, 727-733



- Wong, H. C., Chen, Y. L., Chen, C. L. F., (1988):** Growth, germination and toxigenic activity of *Bacillus cereus* in milk products. *J. Food Prot.* **51**, 707-710
- Wong, H. C., Chong, M. H., Fan, J. Y., (1988).** Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 699-702
- Xiong, R. Xie, G., Edmonson, A.E. Sheard, M. A. (1999);** A mathematical model for bacterial inactivation. *Int. J. Food microbiol.* **46** : 45-55.
- Yacout, S., Bourbonnais, P. and Boudreau, J. (1998) :** Integrating ISO 9000 with HACCP programs in seafood processing industry. *Computers ind. Engng.* **35**, 245-248
- Yokoya, F., and York, G. K. (1965):** Effect of several environmental conditions on the thermal death rate of endospores of aerobic, thermophilic bacteria. *Appl. Microbiol.* **13**, 993-999.
- Zwietering, M. H., De Wit, J. C., Notermans, S., (1996).** Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. *Int. J. Food. Microbiol.* **30** 55-70.
- Zwietering, M. H., De Koos, J. T., Hasenack, B. E., De Wit, J. C. et Van't Riet, K. (1991).** Modelling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1094-1101.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., et Van't Riet, K. (1990).** Modelling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1875-1881.



**ANNEXE 1****LES MILIEUX DE CULTURE****Bouillon nutritif :**

Tryptone	5g
Extrait de levure	2.5g
Glucose	1g
Eau distillée	1000ml

**P.C.A (Plat Count Agar) :**

Tryptone	5g
Extrait de levure	2.5g
Glucose	1g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml

PH = 7.2

**MILIEU MOSEL DE BASE :**

Extrait de viande	1g
Peptone	10g
D-mannitol	10g
Chlorure de sodium	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml

PH = 7.2

**MILIEU MOSEL COMPLET :**

Pour un flacon de 90ml de milieu Mossel de base complet on ajoute stérilement

10ml de jaune d'œuf stérile préparé comme suit :

- Rincer l'œuf à l'alcool ;
- Jeter l'excès d'alcool ;
- Flamber l'œuf ;
- Casser l'œuf entre deux bcs bunsen ;
- Récupérer le jaune d'œuf dans un becher ;
- Diluer au 1/2 avec de l'eau physiologique stérile ;
- Mélanger et utiliser immédiatement.



5ml de Polymyxine à 1mg/ml préparée comme suit :

- Additionner 5ml d'eau physiologique stérile dans le flacon d'antibiotique poudre à l'aide d'une seringue ;
- Bien mélanger ;
- Remplir un tube stérile avec 4.85ml d'eau physiologique stérile ;
- Prélever à l'aide d'une seringue 6UI = 0.15ml de Polymyxine ;
- Additionner les 6UI au tube de 4.85ml d'eau physiologique stérile (obtention des 5mg) ;
- Bien agiter.

#### MILIEU BHIB ( Bouillon cœur-cervelle) :

Infusion de cervelle de bœuf	200.0
Infusion de cœur de bœuf	250.0
Peptone de gélatine	10.0 g/l
Chlorure de sodium	5.0 g/l
Phosphate disodique	2.5 g/l
Glucose	2.0g/l
Eau distillée	1000ml

PH = 7.4

## ANNEXE 2

Extraits de l'arrêté interministériel N° 93069 du 27/10/93 du 29 safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation.

### SECTION 2 : SPECIFICATION DU LAIT

ARTICLE 6 : Le lait ne doit pas :

- Etre coloré, mal propre ou malodorant ;
- Provenir d'une traite opérée moins de sept (07) jours après la part ;
- Provenir d'animaux atteints de maladies contagieuses ou de mammites ;
- Contenir notamment des résidus antiseptiques, antibiotiques et pesticides ;
- Coaguler à l'ébullition ;
- Provenir d'une traite incomplète ;
- Subir un écrémage même partiel.

### SECTION 3 : CLASSIFICATION DES LAITS

ARTICLE 7 : Les laits sont classés, en fonction du nombre de germes totaux, en 3 catégories :

- Catégorie A : moins de 100000 germes totaux par millilitre.
- Catégorie B : de 100000 à 500000 germes totaux par millilitre.
- Catégorie C : plus de 500000 à 2000000 germes totaux par millilitre.

### SECTION 4 : CONDITIONS DE COLLECTE ET DE CONSERVATION AVANT LE TRAITEMENT DU LAIT



ARTICLE 9 : Le lait doit être conservé immédiatement après la traite à une température inférieure ou égale à six (06) degré Celsius.

ARTICLE 10 : Le lait doit être mis à la disposition des entreprises laitières dans les conditions suivantes :

-Le délai entre la traite et la délivrance du lait aux entreprises laitières est fixé à quarante-huit (48) heures au maximum.

-Le délai entre la traite et le premier traitement thermique est fixé à soixante-douze (72) heures au max

Annexe N°3 : Aspect typique de cellules végétatives de *Bacillus cereus* au microscope  
(Grossissement x 1250)

