Table des matières

Liste des figures

Liste des photos

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale …….…..... 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Généralités sur le lait

1- Le lait……. 5

2- Composition du lait de vache …….. 5

2.1- L'eau……. 5

2.2- Les glucides……. 5

2.3- Les lipides…… 5

2.4- Les protides…… 6

2.5- Les minéraux…….. 7

2.6- Les vitamines…….... 7

3- Caractéristiques physico –chimiques du lait…… 8

4- La microflore du lait cru…… 8

4.1- La flore originelle…….. 8

4.2- La flore de contamination …….. 8

4.2.1- la flore d'altération……. 9

4.2.2- la flore pathogène…….. 9

5- Sources de contamination du lait cru……. 9

6- Contamination à partir des équipements…… 10

7- Les laits de consommation……. 11

7.1- le lait cru…….. 11

7.2- Le lait traité thermiquement……. 11

7.2.1- Le lait stérilisé…….... 11

7.2.2- Le lait pasteurisé…….. 12

Chapitre 02 : Thermorésistance des spores bactériennes du lait

1- Généralités sur les bacilles……... 14

2- La sporulation des bacilles ……. 14

3- La structure des endospores……. 14

4- Formation des spores …… 15
5- Résistance …… 15
6- La germination des endospores …….. 16

Chapitre 03 : La laiterie «ENNAJAH» Maghnia

1- La localisation…….. 19
1.1- L'activité de l'entreprise ……. 19
1.2- Matière première (le lait de vache) …….. 20
1.3- Les analyses physico-chimiques de l'entreprise…….. 20
1.3.1- Le contrôle visuel …… 20
1.3.2- Le test d'acidité …….. 20
1.3.3- Le control de la densité ……. 20
1.3.4 - Le contrôle de la matière grasse ……. 20
1.4- Le diagramme de pasteurisation du lait …….. 21

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre 01 : Matériel et méthodes

1- Matériel utilisé……. 24
2- Méthodologie de prélèvement…….. 24
3- Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale…….. 25
4- Dénombrement, Isolement et purification des micro-organismes thermorésistants……. 25
5- Identification phénotypiques des souches thermorésistantes……. 26
5.1- Caractérisation morphologique des isolats…… 26
5.1.1- Aspect macroscopique des colonies…… 26
5.1.2- Aspect microscopique …… 27
5.2- Caractérisation biochimique des isolats…….. 28
5.2.1- Mise en évidence des enzymes respiratoires…….. 28
5.2.2- Croissance sur le milieu mannitol-mobilité…… 28
5.2.3- Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons…….. 28
5.2.4- Test TSI (Gélose Glucose-Lactose-Saccharose-H2S)…….. 29
5.2.5- Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires……. 29
6- Caractérisation des souches par la galerie API 20^{E}…… 30

Chapitre 02 : Résultats et discussion

1- Résultats……. 32

1.1- Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale et de la flore thermorésistante…….. 32
1.2- Contribution à la collection des souches……. 32
1.3- Isolement et purification des souches……. 33
1.4- Caractérisations phénotypiques des isolats……. 33
1.4.1- Aspect microscopique……. 33
1.5-Caractéristiques biochimiques des isolats…… 35
1.5.1-Mise en évidence des enzymes respiratoires…… 35
1.5.2- Résultats de la mise en évidence des activités enzymatiques…….. 35
1.5.3- Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de Simmons ……. 37
1.5.4- Utilisation du milieu au mannitol mobilité……. 37
1.5.5- Dégradation des trois sucres (TSI)…….. 37
1.6-Résultats des plaques API20E…….. 39
2- Discussion……. 40
Conclusion et perspectives…….. 44
Références bibliographiques…….. 47
Annexes…… 57

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Schéma de la structure d'une spore bactérienne……..... 15

Figure 02 : cycle de sporulation bactérienne ……... 16

Figure 03 : Diagramme de fabrication du lait de vache pasteurisé…….. 21

Figure 04 : Dilution de solution mère et ensemencement sur milieu PCA……. 25

Figure 05 : Dilution de la solution mère Traitée thermiquement et ensemencement sur milieu GN……... 26

Figure 06 : Résultats du dénombrement de la flore aérobie mésophile totale et de la flore thermorésistante……..…… 32

LISTE DES PHOTOS

Photos 01 : Exemples d'aspects macroscopiques des isolats cultivés sur gélose PCA …….. 32

Photos 02: Ensemencement sur gélose nutritive (ensemencement par séries de stries)…….. 33

Photos 03 : observation microscopique de la coloration de Gram (x 100)…….. 34

Photos 04 : Observation d'effervescence (catalase positive)…….. 35

Photos 05 : Activités enzymatiques : A. Hydrolyse de la caséine, B. Hydrolyse de l'amidon, C. Hydrolyse de la lécithine…… 36

Photos 06 : Exemples de mise en évidence de l'utilisation de citrate (source de Carbone**)**……. 37

Photos 07 : Exemples de résultats des tests : mannitol mobilité (A), TSI (B)…….. 38

Photos 08 : Exemples de plaques API20E (A. avant incubation / B. après incubation)……. 39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition moyenne du lait de vache ……..... 05

Tableau 2 : Composition moyenne du lait de vache en lipides……. 06

Tableau 3 : Composition moyenne du lait de vache en protéines ……. 06

Tableau 4 : Composition minérale du lait ……. 07

Tableau 5 : La composition moyenne du lait de vache en vitamines……. 07

Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques du lait de vache…… 08

Tableau 7 : Tableau regroupant la flore du lait cru…….. 09

Tableau 8 : les différentes sources de contamination du lait cru……. 10

Tableau 09 : résultats de la coloration de Gram……... 33

Tableau 10: Résultats de la recherche des enzymes réspératoire (catalase,oxydase)……... 35

Tableau 11: Résultats de la recherche des enzymes réspératoire…… 36

Tableau 12 : Résultats des tests biochimiques……. 38

Tableau 13 : résultats des plaques API20E des isolats …… 39

LISTE DES ABRÉVIATIONS

F.A.O : *Food and Agriculture Organization of the United Nation*

UFC : *Unité Formant Colonie*

CIP : *Cleaning In Place ou nettoyage en palace*

F.M.T : *Flore mésophile totale*

F.T.S.M : *Flore thermorésistante sporulée mésophile*

U.H.T : *Ultra haut température*

mL : *millilitre*

°D (D90°C) : *degré dormic*

°C : *degré célsius*

p.H : *potentiel d'hydrogène*

J.O.R.A : *Journal Officiel de la République Algérienne*

I.S.O : *Organisation international de normalisation*

A w : *Activité de l'eau*

Introduction

Introduction Générale

Rapport-Gratuit.com

Introduction générale

Le lait est un aliment très nutritif qui peut être obtenu à partir d'une variété de sources animales, telles que les vaches, les chèvres, les moutons et les buffles, ainsi que les humains, pour la consommation humaine.

En Algérie, le lait est considéré comme un produit de base dans la consommation où il occupe une place importante dans la ration alimentaire de la population.

Sa consommation est estimée à 3,2 milliard de litres par an avec une production nationale limitée à 2.2 milliard de litres de lait par an dont 1.6 milliard de litres de lait cru **(Transaction d'Aalgerie, 2010)** et qui ne couvrent que 40% des besoins, le reste est satisfait par l'importation de poudre de lait et des matières grasses laitières anhydres **(Yakhlaf *et al.*, 1989).**

La teneur en nutriments élevée des laits, qui comprend des protéines, lipides, glucides, vitamines, minéraux et acides aminés essentiels, tous à un pH proche de la neutralité et à une activité de l'eau élevée, offre un environnement idéal pour la croissance de nombreux micro-organismes. Certains de ces nutriments sont directement accessibles à tous les micro-organismes, tandis que d'autres sont fournis ci-après le métabolisme des principales composantes qui sont utilisées par d'autres **(Frank, 1997)**.

La composition spécifique de la microflore du lait influe directement sur le développement ultérieur des produits laitiers. Les microorganismes peuvent provoquer la fermentation du lait par la production de lactate et ont une variété d'impacts différents sur le sensoriel, la texture, la saveur et les propriétés organoleptiques des produits résultants **(Wouters *et al.*, 2002)**. Ils peuvent également avoir un impact négatif sur la qualité du lait et de la durée de conservation. **(Desmasures et Gueguen, 1997; Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007).**

Le traitement thermique du lait de consommation, en particulier la pasteurisation (chauffage à 72° C pendant 15s ou 63° C / 30m) **(Lewis *et al.*, 2009)**, vise principalement à inactiver les micro-organismes nocifs dans le lait et les produits laitiers. Ce traitement est sensé réduire la charge microbienne et limiter la flore pathogène, augmenter la durée de vie et garantir ainsi au consommateur un produit sans risque. En plus de la pasteurisation, des procédures de nettoyage et de désinfection sont appliquées afin de maintenir l'environnement de la transformation du lait propre et hygiénique. Il arrive pourtant que des micro-organismes survivent à ces procédures. **(Cherif Antar A., 2015).**La durée de vie du lait pasteurisé dans les pays développés est d'environ 10 à 16 jours à une température de 05 ºC **(Kelly et O'shea, 2011),** le lait algérien ne peut survivre cette période et les consommateurs procèdent a la congélation pour le conserver.

Il existe plusieurs facteurs qui influencent la durée de vie du lait pasteurisé comme la qualité microbiologique du lait cru, les conditions de traitement et de conditionnement, la possibilité de contamination post-pasteurisation, ainsi que la température de réfrigération **(Medjahdi, 2013).** Cependant, les spores sont des contaminants importants dans l'industrie laitière, car elles peuvent affecter de manière significative la qualité et la sécurité des aliments **(Lucking G. *et al.*, 2013).** Ainsi, l'enquête sur ces microorganismes est une préoccupation majeure pour l'industrie alimentaire et l'administration. Parmi ces derniers, certains *Bacillus spp.* Tels que *B. cereus, B. licheniformis et B. subtilis* sont pertinents, en raison de leur détérioration et / ou de leur nature pathogène.

(Fernandez-No I.C. et al., 2011). L'objectif de ce travail est de rechercher les bactéries sporulées (bacilles) présentes dans le lait de vache pasteurisé provenant d'une laiterie de la région de Tlemcen, et de déterminer le rôle qu'elles peuvent jouer dans la dégradation de sa qualité et la diminution de sa durée de vie.

Le manuscrit comprend deux parties :

La première partie, étude bibliographique divisée en trois chapitres (Généralités sur le lait de vache, la thermorésistance des bactéries sporulées, et une présentation de la laiterie «ENNADJAH» Maghnia).

La deuxième partie, comprend les chapitres suivants:

- Matériels et méthodes utilisés dans ce travail ;
- Résultats et discussion;
- Conclusion et perspectives.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre 01

Généralités sur le lait

1- Le lait :

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite. **(Goursaud, 1985)**

2- Composition du lait de vache :

Tableau 1 : Composition moyenne du lait de vache **(Amiot *et al.*, 2002)**

Constituant	Composition
L'eau	84,3%
Protéines	3.5 %
Caséine	2.8 %
Protéine lactosérique	0.7 %
Matière grasse	3.7 %
Glucides	4.8 %
Cendres	0.7 %

2.1- L'eau :

L'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion. La présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres lui confère un caractère polaire lui permettant la formation d'une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum **(Amiot *et al.*, 2002).**

2.2- Les glucides :

Les glucides représentent 38% de la matière sèche du lait. Quantitativement, ils sont les constituants les plus importants après l'eau **(Perreau, 2014)**. Le sucre principal du lait est le lactose. Il représente 40% de la composition moyenne du lait de vache. C'est un solide blanchâtre, avec un pouvoir sucrant 4 fois plus faible que le saccharose. **(Charles *et al.*, 2005)**

2.3- Les lipides :

La matière grasse du lait se compose principalement de triglycérides, phospholipides et une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β-carotène **(FILQ, 2002).**

Tableau 2 : Composition moyenne du lait de vache en lipides **(Charles *et al*., 2005)**

Constituants majeurs	Composition (%)	Etat physique des composants	Caractéristiques
Triglycérides	98	Les globules gras sont en émulsion de type huile dans l'eau	Se trouvent aux centres des globules gras.
Phospholipides	1		Constituent l'enveloppe des globules gras.
Fraction insaponifiable	1		Rassemblent : les carotènes et les stérols (d'où dévirent les A et B)

2.4- Les protides :

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes. Elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers **(Amiot *et al.*, 2002).** On les classe en deux catégories selon leur solubilité dans l'eau :

- Les caséines (α-S1B, α-S2A, β-A2, k) qui sont en suspension colloïdale se regroupant sous forme de micelles.
- Les protéines du sérum : (β- lactoglobuline, α- lactalbumine) qui se retrouvent sous forme d'une solution colloïdale.

Tableau 3 : Composition moyenne du lait de vache en protéines **(Amiot *et al.*, 2002)**

Constituants majeurs	Composition (%)	Etat physique des composants	Caractéristiques
Caséine	80	Suspension micellaire de Phospho-caseinate de Ca++	principalement : αs1, αs2, β et κ
Protéines du sérum	20	Solution colloïdale	Les deux principales sont la β-lactoglobuline et α-lactalbumine
Substances azotées non protéiques	1.2	Solution vraie	principalement : protéase, peptone.

2.5- Les minéraux :

La teneur du lait en minéraux est de 0,5% **(Perreau, 2014)**. Ces derniers sont très importants tant d'un point de vue structural que nutritionnel et technologique. **(Jean *et al.*, 2008)**

Tableau 4 : Composition minérale du lait **(Charles *et al.*, 2005)**

Minéraux	Composition
Potassium	1500(mg/kg)
Calcium	1180(mg/kg)
Chlorure	958(mg/kg)

2.6- Les vitamines:

Les vitamines participent comme cofacteurs dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires **(Charles *et al.*, 2005)** . L'organisme humain n'est pas capable de les synthétiser, ils se trouvent dans les aliments.

Le lait a d'assez fortes teneurs en vitamines A, D, E, K et en vitamines du groupe B. il a en revanche une très faible teneur en vitamine C **(Perreau, 2014)**.

Tableau 5 : La composition moyenne du lait de vache en vitamines **(Charles *et al.*, 2005)**

Vitamines	Composition
*Hydrosolubles :	
A	40µg/100ml
D	2.4µg/100ml
E	100µg/100ml
K	5µg/100ml
*Liposolubles:	
B6, B1	50.45mg/100ml
B2	175µg/100ml

3- Caractéristiques physico –chimiques du lait:

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en béta carotène **Tableau 6 (Bourgeois *et al.*, 2009).**

Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques du lait de vache **(F.A.O, 1998).**

Constantes	Moyennes	Valeurs extrêmes
Energie : (Kcal/Litre) (KJ /Litre)	 701 2930	 587-876 2454-3662
pH à 20°C	6,6	6,6-6,8
Acidité titrable (Dornic)	16	15-17
Point de congélation (°C)	-	(-0,520)-(-0,550)
Point d'ébullition	-	100,15-100,17

4- La microflore du lait cru :

Le lait est un aliment de choix : il contient des graisses, du lactose, des protéines, des sels minéraux, des vitamines et 87% d'eau. Son PH est de 6,7.Il va être un substrat très favorable au développement des microorganismes.

Vignola (2002) a répartit les microorganismes du lait, selon leur importance, en deux grandes classes : La flore indigène ou originelle et la flore de contamination. Cette dernière est subdivisée en deux sous classe : la flore d'altération et la flore pathogène.

4.1- La flore originelle :

C'est l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis **(Vignola, 2002)**.lorsque le lait est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain, il ne contient que peu de microorganismes (moins de 5000 germes/ml et au moins 01 coliforme/ml). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques, lactobacilles et streptocoques lactiques **(Hermier *et al.*, 1992 et Larpent, 1991)**.

4.2- La flore de contamination :

C'est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Les microorganismes d'altération et pathogènes du lait, sont considérés comme la flore qui s'ajoute au lait extrait du pis de la vache **(Vignola, 2002)**.

4.2.1- la flore d'altération :

Cette flore causera des défauts sensoriels de gout, d'arôme et d'apparence. Elle réduira par la suite la vie du produit laitier **(Vignola, 2002)**.

Trois groupes microbiens sont dominants : les bactéries coliformes (*E. coli* et *Hafnia alvei)*, les Pseudomonas du groupe fluorescent psychrotrophe et les streptocoques lactiques **(Jacquet et Veisseyre, 1987).**

4.2.2- la flore pathogène :

L'animal, l'environnement et l'homme peuvent être la cause majeure de la présence de bactéries pathogènes dans le lait cru **(Vignola, 2002)**.parmi ces dernières, certaines sont retrouvées habituellement a un très faible niveau et ont peu de chance de se développer (Brucella, *Campylobacter fœtus* et *Salmonella*). D'autres sont a un niveau appréciable et peuvent se multiplier, c'est le cas des bactéries mésophiles, telles que : *E. coli* et *Staphylococcus aureus* ou l'espèce psychrotrophe *Yersinia enterocolitica* **(Jacquet et Veisseyre, 1987).**

Tableau 7 : Tableau regroupant la flore du lait cru **(Brisabois *et al*,. 2009)**

Flores		Exemples	Effets
Flore originelle		*Micrococcus sp*	
		Lactobacillus	
		Micrococcus sp	
Flore de contamination	Flore d'altération	*Bacillus*	Provoque la dégradation des composants du lait qui influencera le goût, l'arôme, l'apparence ou la texture.
		Coliforme	
		Levures et moisissures	
		Pseudomonas	
	Flore pathogène	Bactéries infectieuses	Dérèglent le système digestif
		Bactéries toxinogénes	provoquent des intoxications alimentaires

5- Sources de contamination du lait cru :

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Le lait peut être contaminé par des microbes d'origines diverses :

Tableau 8 : les différentes sources de contamination du lait cru : **(Hassan *et al.*, 2002)**

Sources	Genres
Personnel	Coliformes, *Selmonella, Entérococcus, Stapylococcus*
Air	*Streptococcus, Micrococcus, Corynbactérium, Bacillus* Levure et Moisissures.
Intérieur du pis	*Streptococcus, Micrococcus, Corynebactérium*
Extérieur du pis	*Micrococcus, Staphylococcus, Entérococcus, Bacillus*
Fèces	*Eschérichia, Staphylococcus, Listéria, Mycobactérium Selmonella*
Appareil de traite	*Micrococcus, Streptococcus, Bacillus,* Coliformes *Clostridium.*
Litières	*Bacillus, Klebsiella*
Sol	*CLostridium, Bacillus, Pseudomonas Mycobactérium*
Alimentation	Levure et Moisissures
Eau	*Clostridium, Listéria, Bacillus,* Bactérie lactiques Coliformes, *Pseudomonas, Corynebactérium, Alcaligenes*

6- Contamination à partir des équipements :

Elle est souvent caractérisée par la formation des biofilms laitiers qui sont dominés par différentes bactéries. La formation de ces biofilms sur les équipements peut entrainer de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques dues à la détérioration des aliments **(Flint *et al.*, 1997).** Les micro-organismes dans les biofilms catalysent les réactions chimiques et biologiques provoquant la

Rapport-Gratuit.com

corrosion des métaux dans les tuyauteries et les réservoirs, et ils peuvent réduire l'efficacité de transfert de chaleur s'ils deviennent suffisamment épais **(Simoes *et al.*, 2010)**.

Selon **(Petrus *et al.*, 2009)** d'autres facteurs peuvent influencer la durée de vie du lait pasteurisé :

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

7- Les laits de consommation :

Les différents processus technologiques, et les différentes techniques de conservation et de distribution ont permis d'élaborer une large gamme de laits de consommation qui se distinguent par leur composition, leur qualité nutritionnelle et organoleptique et leur durée de conservation **(Jeanetet *et al.*, 2007).**

7.1- le lait cru :

Selon **Sikine *et al.*, 2013**, un lait cru est un lait brut qui n'a pas subi de pasteurisation ni de stérilisation, ni de thermisation, ni de microfiltration. C'est un lait qui n'a jamais excédé la température de 40ºC, c'est-à-dire une température proche de celle du corps de l'animal.

7.2- Le lait traité thermiquement :

Selon l'intensité du traitement, on distingue deux types de laits :

- Le lait stérilisé de longue durée de conservation ;
- Le lait pasteurisé. **(Jeanetet *et al.*, 2007)**

7.2.1- Le lait stérilisé :

La stérilisation a pour but de détruire les microorganismes pouvant se développer lors de l'endosporage. Elle permet l'élimination de tous les microorganismes présents dans le lait. **(Amiot *et al.*, 2002)**

La destruction des microorganismes est fonction de deux paramètres : la durée du traitement thermique et la température.

- Les techniques les plus anciennes utilisaient une température de 105ºC pendant 20 minutes **(Joffin, 2003)** ;

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- Les techniques modernes procédés UHT : ultra-haute température utilisent une température de 140ºC pendant une seconde suivie immédiatement par un refroidissement après détente sous vide **(Joffin, 2003).**

7.2.2- Le lait pasteurisé :

La pasteurisation est un traitement thermique modéré permettant la destruction des Microorganismes pathogènes et d'un grand nombre de microorganismes d'altération. Ce Traitement permet d'une part, d'assurer la salubrité du produit et d'autre part, d'améliorer sa conservabilité **(OuId Moustapha, 2012)**.

En ce qui concerne la réglementation du contrôle du lait, l'arrêté interministériel de 29 Safar 1414 correspondant au 18 Aout 1993 relatif à la spécification et à la présentation de certains laits de consommation p. 16. JORA N° 69 du 27-10-1993 a déclaré l'obligation de la pasteurisation de lait cru de vache ou le lait reconstitué ;

- Soit à une température de 63°C pendant une durée de 30 minutes ;
- Soit à une température de 85°C pendant une durée de 15 à 20 secondes.

Ceci permet la destruction de la presque totalité de la microflore banal et pathogène, à condition de ne pas affecter la structure physique du lait, sa composition, son équilibre chimique, ses enzymes et ses vitamines **(Abdenouri, 2009)**.

La durée de conservation du lait pasteurisé est liée à la qualité du lait cru et le contrôle de la contamination post-pasteurisation. La contamination croisée possible du lait après pasteurisation doit être contrôlée en appliquant des règles strictes de nettoyage et de désinfection **(Smigic, 2012)**. Le suivi de la formation de biofilms doit être pris en compte dans l'élaboration des plans HACCP et dans les spécifications proposées par des organisations telles que l'Organisation internationale de normalisation (ISO) **(Smigic, 2012)**.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Chapitre 02

Thermorésistance des spores bactériennes du lait

1- Généralités sur les bacilles :

Les bactéries du genre Bacillus sont des grands bacilles à Gram positif, groupés en chaînettes, sporulantes, et généralement mobiles avec des flagelles péritriches. Ce genre est aérobie, ou parfois facultatif et catalase positive **(Klein *et al.*, 1998).**

La plupart sont des saprophytes du sol, de l'eau, de l'air et des plantes, comme *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* **(Delarras, 2007).**

Les *Bacillus* sont responsables de l'altération des produits laitiers. Les espèces les plus incriminées sont *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*. Cette altération est due principalement aux activités enzymatiques des souches contaminants les produits et qui peuvent introduire des anomalies dans le lait (la coagulation du lait) **(Christieans et Zagorec, 2013)**.

Ces bactéries sporulées présentent une très forte résistance aux traitements thermiques, comme la pasteurisation. Elles peuvent être extrêmement difficiles à éradiquer d'une laiterie **(Flint *et al.*, 1997).**

2- La sporulation des bacilles :

La sporulation est un phénomène naturel dans le cycle de croissance de certains groupes de bactéries telles que les espèces de *Bacillus* (**Ponce *et al.*, 2008**). C'est un mécanisme de survie, généralement considéré comme un processus qui se produit lorsque l'organisme est en situation de stress (**Barill *et al.*, 2012**).

3- La structure des endospores

Les spores sont constituées d'un noyau, autrement connu sous le nom de protoplaste, qui contient des matières nucléaires, entouré par la membrane corticale et le cortex, qui est à son tour enfermé dans le manteau des spores **(Ponce *et al.*, 2008) (Figure. 1)**. Certaines espèces, comme *Geobacillus sp* et *B.cereus*, peuvent avoir une couche sur le manteau des spores appelés exosporium. L'espèce *B.cereus* peut avoir des appendices**.** La grande différence de structure des spores entre les espèces réside dans le nombre des couches dans la spore, alors que le cortex et le noyau sont très similaires **(Gibbons et Murrey, 1978)**.

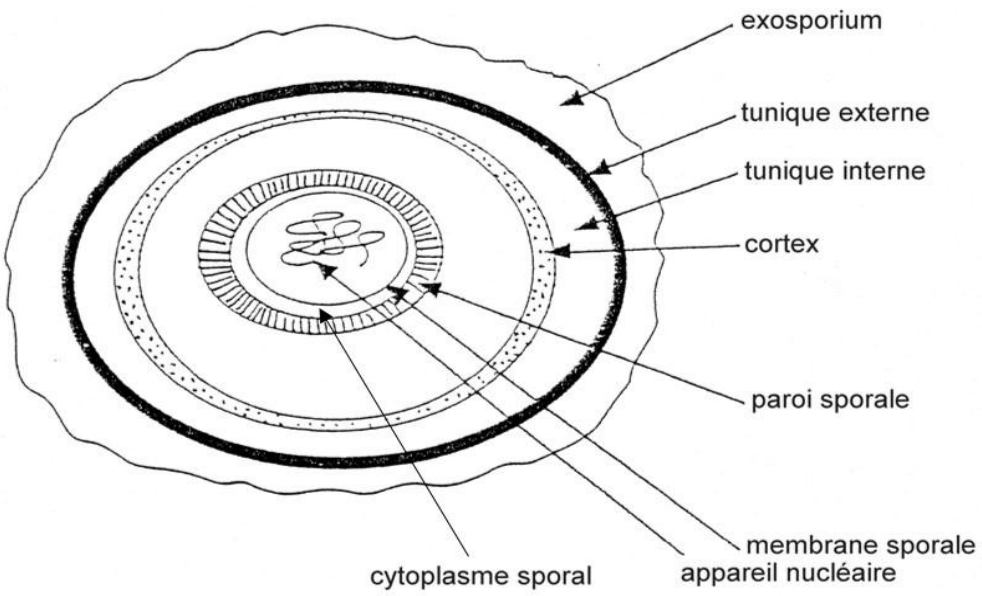


Figure. 1 : Schéma de la structure d'une spore bactérienne.

4- Formation des spores :

La sporulation est un processus complexe, il est constitué d'une série d'étapes qui sont très semblables entre les bactéries sporulées aérobies facultatives et les anaérobies **(Gibbons et Murrey, 1978**). La compréhension de ce processus est importante pour contrôler les spores dans les industries laitières (**Augustin, 2003; Postollec *et al.*, 2010)**.

- La sporulation chez les mésophiles peut être déclenchée par le besoin nutritionnel, une grande densité cellulaire ou des lésions de l'ADN **(Nicholson *et al.*, 2000; Gosh, 2009)**. Le premier stade de sporulation peut être inversé si la culture est transférée dans un environnement riche en nutriments.
- Pour les bactéries thérmophiles, la présence de minéraux (magnésium, le calcium et le potassium) peut jouer un rôle important (**Nicholson *et al.*, 2000)**. Ces minéraux sont importants pour le développement d'une spore mature et peuvent être impliqués dans l'activation du processus de formation des spores. Étant donné que ces minéraux sont également présents dans le lait, ils peuvent aussi stimuler la formation des spores des bacilles thermophiles dans les processus laitiers **(Burgess *et al.*, 2010).**

5- Résistance :

Les spores sont résistantes à la chaleur, à la perturbation mécanique et à une grande variété de produits chimiques (**Ponce *et al.*, 2008)** ce qui rend très difficile leur destruction dans les produits laitiers par les procédés de fabrication **(Gleeson *et al.*, 2013).**

Dans le cas de bacilles mésophiles et thermophiles facultatives, la combinaison de plusieurs propriétés rentrent dans la résistance des spores de *Bacillus*, y compris leur :

- faible teneur en eau ;
- l'imperméabilité de la membrane interne ;
- le peptidoglycane du cortex ;
- de petites protéines (PAS) solubles dans l'acide et l'acide dipicolinique (DPA) (**Walker *et al.*, 2012**; **Ponce *et al.*, 2008; Luu et Stelow, 2014).**

Luu et Stelow (**2014**) supposent que la minéralisation et la faible activité d'eau sont associées à la résistance des spores à la chaleur.

Dans le cas des bacilles thermophiles, la résistance des spores à la chaleur varie considérablement. Les spores de *Geobacillus Spp* ont le potentiel de survivre à un traitement UHT (134 - 145 °C pendant 1 à 10 s) **(Ponce *et al.*, 2008; Postollec *et al.*, 2010**).

6- La germination des endospores :

Le processus de conversion d'une spore à une cellule végétative passe par trois étapes: l'activation, la germination et l'excroissance (**Ponce *et al.*, 2008; Setlow, 2014)**. **(Figure. 2)**

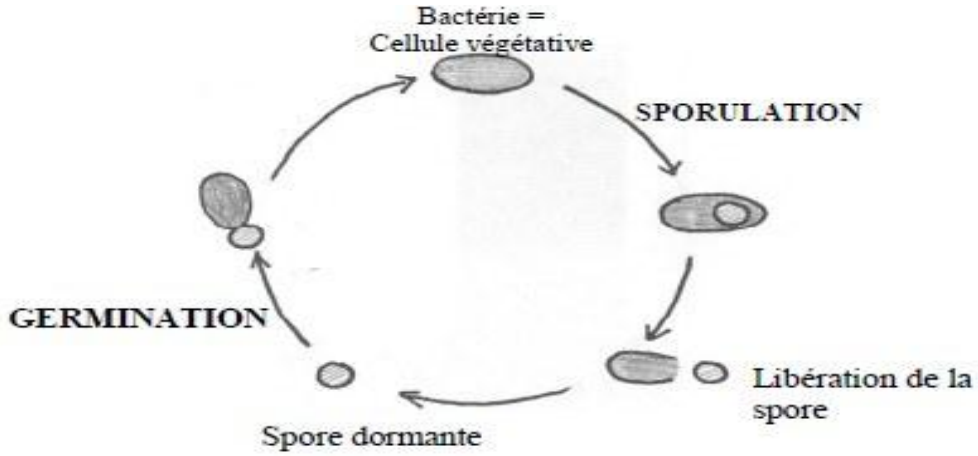


Figure. 2 : cycle de sporulation bactérienne.

Les spores doivent être activées avant que la germination ne se produise **(Giffel et al., 2002).** La chaleur, l'exposition aux produits chimiques et une diminution du pH à 2-3 peuvent activer les spores **(Nicholson et al., 2000; Setlow., 2014).**

Dans l'industrie laitière, la chaleur est le mécanisme le plus probable de l'activation des spores thermophiles, en raison de l'utilisation très étendue de traitement thermique en tant que technologie de conservation **(Seale et aL,2008).**

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

Chapitre 03

Laiterie ENNADJAH

La laiterie «ENNAJAH» Maghnia

1. La localisation *:*

ENNAJAH est une laiterie privée, située dans la commune de Maghnia à 60km de TLEMCEN elle a vu le jour en octobre 2002.

1.1 L'activité de l'entreprise :

Cette laiterie a comme activité le traitement et la transformation du lait cru y compris :

- Le lait pasteurisé (écrémé et demi écrémé);
- Le lait UHT ;
- Le l'ben ;
- Le beurre ;
- La crème fraiche ;
- Le yaourt.

ENNAJAH est constituée d'un bloc administratif organisé comme suit :

- Une direction générale : dirigée par un gérant principal ;

- Une direction de la production ;

- Une administration générale ;

- Un service de comptabilité - un service de finance - une caisse ;

- un service commercial.

La laiterie comporte aussi un laboratoire d'analyses physicochimiques et des ateliers de fabrication :

- Atelier de fabrication de lait de vache pasteurisé, et de la crème fraiche, de beurre pasteurisé et de l'ben ;
- Atelier de production de lait de vache UHT ;
- Atelier de production de yaourt ;
- Trois chambres froides ;
- Une chambre chaude ;
- Magasin de stockage des produits de nettoyage et de l'emballage.

1.2- Matière première (le lait de vache) :

Le lait de vache c'est la principale matière première utilisée dans la laiterie. Cette dernière a implanté 05 centres de collectes (Bekhata, Ain-Temouchent, Remchi, Sidi-Bellabess et Tlemcen).

Le lait de vache arrive à l'usine en vrac dans des camions citernes iso-thermiques.

Dès sa réception à la laiterie, un échantillon est prélevé pour effectuer les tests rapides : acidité, densité et matière grasse. Dans le cas de résultat positif, la vidange est effectuée

1.3- Les analyses physico-chimiques de l'entreprise

1.3.1- Le contrôle visuel :

Le réceptionniste effectue un contrôle visuel afin d'éviter des corps étrangers, le colostrum, le lait glacé, des débris végétaux et d'autre substances étrangères. Il doit aussi vérifier l'aspect et l'odeur du lait.

1.3.2- Le test d'acidité :

Pour ce test, un réactif est utilisé (le pourpre de bromocrésol). Selon l'acidité du lait, on obtient soit:

- Une couleur violette = c'est un bon lait
- Une couleur jaune ou jaune verdâtre = le lait est refusé

1.3.3- Le control de la densité :

Un lait avec une densité supérieure à 1028 est un bon lait (acceptable)

Un lait avec une densité inférieure à 1028 est refusé (lait mouillé)

1.3.4 - Le contrôle de la matière grasse :

Au niveau du laboratoire d'analyses physico-chimiques se fait le contrôle de la matière grasse comme suit :

10mL d'acide sulfurique + 11mL de lait + 1mL d'alcool (Iso amyle alcool).

Après centrifugation (5000tours/5min), et à l'aide d'un butyromètre, on obtient le taux de matière grasse : la meilleure valeur est celle qui est ≥ 34g/l.

Rapport-Gratuit.com

1.4 - Le diagramme de pasteurisation du lait :

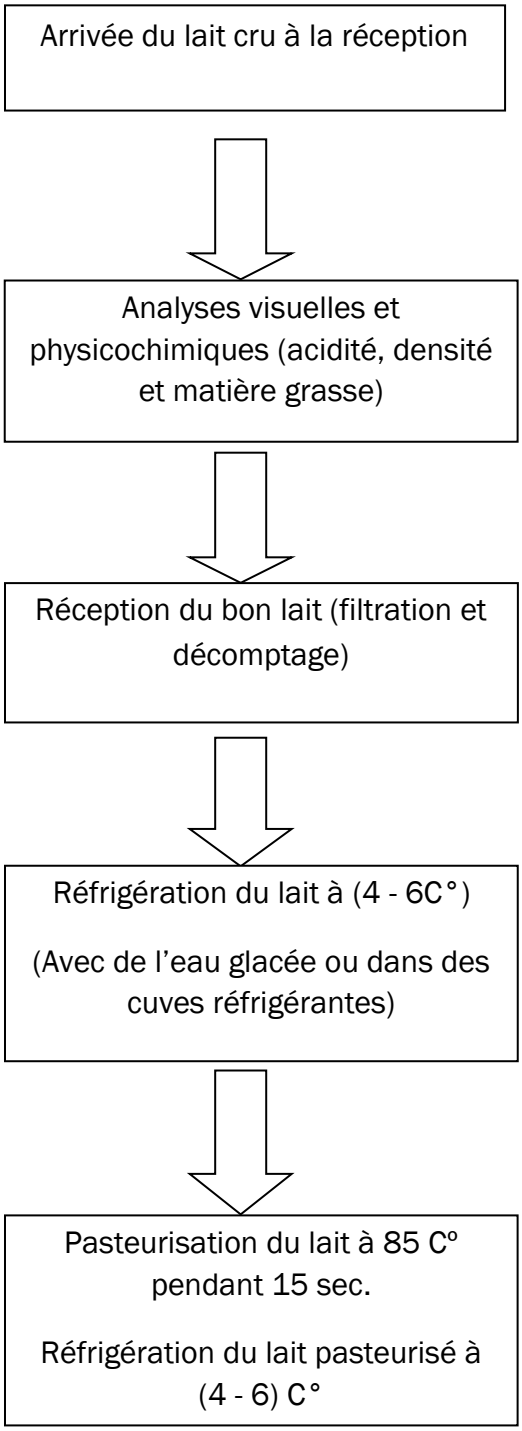


Figure 03 : Diagramme de fabrication du lait de vache pasteurisé

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Partie II

Partie expérimentale

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Chapitre 01

Matériel et méthodes

Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire des sciences de l'animal, Ingénierie Agronomiques et Analyses Agroalimentaires. Département d'Agronomie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université Abou Bakr Belkaid- Tlemcen), dans lesquels nous avons réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques sur les différentes souches de bactéries isolées à partir de cinq échantillons de lait de vache pasteurisé dans le but de les identifier (bactéries sporulées).

1) Matériel utilisé :

- ✓ Autoclave
- ✓ Bec Bensen
- ✓ Balance de précision
- ✓ Bain Marie
- ✓ Etuve bactériologique
- ✓ Micropipette 100 µL et 1000 µL
- ✓ Microscope optique
- ✓ Milieu de culture (PCA, gélose nutritive, TSA, TSI, Mannitol, citrate de Simmons…..).
- ✓ Glacière
- ✓ Plaque chauffante avec agitateur
- ✓ Produits chimique : NaCl, eau de Ringer, l'eau oxygénée, violet de gentiane, lugol, fuschine, alcool.
- ✓ Verrerie usuelle (flacon 250ml, pipette graduées, pipette Pasteur, tube à essais, erlenmeyers, béchers, …..)

2) Méthodologie de prélèvement :

Cinq échantillons de lait de vaches pasteurisé ont été prélevés à partir d'une laiterie dans la région de Tlemcen (l'Ouest d'Algérie) durant le mois de Mars 2017.

Les échantillons (sachets de lait de vache pasteurisés) sont placés dans une glacière et transportés au laboratoire des sciences de l'animal, Ingénierie Agronomiques et Analyses Agroalimentaires de l'université de Tlemcen (faculté SNV/SUT).

3) Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale :

Cette flore appelée aussi « flore aérobie mésophile revivifiable » (FAMT) est un bon indicateur de la qualité générale et de la stabilité des produits ainsi que la qualité (propreté) des installations **(Guiraud, 1998).** A partir de la dilution 10^{-1} (1ml de solution mère dans 9ml de l'eau de Ringer), jusqu'au 10^{-8}, porter aseptiquement 01 ml de chaque dilution dans une boîte de Pétri remplie de milieu PCA, ensuite bien homogénéiser le milieu gélosé. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 72h. Seules les boites contenant entre 30 et 300 colonies sont prises en compte.

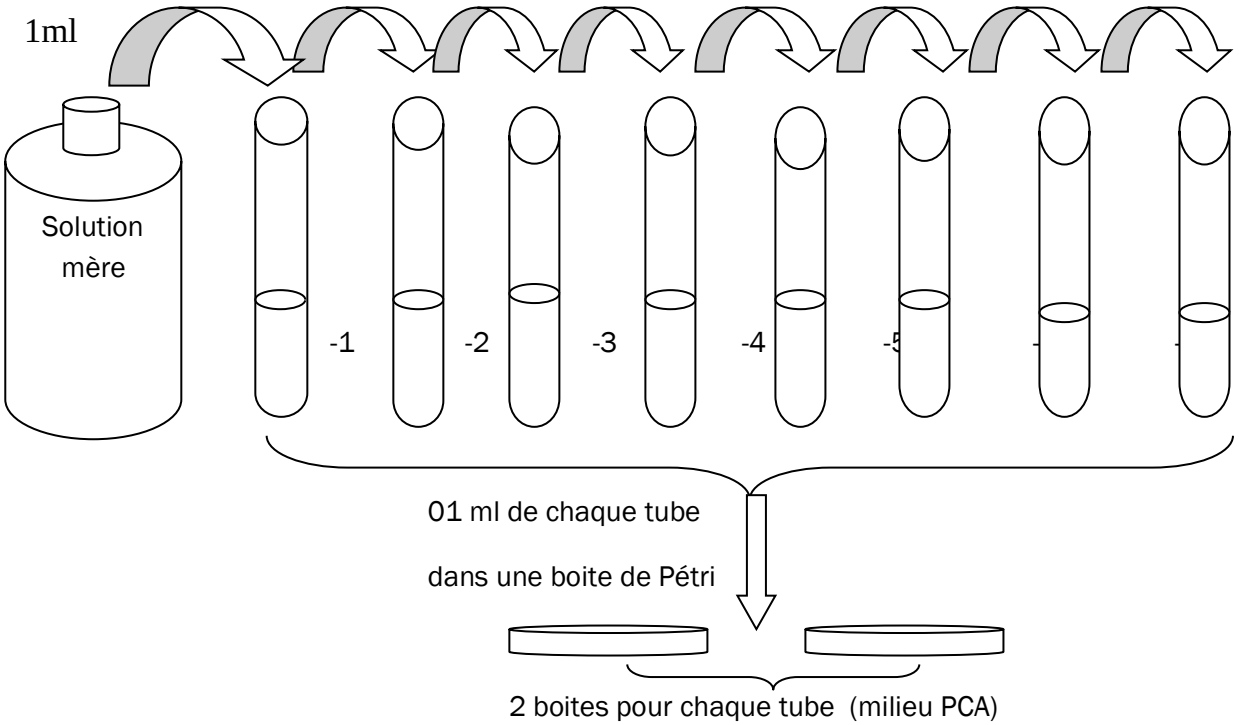


Figure 04 : Dilution de solution mère et ensemencement sur milieu PCA

4) Dénombrement, Isolement et purification des micro-organismes thermorésistants :

Mourgues et al. (1983) ont montré qu'en absence de toute recontamination post-pasteurisation, la qualité de conservation du lait pasteurisé était limitée par des bactéries provenant du lait cru, donc thermorésistantes. Pour leur dénombrement, on emploie le milieu conseillé pour le dénombrement des germes aérobies du lait (PCA). L'incubation est réalisée à 37 °C pendant 72 h **(Larpent, 1997).**

A partir de la solution mère traitée à 80°C pendant 10min, une série de dilutions allant à 10^{-8} est effectuée (1 ml de lait traité dans 9 ml de l'eau de Ringer), 100µL de chaque dilution est ensemencée en surface sur deux boites de Pétri contenant du milieu PCA. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 48h.

Après incubation de chaque boite ensemencée, on choisit au maximum 5 à 7 colonies d'aspects différents pour l'isolement. Chaque colonie choisie est ensemencée sur milieu gélose nutritive. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24h. Cette opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de colonies pures.

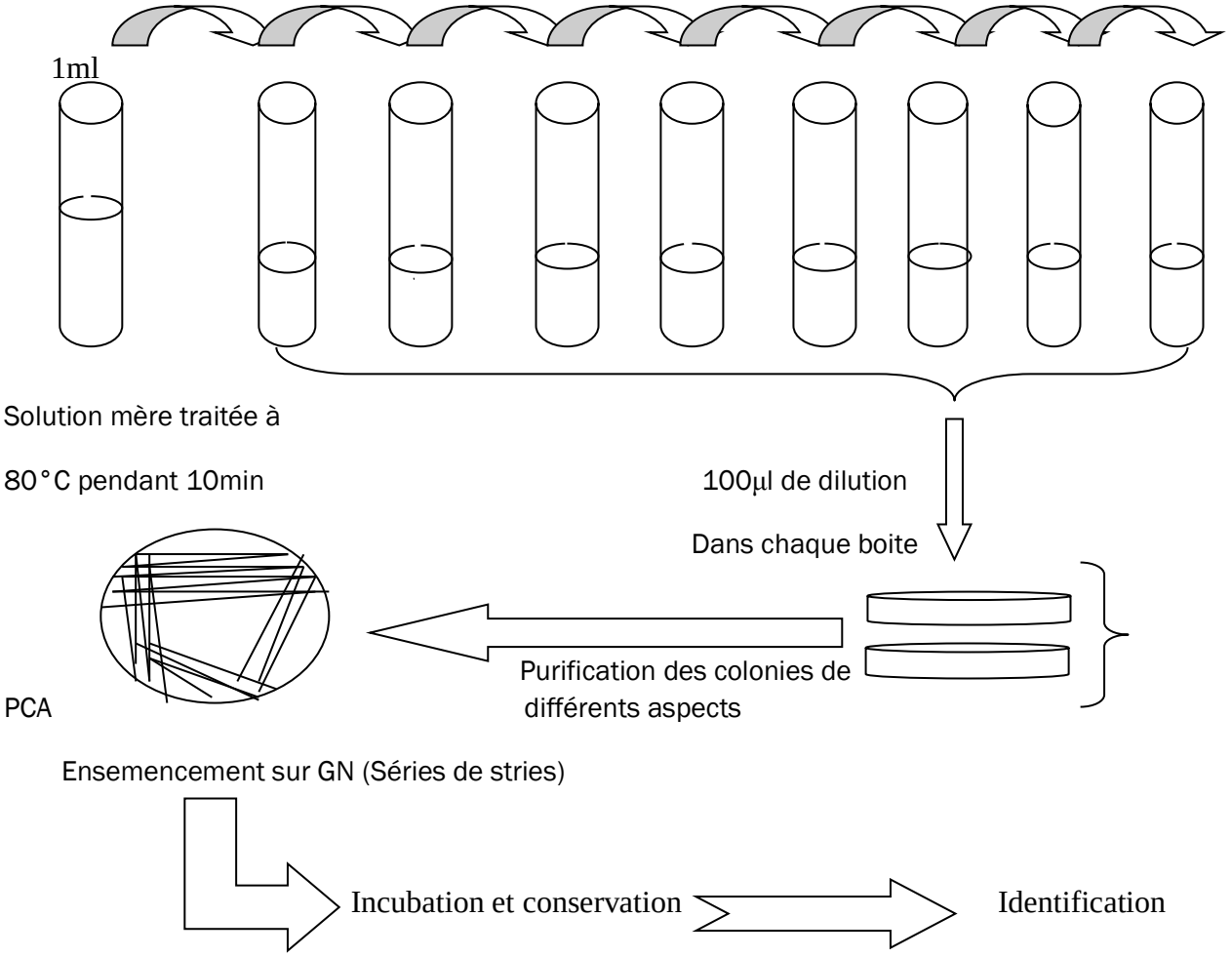


Figure 05 : Dilution de la solution mère Traitée thermiquement et ensemencement sur milieu GN

5) Identification phénotypiques des souches thermorésistantes :

5.1) Caractérisation morphologique des isolats :

5.1.1) Aspect macroscopique des colonies

L'aspect macroscopique des colonies (Aspect, couleur) est déterminé après incubation à 37°C sur GN (Gelose Nutritive) pendant 24h à 48h.

- ✓ **La taille :** est mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible : en comparant la taille de la colonie et le diamètre du champ, on aura une idée plus précise de la taille des petites colonies ;
- ✓ **La forme :** (bombée, ronde, plate, ombiliquée, à centre surélevé, à bords dentelés, en étoile.) ;
- ✓ **L'aspect de la surface :** est bien observé par transillumination oblique. Il peut être lisse, rugueux, …etc ;
- ✓ **L'opacité :** les colonies sont décrites comme : opaques (ne laissent pas passer la lumière), translucides, transparentes ;
- ✓ **La consistance :** Il s'agit d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses, sèches ou encore muqueuses ;
- ✓ **La couleur (pigmentation) *:*** les colonies sont habituellement de couleur crème. Une couleur différente est due à des pigments.

5.1.2) Aspect microscopique :

La morphologie, l'arrangement des cellules le type pariétale des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration de Gram (1884) à l'aide d'un microscope optique **(ZEISS-weastGermany).**

- ✓ **Coloration de Gram**

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de Gentiane*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. À ce stade, les cellules $Gram^-$ seront incolores, les cellules $Gram^+$ sont violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la *Fushine* pour colorer les cellules $Gram^-$ présentes en rose. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif (grossissement X 100) en ajoutant quelques gouttes d'huile à immersion **(Singleton, 1999)**.

5.2) Caractérisation biochimique des isolats :

5.2.1) Mise en évidence des enzymes respiratoires

a) Catalase :

La présence de la catalase est mise en évidence en dissociant à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur une quantité suffisante de la culture sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène **(Gerhardt *et al.*, 1994).**

b) Oxydase :

Le test d'oxydase est basé sur la production de l'enzyme indophénol-oxydase par les organismes possédant le *cytochrome C.* Cette enzyme, en présence de l'oxygène atmosphérique, oxyde un colorant redox (dihydrochlorure de Tetra méthyle para phénylène diamine) pour former un composé violet **(Kohler et *al.*, 2009).**

A partir d'une culture jeune ensemencée sur GN, une colonie est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur **(Aslanzadeh, 2006)** puis mise en contact avec un disque d'oxydase. Un virage de la couleur en violet indique la présence de l'enzyme oxydase chez la bactérie.

5.2.2) Croissance sur le milieu mannitol-mobilité

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les souches étudiées dans le milieu semi-solide mannitol-mobilité par piqûre centrale, et incubé à 37°C±1°C pendant 18 à 24h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol **(Gerhard *et al.*, 1994)**, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries **(Marchal *et al.*, 1991)**.

5.2.3) Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone: le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu est ensemencée par une strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubé à 37°C±1°C pendant 5 jours.

- Citrate-positive : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
- Citrate-négative : pas de culture (coloration verte de milieu inchangée) **(Marchal *et al.*, 1991)**.

5.2.4) Test TSI (Gélose Glucose-Lactose-Saccharose-H_2S)

A l'aide d'une anse contenant des colonies prélevées, on ensemence la pente puis le culot d'un tube par piqûre centrale. L'incubation a était faite à 37°C±1°C pendant 48 à 72h.

- ✓ Une coloration jaune de la pente indique un lactose positif.
- ✓ Une coloration jaune du Culot montre un glucose positif.
- ✓ Une coloration jaune de la zone intermédiaire indique un saccharose positif.

Ce test permet également d'observer la production de H_2S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de gaz CO_2 ou H_2 (bulles dans la gélose) **(Marchal *et al*., 1991)**.

5.2.5) Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires :

a) Détermination de l'activité amylolytique :

La mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon est réalisée par l'ensemencement des souches en une seule strie sur gélose à amidon. Après incubation à 37°C, des observations régulières sont effectuées chaque 24h pendant 72heures en recouvrant la gélose par une solution de *Lugol*. L'absence de coloration autour de la culture indique la dégradation de l'amidon alors que les zones contenant l'amidon se colorent en brun **(De vos *et al*., 2009).**

b) Détermination de l'activité protéolytique :

b.1) Hydrolyse de la caséine :

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur gélose au lait. Les souches sont ensemencées en une seule strie puis incubées à 37Cº. Les résultats sont appréciés quotidiennement durant 72 heures. L'apparition d'une auréole claire autour de la culture indique la dégradation de la caséine **(De vos *et al*.. 2009).**

b.2) Lécithinases :

Selon la méthode de **Genta et Heluane (2001),** 10mL d'une émulsion de jaune d'œuf ont été additionnés à 90mL de milieu de base TSA (gélose Tryptone-Soja) maintenu en surfusion (~45°C), ce mélange était coulé sur des boites de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les souches étaient ensemencées par strie centrale. L'apparition de toute zone claire autour de la culture après 24 à 72 heures d'incubations à 37°C, témoigne que la souche possède des lécithinases **(De vos *et al*., 2009).**

6) Caractérisation des souches par la galerie API 20E :

C'est un système simplifié et standardisé, qui comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés permettant d'effectuer 22 tests biochimiques. Des suspensions bactériennes (mises dans de l'eau physiologique 0,85g/L) sont prélevées à partir des cultures de 18h de chaque souche et sont inoculées dans les micro-tubes de la plaque API 20E. Les plaques sont incubées pendant 24h à 37°C. Les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs**(Camille,2007).**

Rapport-Gratuit.com

Chapitre 02

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1- Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale et de la flore thermorésistante :

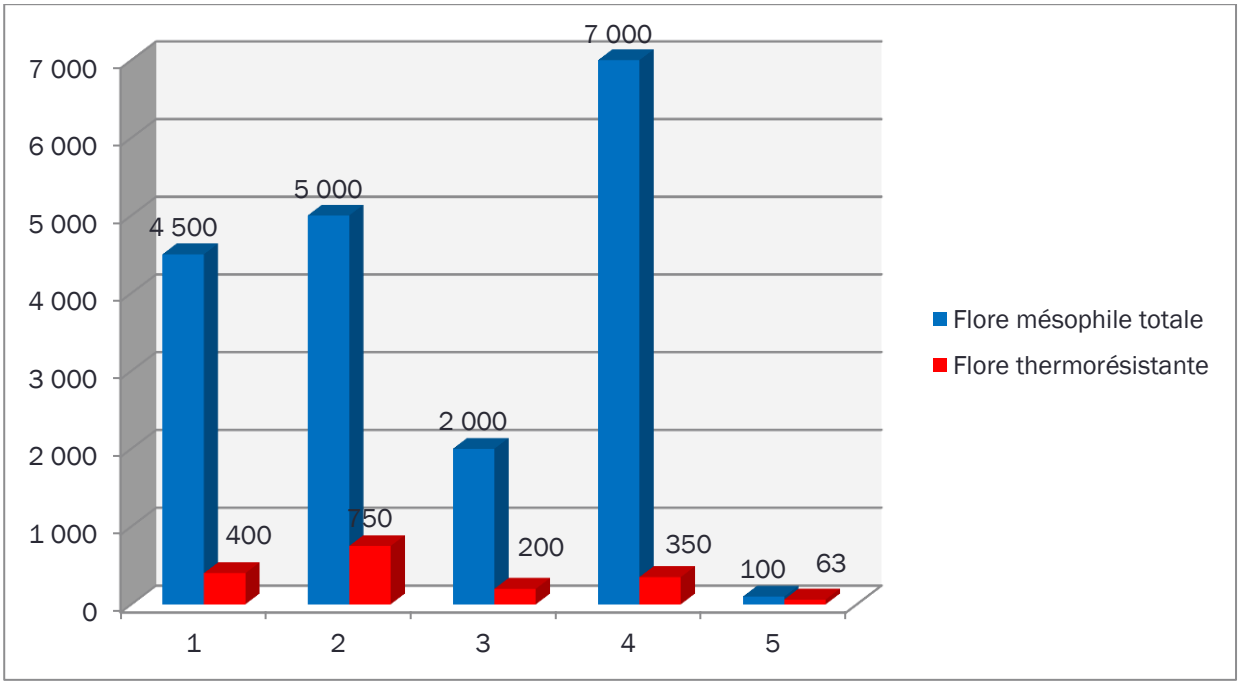
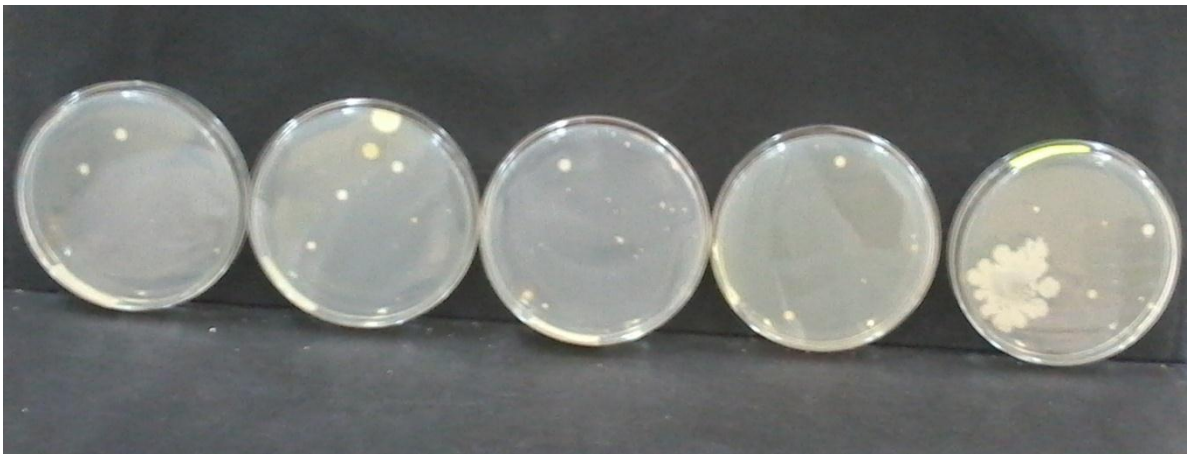


Figure 06 : Résultats du dénombrement de la flore aérobie mésophile totale et de la flore thermorésistante

1- 2. Contribution à la collection des souches :

Des colonies de différents aspects macroscopiques sont apparues après incubation 48h à 72h sur gélose PCA.



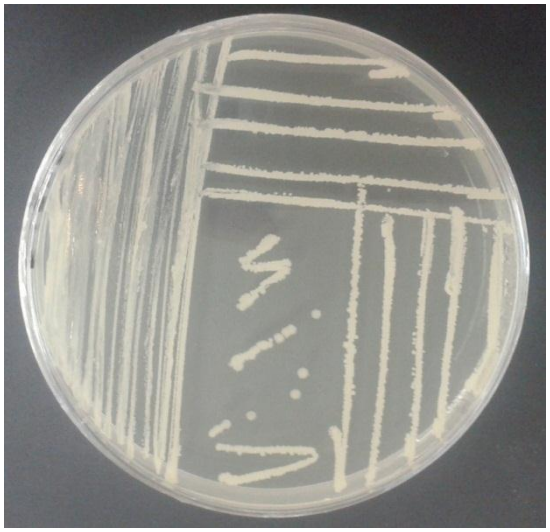
Photos 01 : Exemples d'aspects macroscopiques des isolats cultivés sur gélose PCA.

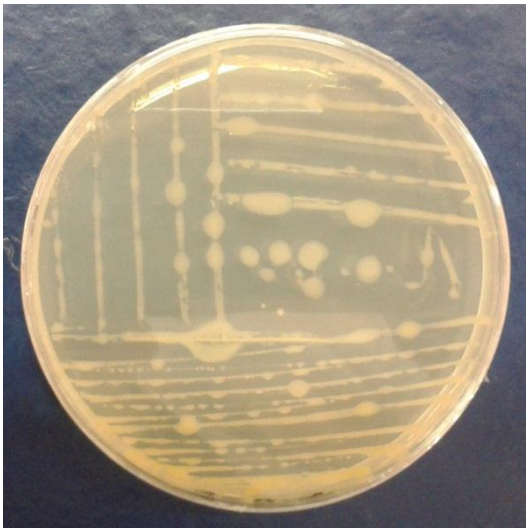
Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1.3-Isolement et purification des souches :

Après purification des colonies par ensemencement par séries de stries, 19 souches ont été sélectionnées à partir de milieu gélose nutritive, la sélection selon des critères fixés.





Photos 02: Ensemencement sur gélose nutritive (ensemencement par séries de stries).

1.4- Caractérisations phénotypiques des isolats

1.4.1- Aspect microscopique

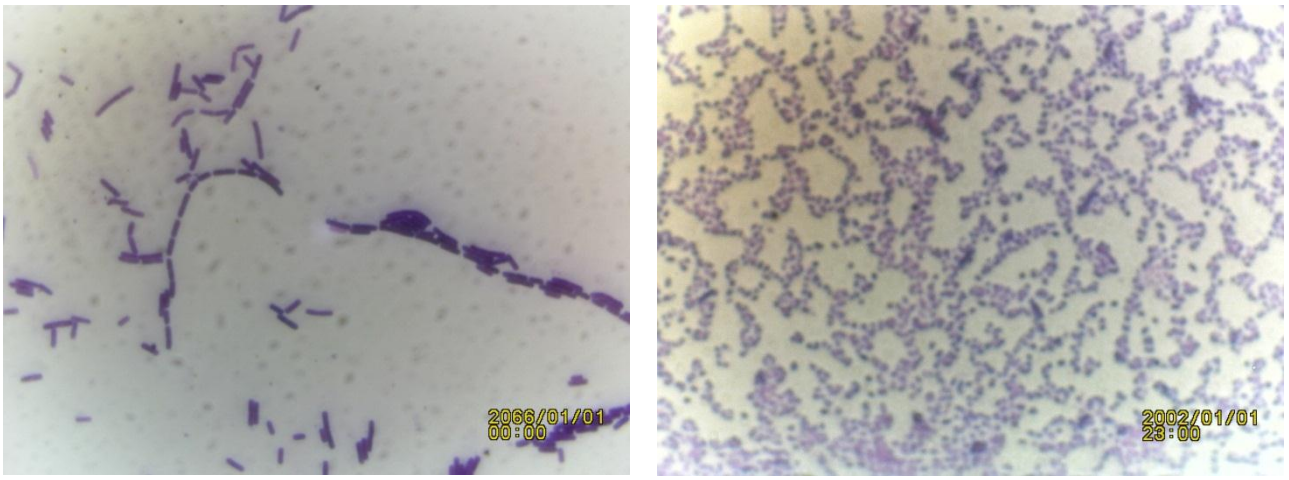
Les résultats de cet examen sont résumés dans le tableau 09.

Souche	Gram	Formes	Regroupements
S1	+	Bacille	En amas
S2	+	Bacille	individuelles
S3	+	cocci	En amas et en chainette
S4	+	cocci	En amas
S5	+	Bacille	En amas
S6	-	cocci	En amas
S7	-	cocci	En chainette et en grappe
S8	+	cocci	En paire et en amas
S9	+	bacille	En amas
S10	+	Bacille	En chainette
S11	+	Bacille	

S12	**+**	**cocci**	**En chainette et en grappe**
S13	**+**	**Bacille**	**En chainette**
S14	**+**	**Bacille**	**En chainette**
S15	**+**	**bacille**	**En paire et en chainette**
S16	**+**	**bacille**	**En paire**
S17	**+**	**Bacille**	**En chainette**
S18	**+**	**Bacille**	**En chainette, en amas et palissade**
S19	**+**	**bacille**	**En amas et individuelle**

Tableau 09 : résultats de la coloration de Gram

Après la coloration de Gram, nous sommes passées à l'observation microscopique aux grossissements (G x 100) avec l'huile à immersion, où nous avons pu observer que la majorité des bactéries étaient Gram positif apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations (tableau 7). L'observation microscopique a montré que 68,41% des souches sont des bacilles et 31,57% sont des cocci. (figure7).



Photos 03 : observation microscopique de la coloration de Gram (x 100).

1.5-Caractéristiques biochimiques des isolats :

1.5.1-Mise en évidence des enzymes respiratoires :

L'observation du test catalase a montré que 76,92% des bacilles sont catalase positive et pour le test d'oxydase, 61,53% des souches sont positives. Elles sont donc aérobies ou anaérobies facultatives.

Photos 04 : Observation d'effervescence (catalase positive).

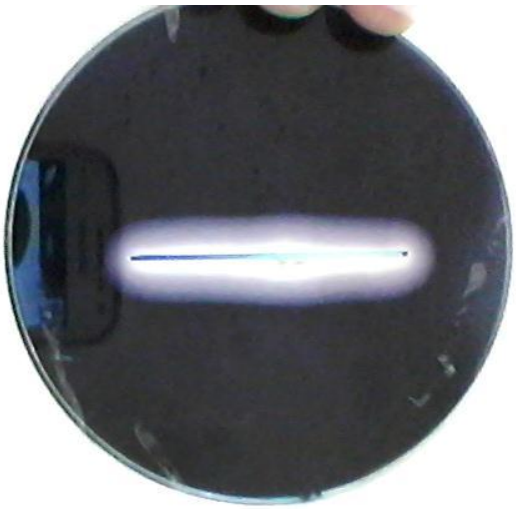
Tableau 10: Résultats de la recherche des enzymes réspératoire (catalase,oxydase).

Souche	Test catalase	Test oxydase
S1	+	+
S2	-	+
S5	+	+
S9	+	-
S10	+	-
S11	+	+
S13	+	+
S14	+	+
S15	+	+
S16	-	-
S17	+	-
S18	-	+
S19	+	-

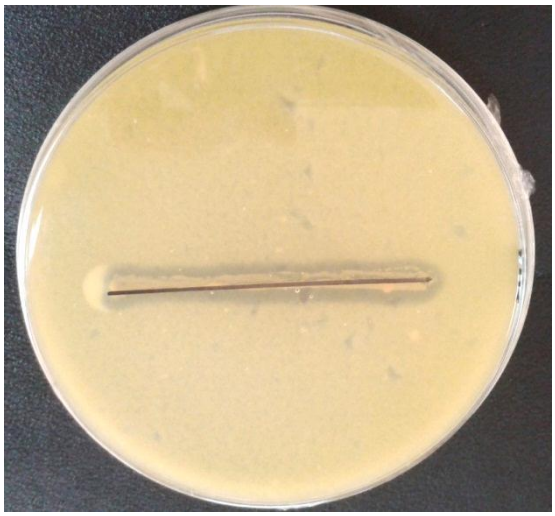
1.5.2-Résultats de la mise en évidence des activités enzymatiques :

Les activités : protéolytique, amyloltique, et lipolytique ont été réalisées en utilisant les milieux suivants : gélose au lait, gélose à amidon, et gélose à émulsion d'œuf (la lécithine), les résultats sont illustrés dans la figure et mentionnés dans le tableau 11.

A



B



C

Photos 05 : Activités enzymatiques : A. Hydrolyse de la caséine, B. Hydrolyse de l'amidon, C. Hydrolyse de la lécithine.

Tableau 11: Résultats de la recherche des enzymes réspératoire

souche	Caséinase	Amylase	Lécithinase
S1	+	-	+
S2	-	+	+
S5	-	-	-
S9	+	-	-
S10	-	-	-
S11	+	-	-
S13	+	+	-
S14	+	+	+
S15	+	+	+
S16	-	+	-
S17	+	-	-
S18	+	+	-
S19	-	-	-

1.5.3-Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de Simmons :

La capacité des souches (bacilles) à assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est observée dans une seule souche comme le montre les résultats résumés dans le tableau 12.

Photos 06 : Exemples de mise en évidence de l'utilisation de citrate (source de Carbone**).**

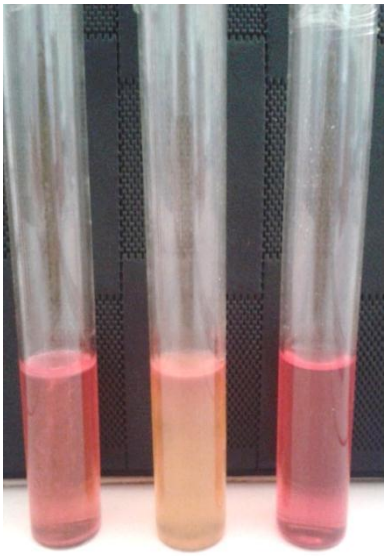
1.5.4-Utilisation du milieu au mannitol mobilité:

Le test mannitol mobilité a révélé que 61,53% des bacilles sont mannitol positif et 30,76% sont mobiles.

1.5.5- Dégradation des trois sucres (TSI) :

En ce qui concerne la dégradation des trois dégagement gazeux n'a été enregistré.

Les résultats sucres, les résultats du test TSI montrent que 30,76% des bacilles sont capables de dégrader le glucose, 69,23% sont capables de dégrader le saccharose et 61,53% sont capables de dégrader le lactose. Aucun des deux tests sont résumés dans le tableau 12.



A **B**

Photos 07 : Exemples de résultats des tests : mannitol mobilité (A), TSI (B).

Tableau 12 : Résultats des tests biochimiques.

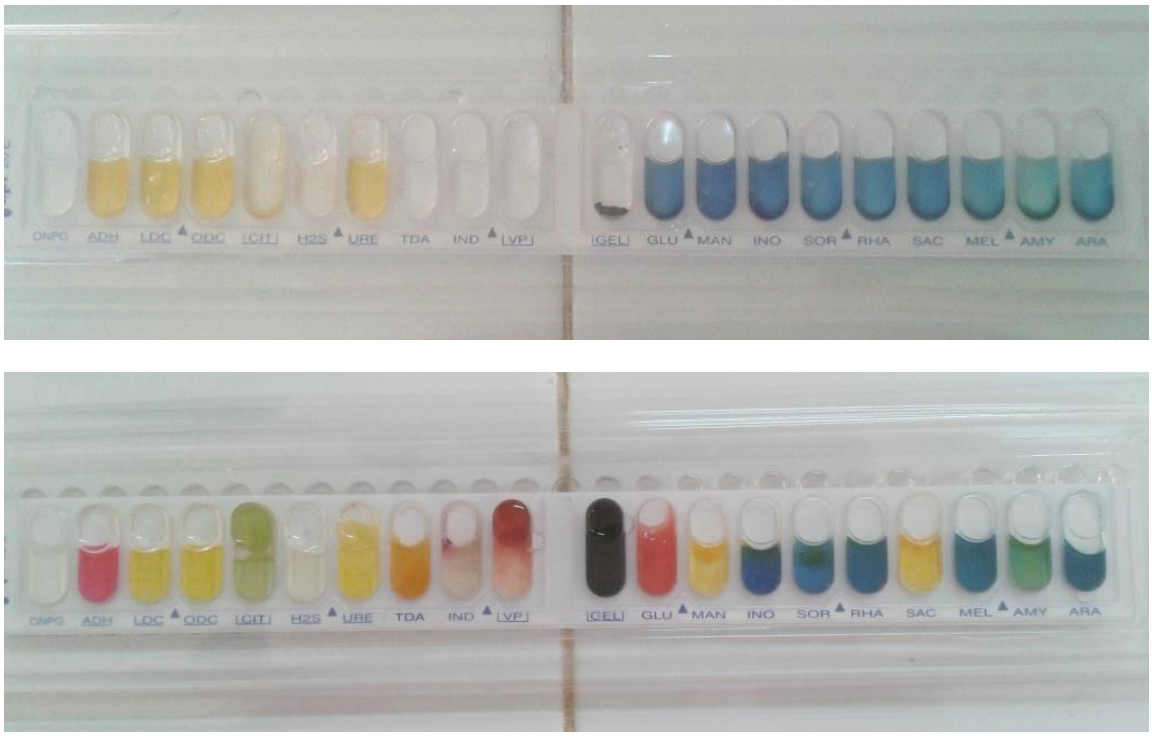
Souche	Citrate	Mannitol	Mobilité	TSI Glu/ Sacch/ Lac
S1	-	-	-	- ++
S2	-	+	+	+++
S5	-	-	-	- - -
S9	-	+	-	- ++
S10	-	-	-	- - -
S11	-	-	-	- - -
S13	-	+	+	+++
S14	-	+	-	- + -
S15	-	+	-	- ++
S16	-	+	+	+++
S17	+	+	-	- ++
S18	-	+	+	+++
S19	-	-	-	- - -

1.6-Résultats des plaques API20E :

Le reste des tests biochimiques ont été réalisés sur plaques API 20 E,

A

B



Photos 08 : Exemples de plaques API20E (A. avant incubation / B. après incubation).

Tableau 13 : résultats des plaques API20E des isolats

Souche	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H_2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	Nitrite
S1	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
S2	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
S5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-
S9	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
S13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
S14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
S15	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
S16	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
S17	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
S18	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
S19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+

les résultats obtenus par le logiciel API feuille de calcul pour l'identification microbienne **(Jean *et al* ., 2007)** sont :

S1 : correspond à *Bacillus cereus* . Elle représente 07,69% des bacilles isolées;

S10 : correspond à *Paenibacillus glucanoliticus*. Elle représente 07,69% des bacilles isolées;

S19 : correspond à *Aneurinbacillus aneurinilyticus.* Elle représente 07,69% des bacilles isolées;

S2, S15 : correspondent à *Bacillus amyloliquefaciens.* Elles représentent 15,38% des bacilles isolées ;

S5, S14: correspondent à *Brevibacillus chochinensis/ centrosporus/ brevis*. Elles représentent 15,38% des bacilles isolées ;

S9, S16, S17 : correspondent à *Bacillus licheniformis*. Elles représentent 23.07% des bacilles isolées ;

S11, S13, S18 : correspondent à *Geobacillus thermoglucosidiasus*. Elles représentent 23.07% des bacilles isolées.

2- Discussion :

Le travail qu'on a mené a permis d'isoler 19 souches bactériennes à partir de 05 échantillons de lait de vache pasteurisé.

Guiraud, 1998 a montré que la flore appelée « flore aérobie mésophile revivifiable » (FAMT) est un bon indicateur de la qualité générale et de la stabilité des produits ainsi que la qualité (propreté) des installations.

Les résultats qu'on a obtenus indiquent une charge FAMT qui varie entre 10^2 et 7×10^3. Selon **Guirod et Rosec., 2004,** la flore totale aérobie mésophile est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banaux de contamination capables de se multiplier en présence d'oxygène à une température de 25 à 40 C° **(Bonnefoy et al., 2002).** En ce qui concerne la flore thermorésistante, les résultats du dénombrement obtenus varient entre 62.5 et 7.5×10^2.

Des approches différentes mais complémentaires de microscopie et de tests biochimiques ont été utilisées pour l'identification de ces souches. Ainsi, l'utilisation de la coloration de Gram combinée à une observation microscopique suivie par une identification phénotypique ont montré que 13 souches sont des bacilles correspondant à 68,41% des isolats et 31,57% sont des coccis. La majorité de ces bactéries sont à Gram positif aérobies, capables de former des spores. Toutefois, 76,92% des bacilles sont catalase positive et pour le test d'oxydase, 61,53% des bacilles sont positives. L'étude enzymatique des bacilles a montré que 61,53% d'entre elles sont capables d'hydrolyser la caséine, 46,15% sont capables d'hydrolyser l'amidon, et 30,76 % sont capables d'hydrolyser la lécithine. Les résultats du test TSI montrent que 30,76% des bacilles sont capables

Rapport-Gratuit.com

de dégrader le glucose, 69,23% sont capables de dégrader le saccharose et 61,53% sont capables de dégrader le lactose. Aucun dégagement gazeux n'a été enregistré. Les autres tests biochimiques étaient réalisés en utilisant la galerie API 20 E pour apprécier les 20 tests présents sur cette plaque.

Les isolats identifiés appartiennent à plusieurs espèces différentes dont (23.07%) *Geobacillus thermoglucosidiasus*, (23.07%) *Bacillus licheniformis*, (15.38 %) *Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis*, (15.38%) *Bacillus amyloliquefaciens*, (7.69%) *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, (7.69%) *Bacillus cereus*, (7.69%) *Paenibacillus glucanolyticus*.

L'étude de **Rückert et al (2004)** a permis d'identifier comme espèces majoritaires: *Anoxybacillus flavithermus* à (43%), suivi par *Bacillus licheniformis* à (37%) et *Geobacillus stearothermophilus* à (11%).

Plusieurs études ont montrés que les bactéries aérobies sporulées appartenant au genre Bacillus et aux genres étroitement apparentés ont été liées de façon répétée à la détérioration du lait cru et pasteurisé et des produits laitiers **(Cempirkova R., 2002 ; Cosentino S. et al., 1997 ; Crielly E.M. et al., 1994 ; Meer R.R et al., 1991 ; Ternstro¨m A. et al., 1993).** Même dans le lait stérilisé dans le commerce, des dégâts causés par des espèces de *Bacillus* ont été signalés, bien que cela soit principalement causé par des enzymes protéolytiques et lipolytiques thermostables ou par la recontamination du lait stérilisé pendant le traitement **(Chen L. et al, 2003 ; Janstova B. et al., 2004 ; Westhoff D.C. et al., 1981).** Cependant, plusieurs espèces de *Bacillus* formant des spores hautement résistantes à la chaleur (HRS) ont été isolées et qui sont capables de survivre au traitement industriel ultra-haute température (UHT) **(Pettersson B. et al., 1996 ; Scheldeman P. et al., 2004).** Les bacilles thermophiles principalement *Anoxybacillu*s et *Geobacillus* sont considérés comme les contaminants les plus importants de l'industrie laitière. **(Murphy *et al.*, 1999 ; Seale *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2012).**

En effet, les thermophiles obligatoires tels que *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus spp.* ne sont pas pathogènes **(Fabienne, 2010)** alors que quelques espèces des thermophiles facultatifs telles que *B. licheniformis* et *B. subtilis* peuvent produire des toxines **(De jonghe et al., 2010)**.

Parmi les bacilles, *B. cereus* a été reconnu comme agent causal d'intoxication alimentaire (depuis plus de 40 ans) liée aux syndromes émétiques et diarrhéiques d'origine alimentaire **(Ghelardi et al., 2002)**. Le groupe *Bacillus cereus* comprend des bactéries gram positives formant des spores qui se situent partout dans l'environnement et ont été isolées d'une large variété d'aliments **(Fricker et al., 2007; Ankolekar et al., 2009)**, y compris le lait cru, pasteurisé et UHT **(Christiansson et al., 1999; Bartoszewicz et al., 2008; Banykó et Vyletelová, 2009; Batchoun et al., 2011)**.

Ces microorganismes ne sont pas souhaités dans l'industrie alimentaire en raison de leur capacité de détérioration et de leur potentiel pathogène **(Zhou et al., 2008; Ankolekar et al., 2009)**.

B. licheniformis a également été associé à une variété de syndromes cliniques, tels que la maladie entérique, la septicémie, la péritonite, l'ophtalmie et les intoxications alimentaires chez les humains en plus de la toxémie bovine et des avortements **(Salkinoja-Salonen et al., 1999)**.

Bien que, généralement, les espèces de Bacillus autres que *B. cereus* ne causent pas d'importantes intoxications alimentaires, des dosages cellulaires confirment à la fois la production et la fonctionnalité des toxines thermolabiles par des souches de *Brevibacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus subtilis* **(Beattie et Williams , 1999)**, de *Bacillus licheniformis* **(Beattie et Williams., 1999; Lindsay et al, 2000)**,de *Bacillus pumilus* **(Lindsay et al, 2000)** et de *Bacillus amyloliquefaciens* **(Phelps et McKillip, 2002)**.

La qualité des produits est un autre problème posé par *Bacillus spp*. dans l'industrie laitière. La production d'enzymes extracellulaires hydrolytiques telles que les protéases, les lipases et lécithinases peut provoquer la détérioration du lait pasteurisé **(Meer et al., 1991).**

Ces enzymes sont responsables de la détérioration des flaveurs et les défauts structurels dans le lait pasteurisé. Elles sont produites dès la germination des spores en raison de l'activation par la chaleur de pasteurisation. Le plus important organisme d'altération dans l'industrie laitière est sans aucun doute *B. cereus*, provoquant 'crème Bitty' en raison de l'agrégation des globules gras (causé par l'activité lécithinase) et défauts de ‘caillage douce’ (causé par l'activité protéolytique) (**Heyndrickx et Scheldeman 2002)**. L'activité protéolytique provoque également des offrandes amères et pourries, tandis que les aspects fruitées et rancunes sont causées par une activité lipolytique **(Meer et al., 1991)**.

Selon **Smigic, 2012,** la durée de conservation du lait pasteurisé est liée à la qualité du lait cru et le contrôle de la contamination post pasteurisation.

En réalité, pour la chaîne de production de produits laitiers, l'environnement de la ferme et le lait cru (qui détermine le nombre de spores jusqu'à 10^4 UFC / mL) sont des sources importantes de contamination **(Coorevits et al., 2008; Crielly et al., 1994; Scheldeman et al., 2005; Giffel et al., 2002)**. De plus, les propriétés hydrophobes des endospores et leur résistance générale à la chaleur, à la dessiccation ou aux désinfectants leur permettent de s'attacher à l'équipement de traitement et de

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

survivre aux procédures de nettoyage **(Andersson et al., 1995; Ryu et Beuchat, 2005; Simmonds et al., 2003)**.

D'une manière générale, la pasteurisation ne parvient pas à tuer efficacement les endospores résistant à la chaleur, en limitant les possibilités de production d'aliments minimalement transformés **(Lucking G., et al., 2013).**

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Conclusion

Conclusion et perspectives

CONCLUSION

Le lait est un aliment riche en nutriments fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment complet. Il fournit aussi aux microorganismes un milieu favorable et des facteurs physicochimiques pour une croissance optimale.

Les aliments et les produits minimalement transformés, dont la durée de conservation est prolongée, tels que les produits laitiers, présentent un risque particulier de contamination et des dommages subséquents aux produits, mais des informations sur les propriétés liées à l'origine et à la qualité des aliments, et des bactéries hautement résistantes à la chaleur sont encore limitées.

Dans cette optique, on a réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques sur les différentes souches de bactéries isolées à partir de cinq échantillons de lait de vache pasteurisé dans le but d'identifier et caracteriser les bactéries formant des spores dans ce lait.

On a pu isoler 19 souches. L'identification phénotypique a révélé que 68,41% des isolats sont des bacilles (13 souches) et 31,57% sont des coccis. La majorité de ces dernières sont des bactéries à Gram positif aérobies, capables de former des spores et à catalase positif. L'étude enzymatique des bacilles a montré que 61,53% d'entre elles sont capables d'hydrolyser la caséine, 46,15% sont capables d'hydrolyser l'amidon, et 30,76 % sont capables d'hydrolyser la lécithine. Les résultats du test TSI montrent que 30,76% des bacilles sont capables de dégrader le glucose, 69,23% sont capables de dégrader le saccharose et 61,53% sont capables de dégrader le lactose. Aucun dégagement gazeux n'a été enregistré.

Les autres tests biochimiques étaient réalisés en utilisant la galerie API 20 E pour apprécier les 20 tests présents sur cette plaque.

Les isolats identifiés appartiennent à plusieurs espèces différentes dont (23.07%) *Geobacillus thermoglucosidiasus*, (23.07%) *Bacillus licheniformis*, (15.38 %) *Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis*, (15.38%) *Bacillus amyloliquefaciens*, (7.69%) *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, (7.69%) *Bacillus cereus*, (7.69%) *Paenibacillus glucanolyticus*.

Plusieurs études, y compris nos résultats, confirment que la pasteurisation ne parvient pas à tuer efficacement les endospores résistant à la chaleur.

Cependant, en ce qui concerne la discussion croissante sur la santé et la sécurité des aliments, une meilleure connaissance des caractéristiques liées à l'origine, à l'identité et à la qualité des aliments pourrait aider à améliorer les mesures de contrôle des spores, contribuant ainsi à la réduction de la perte alimentaire due à une détérioration microbienne.

De plus, une connaissance des flux de contamination à travers la ligne de traitement devrait aider à identifier les étapes critiques dans le processus de contamination par *B. cereus* et les bactéries psychrotrophes, et donc aider à améliorer la sécurité en réduisant ou en éliminant la contamination à la source.

En perspectives, il faut :

- ✓ Sensibiliser les éleveurs producteurs de lait pour la mise en place de meilleurs moyens afin de garantir une matière première de meilleure qualité sanitaire.
- ✓ Améliorer le système de nettoyage en place (CIP) des équipements laitiers.
- ✓ Appliquer des actions physiques au cour du nettoyage.
- ✓ Installer des unités de contrôle microbiologique internes.

Bibliographie

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

Amiot. J, Lapointe-Vignola, Carole, 2002. Science et technologie du lait: transformation du lait. *Presses inter Polytechnique.*

Andersson, A., Ronner, U., Granum, P.E., 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. *International Journal of Food Microbiology 28*: 145–155.

Ankolekar, C., T. Rahmati, and R. Labbé. 2009. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int. J. Food Microbiol.(128*) 460–466.

Aslanzadeh, 2006. Biochimical profile-based microbial identification system. Assessment related to microbial food contamination. *Revue d'Epidemiologie*.

Augustin, Jean-Christophe, 2011. "Challenges in risk assessment and predictive microbiology of foodborne spore-forming bacteria." *Food microbiology* 28.2: 209-213.

Augustin, M. A., P. T. Clarke, and H. M. Craven, 2003. "Powdered milk: characteristics of milk powders." *Encyclopedia of Food Science and Nutrition:* 4703 4711.

Banykó, J., and M. Vyletelová. 2009. Determining the source of *Bacillus cereus* and Bacillus *licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Lett. Appl. Microbiol. 48:*318–323.

Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., ... & Mafart, P., **2012.** Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus spp.* as a function of temperature, pH and a w. *Food microbiology*, *32*(1), 79-86.

Bartoszewicz, M., B. M. Hansen, and I. Swiecicka. 2008. The members of the Bacillus cereus group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiol. 25:*588–596.

Batchoun, R., A. I. Al-Sha'er, and F. Khabour. 2011. Molecular characterization of *Bacillus cereus* toxigenic strains isolated from different food matrices in Jordan. *Food borne Pathog. Dis. 8:*1153–1158.

Beattie, S.H., Williams, A.G., 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* with an improved cytotoxicity assay. *Letters in Applied Microbiology 28*: 221–225.

Bourgeois C., Mescle J. et Zucca J., 1996. Microbiologie alimentaire, aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments .tome1.Edition : Toc, Lavoisier. Paris. pp : 272-293.

Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., De Buyser, M. L., Collette, C., Garin Bastuji, B., & Thorel, M. F., 2009. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, 16(1),* 452-471.

Burgess S.,Lindsay D.,Flint S,H., 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology 144:*215-225.

Cempirkova R., 2002. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples, Vet. Med. Czech (47) 227–233.

Charles, A., Guy L. et Laurent, M., 2005. Biochimie alimentaire. *Cinquième édition de l'abrégé*, Paris(France). p.120-135.

Chen L., Coolbear T., Daniel R.M., 2003. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven Bacillus spp. isolated from milk powder production lines, Int. Dairy J. (14) 495–504.

Cherif Antar A., 2015. Identification et caractérisation de la flore mésophile constitutive des biofilms inféodés aux lignes de production de lait de vache pasteurisé. Doctorat en Biologie Moléculaire et Biochimie. *Univ. De Tlemcen*.

Christiansson, A., J. Berttilsson, and B. Svensson. 1999. Bacillus cereus spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. J. *Dairy Sci. 82:*305–314.

Christieans S.et Zagorec M., 2013. Flores protectrices pour la conservation des aliments. *Editions Quae.* p. 52.

Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P., Heyndrickx, M., 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology 31:*126–140.

Cosentino S., Mulargia A.F., Pisano F., Truveri P., Palmas F., 1997. Incidence and biochemical characteristics of Bacillus flora in Sardinian dairy products, Int. J. Food Microbiol. (38) 235–238.

Crielly, E.M., Logan, N.A., Anderton, A., 1994. Studies on the Bacillus flora of milk and milk products. *Journal of Applied Bacteriology 77*: 256–263.

De Vos P., Garrity G-M., Jones D., Krieg N-R., Ludwig W., Rainey F-A., Schleifer K-H. And Whitman W-B., (2009). Bergey'S Manual Of Systematic Bacteriology, *7nd edition. Volume three, the firmicutes. springer*, New York, USA.

Delarras, C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits.

Desmasures N & Gueguen M (1997) Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. J Dairy Res 64 : 271 – 280.

F.A.O., 1998. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Rome(Italie).Collection FAO : Alimentation et nutrition °28ISBN 92-5-20534-6.

Fernandez-No I.C., Guarddon M., Bohme K., Cepeda A., Calo-Mata P., Barros-Velazquez J., 2011. Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacills subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* (28). p 605-610.

Flint S.H., Bremer P.J., Brooks J.D., 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant description, current concerns and methods of control. *Biofoulding: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research. 11(1).* p : 81-97.

Frank JF., 1997. Milk and dairy products. Food Microbiology –Fundamental and Frontiers (Doyle P, Beuchat R & Montville J, eds), pp. 169 – 186. ASM Press, Washington, DC.

Fricker, M., U. Messelhäuber, U. Busch, S. Scherer, and M. Ehling-Schulz. 2007. Diagnostic real-time PCR assay for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in food and recent food-borne outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol. (73)*1892–1898.

Genta et Heluane, 2001. Mesophilic aerobic microorganisms in spencer J. and Ragout de Spencer A.L.(Editors). Food Microbiology Protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press INC. p 11-24.

Rapport-Gratuit.com

Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A., Senesi, S., 2002. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters* 208,129et 134.

Ghosh, Sonali, and Peter Setlow, 2009. "Isolation and characterization of superdormant spores of Bacillus species." *Journal of bacteriology* 191(6): 1787-1797.

Giffel T.E., Wagendorp M.C., Herrewegh A., Driehuis F., 2002. Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek 81*: 625–630.

Gleeson, David, Aine O'Connell, and Kieran Jordan, 2013. "Review of potential sources and control of thermoduric bacteria in bulk-tank milk. "*Irish Journal of Agricultural and Food Research.*p. 217-227.

Goursaud J., 1985. Composition et propriétés physicochimiques des laits et produits laitiers de vache, chèvre, brebis. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laitiere. *Luquet F.M. ed. Tec et Doc Lavoisier*, Paris.

Guiraud J.P., 1998. Microbiologie des principaux produits alimentaires, in : *Microbiologie Alimentaire, Techniques de Laboratoire. Dunos.* Paris.

Hantsis-Zacharov E & Halpern M (2007) Chryseobacterium haifense sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. Int J Syst Evol Microbiol 57 : 2344 – 2348.

Hassan, Ashraf N., Joseph F. Frank, and Karsten B. Qvist, 2002**.** "Direct observation of bacterial exo polysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy." *Journal of Dairy Science 85 (7):* 1705-1708.

Hermier j., Lenoir j., et Weber f., 1992. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CEPIL. Paris.

Heyndrickx, M., Scheldeman, P., 2002. Bacilli associated with spoilage in dairy and other food products. In: Berkely, R., Heyndrickx, M., Logan, N.A., De Vos, P. (Eds.), Applications and Systematics of Bacillus and Relatives. *Blackwell Science*, Oxford, UK, pp. 64–82.

Jacquet J. et Veisseyre R., 1987. Le lait matière première de l'industrie laitière. p. 187, 188, 189, 225.

Janstova B., Lukasova J., Drackova M., Vorlova L., 2004. Influence of *Bacillus spp*. enzymes on ultra-high temperature-treated milk proteins, Acta Vet. BRNO (73) 393–400.

Jeantet et al., 2007. Sciences des aliments : Biochimie, Microbiologie, Procédés, Production. Sciences et Technologies Agroalimentaires.

Joffin C., Joffin J., 2003. Microbiologie Alimentaire. 5eme et 6eme Ed. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'aquitaine. p: 90-93 et 137-139.

Kelly et O'shea, 2011. Pasteurisers, design and operation. In Fuquay, W.J. Fox, P. F., Meswenney, P.L.H.Encyclopedia of Dairy Sciences. Seconde Edition. Oxford:Elsevier Ltd, p.193-199.

Klein G., Pack A., Bonapart C., Reuter G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria international. *Journal of Food Microbiology.41:* 103-125.

Kohler C., Musser D.J., et Dumas N.B., 2009. Identification of aerobic Gram negatif bacteria. In Goldman E. et Green L.H.(editurs). Practical Hand Book of Microbiology. CRC press Taylo et Francis Group NY, USA. p 67.

Larpent j.p., 1991. Les ferments microbiens dans les industries agroalimentaires (Produits laitiers et carnés). APRIA. Paris.

Larpent J.P., 1997. Techniques de laboratoire, Microbiologie alimentaire. *Ed. TEC et DOC, Lavoisier*, Paris. p. 1073.

Lindsay, D., Mosupye, F.M., Brozel, V.S., von Holy, A., 2000. Cytotoxicity of alkaline-tolerant dairy-associated *Bacillus spp.. Letters in Applied Microbiology 30:*364–369.

Lucking G., Stoeckel M., Atamer Z., Hinrichs J.,Ehling-Schulz M., 2013. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology* (166). p 270-279.

Luu, Stephanie, and Peter Setlow, 2014. "Analysis of the loss in heat and acid resistance during germination of spores of Bacillus species." *Journal of bacteriology 196(9):* 1733-1740.

Marchal N., Bourdon J.L.et Richard C.L., 1991. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .*3ème Ed., Doin éditeurs*, Paris.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Medjahdi K., 2013. Optimisation des méthodes de nettoyage et de désinfection pour l'élimination formés sur des surfaces en plastique. Magister en maitrise de la qualité microbiologique et du développement microbien. *Univ. De Tlemcen*.

Meer, R.R., Bakker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W., 1991. Psychotrophic *Bacillus spp.* In fluid milk products: a review. *Journal of Food Protection 54*: 969–979.

Mourgues R., Deschamps N. et Auclair J., (1983). Influence de la flore thermorésistante du lait cru sur la qualité de conservation du lait pasteurisé exempt de recontaminations post.

Murphy, P.M., Lynch, D., and Kelly, P.M., 1999. Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *Int. J. Dairy Technol.*(*52*) 45–50.

Nicholson W. L., Munakata N., Horneck G., Melosh H. J., & Setlow P., 2000. Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(3), 548-572.

Ould Mustapha A., N'dyae D., Ould kory B., 2012. Etude de la qualité du lait.

Perreau M., 2014. Conduire son troupeau de vaches laitières. *Ed. France Agricole.* p. 30-69.

Petrus, R. R., C. G. Loiola, and C. A. F. Oliveira, 2009. "Microbiological shelf life of pasteurized milk in bottle and pouch." *Journal of food science 75(1):* 36-40.

Pettersson B., Lembke F., Hammer P., Stackebrandt E., Priest F.G., 1996. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat resistant endospores, Int. J. Syst. Bacteriol. (46) 759–764.

Phelps, R.J., McKillip, J.L., 2002. Enterotoxin production in natural isolates of Bacillaceae outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology 68:*3147–3151.

Ponce, Adrian, Stephanie A. Connon, and Pun To Yung, **2008.** "Detection and viability assessment of endospore-forming pathogens." *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*. Springer New York. 481- 523.

Postollec, F., Bonilla, S., Baron, F., Jan, S., Gautier, M., Mathot, A. G., & Sohier, D., 2010. A multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food. *International journal of food microbiology*, *142*(1), 78-88.

Rückert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W., 2004. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. International Journal of Food Microbiology 96, 263–272.

Ryu, J.H., Beuchat, L.R., 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *Journal of Food Protection 68*: 2614–2622.

Salkinoja-Salonen, M., Vuorio, R., Andersson, M., Kampfer, P., Honkanen Buzalski, T., 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4637e4645.

Scheldeman P., Goossens K., Rodriguez-Diaz M., Pil A., Goris L., Herman L., De Vos P., Logan N.A., Heyndrickx M., 2004. *Paenibacillus lactis sp. nov.*, isolated from raw and heat-treated milk, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (54) 885–891.

Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P., Heyndrickx, M., 2005. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology 71*: 1480–1494.

Seale, R.B., Flint, S.H., Mc Quillan, A.J., and Bremer, P.J. (2008). Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Appl. Environ. Microbial.* 74:731–737.

Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J., and Bremer, P.J., 2008. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*(74) 731–737.

Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J., Bremer, P.J., 2008. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to différent surfaces. *Applied and Environmental Microbiology.74* : 731-737.

Setlow P., 2003. Spore germination. *Current opinion in microbiology*, *6*(6), 550-556.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Setlow Peter, 2014. "Germination of spores of Bacillus species: what we know and do not know." *Journal of bacteriology 196(7):* 1297-1305.

Setlow, Peter, 2014. "Germination of spores of Bacillus species: what we know and do not know." *Journal of bacteriology* 196(7) 1297-1305.

Sikine M., 2013. Suivi de la viscosité et la texture des produits laitiers. Master en sciences et techniques. *Univ. Sidi Mohammed Ben Abdallah*. Maroc.

Simmonds, P., Mossel, B.L., Intaraphan, T., Deeth, H.C., 2003. Heat resistance of Bacillus spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *Journal of Food Protection 66*: 2070–2075.

Simões, Manuel, Lúcia C. Simões, and Maria J. Vieira, **2010.** "A review of current and emergent biofilm control strategies." *LWT-Food Science and Technology 43 (4):* 573-583.

Singleton P., 1999. Spore heat Resistance Correlated with water content, wet density, and protoplast/ sporoplast volume ratio. Journal of bacteriology 150(2), 870-877.

Ternstro¨m A., Lindberg A.M., Molin G., 1993. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to Pseudomonas and Bacillus, J. Appl. Microbiol. (19) 528–540.

Transaction d'Algerie, 2010. Selon un rapport d'UBI France : l'Algerie premier importateur africain de denrées alimentaires, Ultrasound And Otheremerging Technolgies. In James G. Brennan (Ed.), Food *Université IBN TOFAIL*, Maroc.

Vignola C., 2002. Sciences et technologie du lait : la fraction de technologie laitière du Québec-ing. p. 25, 58, 61, 89, 90, 144, 145. Ed. École polytechnique de Montréal.

Walker, N. E., 2012. Physiological and genetic factors affecting transfection and transformation in *bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry of Thermophily*, 127.

Walker, N. E., 2012. Physiological and genetic factors affecting transfection and transformation in *bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry of Thermophily*, 127.

Westhoff D.C., Dougherty S.L., 1981. Characterization of Bacillus species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk, J. Dairy Sci. (64) 572–580.

Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J & Smit G (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. Int Dairy J 12 : 91 – 109.

Yakhlef H., 1989. La production extensive de lait en Algérie, Institut National Agronomique, Département de Productions Animales, El Harrach, Alger (Algérie):135(139 pages).

Yuan, D.D., Liu, G.C., Ren, D.Y., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C.P., Yang, Y.Z., Ma, W., Li, Y., and Zhang, L.B. (2012). A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Contr.* 25: 752–757.

Yuan, D.D., Liu, G.C., Ren, D.Y., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C.P., Yang, Y.Z., Ma, W., Li, Y., and Zhang, L.B., 2012. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Contr.* (25) 752–757.

Zhou, G., H. Liu, J. He, Y. Yuan, and Z. Yuan. 2008. The occurrence of *Bacillus cereus, B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. *Int. J. Food Microbiol. 121:*195–200.

Annexes

Annexes

Gélose nutritive standard Plate Count Agar P.C.A (Ph=7)

Hydrolysat trypsique de caséine…….2.5g

Extrait de viande……..0 5g

Glucose…….……....01g

Extrait de la levure…….. 2.5g

Agar……..…….15g

Eau distillé ……1000ml

Milieu TSI ou Gélose- Glucose – Lactose –Saccharose – H2S (Ph= 7,4)

Extrait de viande de boeuf……. 03g

Extrait de levure …….….. .03g

Peptone ……...…20g

Chlorure de sodium …….……. 05g

Citrate ferrique…. …….…0.3g

Thiosulfate de sodium…… ……..….0.3g

Lactose…….….…. 10g

Glucose ……. 01g

Saccharose ……...…..10g

Rouge de phénol…….… 0.05g

Agar…….….….…..12g

Eau distillée …….....1000ml

Gélosés nutritive (Ph=7)

Peptone……15g

Extrait de viande ……..……. 10g

Extrait de levure ……..…… 0.2g

Chlorure de sodium……..0.5g

Agar……..……..20g

Eau distillée……1000ml

Gélose au lait (Milk-agar)

Poudre de lait écrémé……..……05g

Agar ……..02g

Eau distillée……..……...…..50 ml

Gélose à l'amidon

Amidon …….05g

L'eau distillée……..…….…….. 50ml

Gélose nutritive…….……..……. 500ml

Milieu : Mannitol-mobilité (Ph 7.6-7.8)

Peptone trypsique de viande ……..20 g

Agar ……....04 g

Mannitol…….. ……..…02 g

KNO3……..01 g

Rouge de phénol à 1 %..... 04g

Eau distillée ……....1000 ml

Gélose au Citrate de Simmons (Ph= 6,6)

Ammonium dihydrogenophosphate…….…….… 01g

Phosphate dipotassique……..…….…01g

Chlorure de sodium…….. ……. 05g

Citrate de Sodium……...…… 02g

Sulfate de magnésium……0.2g

Bleu de Bromothymol……..…….. 0.08g

Agar……. 18g

Eau distillée……..…… 1000ml

Emulsion de jaune d'oeuf :

Dans un flacon stérile, récupérer le jaune d'oeuf après avoir flamber la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes, ensuite ajouter le même volume en eau physiologie stérile. Mélanger rigoureusement puis mettre le mélange au réfrigérateur pendant 24h. Enfin, mélanger Avec la gélose TSA devant le bec bensen.

BHIB (pH 7.4 ± 0.2 / 25°C)

Brain infusion solids ..... …….12,5g

Beef heart infusion solids ..... …….5,0g

Proteose peptone 10g

Glucose ..... ……..2,0g

Sodium chloride.....5,0g

Disodium phosphate..... 2,5g

Eau physiologie

9g de NaCL pour 1000ml d'eau distillée.

Rapport-Gratuit.com