

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA  
TERRE ET DE L'UNIVERS



## Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Département : Ecologie et Génie de l'environnement

Option: Microbiologie Appliquée

Thème :

---

---

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

---

---

Présenté par :

- BORDJIBA Khawla
- BOUNAB Yousra
- ZEGHDOUDI Khouloud

Devant le jury composé de :

Président	Dr. GUETTAF. M	M.C.B	Université de Guelma
Examinatrice	Dr. ROUAIGUIA. M	M.C.B	Université de Guelma
Encadreur	Dr. DJAMAA. F	M.C.B	Université de Guelma
Co-Encadreur	Dr. RAZKALLAH. Z	Docteur	Université de Guelma

Année Universitaire : 2019/2020

## **Remerciement**

*Tout d'abord, nous remercions \*Allah\* Tout puissant qui nous a donné la force,  
la volonté et le courage d'accomplir ce travail.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements notre  
profonde gratitude*

*À notre président de jury **Mr. GUETTAF Mohamed, Maître de conférences B**  
à l'université de Guelma pour d'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*À notre examinatrice **M<sup>me</sup> ROUAIGUIA Meriem, Maître de conférences B** à  
l'université de Guelma, pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail en acceptant  
d'examiner notre travail.*

*À notre encadreur **M<sup>me</sup> DJAMAA Fatma, Maître de conférences B** à  
l'université de Guelma. Nous la remercions de nous superviser, diriger, aider et  
conseiller avec toute la patience et la gentillesse.*

*Un merci particulier à **M<sup>elle</sup>. RAZKALLAH Zahra, Docteur** à l'université de  
Guelma pour son aide, ses judicieux conseils et son soutien scientifique et  
moral.*

*Nous remercions également toute l'équipe pédagogique de l'Université de  
Guelma*

*Enfin, tous ceux que nous avons oubliés peuvent trouver ici nos sincères  
remerciements pour leur soutien, leur aide et leurs contributions à la réalisation  
de ce mémoire.*

## ***Dédicace***

« Louange à " **Dieu** " qui nous avoir éclairé sur le droit chemin de nous avoir accordé la connaissance de la science »

*Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyée et encouragée à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :*

**À mes parents**, *Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

**À ma tante et à son mari**, *qui ont tant travaillé pour m'élever, m'éduquer et m'offrir tout ce qui est beau pour mon bonheur. Que Dieu les protège pour moi et maintienne leur santé.*

**À mon mari** *pour son soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts.*

**En l'honneur de ma chère grand-mère « Allah yerahmha »**, *qui a toujours été fière de moi et m'a beaucoup encouragé à étudier, que Dieu habite elle dans le paradis.*

**À ma grand-mère:** *que Dieu prolonge sa vie.*

**À mon frère :** *Abderrazak et son femme : Samira, mes frères : Zakaria et Abdennacer, mes sœurs : Hasna et ma chère petite sœur adorée : Hibet al rahmen.*

**À ma belle-sœur :** *Widad.*

**À ma belle-mère, beau-père, et À tous les membres de ma belle famille sans aucune exception.**

**Mes oncles et tantes ainsi que leurs épouses, époux et enfants.**

**Mes chers cousins et mes neveux, spécialement :** *Selma, Hanane, Amel, Asma et Chahed.*

**Toutes mes amies, particulièrement:** *Nada, Marwa, Bouchra, Safa, Hananne et Khadidja.*

**À mes collègues :** *Yousra et Khouloud qui ont accompli ce travail avec moi.*

*C'est avec une immense gratitude et reconnaissance que je dédie ce travail à mon encadreur de mémoire: M<sup>me</sup>. DJAMAA Fatma, elle a toujours cru en nous, nous a encouragé, si ce travail a aboutit aujourd'hui c'est pour une unique raison: Vous rendre hommage à travers cette étude.*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce mémoire soit possible, je vous dis merci.*

***Khawla***

# ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail*

*À ma chère mère qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.*

*À mon très cher père : aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation, merci pour le soutien, l'aide et la compréhension,*

*À mes chères frères et uniques : Bouchra et Ghassan, ma fierté dans cette vie, qui n'ont pas cessé de m'encourager et soutenir pour la réalisation de ce travail.*

*À toutes mes chères amies.*

*À tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'élaboration de ce travail.*

***Yousra***

# ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail à*

*Avant tout, je remercie le grand dieu qui nous a aidés à élaborer ce modeste travail.*

*Je dédie également mes très chers parents qui m'ont guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, ma mère qui a été à mes côtés et ma soutenu durant toute ma vie, et mon père qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis, merci mes parents.*

*À mes chères sœurs : Roumaïssa ; Aya ; Nada ; Assile.*

*À ma cher unique frère : Djaber.*

*À mon mari : Liyes pour mon soutien, et un compagnon de mon chemin ; que dieu le protège.*

*À ma petite princesse : Jouri Chams Elyakin, que dieu te protège ma beauté.*

*J'exprime également ma profonde gratitude à tous les membres de ma famille, « AMIRI et ZEGHDOUDI » Et tous mes enseignants.*

*À tous mes amis, chacun par son nom.*

*À tous les étudiants de promotion de microbiologie appliquée.*

*Et toute personne qui me connaît Et merci.*

***Khouloud***

# Table des matières

Liste des figures.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Introduction.....	1

## *Synthèse bibliographique*

### *Chapitre I : généralités sur le lait et la pasteurisation*

1. Définition.....	3
2. Composition du lait.....	3
3. Propriétés du lait.....	4
3.1. Propriétés organoleptiques.....	4
3.1.1. Couleur.....	4
3.1.2. Odeur.....	4
3.1.3. Saveur.....	4
3.1.4. Viscosité ou consistance.....	4
3.2. Propriétés physico-chimiques.....	4
4. Les flores microbiennes de lait.....	5
4.1. Flore indigène ou originelle.....	5
4.2. Flore contaminant.....	5
5. La qualité hygiénique du lait.....	6
5.1. Facteurs de contamination.....	6
5.2. Origine de la contamination.....	6
5.2.1. Contamination par l'eau.....	6
5.2.2. Contamination par les manipulateurs.....	6
5.2.3. Contamination par la poudre.....	7
5.2.4. Contamination à partir des équipements.....	7
6. Les différents types de lait.....	7
6.1. Lait de consommation en fonction du taux de matière grasse.....	7
6.1.1. Lait entier.....	7
6.1.2. Lait demi-écrémé.....	7
6.1.3. Lait écrémé.....	8
6.2. Lait non traité thermiquement.....	8
6.2.1. Lait cru.....	8
6.2.2. Lait microfiltré.....	8
6.3. Lait traité thermiquement.....	8
6.3.1. Lait de longue conservation.....	8
6.3.2. Lait pasteurisé.....	8
7. La pasteurisation.....	10
7.1. Les différents types de la pasteurisation.....	11
7.2. Avantages et inconvénients de la pasteurisation.....	11
8. Pasteurisateur : description et fonctionnement.....	13
8.1. Section du pasteurisateur.....	13
8.2. Echangeurs.....	14
8.2.1. Définition.....	14
8.2.2. Principe.....	14
8.3. Les différents types de pasteurisateur.....	15
8.3.1. Cuves à double paroi.....	15

8.3.2.	Pasteurisateurs tubulaires .....	15
8.3.3.	Pasteurisateurs à plaques .....	16
8.4.	Conditions auxquelles doit répondre un pasteurisateur .....	16
9.	Les étapes de fabrication du lait pasteurisé .....	17
9.1.	Procédé de fabrication du lait de vache pasteurisé .....	17
9.1.1.	Contrôles des laits crus .....	17
9.1.2.	Epuration et clarification .....	18
9.1.3.	Standardisation .....	18
9.1.4.	Homogénéisation .....	19
9.1.5.	Pasteurisation .....	19
9.1.6.	Refroidissement .....	20
9.1.7.	Conditionnement .....	20
9.1.8.	Entreposage .....	21
9.2.	Procédé de fabrication du lait recombinaison pasteurisé .....	21
9.2.1.	Définitions .....	21
9.2.2.	Méthodes de reconstitution et de recombinaison .....	22
10.	Production et consommation de lait en Algérie .....	23

## *Chapitre II : Les bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé*

1.	Définition des bacilles thermophiles .....	25
2.	Les caractéristiques des bacilles thermophiles .....	25
2.1.	Les thermophiles obligatoires .....	26
2.2.	Les thermophiles facultatifs .....	26
3.	Importance des bacilles thermophiles dans la transformation des produits laitiers .....	27
3.1.	Potentiel d'altération des bacilles thermophiles .....	27
3.2.	Endospores résistant à la chaleur des bacilles thermophiles .....	27
3.3.	Structure de l'endospore .....	27
3.4.	Formation des spores .....	28
3.5.	Résistance .....	29
3.6.	Germination des endospores .....	29
4.	Les bacilles thermophiles comme indicateurs d'hygiène .....	30
5.	Les biofilms des bacilles thermophiles .....	32
5.1.	Définition .....	32
5.2.	Composition de biofilm .....	33
5.2.1.	Les microorganismes .....	33
5.2.2.	La matrice .....	33
5.3.	Les facteurs influençant l'attachement aux surfaces industrielles .....	33
5.3.1.	L'hydrophobicité et la topographie du support .....	34
5.3.2.	Les propriétés physico-chimiques de surface des bactéries .....	34
5.4.	Les étapes de formation de biofilm par des bacilles thermophiles .....	35
5.4.1.	Fixation des cellules et des spores aux surfaces .....	36
5.4.2.	Développement de biofilm .....	37
5.4.3.	Développement des spores dans les biofilms .....	37
5.5.	Résistance du biofilm .....	38
6.	Stratégies de lutte contre le biofilm de l'environnement laitier .....	38
6.1.	Efficacité du nettoyage industriel sur les biofilms .....	39
6.2.	Dissolution de la matrice du biofilm .....	40
6.3.	Contrôle de la flore sporulée dans les lignes de production de lait pasteurisé .....	41
6.4.	Biocides naturels, voie potentielle d'amélioration du CIP .....	41

## *Étude expérimentale*

### *Chapitre III : Matériel et Méthodes*

1. Objectif de travail.....	42
2. Prélèvements .....	42
3. Transport des échantillons.....	42
4. Traitement des échantillons.....	42
4.1. Préparation des dilutions décimales .....	42
4.2. Ensemencement .....	43
5. Identification .....	43
5.1. Caractères cultureux .....	43
5.2. Morphologie cellulaires .....	43
5.2.1. Coloration de Gram.....	43
5.2.2. Recherche des spores .....	44
6. Conservation des souches .....	44
7. Caractères physiologiques.....	45
7.1. Test de catalase .....	45
7.2. Test d'hydrolyse de l'amidon (Activité amylolytique) .....	45
7.3. Test d'hydrolyse de la caséine (Activité protéolytique) .....	45
7.4. Test de tween 80 (Activité lipolytique).....	46
8. Galerie API 20 E .....	46
9. Détermination de potentiel de formation de biofilms .....	47

### *Résultats et discussion*

1. Prélèvements des souches .....	49
2. Détermination des caractéristiques phénotypiques .....	50
2.1. Caractéristiques cultureux.....	50
2.2. Caractères morphologiques.....	52
2.2.1. Coloration de Gram.....	52
2.2.2. Recherche des spores .....	53
3. Caractères physiologiques.....	54
3.1. Test de catalase .....	54
3.1. Test d'hydrolyse de la caséine (Activité protéolytique).....	54
3.2. Test d'hydrolyse de l'amidon (Activité amylolytique) .....	55
3.3. Test de tween 80 (Activité lipolytique).....	55
4. Caractéristique biochimique.....	58
5. Détermination du potentiel de formation de biofilm.....	63
Conclusion.....	74
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Pasteurisateur à 4 sections .....	14
<b>Figure 2.</b> Cuves de pasteurisation (60 à 600 litres) .....	15
<b>Figure 3.</b> Principe des divers types de pasteurisateurs tubulaires (tubes vus en coupe).....	16
<b>Figure 4.</b> Plaques de pasteurisation .....	16
<b>Figure 5.</b> Schéma d'une écrémeuse centrifugeuse .....	18
<b>Figure 6.</b> Schéma d'un pasteurisateur à plaques .....	20
<b>Figure 7.</b> Diagramme de fabrication du lait reconstitué-recombiné dans une laiterie .....	23
<b>Figure 8.</b> Structure d'une spore .....	28
<b>Figure 9.</b> Cycle de sporulation et germination de <i>B. subtilis</i> .....	30
<b>Figure 10.</b> Détails d'un biofilm (×1250) .....	32
<b>Figure 11.</b> Micrographie électronique à balayage d'un biofilm d' <i>A. Flavithermus</i> de 18 h sur la surface de l'acier inoxydable. ....	35
<b>Figure 12.</b> Exemples de surfaces mal nettoyées en industrie laitière .....	39
<b>Figure 13.</b> Aspect des colonies sur TSA .....	51
<b>Figure 14.</b> Les photos montrant différent aspect macroscopiques .....	51
<b>Figure 15.</b> Aspect des colonies sur la gélose TSA .....	51
<b>Figure 16.</b> Observation au microscope optique de frottis bactérien après coloration de Gram (X100) .....	52
<b>Figure 17.</b> Les photos prises avec microscope optique d'une souche isolée (G x 100) .....	52
<b>Figure 18.</b> Les photos prises au microscope optique (G × 100) .....	53
<b>Figure 19.</b> Observation au microscope optique de la spore après coloration de violet de gentiane (X 100).....	53
<b>Figure 20.</b> Observation microscopique d'une spore au grossissement (x 100) .....	53
<b>Figure 21.</b> Observation microscopique d'une spore centrale .....	53
<b>Figure 22.</b> Photo d'une souche catalase positif.....	54
<b>Figure 23.</b> Photo d'une souche a catalase positive.....	54
<b>Figure 24.</b> Une souche bactérienne de la catalase positif.....	54
<b>Figure 25.</b> Activité protéolytiques des souches sur gélose au lait.....	55
<b>Figure 26.</b> Photo montrant la production de protéase sur la gélose au lait.....	55
<b>Figure 27.</b> Activité protéolytiques des souches sur gélose au lait.....	55
<b>Figure 28.</b> Activité amylolique des souches sur gélose à l'amidon .....	55
<b>Figure 29.</b> Activité amylolique des souches sur gélose à l'amidon .....	55
<b>Figure 30.</b> Activité amylolique sur gélose à l'amidon .....	55
<b>Figure 31.</b> Activité lipolytique des souches sur gélose au Tween 80.....	56
<b>Figure 32.</b> Photo montrant la production de lipase sur gélose au tween 80 .....	56
<b>Figure 33.</b> Activité lipolytique des souches sur gélose au Tween 80.....	56
<b>Figure 34.</b> Photo de la galerie API 20 E du biotype 1 .....	60
<b>Figure 35.</b> Photo montrant une galerie API 20 E de biotype 1.....	61
<b>Figure 36.</b> Photo montrant une galerie API 20 E de biotype 2.....	61
<b>Figure 37.</b> Photo montrant une galerie API 20 E de biotype 3.....	62
<b>Figure 38.</b> Photo de la galerie API 20 E du biotype 1 .....	62
<b>Figure 39.</b> Photo de la galerie API 20 E du biotype 2.....	62

<b>Figure 40.</b> Photo de la galerie API 20 E du biotype 3 .....	63
<b>Figure 41.</b> Photo de la galerie API 20 E du biotype 4 .....	63
<b>Figure 42.</b> Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 30°C .....	64
<b>Figure 43.</b> Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 42°C .....	65
<b>Figure 44.</b> Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 55°C .....	65
<b>Figure 45.</b> Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé à 30°C.....	66
<b>Figure 46.</b> Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé à 42°C.....	66
<b>Figure 47.</b> Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé 55°C .....	67
<b>Figure 48.</b> Formation de biofilm sur le milieu TSB à 30°C .....	67
<b>Figure 49.</b> Formation de biofilm sur le milieu TSB à 42°C .....	68
<b>Figure 50.</b> Formation de biofilm sur le milieu TSB à 55°C .....	68
<b>Figure 51.</b> Formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 30°C.....	69
<b>Figure 52.</b> Formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 42°C.....	69
<b>Figure 53.</b> Formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 55°C.....	70
<b>Figure 54.</b> Formation du biofilm sur milieu TSB à 30°C.....	70
<b>Figure 55.</b> Formation du biofilm sur milieu TSB à 42°C.....	71
<b>Figure 56.</b> Formation du biofilm sur milieu TSB à 55°C.....	71
<b>Figure 57.</b> Formation du biofilm sur le milieu lait écrémé à 30°C .....	72
<b>Figure 58.</b> Formation du biofilm sur le milieu lait écrémé à 42°C .....	72
<b>Figure 59.</b> Formation du biofilm sur milieu lait écrémé à 55°C .....	73

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Composition moyenne du lait de différentes espèces animales .....	3
<b>Tableau 2.</b> Principales propriétés physico-chimiques du lait.....	4
<b>Tableau 3.</b> Flore indigène du lait cru .....	5
<b>Tableau 4.</b> Influence de la pasteurisation sur la teneur en vitamines .....	12
<b>Tableau 5.</b> Caractéristiques des bacilles thermophiles obligatoires.....	26
<b>Tableau 6.</b> Caractéristiques des bacilles thermophiles facultatifs.....	26
<b>Tableau 7.</b> Répartition des souches selon leur origine .....	49
<b>Tableau 8.</b> Répartition des souches selon leur origine .....	49
<b>Tableau 9.</b> Répartition des souches selon leur origine .....	50
<b>Tableau 10.</b> Comparaison des activités enzymatiques des souches de bacilles thermophiles	56
<b>Tableau 11.</b> Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires ...	57
<b>Tableau 12.</b> Tableau résume les activités enzymatiques.....	57
<b>Tableau 13.</b> Détermination des profils biochimiques des souches par galeries API 20E .....	58
<b>Tableau 14.</b> Résultat de l'identification par galerie API 20 E .....	59
<b>Tableau 15.</b> Les résultats des tests biochimiques des souches.....	59
<b>Tableau 16.</b> Les différents biotypes et orientation de l'identification taxonomique des bacilles thermophiles .....	60
<b>Tableau 17.</b> Identification présomptive.....	62
<b>Tableau 18.</b> Tableau récapitulatif des biotypes .....	63

## Liste des abréviations

**%:** Pourcentage.

**° D:** Degré Doronic.

**μ:** Micro.

**μm:** Micromètre.

**ADN:** Acide désoxyribonucléique.

**API<sup>®</sup> 20 E :** Appareils et Procédés d'Identification avec 20 testes pour les Entérobactéries.

**ARN:** Acide ribonucléique.

**° C:** Degré Celsius.

**CIP:** Cleaning in place.

**DLC :** Date Limite de Consommation.

**DO:** Densité Optique.

**EPS (extracellular polymeric substances):** substances polymériques extracellulaire.

**FAO:** (Food and Agriculture Organization) Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

**g :** Gramme.

**g/l :** Gramme par litre.

**Germes/ cm<sup>2</sup>:** Nombre des germes par centimètre au carié.

**H:** Heure.

**HTST:** High Temperature, Short Time.

**K:** Kelvin.

**Kg:** Kilogramme.

**KJ:** Kilojoule.

**L :** Litre.

**m/m :** la masse de la matière grasse du lait sur celle du lait concerné.

**m:** Mètre.

**mg :** Milligramme.

**MGLA :** matière grasse laitière anhydre.

**min:** Minute.

**ml :** millilitre.

**mm :** Millimètre.

**Mol :** Mole (quantité de matière).

**N:** Newton (force).

**Ohm:** Ohme (résistance électrique).

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé.

**Pa :** Pascal.

**pH :** Potentiel Hydrométrique.

**S:** Second.

**Spp :** abréviation de "species" (= "espèces"), pluriel de "sp.". Abréviations utilisées pour désigner toutes les espèces se référant à un genre (exemple : *Geobacillus Spp.* = ensemble des espèces appartenant au genre *Geobacillus*).

**T:** Température.

**TSA:** Trypticase Soja-Agar.

**TSB :** Trypticase soja bouillon.

**TSE :** Tryptone Sel Eau.

**UFC/ml:** Unité Formant une Colonie par millilitre.

**UFC:** Unité Formant une Colonie.

**UHT:** Ultra Haute Température.

**V:** Volume.

# *Introduction*

Le lait est un composant majeur de notre diète quotidienne; il occupe une place stratégique dans notre alimentation et constitue une source importante équilibrée en nutriments de base (protéines, glucides et lipides), en vitamines et en minéraux, notamment en calcium alimentaire (**Fernane-Boumedine, 2017**).

En industrie laitière, la persistance des contaminants bactériens à la surface des équipements est due à la formation de spores et de biofilms. Ces derniers sont impliqués dans les problèmes de contamination croisée qui affectent la qualité des produits transformés et limitent leur durée de conservation. C'est le cas du lait pasteurisé, qui de plus a subi un traitement thermique modéré, la pasteurisation étant sans effet sur les spores bactériennes. Les bactéries sporulées les plus rencontrées appartiennent à *Bacillus* et aux genres apparentés. Cette situation est compliquée dans les pays où le lait pasteurisé est obtenu à partir de la poudre de lait d'importation initialement contaminée par les spores bactériennes, presque toutes les branches de l'industrie alimentaire y compris le secteur des produits laitiers sont remises en cause par le problème de biofilms, auxquels ils causent de lourds problèmes économiques et sanitaires. Ces écosystèmes microbiens sont caractérisés par leur tolérance aux biocides et sont responsables de la persistance des contaminations sur les équipements laitiers. La résistance des biofilms aux procédures de nettoyage-désinfection, largement documentée, est un problème crucial auquel se heurte l'industrie laitière. Leur élimination requiert des traitements sévères avec de puissants oxydants et nécessite le développement de nouvelles stratégies d'hygiène (**Malek, 2019**).

Les bacilles thermophiles sporulants sont des contaminants courants des produits laitiers, bien que non pathogènes, de nombreux bacilles thermophiles formant des spores produisent des enzymes extracellulaires qui, si on les laisse se former, peuvent avoir un impact négatif sur la qualité du produit, ces bacilles thermophiles formant des spores sont présents à de très faibles niveaux dans le lait cru, mais leurs spores peuvent survivre aux traitements thermiques, comme la pasteurisation, et se fixer aux surfaces en acier inoxydable dans les équipements de transformation (**Teh et al., 2015**).

Le présent manuscrit porte principalement les objectifs suivants: La recherche de bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé (recombiné et de vache) et de déterminer le rôle qu'ils peuvent jouer dans la dégradation de la qualité du lait pasteurisé produit dans une laiterie et la diminution de sa durée de vie.

Nous avons structurés notre démarche en deux parties :

- La première présente une synthèse bibliographique constituée de deux chapitres : le premier est consacré à donner une idée générale sur le lait, sa composition, ces propriétés physico-chimiques et organoleptiques, la définition de la pasteurisation et les étapes de fabrication du lait de vache pasteurisé et du lait recombinaé pasteurisé, le deuxième chapitre concerne les bacilles thermophiles et leurs propriétés.
- La deuxième partie rassemble : Le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude pour isoler les bacilles thermophiles à partir de différents échantillons (le lait de vache, le lait recombinaé à la sortie du pasteurisateur et en sachet) et pour identifier les souches isolées et étudier les activités enzymatiques et le potentiel de formation de biofilm. Enfin, les résultats qui ont été comparés, analysés et interprétés en s'appuyant sur d'autres recherches similaires à notre étude.



# *Synthèse bibliographique*

# ***Chapitre 01 :***

## ***Généralités sur le lait et la pasteurisation***

## 1. Définition

Le lait apparaît comme un liquide opaque blanc mat plus ou moins jaunâtre selon la teneur en  $\beta$  carotènes de la matière grasse. Il a une odeur peu marquée mais reconnaissable. Le lait ne contient qu'un seul type de glucide, le lactose, susceptible de se dégrader en acide lactique (**Bendimerad, 2013**).

Le lait n'est cependant pas un aliment complet, car carencé en fer et acides aminés soufrés (méthionine, cystéine). Il contient des protéines riches en résidus d'acides aminés essentiels et des minéraux d'intérêt nutritionnel (calcium et phosphore) sous forme organique et minérale facilement assimilable par l'organisme (**Romain et al., 2008**).

## 2. Composition du lait

Le lait, proche du plasma sanguin, est un sérum comportant une émulsion de matière grasse, une suspension de matière protéique caséuse, du lactose, des sels et minéraux, des protéines solubles et des traces d'éléments divers (**Fernane-Boumedine, 2017**).

Les principaux constituants du lait sont, par ordre décroissant :

- de l'eau majoritairement,
- des glucides principalement représentés par le lactose,
- des lipides essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras,
- des protéines : caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles,
- des sels et minéraux à l'état ionique et moléculaire,
- des éléments à l'état de traces mais au rôle biologique important : enzymes, vitamines, oligo-éléments (**Boultif, 2015**).

Ainsi, la composition du lait varie selon les espèces animales mais aussi selon différents facteurs tels que l'individualité, la race, la période de lactation, l'alimentation, la saison, l'âge. En règle générale, l'eau est le constituant principal du lait. La proportion des autres constituants varie selon les espèces (**Tableau 1**) (**Fernane-Boumedine, 2017**).

**Tableau 1.** Composition moyenne du lait de différentes espèces animales (**Vinola, 2002**).

Animaux (%)	Eau	Protéines	Matières grasses	Glucides	Minéraux
<b>Vache</b>	87,5	3,2	3,7	4,6	0,8
<b>Chèvre</b>	87,0	2,9	3,8	4,4	0,9
<b>Brebis</b>	81,5	5,3	7,4	4,8	1,0
<b>Chamelle</b>	87,6	3,0	5,4	3,3	0,7
<b>Jument</b>	88,9	2,5	1,9	6,2	0,5

### 3. Propriétés du lait

#### 3.1. Propriétés organoleptiques

##### 3.1.1. Couleur

Fraîchement extrait de la mamelle, le lait est un liquide blanc-jaunâtre ou blanc-mat, opaque à cause des micelles de caséine. Il peut être bleuté ou franchement jaunâtre quand il est riche en lactoflavine (Sina, 1992).

##### 3.1.2. Odeur

Elle est faible en général et est variable en fonction de l'alimentation de la femelle productrice (Sina, 1992).

##### 3.1.3. Saveur

Elle est douçâtre, légèrement sucrée en raison de la richesse du lait en lactose dont le pouvoir sucrant est inférieur à celui du saccharose (Sina, 1992).

##### 3.1.4. Viscosité ou consistance

Le lait est de viscosité variable en fonction de l'espèce animale. Ainsi le lait des monogastriques (jument, ânesse) est plus visqueux que celui des polygastriques (vache, bufflesse, brebis, chèvre). Dans la même espèce, le lait est d'autant plus visqueux qu'il contient plus de colostrum dont la présence en son sein le rend impropre à la consommation (Sina, 1992).

#### 3.2. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physicochimiques du lait et de ses dérivés sont déterminantes dans l'optimisation des procédés développés pour leur transformation et leur stabilisation. Elles sont dues à l'ensemble (masse volumique) ou une partie (pression osmotique, point de congélation) des constituants solubilisés et dispersés dans la phase aqueuse. Les principales propriétés physicochimiques du lait sont indiquées dans le **tableau 2** (Thomas *et al.*, 2008).

**Tableau 2.** Principales propriétés physico-chimiques du lait (Thomas *et al.*, 2008).

<b>Pression osmotique</b>	~ 700,10 <sup>3</sup> Pa
<b>Activité d'eau</b>	~ 0,993
<b>Point d'ébullition</b>	~ 100,15 °C
<b>Point de congélation</b>	~ - 0.53 °C
<b>Indice de réfraction</b>	1,3440 -1,3485
<b>Masse volumique (à 20 °C)</b>	~ 1030 Kg .m <sup>-3</sup>
<b>Conductivité spécifique</b>	~ 0,0050 ohm <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>
<b>Force ionique</b>	~ 0,08 Mol
<b>Tension interfaciale (20 °C)</b>	~ 47- 53 N. m <sup>-1</sup>

<b>Viscosité (lait non homogénéisé)</b>	$\sim 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$
<b>Conductibilité thermique (à 20 °C) (Lait à 3% de matière grasse)</b>	$\sim 0,56 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
<b>Diffusivité thermique (15-20 °C)</b>	$\sim 1,25 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
<b>Chaleur spécifique</b>	$\sim 3900 \text{ J} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
<b>pH (à 20 °C)</b>	6,6 - 6,8
<b>Acidité titrable</b>	15 - 17 ° D
<b>Coefficient d'expansion thermique (273 K-333 K)</b>	$0,0008 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{K}^{-1}$
<b>Potentiel oxydoréduction (20 °C, pH 6,6 et en équilibre avec l'air)</b>	+0,25 à + 0,35 v

#### 4. Les flores microbiennes de lait

Le lait représente un milieu de culture idéal pour les bactéries; il consiste en gouttelettes de graisse émulsionnée et de constituants physiologiques dissous dans l'eau tels que sels, sucres et protéines. Les bactéries se développent plus vite dans le lait que dans l'eau (Drapeau *et al.*, 1977). On répartit les microorganismes du lait selon leur importance en deux grandes classes :

##### 4.1. Flore indigène ou originelle

La flore indigène des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et d'autres facteurs. Le lait qui sort du pis de la vache est pratiquement stérile. Les genres dominants de la flore indigène sont principalement des microorganismes mésophiles (Tableau 3) (Vinola, 2002).

**Tableau 3.** Flore indigène du lait cru (Vinola, 2002).

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

##### 4.2. Flore contaminant

La flore contaminant est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits laitiers. On considère comme flore contaminant d'altération et pathogène du lait

l'ensemble des microorganismes qui s'ajoutent au lait extrait du pis de la vache. Il semble que la contamination à l'étable soit la plus importante (**Vinola, 2002**).

## **5. La qualité hygiénique du lait**

### **5.1. Facteurs de contamination**

- Les poussières et les gouttelettes en suspension dans l'air peuvent contaminer le lait avec des micro-organismes.
- Il faut empêcher rigoureusement tout contact du bétail avec les déchets humains.
- Le lait cru, s'il a une teneur bactérienne élevée, peut provoquer des troubles gastro-intestinaux.
- La présence dans le lait de micro-organismes qui peuvent donner lieu à la production d'enterotoxines constitue également un risque de maladie pour l'homme (**Drapeau et al., 1977**).

### **5.2. Origine de la contamination**

#### **5.2.1. Contamination par l'eau**

- L'eau utilisée au cours des opérations de production primaire devrait être salubre pour son utilisation prévue et ne devrait présenter aucun danger de contamination du lait (**FAO et OMS, 2011**).
- L'eau doit être potable et notamment répondre aux standards fixés par l'organisation mondiale de la santé (OMS). Sur le plan microbiologique, elle ne doit contenir aucun germe pathogène. Sur le plan physicochimique, elle ne doit contenir ni pesticides, ni nitrates, avoir une dureté totale comprise entre 0 et 15 et un pH voisin de la neutralité (**FAO, 1995**).

#### **5.2.2. Contamination par les manipulateurs**

- La contamination peut provenir aussi bien de personnes saines que malades ou guéries (porteurs sains).
- Les contaminations par manipulation sont d'abord des contaminations de contact, essentiellement au niveau des mains.
- Le manque d'hygiène peut entraîner la présence sur la peau de bactéries intestinales (contamination fécale : *Salmonella*).
- Des contaminations par aérosols (toux, éternuement, mais tout simplement aussi respiration). Par ailleurs, la contamination peut être liée aux vêtements (**Guiraud, 2012**).

### 5.2.3. Contamination par la poudre

Le lait en poudre est un produit microbiologiquement stable, avec une activité de l'eau de 0,3-0,4, ce qui est trop faible pour favoriser la croissance des microorganismes. Cependant, après avoir été reconstitué, le lait en poudre est susceptible de se développer et de se détériorer comme le lait pasteurisé. À condition que le lait en poudre soit protégé de la contamination par l'humidité avant utilisation, le nombre de micro-organismes présents diminue généralement pendant le stockage, bien que le nombre de spores puisse rester constant (Augustin *et al.*, 2003).

### 5.2.4. Contamination à partir des équipements

Elle est souvent caractérisée par la formation des biofilms laitiers qui sont dominés par différentes bactéries. La formation de ces biofilms sur les équipements peut entraîner de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques dues à la détérioration des aliments et à la dépréciation des équipements. Les micro-organismes dans les biofilms catalysent les réactions chimiques et biologiques provoquant la corrosion des métaux dans les tuyauteries et les réservoirs et ils peuvent réduire l'efficacité de transfert de chaleur s'ils deviennent suffisamment épais (Simões *et al.*, 2010).

## 6. Les différents types de lait

### 6.1. Laits de consommation en fonction du taux de matière grasse

#### 6.1.1. Lait entier

C'est un lait traité thermiquement qui, en ce qui concerne sa teneur en matière grasse (teneur en matière grasse : rapport de la masse de la matière grasse du lait sur celle du lait concerné) (GEM RCN, 2009), répond à l'une des formules suivantes :

- ✓ **Lait entier normalisé** : un lait dont la teneur en matière grasse s'élève à 3,50 % m/m au minimum (GEM RCN, 2009).
- ✓ **Lait entier non normalisé** : un lait dont la teneur en matière grasse n'a pas été modifiée depuis le stade de la traite. Toutefois, la teneur en matière grasse ne peut être inférieure à 3,50 % (m/m) (GEM RCN, 2009).

#### 6.1.2. Lait demi-écrémé

C'est un lait traité thermiquement dont la teneur en matière grasse a été ramenée à un taux qui s'élève à 1,50 % (m/m) au minimum et à 1,80 % (m/m) au maximum (GEM RCN, 2009).

### 6.1.3. Lait écrémé

C'est un lait traité thermiquement dont la teneur en matière grasse ne peut excéder 0,50 % (m/m) (GEM RCN, 2009).

## 6.2. Lait non traité thermiquement

### 6.2.1. Lait cru

Si le lait cru est un produit intéressant sur le plan de la nutrition puisqu'il n'a subi aucun traitement d'assainissement lui permettant d'assurer une meilleure conservation, sa production et sa commercialisation doivent être sévèrement contrôlées en raison des risques qu'il peut encore présenter pour la santé (Leseur *et al.*, 1985).

### 6.2.2. Lait microfiltré

La microfiltration tangentielle appliquée à un lait écrémé permet d'éliminer la quasi-totalité des micro-organismes (trois à cinq réductions décimales), sans inactivation des enzymes endogènes du lait et tout en préservant ses qualités intrinsèques au plan nutritionnel et sensoriel. L'introduction de la microfiltration permet de doubler la date limite de consommation (DLC) par rapport à des laits pasteurisés (Romain *et al.*, 2008).

## 6.3. Lait traité thermiquement

Selon l'intensité des traitements thermiques, on distingue : les laits pasteurisés et les laits de longue conservation (Romain *et al.*, 2008).

### 6.3.1. Lait de longue conservation

Les laits ont un traitement thermique de type stérilisation dont l'objectif est de détruire tous les microorganismes. Ce sont des laits de moins bonne qualité organoleptique et nutritionnelle que des laits pasteurisés (Kabir, 2015).

### 6.3.2. Laits pasteurisé

Le lait pasteurisé, fabriqué à partir de lait cru ou de lait reconstitué, écrémé ou non, est un lait qui a subi un traitement thermique (pasteurisation) qui détruit plus de 90 % de la flore (jusqu'à 98 %) contenue dans le lait (notamment tous les germes pathogènes non sporulés, notamment les germes de la tuberculose et de la brucellose) (M'boya, 2001).

Le lait pasteurisé est un lait chauffé entre 72 et 85 °C pendant 15 à 20 secondes, puis immédiatement refroidi jusqu'à une température inférieure à 6 °C. Le lait pasteurisé présente une réaction négative au test phosphatase : la phosphatase est une enzyme du lait, inactivée lors du processus de pasteurisation. Une réaction négative au test phosphatase est donc une preuve d'une bonne pasteurisation (Velez, 2017).

#### ❖ Les types du lait pasteurisé



Deux catégories de laits pasteurisés sont à distinguer : Lait pasteurisé conditionné et Lait pasteurisé de haute qualité (**Leseur et al., 1985**).

- **Lait pasteurisé conditionné**

Pratiquement, le traitement est réalisé à une température nettement plus élevée que celle nécessaire pour détruire le bacille de Koch 75-85°C pendant un temps plus ou moins long (15-30 secondes). La constatation de ce degré de traitement thermique atteint peut être réalisée par la recherche d'une enzyme : la phosphatase détruite à cette température (**Leseur et al., 1985**).

- **Lait pasteurisé de haute qualité**

C'est en 1965 que ce lait a été défini. Il se différencie du précédent sur deux points :

- Le traitement thermique d'assainissement est une pasteurisation dont le couple temps-température oscille entre 72 °C – 75 °C/ 15 à 30 secondes. La vérification de ce type de traitement est effectuée, comme dans le cas du lait pasteurisé conditionné, par la recherche de la phosphatase (qui doit être détruite). De plus, dans le cas du lait pasteurisé de haute qualité, une autre enzyme, la peroxydase, ne doit pas être détruite, par conséquent, une caractéristique de ce traitement et sa recherche doit être positive.
- La qualité du lait de départ est déterminée (moins de 500 000 germes/ml) (**Leseur et al., 1985**).

- ❖ **Altération principalement rencontrée du lait pasteurisé**

- Goût de cuit : provoqué par un chauffage trop intense, ce goût de cuit peut être plus ou moins prononcé ;
- Contamination microbienne : elle a lieu surtout au moment du conditionnement. Elle peut provenir de la machine elle-même, de l'emballage, ou encore de l'environnement ;
- Présence de germes sporulés thermorésistants : ces germes peuvent provenir du lait cru lui-même, puis du tank de réfrigération, des équipements industriels. Le chauffage ne les a pas détruits et on peut les retrouver ainsi dans le lait pasteurisé ;
- Phénomène physico-chimique, tels que la lipolyse ou l'oxydation des matières grasses : pour prévenir ces problèmes, il faut soustraire le lait de l'action de la lumière et l'entreposer à une température suffisamment basse (+ 6°C). De même, les opérations mécaniques de pompage doivent être correctement maîtrisées (**Leseur et al., 1985**).

- ❖ **Problématique du lait pasteurisé**

Un problème récurrent en industrie laitière est la qualité microbiologique du lait pasteurisé, la contamination du lait spécialement par les bactéries productrices de spores

demeure une barrière biologique spécifique qui limite la durée de vie et la qualité des laits traités thermiquement. De nombreuses études sont menées à travers le monde pour résoudre ce problème, afin de prolonger la durée de vie du lait pasteurisé. Toutefois, les facteurs limitant varient d'un pays à un autre, en fonction des conditions de production du lait (**Malek, 2013**).

Les sources de contamination potentielles sont variables : le lait cru, les surfaces des équipements et les matériaux de conditionnement, les températures utilisées pour le traitement de pasteurisation affectent, elles aussi, la durée de vie du lait pasteurisé. Celle-ci varie de quelques jours (2 à 3) à quelques semaines (3 à 4) selon les pays. En effet, parmi ces facteurs limitant, le procédé de pasteurisation constitue une étape clé dans la sélection des germes sporulés. La température affecte inversement les populations bactériennes du lait pasteurisé, les décomptes bactériens les plus élevés sont trouvés dans les laits soumis aux plus hautes températures. Ceci est dû à l'activation des spores, qui vont germer, se multiplier et former des biofilms. Ces derniers constituent de nouveau, de véritables réservoirs de spores bactériennes. Ainsi, les bactéries du genre *Bacillus* tels que les représentant du groupe *B. cereus* et les bacilles thermophiles tels que *Geobacillus* et *Anoxybacillus* sont les organismes caractéristiques des biofilms inféodés à l'environnement des laiteries (**Malek, 2013**).

## **7. La pasteurisation**

La pasteurisation est un traitement thermique à des températures comprises entre 60 et 100°C ayant pour but de détruire la totalité des micro-organismes pathogènes non sporulés et de réduire significativement la flore végétative présente dans un produit. C'est un procédé de conservation limité pour lequel le produit doit être conditionné hermétiquement (avec ou sans atmosphère modifiée ou sous vide) et réfrigéré (le produit pasteurisé peut être en effet conservé à + 4°C de quelques jours à quelques semaines) (**Chillet, 2011**).

La pasteurisation est une technique utilisée très fréquemment en agroalimentaire. L'objectif est d'allonger de façon significative la durée de conservation des aliments. La pasteurisation réduit au maximum les activités biologiques d'un produit tout en évitant de modifier ses caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles (**Chillet, 2011**).

Les activités biologiques détruites ou inactivées par la pasteurisation sont :

- Les flores non pathogènes d'altération des aliments ;
- Les flores pathogènes et toxigènes (*salmonella, brucella, listeria*, etc.) ;

- Les enzymes endogènes comme la lipoxigénase du soja (oxygénase qui catalyse l'oxygénation des acides gras polyinsaturés) ou la plasmine présente dans le lait (protéase dont le spectre d'action est assez large) ;
- Les enzymes intracellulaires nuisibles (**Chillet, 2011**).

La pasteurisation, comme tout traitement thermique, doit permettre :

- De préserver l'aspect nutritionnel du produit tel que la non-destruction des vitamines ;
- De ne pas modifier ses qualités organoleptiques telles que l'absence de brunissement, de décoloration, de goûts de cuit, de rupture de l'émulsion, de coagulation des protéines, etc. (**Chillet, 2011**).

### **7.1. Les différents types de la pasteurisation**

On distingue trois types de traitement :

- **Pasteurisation basse** (62-65°C / 30 min) : elle n'est réalisable qu'en batch et est abandonnée en laiterie (**Romain et al., 2008**) ;
- **Pasteurisation haute** (71-72°C / 15-40 min) ou **HTST**: elle est réservée aux laits de bonne qualité hygiénique. Au plan organoleptique et nutritionnel, la pasteurisation haute n'a que peu d'effets. Au niveau biochimique, la phosphatase alcaline est détruite ; par contre la peroxydase reste active et les taux de dénaturation des protéines sériques et des vitamines sont faibles. La date limite de consommation (DLC) des laits ayant subi une pasteurisation haute est de 7 jours après conditionnement (bouteille en verre ou en carton, polyéthylène ou aluminium) (**Romain et al., 2008**) ;
- **Flash pasteurisation** (85-90°C à 1-2 s): elle est pratiquée sur les laits crus de qualité moyenne; la phosphatase et la peroxydase sont détruites (**Romain et al., 2008**).

### **7.2. Avantages et inconvénients de la pasteurisation**

Parmi les avantages de la pasteurisation du lait :

- Rendre le lait plus sain ;
- Augmenter ses qualités de conservation (**Génin, 1935**).

Alors que les inconvénients de la pasteurisation du lait sont :

- La pasteurisation présente donc un inconvénient majeur : elle ne détruit pas les flores sporulées (**Chillet, 2011**).
- Un lait impur ne sera jamais rendu propre par la pasteurisation. Il faut donc purifier le lait brut pour obtenir ensuite de bons résultats au cours de la pasteurisation. Le lait impur

contient en effet en abondance des microorganismes qui résistent à la chaleur, aussi après pasteurisation devient-il rapidement inemployable (**Génin, 1935**).

- La pasteurisation diminue la teneur en crème du lait. Dès que la température dépasse 65°C, cette diminution est sensible et entre 63 et 64°C, elle peut atteindre 20-30 %. à 68°C, elle est de 40-50%. Par un refroidissement rapide, on peut éviter en partie ces inconvénients; encore faut-il que le refroidissement soit tel, qu'une température comprise entre 15 et 45°C soit rapidement atteinte. Un refroidissement lent, au contraire, a une action très défavorable sur la teneur en crème, et plus basse est la température à laquelle le lait est refroidi, meilleure est sa teneur en crème (**Génin, 1935**).
- La pasteurisation peut entraîner une modification de la constitution chimique du lait. L'albumine résiste à une température de l'ordre de 63°C, mais à 65°C, elle est en partie précipitée. L'équilibre entre les constituants minéraux est modifié, et en particulier, il y a précipitation de certaines proportions de calcium et de phosphore (**Génin, 1935**).
- La pasteurisation provoque une légère perte de certaines vitamines hydrosolubles (B1, B6, B9 et vitamine C). Lors de la pasteurisation du lait, la vitamine C est largement détruite. Ainsi il y a des pertes, en thiamine et en riboflavine. Les différentes vitamines du lait ainsi que le pourcentage de perte après traitement sont indiqués dans le tableau ci-dessous (**Tableau 4**) (**Fernane-Boumedine, 2017**).

**Tableau 4.** Influence de la pasteurisation sur la teneur en vitamines (**Génin, 1935**).

<b>Vitamine A</b>	Cette vitamine résiste à l'action de la chaleur et n'est pas modifiée par la pasteurisation.
<b>Vitamine B<sub>1</sub></b>	Cette vitamine ne résiste pas d'une façon parfaite à la chaleur, mais il ne semble pas que la pasteurisation réduise sa teneur dans le lait.
<b>Vitamine B<sub>2</sub></b>	Résiste à la chaleur.
<b>Vitamine C</b>	Est très sensible à l'action de la chaleur et est détruite à un plus ou moins grand degré par la pasteurisation. La quantité de vitamine C détruite par la chaleur dépend de l'oxydation subie par le lait. Cette dernière est accélérée par l'action catalytique des métaux. Le lait chauffé dans des récipients en verre et en même temps soumis à l'action de l'air, perd 33% de sa vitamine C. Si le chauffage s'effectue en vase scellé, la-perte n'est que de 20 %. En présence de cuivre et d'air, la perte est de 79 % L'aluminium et le nickel ont une très faible action catalytique sur ce phénomène.
<b>Vitamine D</b>	Cette vitamine ne résiste pas d'une façon parfaite à la chaleur, mais il semble que la pasteurisation soit sans action sur elle.
<b>Vitamine E</b>	D'après l'état actuel des recherches, la pasteurisation semble sans action sur cette vitamine.

Les inconvénients de la pasteurisation pour les distributeurs et les consommateurs sont :

- Une date limite de consommation (DLC) courte, de quelques jours ;
- Un stockage impératif en milieu réfrigéré. Ainsi, le coût de distribution d'un produit pasteurisé est nettement plus élevé que celui d'un produit stérilisé (**Chillet, 2011**).

## 8. Pasteurisateur : description et fonctionnement

Les produits peuvent être pasteurisés suivant différents types de traitements :

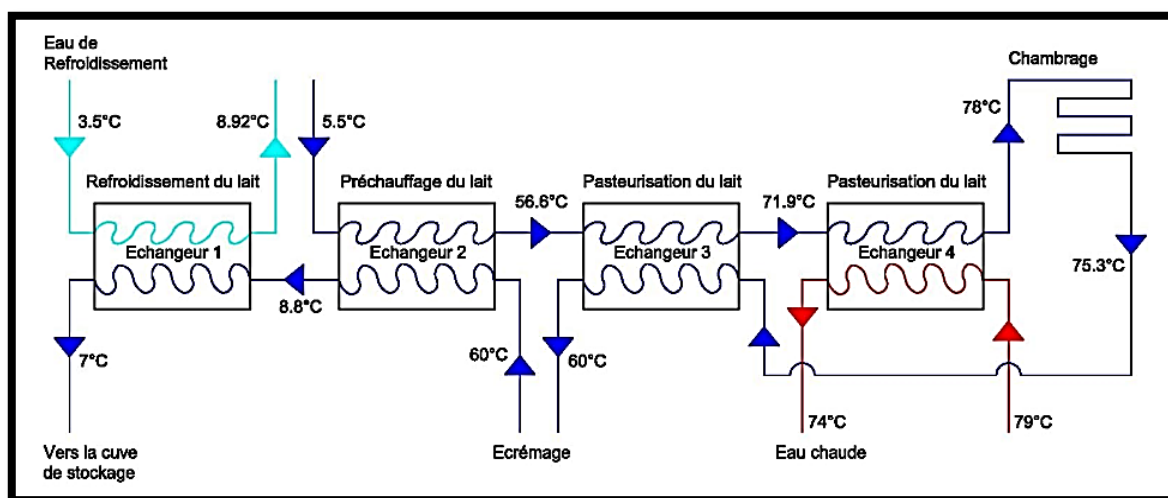
- Les traitements en vrac : Soit en mode discontinu (batch) dans une cuve agitée thermostatée à double enveloppe contenant le produit pendant un temps de séjour donné avant la vidange de la cuve (mode souvent rencontré à petite et moyenne échelles) ; Soit en mode continu dans un pasteurisateur dans lequel le produit s'écoule de manière continue (mode rencontré à l'échelle industrielle) (**Chillet, 2011**) ;
- Les traitements après conditionnement : l'étude porte ici sur les appareils permettant de pasteuriser en vrac un produit liquide en mode continu (**Chillet, 2011**).

### 8.1. Section du pasteurisateur

Le pasteurisateur est composé de quatre sections :

- Une section de récupération de chaleur pour le préchauffage et le pré-refroidissement : elle permet de diminuer les coûts énergétiques (**Chillet, 2011**), dans laquelle le lait entrant est réchauffé par le lait pasteurisé sortant (**Leclercq-perlat, 1986**).
- Une section de chauffage de deux passes dans laquelle le lait préchauffé est porté à sa température de pasteurisation au moyen d'énergie calorifique fournie par un courant d'eau chaude (**Leclercq-perlat, 1986**).
- Une section de chambrage de trois passes dans laquelle le lait est maintenu à sa température de pasteurisation pendant une durée fixée par le rapport entre le volume du chambreur et le débit de lait (**Leclercq-perlat, 1986**). Un chambreur, tube isolé thermiquement dans lequel le produit circule à la température du brème : sa taille et le débit du produit déterminent la durée de la pasteurisation ; ce temps correspond au rapport entre le volume du chambreur et le débit volumique du produit ; ce maintien à la température du brème est appelé chambrage (**Chillet, 2011**), qui est le lieu où le temps de séjour du lait à haute température est suffisant pour neutraliser les germes, consiste, sur l'aspect énergétique, en un refroidissement du lait par déperdition (**Rameh, 2018**).
- Une section de refroidissement dans laquelle le lait pré-refroidi sortant de la section récupération d'énergie est amené à sa température de stockage (4°C environ) au moyen

d'énergie frigorifique fournie par un courant d'eau glacée (**figure 1**) (**Leclercq-perlat, 1986**).



**Figure 1.** Pasteurisateur à 4 sections (**Rameh, 2018**).

## 8.2. Echangeurs

### 8.2.1. Définition

Les sections de récupération, de chauffage et de refroidissement sont constituées d'échangeurs dont le principe de fonctionnement repose sur les transferts de chaleur à travers une paroi (**Chillet, 2011**).

Un échangeur de chaleur est un élément dans lequel :

- Soit un fluide chaud cède de la chaleur au produit froid et ainsi le réchauffe ;
- Soit un fluide froid prend de la chaleur au produit chaud et le refroidit (**Chillet, 2011**).

### 8.2.2. Principe

#### a) Transferts de chaleur

Les transferts de chaleur sont les suivants :

- Dans la section de récupération, c'est le produit chaud qui préchauffe le produit froid, et le produit chaud, ce qui permet de réduire les coûts énergétiques ;
- Dans la section de chauffage, c'est le fluide thermique (eau chaude) qui chauffe le produit préchauffé ;
- Dans la section de refroidissement, c'est le liquide de refroidissement (eau froide ou eau glycolée) qui refroidit le produit pré-refroidi (**Chillet, 2011**).

#### b) Circulation des fluides

On distingue deux types de circulation :

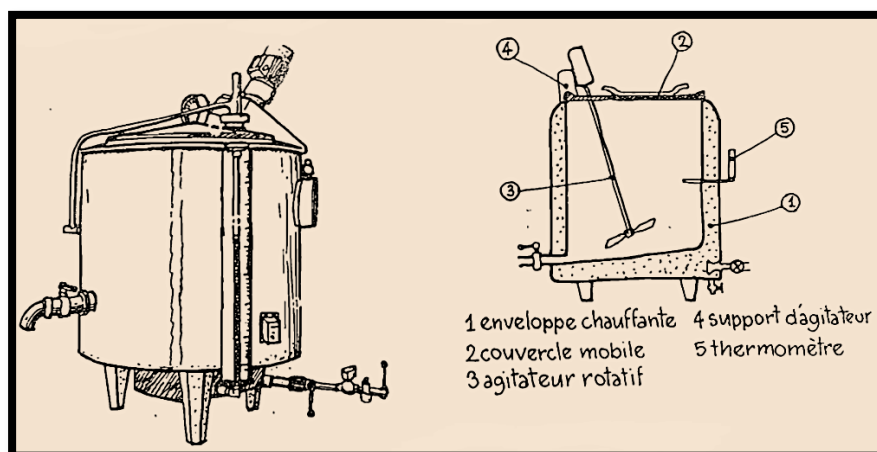
- Cas des échangeurs à co-courant : fluide (chaud ou froid) et produit circulent dans le même sens ;
- Cas des échangeurs à contre-courant : fluide (chaud ou froid) et produit circulent en sens inverses (**Chillet, 2011**).

Dans les échangeurs, la circulation des liquides est le plus souvent de type contre-courant. Le gradient de température se maintient sur toute la longueur de l'échangeur. Les échangeurs à contre-courant présentent ainsi une efficacité plus grande que les échangeurs à co-courant car la surface d'échange nécessaire est plus faible pour le même traitement ; ils permettent donc d'obtenir un meilleur taux de récupération (**Chillet, 2011**).

### 8.3. Les différents types de pasteurisateur

#### 8.3.1. Cuves à double paroi

Ces pasteurisateurs sont essentiellement constitués par une cuve à double paroi conditionnée (**figure 2**). Dans cette cuve le lait est chauffé à 63° C puis maintenu à cette température pendant 30 mn avant d'être refroidi. Un agitateur bas le lait au cours de l'opération afin d'accélérer les échanges thermiques. La production de mousses de surface doit être évitée pour ne pas soustraire de germes à l'action thermique. Ces appareils fonctionnent le plus souvent en discontinu. La cuve est un matériel largement utilisé en laiterie et qui peut être un élément de base d'une minilaiterie (**Cisse, 1997**).

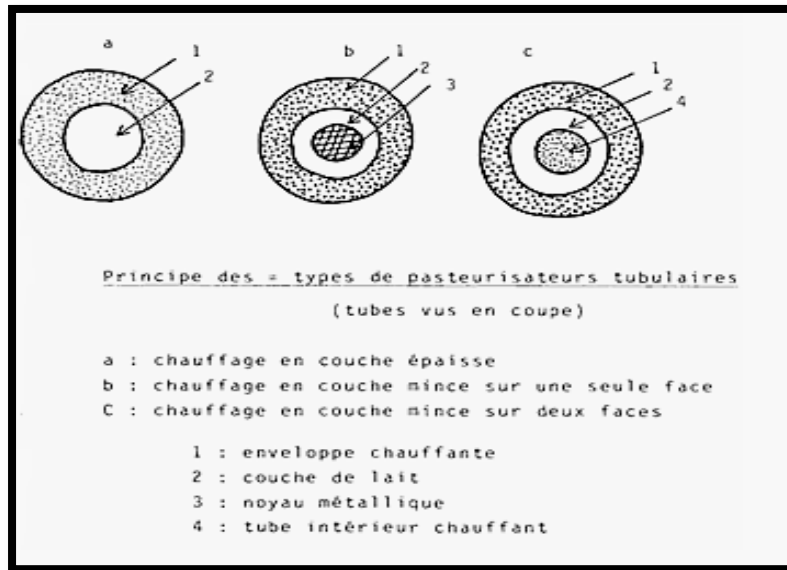


**Figure 2.** Cuves de pasteurisation (60 à 600 litres) (**Cisse, 1997**).

Dans le cas de fonctionnement est toujours continu. Le lait s'écoule en couche mince le long d'une ou de deux parois chauffantes (**Cisse, 1997**). Nous pouvons distinguer :

#### 8.3.2. Pasteurisateurs tubulaires

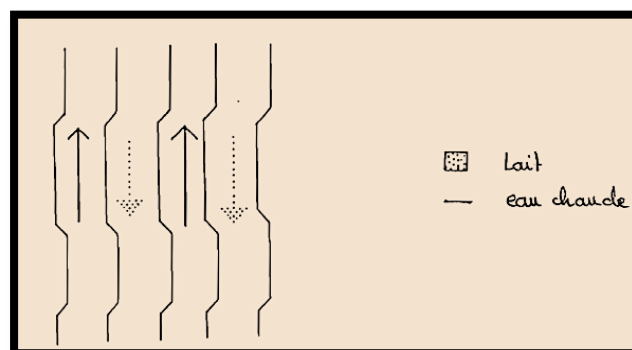
Le lait traverse le faisceau dans lequel il est chauffé sur une ou deux faces selon le cas par l'action de l'eau chaude circulant à contre-courant (**figure 3**) (**Cisse, 1997**).



**Figure 3.** Principe des divers types de pasteurisateurs tubulaires (tubes vus en coupe) (Sina, 1992).

### 8.3.3. Pasteurisateurs à plaques

Ils comportent principalement une série de plaques ondulées ou nervurées en nombre variable, serrées les unes contre les autres. L'espace qui sépare deux plaques consécutives (3 à 4 mm) est parcouru par le lait alors que l'élément chauffant (eau ou vapeur à basse pression) circule à contre-courant dans les espaces qui précèdent et qui suivent immédiatement (**figure 4**) (Cisse, 1997).



**Figure 4.** Plaques de pasteurisation (Cisse, 1997).

### 8.4. Conditions auxquelles doit répondre un pasteurisateur

Un pasteurisateur doit :



- Assurer l'homogénéité du chauffage à la température choisie pour que l'effet bactéricide recherché soit réellement obtenu et pour que le lait ne soit pas modifié par des surchauffes intempestives.
- Permettre le nettoyage complet et rapide de toutes les surfaces au contact du lait afin d'éviter les recontaminations après chauffage.
- Etre économique;
- Etre peu encombrant pour faciliter le nettoyage;
- Respecter la structure et la composition du lait (il faut travailler à l'abri de l'air pour éviter le dégagement de CO<sub>2</sub>;
- Une installation de pasteurisation doit toujours comporter un appareil de réfrigération (Cisse, 1997).

### **9. Les étapes de fabrication du lait pasteurisé**

Sur la base de la nature du lait utilisé pour la production du lait pasteurisé, il est possible de distinguer trois types de laiteries :

- ✓ Les laiteries qui traitent en exclusivité la poudre d'importation et produisent du lait reconstitué ou recombinaison.
- ✓ Les laiteries qui produisent à la fois les deux types de lait pasteurisé: le lait recombinaison pasteurisé et le lait de vache local pasteurisé. Dans ces laiteries « mixtes », les deux productions, lait de vache-lait recombinaison, se font alternativement le jour même ou alors un jour sur deux.
- ✓ La troisième catégorie est représentée par les laiteries minoritaires (25 %) qui traitent uniquement le lait de vache local (Malek, 2019).

### **9.1. Procédé de fabrication du lait de vache pasteurisé**

#### **9.1.1. Contrôles des laits crus**

Le lait cru réceptionné par les ateliers de pasteurisation doit être:

- ✓ Propre à la consommation humaine. Exemple: éliminer les laits colorés, malpropres, malodorants...
- ✓ De bonne qualité bactériologique. La charge microbienne du lait avant le traitement de la pasteurisation doit être la plus faible possible car les conséquences sont sanitaires (Présence de toxines microbiennes responsables d'accidents de type allergiques chez les consommateurs et effet population avec risque de la persistance d'une flore pathogène) et

technologiques (le chauffage du lait altère les constituants du lait et diminue ses aptitudes à la fabrication des produits laitiers (fromages....)).

✓ Stable à la chaleur pour éviter la coagulation au cours de la pasteurisation (Sina, 1992).

### 9.1.2. Epuration et clarification

Cette opération permet d'éliminer les impuretés et une quantité importante de germes; elle améliore ainsi l'efficacité de la pasteurisation (Sina, 1992). Lors de la clarification, on soumet le lait à une force centrifuge dans le but d'en extraire les particules plus denses, tels les débris cellulaires, les leucocytes et les matières étrangères (Kabir, 2015).

### 9.1.3. Standardisation

La standardisation consiste à harmoniser la composition des laits provenant de différentes exploitations. Pour cela, dans les laiteries industrielles, le lait passe dans une écrémeuse centrifugeuse. La machine comprend un récipient de forme cylindro-conique, constitué d'une pile de disques et appelé bol, qui tourne à grande vitesse. Sous l'action de la force centrifuge, le lait est séparé des globules gras. Ces derniers se dirigent vers l'axe de rotation et sont entraînés vers la sortie de la crème, tandis que les autres composants du lait (glucides, protéines), plus lourds, se dirigent vers la périphérie du bol et sont orientés vers la sortie du lait écrémé (figure 5). La crème ainsi séparée du lait écrémé contient environ 35 % de matière grasse. Puis, le lait écrémé et la crème sont de nouveau mélangés dans les proportions voulues (Velez, 2017). Puisqu'elle offre à sa clientèle un choix de lait de différentes teneurs en matière grasse, l'industrie laitière doit s'en tenir avec précision aux normes établies pour chacune de ces teneurs (Kabir, 2015).

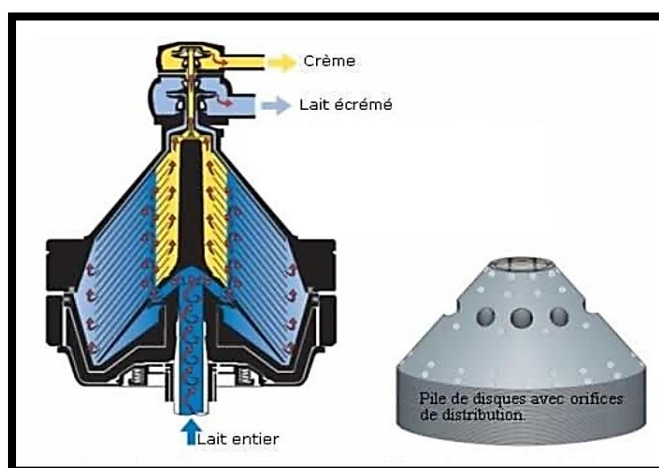


Figure 5. Schéma d'une écrémeuse centrifugeuse (Velez, 2017).

**9.1.4. Homogénéisation**

Parce qu'elle présente l'avantage de stabiliser l'émulsion de la matière grasse uniformément dispersée dans tout le liquide, l'homogénéisation du lait de consommation s'est généralisé et est devenue une norme dans l'industrie. De plus, ce traitement donne au lait une saveur et une texture plus douces, plus onctueuses par la même teneur de matière grasse (**Kabir, 2015**). L'homogénéisation consiste à soumettre le lait à une forte pression : 100 bar pour le lait destiné à la pasteurisation, et jusqu'à 250 bar pour le lait destiné à la stérilisation. Le lait, chauffé à environ 60-70 °C, est projeté sous cette forte pression dans une tubulure obstruée par un clapet (**Velez, 2017**).

**9.1.5. Pasteurisation**

Dans une installation classique de pasteurisation, le lait passe entre des plaques constituant plusieurs éléments :

- Un récupérateur dans lequel le lait cru arrivant est préchauffé, vers 60-65°C, par le lait chaud sortant du chambreur;
- Un réchauffeur où le lait est porté à la température de pasteurisation (80°C par exemple) par contact avec des tubes ou des plaques contenant de l'eau chaude;
- Un chambreur où le lait est maintenu à la température de pasteurisation pendant le temps voulu (20 secondes par exemple) ;
- Un récupérateur (le même qu'à la première étape) où le lait est refroidi (35°C) par échange avec le lait cru froid entrant ;
- Un réfrigérant, comprenant généralement deux sections, l'une d'eau froide, l'autre d'eau glacée ou de saumure, où le lait est refroidi à + 3, + 4 °C.
- L'installation est complétée par des thermomètres et des dispositifs de déviation du lait insuffisamment chauffé (**figure 6**) (**Velez, 2017**).

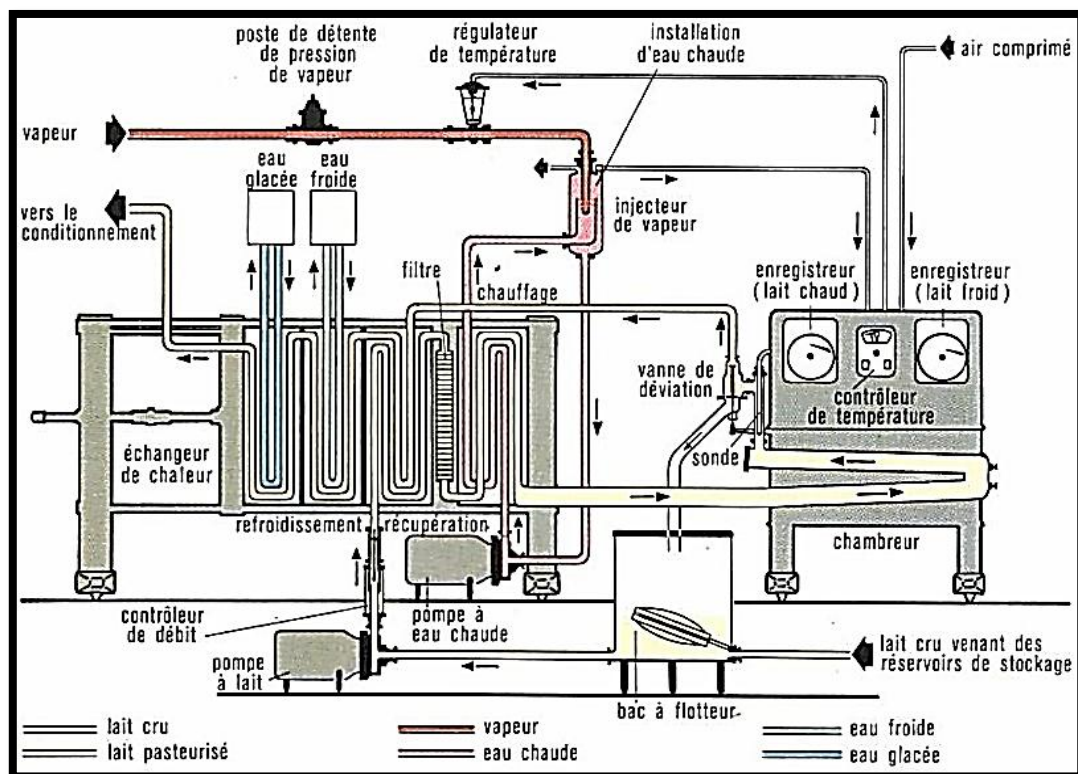


Figure 6. Schéma d'un pasteurisateur à plaques (Velez, 2017).

### 9.1.6. Refroidissement

Après la pasteurisation, le refroidissement du lait à une température voisine du point de congélation favorise une plus longue conservation. Au stade post pasteurisation et lors du conditionnement, il importe également d'éviter toute contamination, spécialement par les bactéries psychotropes, qui sont de principales responsables de la détérioration subséquente des pasteurisés (Kabir, 2015).

### 9.1.7. Conditionnement

Le contenant est le médium utilisé pour transporter les produits laitiers fluides dans les réseaux de production et de distribution. A cet égard, il doit avoir certaines qualités particulières: présenter une forme et une apparence attrayante; offrir une protection efficace contre le choc physique de la lumière et de la chaleur; être facile à ouvrir, préserver le contenu des odeurs, substances de saveurs étrangères, bien se manipuler, être fait de matériel inerte, être économique et adaptés aux exigences modernes de production et transmettre au consommateur des informations relatives au produit. Le nettoyage et l'assainissement ou la stérilisation des équipements de conditionnement sont des opérations d'importance primordiale pour la qualité du produit fini (Kabir, 2015).

### 9.1.8. Entreposage

La chambre froide est considérée comme l'endroit de transition où le produit fini doit séjourner le plus court temps possible avant sa distribution, pour des raisons de fraîcheur et d'économie. Ce local a comme mission de préserver la qualité des produits et ne doit pas constituer un palliatif à un manque de refroidissement à d'autres étapes de la production. L'éclairage doit être adéquat sans affecter la réfrigération et la qualité du produit, faciliter le travail du personnel et permettre de juger rapidement de la propreté des lieux (**Kabir, 2015**).

## 9.2. Procédé de fabrication du lait recombinaison pasteurisé

### 9.2.1. Définitions

- ✓ **La recombinaison:** c'est l'opération qui consiste à mélanger dans une eau convenable les différents composants du lait pour réaliser un produit le plus proche possible du lait initial. Les trois composants essentiels sont l'eau, la poudre de lait écrémé spray et la matière grasse laitière anhydre. Dans certains cas quelques adjuvants complémentaires sont utilisés (**Boultif, 2015**).
- ✓ **La reconstitution:** c'est l'opération qui consiste à diluer dans une eau convenable une poudre spray grasse, elle peut aussi correspondre à reconstituer un lait écrémé (**Boultif, 2015**).

L'arrêté interministériel du 18 août 1993, publié sur le journal officiel algérien, relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation a donné les définitions suivantes pour le lait reconstitué et le lait recombinaison (**Boultif, 2015**)

✓ **Le lait reconstitué est dit:**

- Ecrémé, en cas d'utilisation de lait en poudre écrémé extra grade c'est-à-dire titrant moins de 1,25 % de matières grasses,
- Entier, en cas d'utilisation de lait en poudre titrant au moins 26% de matières grasses (**Boultif, 2015**).

- ✓ **Le lait recombinaison** est obtenu par mélange d'eau, de matière grasse et de lait en poudre écrémé extra grade titrant moins de 1.25 % de matière grasse (**Boultif, 2015**).

Le terme « recombinaison » est utilisé pour désigner les deux types de laits pasteurisés issus de la technologie de la reconstitution des poudres laitières ou de leur recombinaison (**Malek, 2019**).

### 9.2.2. Méthodes de reconstitution et de recombinaison

La température de reconstitution varie entre 35 et 45 °C. On verse la poudre dans l'eau contenue dans une cuve ou, mieux, dans un tank tout en agitant assez énergiquement pendant 20 à 30 minutes. Afin de permettre une bonne hydratation de la poudre, il faut maintenir le mélange sous agitation à la température de 5 à 10 °C pendant 5 à 12 heures. Au cours de l'opération, il est nécessaire d'éviter l'introduction d'air dans le mélange. Il est préférable d'utiliser les dispositifs de mélange comportant une pompe de recirculation avec apport de la poudre par une trémie située avant la pompe plutôt que ceux comportant la simple agitation mécanique en tank ou en cuve (FAO, 1995).

Le lait reconstitué est ensuite débarrassé par filtration de toutes les impuretés physiques telles les insectes, la poudre insoluble, poiles...etc., puis subit une opération de dégazage qui assure l'échappement des gaz dissous incorporés ainsi que les mauvaises odeurs ; ce qui permet même d'éviter l'oxydation de la matière grasse au cours de la recombinaison. La désodorisation est réalisée sous vide par abaissement de la température de lait ; du fait de la faible pression, les vapeurs entraînent les particules volatiles malodorantes qui se condensent par refroidissement et sont ainsi évacués (Ait-Saada *et al.*, 2008).

Dans le cas de la préparation du lait recombinaison l'apport de matière grasse se fait:

- Soit directement dans le lait reconstitué (écrémé) après fluidification de la MGLA par réchauffage vers 38-42 °C. Le mélange est ensuite agité à la température de 55 à 65 °C puis homogénéisé sous une pression d'environ 250 bars;
- Soit sous forme d'une crème à 20-30 % de matière grasse obtenue par mélange de lait écrémé et de MGLA chauffé à 55-65 °C et homogénéisée dans un appareil à deux étages, le premier opérant à 200 bars environ et le second à 50 bars. Cette crème est ensuite mélangée énergiquement avec le lait reconstitué écrémé préalablement préparé (FAO, 1995).

On procède ensuite à la pasteurisation à la température de 74°C pendant 15 à 20 secondes pour le lait. S'il s'agit de mélanges à teneurs en matières sèches plus élevées, la température doit être augmentée (80-85 °C pendant 20 à 25 secondes) (FAO, 1995). Le lait ainsi pasteurisé est refroidi à une température de 4°C et stocké en fin dans des tanks à 9°C avant son conditionnement (Ait-Saada *et al.*, 2008).

Parfois, le lait cru est additionné à de faibles quantités au lait reconstitué pour des raisons économiques afin de réduire l'utilisation de la MGLA et d'améliorer la qualité alimentaire et marchande (Ait-Saada *et al.*, 2008).

Le lait reconstitué ou recombinaé pasteurisé est conditionné en sachet polyéthylène monocouche et est largement consommé, car il bénéficie de la subvention de l'état. Le lait recombinaé pasteurisé devient acide après 24 h à température ambiante et même à la température du réfrigérateur domestique. Il doit être immédiatement bouilli et consommé dans les heures qui suivent ou alors il est congelé si on veut lui garantir une conservation plus longue. L'ébullition a pour effet de réduire encore la flore de contamination, mais sans la détruire complètement (figure 7) (Malek, 2019).

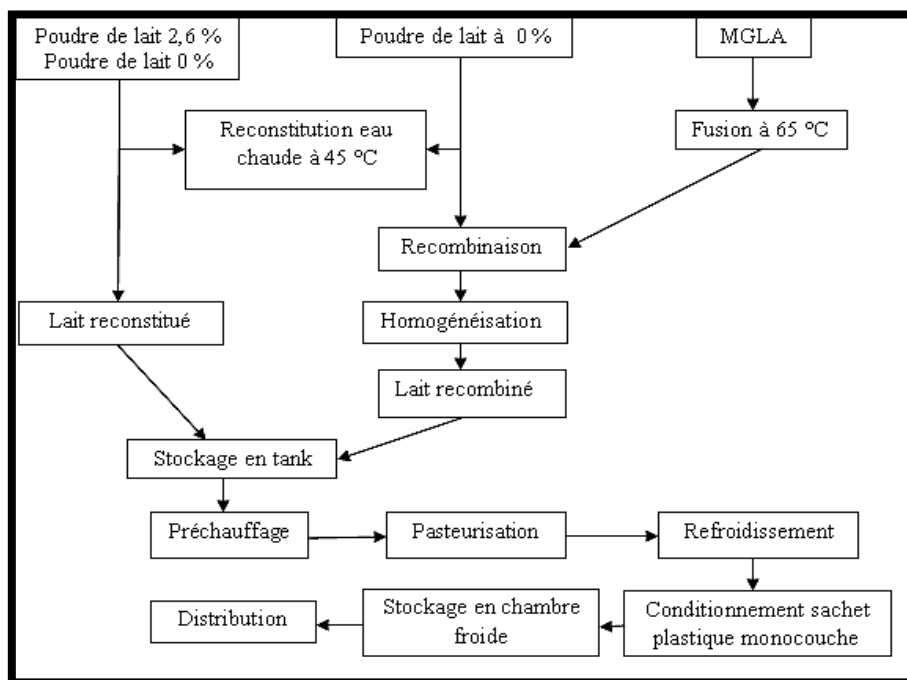


Figure 7. Diagramme de fabrication du lait reconstitué-recombinaé dans une laiterie analysée (Malek, 2019).

## 10. Production et consommation de lait en Algérie

L'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb et le second pays au monde importateur de lait et de ses dérivés avec un marché annuel estimé, en 2004, à 1,7 milliard de litres plus de trois milliards de litres en 2007 et une consommation moyenne de l'ordre de 115 litre par habitant et par an en 2010 (Boultif, 2015).

Dans ce pays de 40 millions d'habitants, le taux de consommation estimé entre 100 et 200 kg de lait par habitant et par an, est proche de celui des pays de plus grande importance démographique tels que l'Inde ou le Brésil. Toutefois, à cause d'une production laitière insuffisante, l'industrie laitière de ce pays est tributaire du lait d'importation sous toutes ses formes, entier, écrémé ou partiellement écrémé, qui représente 42 % de la production laitière

nationale, le reste (58 %) étant la part du lait de vache produit localement. L'Algérie est, en effet, le 3<sup>e</sup> importateur mondial de lait en poudre écrémé, et occupe la 2<sup>e</sup> place après la Chine pour l'importation de lait en poudre entier. Sur le marché, le consommateur Algérien au choix entre les différents laits pasteurisés produits à l'échelle nationale, son choix est guidé, en premier lieu par le pouvoir d'achat, le prix du lait reconstitué soutenu par l'état étant le moins cher. Toutefois le consommateur est de plus en plus conscient de la qualité nutritionnelle moindre du lait reconstitué comparée à celle du lait frais et est souvent réticent quant à la qualité organoleptique de ce produit. Ses récriminations concernent le goût, l'odeur ou parfois la consistance du lait reconstitué pasteurisé (**Malek, 2019**).



## ***Chapitre 02 :***

# ***Les bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé***

### 1. Définition des bacilles thermophiles

Les bacilles thermophiles sont des bactéries sporulées appartenant à *Bacillus* et aux genres apparentés. Ils sont formés d'espèces qui se développent de façon optimale à 50–55°C sur l'acier inoxydable. Les principaux genres *Anoxybacillus* et *Geobacillus* sont un groupe de contaminants importants de l'industrie laitière où ils sont introduits via la poudre de lait, et sélectionnés lors du processus même de production de cette dernière. En effet, les thermophiles obligatoires tels que *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus spp* ne sont pas pathogènes alors que quelques espèces de thermophiles facultatifs telles que *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis* peuvent produire des toxines. D'une manière générale, les bacilles thermophiles sont capables de croître dans les sections où la température est comprise entre 40 et 65°C et sont caractérisés par des taux de croissance rapides (15 à 20 min), la formation de spores thermorésistantes et un potentiel élevé de formation de biofilms. Ils participent de ce fait à la dégradation de la qualité du lait pasteurisé et à la diminution de sa durée de vie (Malek, 2019).

### 2. Les caractéristiques des bacilles thermophiles

Des études taxonomiques ont montré que le genre *Bacillus* est très diversifié. Tout au long des années 1980, il y a eu un débat sur la question de savoir si le genre *Bacillus* était vraiment un genre ou plusieurs, et l'analyse de la séquence d'ARNr 16s ainsi que les études d'hybridation ADN-ADN sont devenus des techniques clés pour définir les espèces. Les travaux menés tout au long des années 90 ont abouti à la reclassification d'espèces du genre *Bacillus* en nouveaux genres. Une étude taxonomique a conduit à la reclassification de *Bacillus stearothermophilus* dans le nouveau genre *Geobacillus*. L'isolement d'*Anoxybacillus pushchinoensis* a conduit à la reclassification de *Bacillus flavothermus* en *A. flavithermus*. Avant sa reclassification, *A. flavithermus* n'était pas reconnu comme une espèce valide. Dans l'industrie laitière, *A. flavithermus* peut avoir été identifié par erreur comme *B. stearothermophilus* avant 2001. Les membres du genre *Bacillus* et les bacilles thermophiles obligatoires ont généralement des besoins nutritionnels simples ; par conséquent, ils ne nécessitent pas d'acides aminés spécifiques pour leur croissance et sont capable de se développer sur des milieux simples tels que la tryptone soja agar (TSA). La température de croissance optimale des bacilles thermophiles se situe généralement entre 50 et 65°C, mais varie selon les espèces et les souches (Burgess *et al.*, 2010).

### 2.1. Les thermophiles obligatoires

Ils ne poussent qu'à des températures élevées (environ 40-68°C) et comprennent *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus spp* (tableau 5) (Burgess et al., 2010).

Les bacilles thermophiles tels que *Geobacillus spp*, n'étant pas détruite par la pasteurisation, est responsable de l'altération du lait pasteurisé et de la réduction de sa durée de vie (Malek, 2019).

**Tableau 5.** Caractéristiques des bacilles thermophiles obligatoires (Burgess et al., 2010).

	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>
<b>Croissance maximale T °C</b>	65–72	65–68	70
<b>Croissance minimale T °C</b>	30–38	37	35–47
<b>Anaérobie</b>	Oui	Non	Non
<b>pH</b>	6–9	6–8	5.2–8
<b>Sporange gonflé</b>	Oui	Oui	Oui
<b>Position des Spores</b>	Terminal	Terminal	Terminal
<b>Réaction de voges-proskauer</b>	Positif	Négatif	Négatif
<b>Croissance dans 7% Na Cl</b>	Non	Non	Non
<b>Nitrate réduit en nitrite</b>	Oui	Variable	Oui
<b>Hydrolyse de Caséine</b>	Oui	Variable	Variable
<b>Hydrolyse de Gélatine</b>	Non	Oui	Variable
<b>Hydrolyse d'amidon</b>	Oui	Oui	Variable

### 2.2. Les thermophiles facultatifs

Également appelées micro-organismes thermotolérants. Appartiennent au genre *Bacillus* et ont tendance à croître à des températures à la fois mésophiles et thermophiles, selon la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus smithii*, *Bacillus sporothermoduran* (tableau 6) (Burgess et al., 2010).

**Tableau 6.** Caractéristiques des bacilles thermophiles facultatifs (Burgess et al., 2010).

	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus Coagulans</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus sporotherodurans</i>
<b>Croissance maximale T °C</b>	50–55	45–55	57–61	50–55	45–55
<b>Croissance minimale T °C</b>	15	5–20	15–25	5–15	20
<b>Anaérobie</b>	Oui	Non	Oui	Non	Non
<b>pH</b>	5.5–8.5	5.5–8.5	4–10.5	5.5–8.5	Inconnue
<b>Sporange gonflé</b>	Non	Non	Variable	Non	Non
<b>Position des spores</b>	Central	Central	Subterminal	Central	Terminal

Réaction de voges-proskauer	Positif	Positif	Variable	Positif	Négatif
Croissance dans 7% Na Cl	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Nitrate réduit en nitrite	Oui	Oui	Variable	Non	Non
Hydrolyse de Caséine	Oui	Oui	Non	Oui	Faible
Hydrolyse de Gélatine	Oui	Oui	Variable	Oui	Non
Hydrolyse d'amidon	Oui	Oui	Oui	Non	Non

### 3. Importance des bacilles thermophiles dans la transformation des produits laitiers

#### 3.1. Potentiel d'altération des bacilles thermophiles

Les souches de thermophiles obligatoires et facultatives sont capables de produire des acides, ainsi que diverses enzymes thermostables, notamment des protéinases et des lipases, qui pourraient entraîner la détérioration des produits laitiers. On pense que le potentiel réel des thermophiles obligatoires à altérer les produits laitiers est faible, car les produits laitiers sont généralement stockés à des températures inférieures à 37°C, températures auxquelles les thermophiles obligatoires ne se développeront pas (**Burgess et al., 2010**).

La production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires telles que les protéases, les lipases et les lécithinases peuvent provoquer l'altération du lait pasteurisé. Ces enzymes d'altération sont responsables des mauvais goûts et des défauts structurels du lait pasteurisé, l'activité protéolytique provoque également des défauts de goût amer et pourri, tandis que les défauts de goût fruité et rance sont causés par l'activité lipolytique, elles sont produites dès que les spores germent en raison de l'activation thermique par la pasteurisation (**De Jonghe et al., 2010**). Comme les protéases des organismes thermophiles provoquent une dégradation de la caséine qui entraîne une altération protéolytique du lait et des produits laitiers traités thermiquement (**Chopra et al., 1984**).

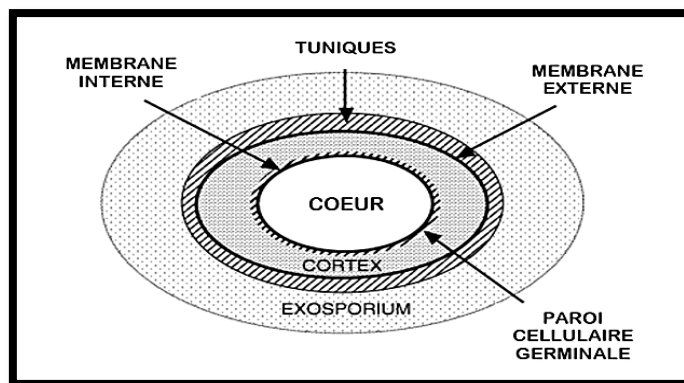
#### 3.2. Endospores résistant à la chaleur des bacilles thermophiles

La sporulation est un processus naturel dans le cycle de croissance de certains groupes de bactéries telles que les espèces de *Bacillus*. Il s'agit d'un mécanisme de survie, généralement considéré comme un processus qui se produit lorsque l'organisme est soumis à un stress. Dans l'environnement laitier, la formation d'endospores de bacilles thermophiles se produit facilement, mais les facteurs contribuant à ce processus ne sont pas clairement compris (**Burgess et al., 2010**).

#### 3.3. Structure de l'endospore

Les spores sont constituées d'un noyau, également appelé protoplaste, qui contient la matière nucléaire, entouré de la membrane corticale et du cortex, qui est à son tour enfermé

dans la couche de spores. Certaines espèces, comme *Geobacillus spp* peut avoir une couche sur le manteau de la spore appelée exosporium. La principale différence de structure des spores entre les espèces est la structure et le nombre de couches dans le manteau de la spore, alors que le cortex et le noyau sont très similaires. Par exemple, la plupart des spores contiennent un manteau extérieur et un manteau intérieur (**figure 8**) (Burgess *et al.*, 2010).



**Figure 8.** Structure d'une spore (Durand, 2014).

### 3.4. Formation des spores

La sporulation est un processus compliqué, divisé en une série d'étapes qui sont considérées comme très similaires parmi les bactéries aérobies et anaérobies facultatives formant des spores. Il est important de comprendre comment se produit la formation des spores car cette connaissance peut aider à contrôler les spores dans les usines de transformation laitière. En général, la température optimale et le pH optimal pour la formation de spores sont similaires à ceux de la croissance des cellules végétatives, mais la plage de ces deux paramètres est plus étroite. Les conditions qui déclenchent la formation de spores chez les bactéries thermophiles dans un environnement laitier sont mal définies. Cependant, la présence de minéraux, tels que les composés de magnésium, de calcium et de potassium, peut jouer un rôle. Ces minéraux sont importants pour le développement d'une spore mature et peuvent être impliqués dans l'activation du processus de formation de la spore. Les minéraux, en particulier le calcium, s'accumulent dans les spores, ce qui fait que le noyau contient la plupart de ces minéraux. Il a été démontré que le calcium augmente l'expression des gènes impliqués dans le processus de sporulation. Les sels minéraux sont couramment utilisés dans les milieux de sporulation. Comme ces minéraux sont également présents dans le lait, ils peuvent également stimuler la sporulation des bacilles thermophiles dans les processus laitiers. La preuve de cette possibilité se trouve dans la formation de spores de *Geobacillus* en laboratoire, qui est influencée par le milieu de développement et la présence de sels. En outre,

le temps nécessaire à la formation des spores varie également beaucoup dans les bacilles thermophiles, par exemple, la plupart des milieux de sporulation avec des minéraux ajoutés ont tendance à produire des spores en 7 jours (**Burgess et al., 2010**).

### 3.5. Résistance

Les spores résistent à la chaleur, aux perturbations mécaniques et à une grande variété de produits chimiques, ce qui rend leur destruction très difficile dans les processus de fabrication de produits laitiers. L'activité de l'eau de la spore est également importante pour la résistance aux spores. Il a été démontré que la structure des spores de *B. sporothermodurans* changeait lorsque les spores étaient isolées en différents endroits, c'est-à-dire que les spores isolées du lait UHT étaient plus denses, plus petites et plus résistantes à la chaleur que celles isolées du lait cru. En outre, des études ont montré que les spores qui se sont formées à des températures supérieures à la température de croissance optimale d'une souche particulière tendent à être plus résistantes à la chaleur, et il semble que le choc thermique puisse être responsable de ce phénomène observé. Dans le cas des bacilles thermophiles, les profils de résistance à la chaleur des spores varient considérablement (**Burgess et al., 2010**).

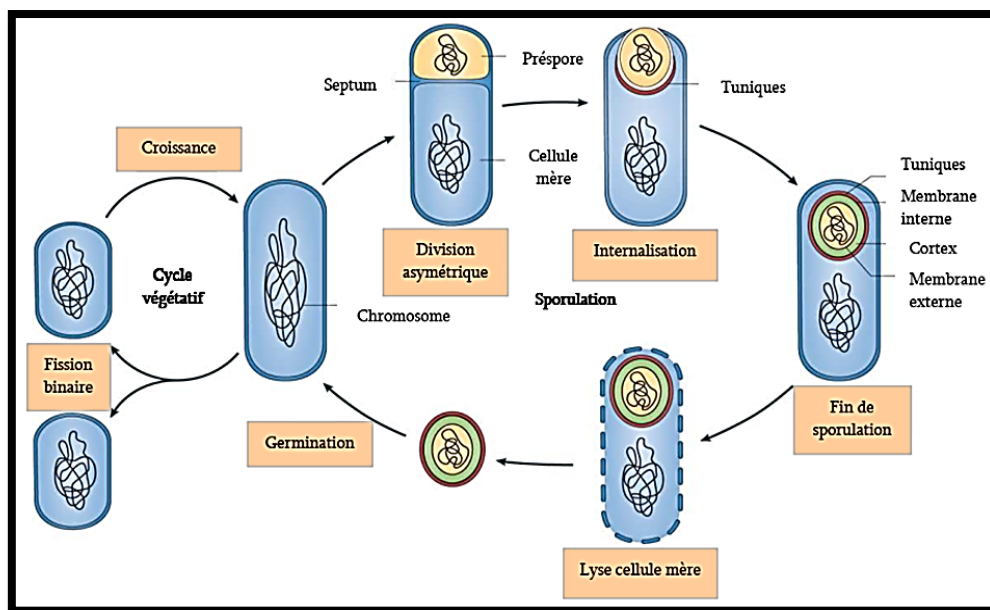
Les bacilles thermophiles, seules les spores de *Geobacillus spp* ont le potentiel de survivre aux traitements UHT (134-145°C pendant 1-10 s). Ainsi *B. licheniformis*, *B. subtilis* et *B. pumilus* étaient capables de survivre à 135 °C pendant 10 s. Une étude plus approfondie a montré que sur un certain nombre de souches de *Bacillus* (dont *B. licheniformis*) obtenues à partir de produits laitiers, seul *B. sporothermodurans* a survécu à des traitements à haute température  $\geq 120^{\circ}\text{C}$  pendant 5 s. Il est difficile de comparer les études de résistance à la chaleur dans des essais en laboratoire, car les conditions de sporulation telles que la température, le pH et la composition du milieu peuvent contribuer à la résistance aux spores (**Burgess et al., 2010**).

La production d'endospores résistantes à la chaleur (80-100°C pendant 10 à 30 minutes) et très résistantes à la chaleur ( $> 106^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes) par les bacilles thermophiles est une question particulièrement importante pour les producteurs de lait en poudre, car ces poudres sont utilisées comme ingrédients dans d'autres types de produits laitiers, tels que les produits traités à ultra-haute température (UHT) (**Burgess et al., 2010**).

### 3.6. Germination des endospores

Trois étapes sont impliquées dans le processus de transformation d'une spore en cellule végétative: l'activation, la germination et la croissance. Les mécanismes d'activation des spores ne sont pas bien compris, mais il est généralement admis que les spores doivent être

activées avant que la germination puisse avoir lieu. La chaleur, les produits chimiques et une diminution du pH à 2-3 peuvent activer les spores. Dans l'industrie laitière, la chaleur est le mécanisme le plus probable d'activation des spores thermophiles, en raison de l'utilisation intensive de la chaleur comme technologie de conservation. Ce processus semble être spécifique à la souche et à l'espèce. Par exemple, il a été démontré que les spores de *G. stearothermophilus* sont activées à des températures atteignant 110°C, alors que les spores de *B. subtilis* ont une température d'activation plus basse, de 65 à 70°C. Les spores "super dormantes" peuvent nécessiter une température d'activation plus élevée que les spores dormantes qui se germent facilement. Il n'existe aucun produit chimique connu pour activer toutes les souches de *G. stearothermophilus*. Après l'activation des spores mésophiles, la germination est déclenchée par des nutriments (par exemple, L'alanine) qui se lient aux récepteurs de germination ou par d'autres moyens tels que la haute pression, les sels ou le lysozyme. Ce processus est mal compris pour les bacilles thermophiles (**figure 9**) (Burgess *et al.*, 2010).



**Figure 9.** Cycle de sporulation et germination de *B. subtilis* (Durand, 2014).

#### 4. Les bacilles thermophiles comme indicateurs d'hygiène

Les bacilles thermophiles, tels qu'*Anoxybacillus*, *Geobacillus* et *Bacillus*, sont des contaminants courants qui se développent dans les chaînes de transformation des usines de production de lait en poudre. Ces contaminants sont utilisés comme organismes indicateurs pour l'hygiène des usines et des limites de spécifications basées sur leur nombre ont été mises en place pour garantir la qualité du lait en poudre. Bien qu'il soit universellement reconnu que

ces bacilles thermophiles ne constituent pas un risque pour la santé du consommateur **(Rueckert et al., 2006)**.

La contamination du lait en poudre par des bactéries d'altération du lait, résistantes à la chaleur et formant des spores, demeure une préoccupation importante pour l'industrie laitière. La bactérie thermophile sporulée *Anoxybacillus flavithermus* est responsable de la détérioration des produits laitiers en poudre, et sa présence dans les environnements de transformation laitière est une préoccupation **(Tasara et al., 2017)**.

La présence d'un nombre élevé ( $>10^4$  UFC / g) de thermophiles dans les produits laitiers finis, comme les poudres de lait, est un indicateur d'une mauvaise hygiène pendant la transformation. On pense que les contaminants thermophiles initiaux entrent dans un processus de fabrication laitière via le lait cru sous forme d'endospores. Cependant, la qualité du lait cru en termes de nombre de thermophiles n'est pas liée au nombre de thermophiles présents dans le produit final en poudre de lait. En fait, les niveaux de thermophiles dans le lait cru sont généralement très faibles ( $<10$  UFC / ml). En de rares occasions où des niveaux plus élevés se produisent (par exemple  $>100$  UFC / ml), les espèces thermophiles prédominantes dans ce lait cru ont tendance à être *B. licheniformis* et *B. coagulans*. Cependant, lorsque le produit final à base de lait cru de cette qualité est transformé, les espèces thermophiles prédominantes sont généralement *A. flavithermus* et *Geobacillus spp.* **(Burgess et al., 2010)**.

Par conséquent, un faible nombre de spores dans le lait cru initial et un court temps de séjour ( $< 30$  min) de lait dans une usine de transformation laitière ne peuvent pas expliquer le nombre élevé résultant ( $10^4 - 10^6$  UFC / g) de bacilles thermophiles dans les produits laitiers finaux. Cependant, la croissance de ces bactéries dans l'usine de fabrication elle-même explique ce phénomène. En particulier, les bacilles thermophiles se sont révélés se développer sous forme de biofilms sur les surfaces des équipements de transformation ou dans les couches d'encrassement du lait. Une croissance importante peut se produire lorsque les cycles de production sont trop longs, l'équipement de fabrication n'est pas nettoyé correctement entre les cycles de production, des boucles de recyclage sont utilisées et des ingrédients ou des sous-produits contenant des thermophiles sont utilisés. Quelques exemples de procédés laitiers dans lesquels la croissance thermophile a été un problème comprennent le lait en poudre, le lait pasteurisé, le babeurre et le lactosérum **(Burgess et al., 2010)**.

La formation de biofilms sur les équipements de l'industrie laitière peut entraîner de graves problèmes d'hygiène et des pertes économiques dues à l'altération des aliments et des



équipements. Les micro-organismes présents dans les biofilms catalysent les réactions chimiques et biologiques provoquant la corrosion des métaux dans les pipelines et les réservoirs, et ils peuvent réduire l'efficacité du transfert de chaleur si les biofilms deviennent suffisamment épais au niveau des échangeurs de chaleur à plaques et des pipelines (Simões *et al.*, 2010)

## 5. Les biofilms des bacilles thermophiles

### 5.1. Définition

Un biofilm est ensemble des microorganismes, soit de la même espèce, soit d'espaces différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il constitue un ensemble de cellules isolées et de micro-colonies de cellules filles, associées entre elles et/ ou aux surfaces. Cet ensemble est contenu dans une matrice constituée d'exopolysaccharides bactériens, de matières organiques et non organiques, ainsi que des macromolécules piégées du milieu environnant. Le biofilm n'est pas toujours film continu (tapis), on observe parfois un développement en « patch ». Les biofilms ne sont pas simplement des microorganismes immobilisés sur les surfaces. Cette organisation permet à des organismes unicellulaires d'adopter un comportement comparable à celui d'un tissu eucaryote avec communication entre cellules via des signaux chimiques, échanges de matériel génétique, interactions métaboliques (figure 10) (Branger *et al.*, 2007).

Les biofilms constituent un mode de croissance protégé qui permet aux microorganismes de survivre dans des environnements hostiles, leur physiologie et leur comportement étant sensiblement différents de ceux de leur homologue (Simões *et al.*, 2010).

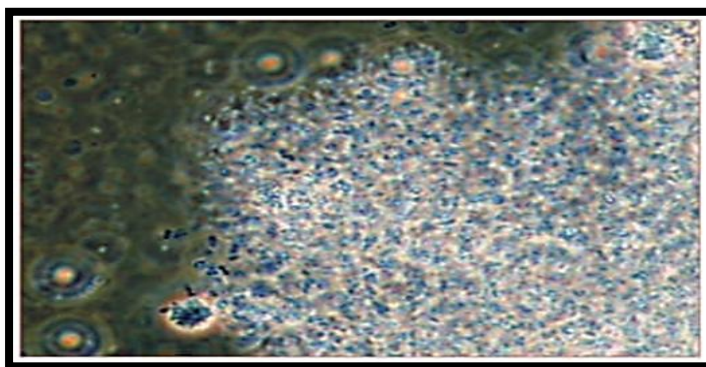


Figure 10. Détails d'un biofilm ( $\times 1250$ ) (Branger *et al.*, 2007).

## 5.2. Composition de biofilm

Le biofilm est composé de microorganismes situés au sein d'une matrice (**Branger et al., 2007**).

### 5.2.1. Les microorganismes

Seuls quelques biofilms sont composés d'un seul type d'organisme (ce phénomène est lié aux conditions environnantes, plus souvent qu'à la nature même des organismes). Les biofilms naturels ne sont que rarement clonaux. Mais au contraire abritent souvent de nombreux types de microorganismes : bactéries, protozoaires, algues, mycètes, chaque groupe exécutant des fonctions métaboliques spécialisées. Ils représentent moins d'un tiers de l'ensemble (**Branger et al., 2007**).

### 5.2.2. La matrice

Elle exerce différents rôles. Elle assure la cohésion de chaque micro-colonie, les protège, absorbe l'eau et piège les petites particules circulantes. Elle fournit des nutriments dissous et élimine leurs déchets. Elle est composée :

- D'eau (dont la teneur est variable selon les matrices);
- Des **EPS**: en termes de poids et de volume. Ils constituent l'élément structural majeur du biofilm dont ils peuvent représenter jusqu'à 85 % de la masse totale. Ils interviennent sur les relations des microorganismes entre eux et avec les surfaces. Ces EPS sont surtout constituées d'exopolysaccharides. Cependant le biofilm existe dès la phase d'adsorption avant la synthèse des EPS. Les cellules associées au biofilm peuvent produire des enzymes capables de détruire la matrice d'EPS, et de s'en servir comme nutriments en cas de famine. Ceci lui permet par la même occasion de s'échapper du biofilm pour trouver des nutriments ailleurs:
- De débris cellulaires (protéines, acides nucléiques) ;
- De déchets du métabolisme cellulaire, comme des sels d'acides organiques pyruvate succinate) qui favorisent notamment les phénomènes de corrosion des surfaces ;
- De débris issus des matières en contact avec les surfaces (Produits alimentaires. fluides biologiques. eaux diverses) (**Branger et al., 2007**).

## 5.3. Les facteurs influençant l'attachement aux surfaces industrielles

Parmi les facteurs qui influencent l'attachement microbien aux surfaces inertes, les propriétés de surface des cellules et des supports inertes (**Malek, 2013**).

### 5.3.1. L'hydrophobicité et la topographie du support

Les matériaux les plus couramment utilisés en industrie laitière sont les aciers inoxydables, parce qu'ils répondent exactement aux exigences des matériaux en contact avec les aliments. Ce sont des matériaux qui sont neutres sur les plans chimique, bactériologique et organoleptique, ils sont faciles à nettoyer et résistants à la corrosion. Le choix du matériau est d'une grande importance, les propriétés de surface telles que la rugosité, la capacité de nettoyage et de désinfection, et l'humidité exprimée en hydrophobicité, déterminent le statut hygiénique du matériau et son influence sur l'adhésion bactérienne (**Malek, 2013**).

L'hydrophobicité est reconnue comme un paramètre significatif de l'adhésion des bactéries aux surfaces inertes. Il est cependant admis que les cellules dont la surface est hydrophobe adhèrent préférentiellement aux surfaces hydrophobes qu'aux surfaces hydrophiles et inversement. Toutefois, ceci ne semble pas être une règle générale sachant que la formation de biofilms hydrophiles sur des substrats hydrophobes a été rapportée (**Malek, 2013**).

La rugosité du support est elle aussi largement controversée quant à sa relation à l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm. En effet, la surface de l'acier inoxydable n'est pas uniforme mais présente des dissymétries révélées dans l'ultrastructure de ce matériau et exprimées sous le terme de rugosité. Celle-ci peut influencer le mode d'aggrégation des cellules et la formation de micro-colonie et par conséquent la morphologie et la structure du biofilm. Les surfaces lisses sont généralement considérées comme défavorables à l'adhésion bactérienne (**Malek, 2013**).

En outre, il a été montré que l'adhésion bactérienne est influencée par l'orientation des cellules, leur taille et l'écart entre les sillons. D'une part, l'orientation des cellules dans des directions autres que parallèles aux sillons de la surface du matériau réduit l'adhésion. Une relation entre la rugosité et l'adhésion a été trouvée sous l'influence de la température (**Malek, 2013**).

### 5.3.2. Les propriétés physico-chimiques de surface des bactéries.

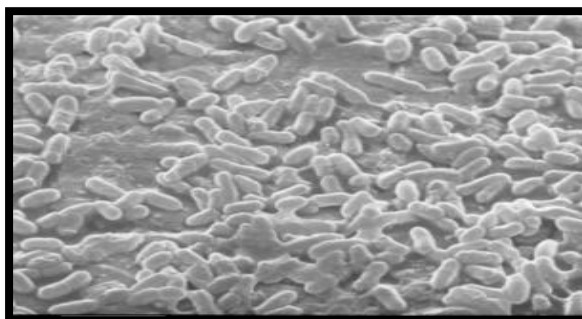
Les cellules bactériennes s'orientent perpendiculairement aux interfaces dans les systèmes air/eau ou eau/solide grâce aux portions hydrophobes de toute cellule propulsée de la phase aqueuse au système. Les interactions hydrophobes permettent aux cellules bactériennes d'outrepasser les forces répulsives exercées par le substrat et de réaliser l'adhésion (**Malek, 2013**).

Toutefois, pour l'adhésion à l'inox n'était pas liée à l'hydrophobicité et la charge de surface des cellules de bacilles thermophiles mais plutôt à leurs protéines de surfaces. D'une manière générale de nombreux travaux, ont montré que cette propriété subit des modifications plus ou moins importantes en fonction des conditions environnementales telles que le pH (Malek, 2013).

#### 5.4. Les étapes de formation de biofilm par des bacilles thermophiles

En industrie laitière, la formation de biofilms peut avoir lieu dans les différents sites de la chaîne de transformation du lait, avec une prévalence élevée au niveau des sites difficiles à nettoyer tels que les extrémités mortes, les joints, les valves, les creux et les crevasses. Le développement de biofilms sur les équipements laitiers est très rapide (8–12 h), avec des nombres de bactéries souvent supérieurs à  $10^6$  bactéries/cm<sup>2</sup>. Le risque de transfert de ces bactéries au lait qui circule dans les lactoducs, ou contamination croisée, est grand (Malek, 2019). On pense que la formation de biofilm des bacilles thermophiles se produit dans des sections des usines de fabrication de produits laitiers à des températures élevées de 40 à 65°C (Burgess *et al.*, 2010).

Les biofilms des bacilles thermophiles sont appelés biofilms de processus. On pense généralement que les biofilms de processus sont dominés par une seule espèce en raison des pressions sélectives du milieu environnant. Les pressions sélectives dans une usine laitière peuvent inclure la chaleur, la composition du produit, le pH et l'activité de l'eau. La structure et la composition des biofilms thermophiles sont mal connues. Sur la base d'expériences menées en laboratoire, il apparaît que les biofilms des bacilles thermophiles sur l'acier inoxydable peuvent former une monocouche (figure 11), et ne constituent donc pas la dernière étape d'un biofilm traditionnel, composé d'une multicouche de cellules bactériennes incorporées dans une matrice EPS avec canaux d'eau (Burgess *et al.*, 2010).



**Figure 11.** Micrographie électronique à balayage d'un biofilm d'*A. Flavithermus* de 18 h sur la surface de l'acier inoxydable.

(Note : Le biofilm a été formé à l'aide d'un réacteur de laboratoire à recirculation dans lequel le lait écrémé pasteurisé a été chauffé à 55°C et remis en circulation sur des coupons en acier inoxydable de 1 cm<sup>2</sup> (Burgess *et al.*, 2010).)

#### 5.4.1. Fixation des cellules et des spores aux surfaces

Un grand nombre de facteurs influencent la fixation des cellules et des spores à une surface, notamment les interactions entre le micro-organisme et le film de conditionnement et les interactions physico-chimiques entre le micro-organisme et la surface (Teh *et al.*, 2015).

Un film de conditionnement se forme sur une surface presque immédiatement après son contact avec une solution aqueuse, il est constitué de molécules organiques et inorganiques, qui sont transportées de la phase aqueuse à l'interface solide-liquide par des forces de diffusion ou de dynamique des fluides. Il peut modifier les propriétés physico-chimiques de la surface, telles que la charge de surface et l'hydrophobie, et les molécules adsorbées à la surface peuvent occuper des sites de liaison pour les bactéries. Les molécules du film de conditionnement peuvent également servir de source de nutriments pour les microorganismes qui se développent activement à la surface (Teh *et al.*, 2015).

L'hydrophobie joue un rôle important dans l'attachement des spores aux surfaces, avec la règle générale que plus un micro-organisme ou une surface est hydrophobe, plus l'attachement est important. Cette règle est étayée par l'observation que les spores de *Geobacillus spp* en suspension dans des solutions salines simples se fixent en plus grand nombre sur des surfaces ayant une plus grande hydrophobie, comme le polystyrène, que sur des surfaces hydrophiles, comme le verre (Teh *et al.*, 2015).

Toutefois, lorsque les spores étaient en suspension dans du lait écrémé et exposées aux mêmes surfaces, aucune différence dans le nombre de spores se fixant aux surfaces n'a été observée. Cela peut être dû aux protéines du lait, adsorbées sur le substrat (c'est-à-dire le film de conditionnement) et aux surfaces des spores, qui masquent les propriétés de surface originales des spores et du substrat. (Teh *et al.*, 2015).

Le processus d'attachement semble être un processus multifactoriel; par conséquent, la capacité d'un organisme à se fixer ne peut pas être directement attribuée à un seul facteur. Par exemple, les protéines de surface cellulaire peuvent jouer un rôle dans l'attachement pour certaines espèces mais pas pour d'autres, par exemple une légère réduction de la capacité des spores de *B. cereus*, sans exosporium, à se fixer à l'acier inoxydable. En revanche, lorsque l'enveloppe protéique externe a été retirée des spores d'*A. Flavithermus* et de *Geobacillus spp*

il n'y a pas eu de réduction significative de l'attachement des spores à l'acier inoxydable (Burgess *et al.*, 2010).

#### 5.4.2. Développement de biofilm

Le développement du biofilm par des bacilles thermophiles a été analysé de manière approfondie en laboratoire. Dans des conditions favorables (température, pH et activité de l'eau), les spores attachées germent, se développent et forment un biofilm (Teh *et al.*, 2015).

(Burgess *et al.*, 2009) ont démontré que les biofilms créés par *A. flavithermus* peuvent être initiés à partir de cellules végétatives ou de spores (Teh *et al.*, 2015).

Les souches d'*A. Flavithermus* et de *Geobacillus spp* atteignent une densité cellulaire de biofilm de 6 à 7 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> après 6 heures. Il est probable que les biofilms qui se développent dans les équipements de production de lait en poudre contiendront plusieurs espèces de bacilles thermophiles. Une étude a montré que *G. thermoglucosidans*, isolé à partir de produits laitiers, est incapable de se développer et de produire un biofilm dans le lait en culture pure mais peut le faire en présence d'autres souches de bacilles thermophiles. On pense que les biofilms de thermophiles dans les lignes de traitement se développent comme une monocouche, en raison de la fine couche limite créée par les taux de cisaillement élevés de l'écoulement turbulent (Teh *et al.*, 2015).

#### 5.4.3. Développement des spores dans les biofilms

L'étape suivante n'est pas claire, mais il semble que de nouvelles spores soient générées en même temps que le biofilm thermophile se développe. Dans le cas d'*A. Flavithermus*, la formation de biofilm et la formation de spores semblent se produire simultanément dans un réacteur à écoulement continu (Burgess *et al.*, 2010).

Les biofilms de *B. subtilis* produisaient des spores lorsqu'ils étaient placés dans des conditions limitant les nutriments. Les biofilms autorisés à se développer sur des surfaces en acier inoxydable pendant 48 heures étaient constitués à 90% de spores (Teh *et al.*, 2015).

La variation de température a un effet considérable sur la formation de spores par les bacilles thermophiles. Par exemple, les spores représentaient jusqu'à 10 à 50% d'un biofilm d'*A. Flavithermus* de 8 h cultivé à 55 et 60°C, tandis qu'aucune spore n'était détectée dans un biofilm correspondant cultivé à 48°C (Burgess *et al.*, 2010).

### 5.5. Résistance du biofilm

Les microorganismes du biofilm sont généralement 1 000 fois plus résistants que les cellules planctoniques aux produits chimiques de nettoyage et aux désinfectants couramment utilisés pour nettoyer les usines de transformation des aliments. Cela crée un problème potentiel car des surfaces d'usines incomplètes peuvent permettre une croissance rapide du biofilm au cours du prochain cycle de fabrication. Des bactéries peuvent être libérées du biofilm qui contamine le produit circulant dans l'usine. C'est ce qu'on appelle le potentiel de transport du biofilm (**Flint *et al.*, 2001**).

En raison de leur résistance au traitement thermique et aux agents antimicrobiens, les biofilms de l'environnement laitier sont difficiles à éliminer même avec des procédures de nettoyage et de désinfections acceptables. En outre, la ré-adhésion des bactéries à la surface des équipements du système de canalisation du lait survient même durant le nettoyage en place (CIP) (**Malek, 2013**).

La résistance des biofilms aux procédures de nettoyage et de désinfection largement documentées est un problème critique auquel est confrontée l'industrie laitière. Pour s'en débarrasser, il faut des traitements sévères aux oxydants forts et nécessite le développement de nouvelles stratégies d'hygiène (**Malek, 2019**).

Le rôle de la matrice organique qui protège les bactéries, les rendant inaccessibles à l'action des agents antimicrobiens, est largement reconnu. L'hétérogénéité physiologique et le phénotype de croissance altérée ou l'existence de sous populations de cellules dans un état de dormance, notamment les cellules persistantes (persister cells), sont également à la base de la résistance des biofilms aux agents antimicrobien (**Malek, 2019**).

### 6. Stratégies de lutte contre le biofilm de l'environnement laitier

Les stratégies de lutte contre les biofilms sont essentiellement basées sur l'action des agents antimicrobiens, antibiotiques ou biocides, et se heurtent toujours au problème crucial de la résistance sessile (**Malek, 2019**).

Les bacilles thermophiles varient dans leur capacité à former des biofilms; par conséquent, il est important de sélectionner le formateur de biofilm le plus robuste avant de tester les désinfectants et les surfaces antimicrobiennes (**Burgess *et al.*, 2014**).

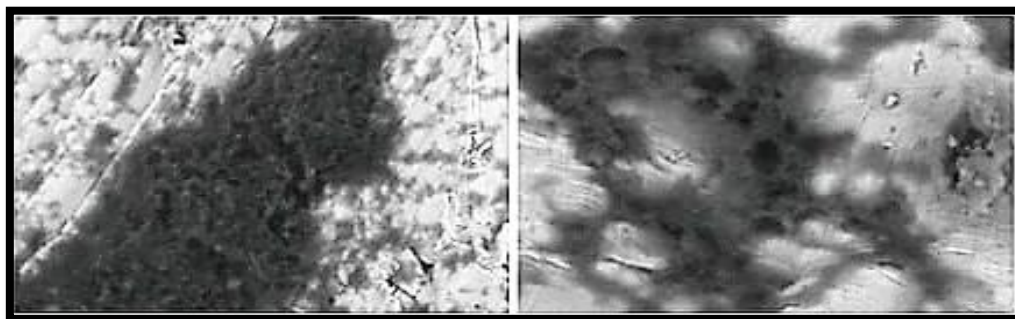
Les stratégies de nettoyage testées étaient basées sur la biochimie et la physiologie du biofilm et étaient axées sur la chimie des nettoyants, la durée et la température du processus de nettoyage et une combinaison de divers nettoyants. Le succès des régimes de nettoyage a été déterminé en fonction de l'élimination des cellules et des débris organiques et de

l'élimination des cellules viables. Les agents de nettoyage alternatifs basés sur la dégradation enzymatique ou non enzymatique des protéines ou polysaccharides cellulaires, l'action des tensioactifs, l'utilisation de l'attaque oxydative et des radicaux libres ont varié en degrés de leur succès. La combinaison de l'action protéolytique avec des tensioactifs a augmenté la mouillabilité et a donc amélioré l'efficacité du nettoyage (**Parkar et al., 2004**).

### 6.1. Efficacité du nettoyage industriel sur les biofilms

Dans les industries agro-alimentaires, les surfaces en contact avec les aliments sont régulièrement nettoyées et désinfectées avec des produits chimiques. Pour les circuits fermés, un nettoyage acido-alcalin, le système CIP est utilisé. Les produits les plus couramment utilisés sont la soude caustique (NaOH) et l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>). Un CIP standard comprend : un rinçage à l'eau froide, un traitement avec NaOH 1% à 65°C pendant 10 min, un rinçage intermédiaire, un traitement avec HNO<sub>3</sub> 1 % à 65°C pendant 10 min et un rinçage final. Plusieurs combinaisons sont adoptées par les laiteries, en fonction de la nature de la souillure (microbienne et chimique) et du taux d'encrassement (**Malek, 2019**).

Les laiteries algériennes analysées utilisent un barème élevé (NaOH 2% à 80 °C pendant 10 à 20 min et HNO<sub>3</sub> 1% à 70°C pendant 10 min), qui ne permet, cependant, pas l'élimination totale du biofilm (**figure 12**) (**Malek, 2019**).



À gauche : segment de pré-pasteurisation      À droite : segment de post-pasteurisation

**Figure 12.** Exemples de surfaces mal nettoyées en industrie laitière (**Malek, 2019**).

**(Note :** les biofilms matures formés in situ sur des lames en inox placées à l'intérieur de conduites de lait pendant 7 jours et observées au microscope électronique à balayage environnemental (ESEM), après application du système de nettoyage (CIP) (**Malek, 2019**).

Les laiteries algériennes utilisent un CIP correct mais qui doit être optimisé et complété par une étape de désinfection. Une désinfection est parfois nécessaire en complément du CIP, pour éliminer les cellules résiduelles viables et éviter la régénération du



biofilm sur les surfaces nettoyées. Toute bactérie résiduelle laissée après le cycle de nettoyage peut potentiellement se sporuler et donc continuer à proliférer (**Parkar et al., 2004**).

Différentes stratégies de nettoyage pour contrôler la formation de biofilms de bacilles thermophiles sporulés. Les nettoyants ont été sélectionnés sur la base de leurs mécanismes d'action, à savoir :

- Le nettoyage alcalin, qui provoque la dissolution du matériel cellulaire et l'élimination des dépôts de calcium, par exemple la soude caustique et l'acide standard, et l'éliminateur (**Parkar et al., 2004**).
- Le nettoyage à base d'enzymes:
  - a. Les nettoyants à base de protéase tels que Paradigme, qui est un nettoyant à base d'enzymes combinant une activité protéolytique avec une action tensioactive, et Purafect, une sérine protéase.
  - b. Les agents à base de polysaccharidase tels que Purastar<sup>TM</sup>, une  $\alpha$ -amylase, Cellulase, une polysaccharidase et mutanolysine, un peptidoglycane hydrolase de paroi cellulaire (**Parkar et al., 2004**).
- Produits chimiques oxydants tels que l'hypochlorite de sodium, l'Halamid (une chloramine), l'Oxine (dioxyde de chlore) et le Perform (combinaison d'acide peracétique et de peroxyde d'hydrogène). Ce sont tous des pro-oxydants généraux qui génèrent des espèces réactives d'oxygène et/ou de chlore et qui déclenchent une cascade d'attaques oxydatives sur des fragments contenant des groupes bactériens -SH tels que des enzymes, et une attaque peroxydative sur les acides gras insaturés de la membrane (**Parkar et al., 2004**).
- Un chlorure d'ammonium quaternaire, tel que le Bactosolve, qui provoque la dégradation de la membrane cellulaire, suivie d'un efflux de potassium intracellulaire et enfin de dommages aux protéines cellulaires/acides nucléiques cellulaires (**Parkar et al., 2004**).
- Les détergents, tels que le Tween-80 (un polysorbate synthétique) et l'acide dobanique, ont des effets tensioactifs ; ils améliorent l'accès d'autres nettoyants aux biofilms en augmentant leur mouillabilité (**Parkar et al., 2004**).

## 6.2. Dissolution de la matrice du biofilm

Devant l'inefficacité des méthodes traditionnelles de nettoyage et de désinfection à lutter contre le biofilm, de nouvelles stratégies d'hygiène sont développées. Celle-ci sont basées sur l'attaque de la matrice organique et comprennent, notamment, l'utilisation des détergents enzymatiques. Ces derniers, en hydrolysant la matrice du biofilm, permettent aux

désinfectants d'atteindre plus facilement leurs cibles. L'accent est ainsi mis sur la détergence, en particulier le nettoyage alcalin, et son importance dans le décrochement du biofilm et la solubilisation de la matrice organique, en amont de la désinfection (Malek, 2019).

L'incorporation des enzymes dans les solutions de nettoyages utilisées dans le système CIP ou la combinaison de différents détergents alcalins ont amélioré l'efficacité du CIP dans l'élimination du biofilm. Le traitement pendant 1 min à 25°C par une préparation alcaline a permis d'enlever plus de 99% de la matrice du biofilm. Même le nettoyage enzymatique est amélioré par la solubilisation des enzymes dans des tampons alcalins contenant des tensioactifs. En outre, le nettoyage alcalin permet l'utilisation de produits désinfectants à des températures et à des concentrations non-corrosives (Malek, 2019).

Le nettoyage alcalin est en effet obligatoire en industrie laitière, tandis que le nettoyage acide est pratiqué occasionnellement dans certaines laiteries pour éviter la formation de la pierre de lait, « Milk stone », en présence de fortes concentrations de résidus minéraux. Toutefois, le nettoyage acide peut s'avérer indispensable contre les germes présentant une tolérance alcaline, et persistant sur les équipements (Malek, 2019).

### **6.3. Contrôle de la flore sporulée dans les lignes de production de lait pasteurisé**

Le contrôle des bacilles thermophiles et de leurs biofilms en industrie laitière repose sur le raccourcissement des cycles de production (6 à 8 h), l'augmentation de la fréquence du nettoyage, l'utilisation des désinfectants et la réduction de la surface dans les zones optimales de température (Malek, 2019).

Le régime de nettoyage proposé par Parkar *et al.*, 2004 (Na OH 2 % à 75 °C pendant 30 min et HNO<sub>3</sub> 1,8 % à 75 °C pendant 30 min) a permis l'élimination efficace des biofilms formés par ces bacilles (Malek, 2019).

### **6.4. Biocides naturels, voie potentielle d'amélioration du CIP**

L'élimination de la flore sporulée et du biofilm de l'environnement laitier nécessite une approche CIP améliorée capable de dissoudre la matrice du biofilm et une étape de désinfection efficace, permettant une meilleure éradication de la contamination résiduelle persistante. Pour lutter contre la résistance des microorganismes aux produits chimiques, des biocides naturels tels que les huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales sont largement étudiées pour leurs activités antimicrobiennes et antibiofilms (Malek, 2019).

# *Etude expérimentale*

# *Matériel et méthodes*

## **1. Objectif de travail**

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

## **2. Prélèvements**

Le schéma d'échantillonnage est variable selon le but de la recherche effectuée et selon la nature du produit. Dans le cas où un plan à 2 ou 3 classes est appliqué, chaque prélèvement doit être constitué au moins de 5 échantillons (n=5) (**Guiraud, 2012**).

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

- Le lait pasteurisé recombinaé à partir de pasteurisateurs.
- Le lait pasteurisé de vache à partir de pasteurisateurs.
- Le lait pasteurisé recombinaé en sachet.
- Le lait pasteurisé de vache en sachet.
- 10 ml du lait pasteurisé recombinaé en sachet est incubé à 55°C et pendant 24h, puis analysé à l'issue de ce délai.
- 10 ml du lait pasteurisé de vache en sachet est incubé à 55°C et pendant 24h, puis analysé à l'issue de ce délai.

En raison des conditions actuelles dans le monde dues à Covid-19, nous n'avons malheureusement pas pu faire ces prélèvements, à cause de ça nous avons adopté les prélèvements et les résultats déjà réalisés par des études précédentes (**Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013**) à partir des laiteries inconnues de la région de Tlemcen.

## **3. Transport des échantillons**

D'après **Batahri, 2015** : Les échantillons sont transportées dans une glacière à 4°C et sont analysés tout suite après leur réception au laboratoire pour que l'échantillon soit représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

## **4. Traitement des échantillons**

### **4.1. Préparation des dilutions décimales**

#### **• Les échantillons du lait de pasteurisateur**

D'après **Chouiti, 2013** : Une fois l'échantillon au laboratoire, près du bec bunsen, on ouvre le flacon stérile qui contient le lait à partir du pasteurisateur et on prend 1 ml de

l'échantillon par pipette gradué et on le verse dans des tubes en verre stérile qui contiennent 9 ml du TSE (**Annexe 1**). Puis on réalise des dilutions décimales jusqu'à la dilution  $10^{-3}$ .

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

D'après **Chouiti, 2013** : Près de la zone stériles, on essuie une extrémité du sachet avec un coton imbibé d'alcool, et par un couteau ou une anse de platine bien stérilisé, on coupe l'une des extrémités, une fois le sachet est ouvert on prend 1 ml par pipette stérile et on la verse dans un tube en verre stérile qui contiennent 9 ml du TSE pour faire des dilutions décimale jusqu'à la dilution  $10^{-3}$ .

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

D'après **Chouiti, 2013** : Après 24 h d'incubation le lait étant déjà coagulé, on procède à une agitation au vortex des tubes pour liquéfier le gel et réaliser des dilutions décimales par l'utilisation de diluant TSE.

#### **4.2. Ensemencement**

L'ensemencement des bacilles thermophiles s'effectue en surface sur le milieu TSA (**Annexe 2**) coulé dans des boîtes de pétri. Grâce à des micropipettes de 100  $\mu$ l on dépose 0.1 ml de la dernière dilution 1/1000 (tube n° 3) dans les boîtes de pétri préparée qui contient le milieu. On utilise des pipettes pasteurs en forme un râteau pour étaler uniformément cet inoculum sur la gélose. Les boîtes seront incubées à 55°C pendant 24 - 48h.

### **5. Identification**

D'après **Chouiti, 2013** : On doit examiner les isolats bactériens par la coloration de Gram, et celle de la spore pour la caractérisation morphologique et la production de catalase pour la confirmation de l'identification aux bacilles sporogènes aérobies.

#### **5.1. Caractères culturels**

La culture en boîte de pétri avec obtention de colonies séparées permette de déterminer la forme et la couleur de ces dernières. L'examen des colonies peut être effectué à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire ou d'une loupe compte-fils (**Guiraud, 2012**).

#### **5.2. Morphologie cellulaires**

##### **5.2.1. Coloration de Gram**

###### **❖ Principe général**

Sur le frottis bactérien se préparé, le premier colorant, le cristal violet oxalaté, va colorer en violet les bactéries, puis le lugol (solution iodo-iodurée) libère de l'iode qui va fixer le colorant précédent. Un complexe iode-cristal violet se forme ; il sera solubilisé par l'alcool à 95 °C lors de la phase de décoloration, uniquement pour les bactéries à Gram -.Le

deuxième colorant, dit de contraste, la safranine, va colorer en rose les bactéries à Gram- ; les bactéries à Gram +, non décolorées par l'alcool, ont conservé leur couleur violette. La division du monde bactérien en deux groupes (Gram + et Gram -) est principalement liée à une différence de structure chimique des parois cellulaires des bactéries (**Delarras, 2014**).

#### ❖ Mode opératoire

Le protocole est le suivant :

- Préparer un frottis d'un produit pathologique ou d'une culture bactérienne pure.
- Recouvrir le frottis de violet cristal oxalaté ; laisser agir 1 minute ; rincer à l'eau distillée.
- Verser du lugol et le laisser agir pendant 1 minute ; rincer à l'eau distillée.
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée.
- Recolorer avec de la safranine pendant 10 à 30 secondes ; rincer à l'eau distillée.
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen (**Delarras, 2014**).

La safranine peut être remplacée par de la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10 pendant 1 minute. Observer au microscope à l'objectif x 100 à immersion. Avec cette coloration double, les bactéries «Gram +» apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries «Gram-» sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras, 2014**).

#### 5.2.2. Recherche des spores

Réaliser un frottis de la culture bactérienne puis :

- Le recouvrir d'une solution aqueuse de vert malachite à 0,5% ;
- Chauffer pendant quelques minutes, sur une platine chauffante, jusqu'à émission de vapeurs ;
- Rajouter du colorant pendant le chauffage si nécessaire, sans jamais laisser évaporer complètement le colorant ;
- Laver à l'eau distillée;
- Colorer avec de la safranine, pendant 30 secondes (**Delarras, 2014**).

Les cellules végétatives apparaissent colorées en rouge, les spores en vert dans leurs sporanges rouges et les spores libres colorées en vert (**Delarras, 2014**).

#### 6. Conservation des souches

D'après **Chouiti, 2013** : Les souches isolées des bacilles thermophiles sont conservées dans des tubes à essai contenant de la (TSA) incliné. Les souches sontensemencées sur la pente des tubes par des stries, puis incubées à 55°C pendant 24h. Ensuite laissé sporuler pendant 3 jours dans l'étuve à 55 °C, pour être conservés à 4°C.

## **7. Caractères physiologiques**

### **7.1. Test de catalase**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage (**Delarras, 2014**).

#### **❖ Méthode**

Prendre une lame porte objet propre. Déposez sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose (**Delarras, 2014**).

#### **❖ Résultat**

Effectuer le test sur les souches à caractériser et observer. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase: test catalase + (**Delarras, 2014**).

### **7.2. Test d'hydrolyse de l'amidon (Activité amylolytique)**

L'amidon est un polysaccharide, polymère du glucose  $\alpha$ , constitué d'amylose et d'amylopectine. Cette recherche est réalisée sur une **gélose à l'amidon (Annexe 3)** (**Delarras, 2014**).

#### **❖ Ensemencement et incubation du milieu**

- Ensemencer en points les boites de gélose à l'amidon avec les souches à caractériser.
- Incuber à 55 °C pendant 1 à 5 jours (**Delarras, 2014**).

#### **❖ Lecture et interprétation du milieu**

L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour de chaque colonie (point d'ensemencement). L'observation est plus nette en inondant la surface du milieu avec du lugol (solution iodo-iodurée) (**Delarras, 2014**).

### **7.3. Test d'hydrolyse de la caséine (Activité protéolytique)**

La caséine, protéine du lait, peut être hydrolysée par certaines espèces bactériennes ; la recherche de l'activité caséolytique est notamment utile dans l'identification des *Bacillus*. Cette recherche est réalisée sur une **gélose au lait (Annexe 4)** (**Delarras, 2014**).

#### **❖ Ensemencement et incubation**

- Ensemencer en points avec les souches à tester.
- Incuber à la température adéquate (55 °C) pendant 1 à 8 jours (**Delarras, 2014**).

#### **❖ Lecture et interprétation du milieu**



Les zones d'éclaircissement du milieu autour des colonies traduisent un résultat caséinolyse positif (*Bacillus subtilis*...); l'absence de telles zones exprime un test caséinolyse négatif (Delarras, 2014).

#### **7.4. Test de tween 80 (Activité lipolytique)**

L'activité lipolytique des isolats lactiques a été recherchée sur le milieu gélose au **tween 80**. La lipolyse se manifeste par la formation d'une zone de précipitation visible autour de la colonie résultant de la formation de cristaux du sel de calcium de l'acide gras libéré (Belhamra, 2017).

Elle est réalisée sur milieu **TSA** à base de **tween 80** (Annexe 5), après préparation et autoclavage il est réparti en boîtes de pétri pour la solidification puisensemencé en une seule strie pour chaque souche. L'incubation se fait à 55°C pendant 24h. L'apparition d'un halo opaque autour des colonies exprime la présence d'une estérase (Chouiti, 2013).

### **8. Galerie API20 E**

#### **❖ Composition de la galerie**

La galerie API20 E est composée de 20 micro tubes (surmontés de cupules) contenant des substrats déshydratés, qui permettent de réaliser 21 tests biochimiques du métabolisme respiratoire, glucidique et protéique (Delarras, 2014).

#### **❖ Mode opératoire**

##### **a) Préparation de l'inoculum**

À partir d'une culture pure (de 18 à 24 heures), préparer une suspension bactérienne homogène dans une ampoule d'API suspension Medium d'API (5 ml). Un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif, peut également être utilisé pour préparer la suspension (Delarras, 2014).

##### **b) Noculation de la galerie**

Inoculer la galerie suivant le mode opératoire du fabricant, en notant que:

- Pour les tests CIT, VP, GEL, les tubes et les cupules doivent être remplis avec la suspension bactérienne.
- Pour les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S et URE, les cupules sont remplies d'huile de paraffine afin d'obtenir une anaérobiose (Delarras, 2014).

Incuber : pour les espèces thermophiles à 55 ± 2°C pendant 3h à 3h30, 6h à 6h30 et 24 ± 2 heures en surélevant légèrement la base des tubes (pour conserver toute production de gaz) (Delarras, 2014).

❖ **Lecture et interprétation de la galerie**

Deux cas se présentent:

- Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, relever sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.
- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test glucose) est inférieur à 3, incuber à nouveau la galerie  $24 \pm 2$  heures sans rajouter les réactifs (Delarras, 2014).

**9. Détermination de potentiel de formation de biofilms dans la microplaque de titration 96 puits**

❖ **Les microplaques de titration**

La technique des microplaques de titration au cristal violet, est une technique très utilisée, pour la formation de biofilms. C'est une technique colorimétrique basée sur le principe que le cristal violet se lie de manière proportionnelle à la biomasse du biofilm. En effet cette technique de coloration permet de visualiser les cellules qui s'attachent à la surface et se colorent en pourpre avec le cristal violet, alors que les surfaces abiotiques ne sont pas colorées (Malek, 2013).

❖ **Protocole**

La capacité des souches de bacilles thermophiles à former le biofilm est testée par la méthode de microplaque de titration 96 puits selon le protocole de (Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013; Sadiq *et al.*, 2017; Coleri-cihan *et al.*, 2017), procéder comme suit :

- La formation de biofilm est réalisé dans deux milieux de culture : le milieu TSB (Annexe 6) et le lait écrémé.
- Dans les puits des microplaques de titration 96 puits stériles, 100  $\mu$ l de TSB ou de lait écrémé et 80  $\mu$ l de suspension bactérienne préparé dans l'eau physiologique est ajusté à une DO (densité optique) de 0.6-0.8 sont introduit à la première rangée constitue est remplie par le milieu nonensemencé et constitue le témoin.
- Pour chaque souche, au moins 5 puits ont été remplis de TSB.
- Les plaques sont incubées à différentes températures 30°C, 42°C, 55°C pendant 24h.
- Après incubation, les plaques sont d'abord vidés avec la micropipette.
- Rinçage à l'eau distillée stérile trois fois pour éliminer les cellules non adhérentes (toutes les cellules planctoniques).
- Laisser sécher 10 à 15 min.

- Les cellules adhérentes des puits ont été fixées avec 200 µl de méthanol à 95%, incubées à 37°C pendant 15 min, puis les plaques ont été vidées et séchées à température ambiante pendant 15 min.
- Remplir les puits avec 200 µl de cristal violet à 0.5 % qui joue un rôle dans la révélation et la fixation de biofilm. Le temps de coloration est 20 min.
- Rinçage à l'eau distillée stérile 3 fois.
- Séchage des plaques en positions renversé.

❖ **La lecture des plaques**

- Avant la mesure de la DO la spectrophotométrie munis d'un lecteur de microplaque 630 nm les puits sont remplis avec une solution dissolvante constituée d'éthanol et d'acide acétique glacial dilué dans de l'eau distillé.

# *Résultats et discussion*

**1. Prélèvements des souches****❖ Les souches isolées d'après Chouiti, 2013**

Les souches prélevées à partir de différents lots des laits pasteurisés (recombiné et de vache) ont mentionnés dans **le tableau 7**.

**Tableau 7.** Répartition des souches selon leur origine (**Chouiti, 2013**).

<b>Souches</b>	<b>Origine</b>
<b>S1</b>	Lait pasteurisé recombinaé incubé
<b>S2</b>	Lait pasteurisé à partir de pasteurisateur
<b>S3</b>	Lait pasteurisé du mélange
<b>S4</b>	Lait pasteurisé recombinaé
<b>S5</b>	Lait pasteurisé de vache
<b>S6</b>	Lait pasteurisé à partir de pasteurisateur
<b>S7</b>	Lait pasteurisé du mélange
<b>S8</b>	Lait pasteurisé de vache incubé
<b>S9</b>	Lait pasteurisé recombinaé
<b>S10</b>	Lait pasteurisé incubé

**❖ Les souches isolées d'après Benyahia, 2013**

Les souches prélevées à partir des équipements laitiers ont été isolées lors des différents prélèvements réalisées avant et après le CIP, comme montre **le tableau 8**.

**Tableau 8.** Répartition des souches selon leur origine (**Benyahia, 2013**).

<b>Souches</b>	<b>Origine</b>	<b>Date de prélèvement</b>
<b>S1</b>	Tank avant CIP	14/05/2013
<b>S2</b>	Tank après CIP	27/05/2013
<b>S3</b>	Pasteurisateur	05/05/2013
<b>S4</b>	Tank après CIP	05/05/2013
<b>S5</b>	Tuyauterie (coude)	14/05/2013
<b>S6</b>	Tank après CIP	14/05/2013
<b>S7</b>	Tank avant CIP	30/05/2013
<b>S8</b>	Canalisation (entrée coude)	30/05/2013
<b>S9</b>	Canalisation (sortie coude)	30/05/2013

---

---

S10	Tank de préparation	05/05/2013
-----	---------------------	------------

### ❖ Les souches isolées d'après Bensafi, 2013

Les souches prélevées à partir de lait cru et de poudre de lait ont été isolées de six prélèvements par des cuves de collectes et des sachets de poudre.

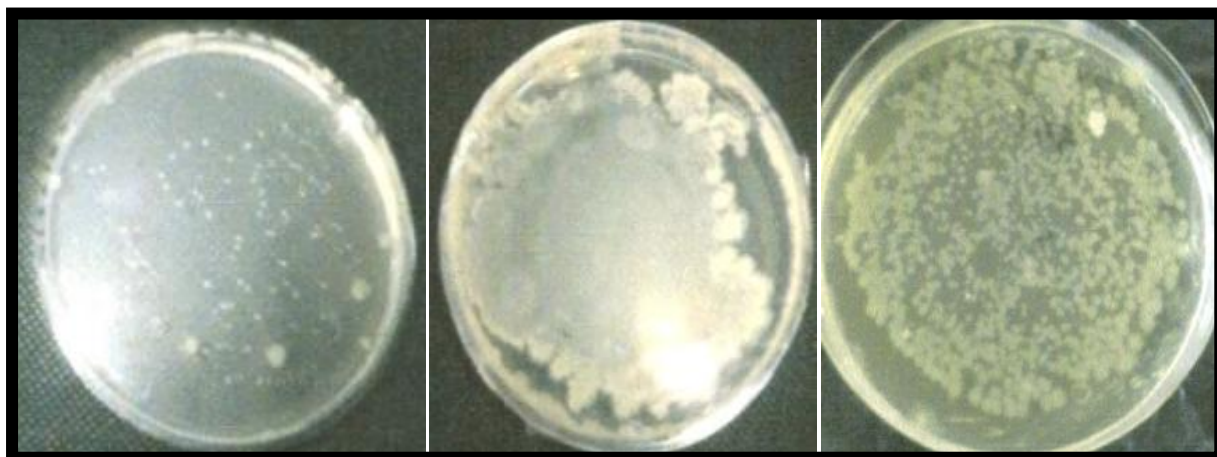
**Tableau 9.** Répartition des souches selon leur origine (**Bensafi, 2013**).

Souches	Origines	Date de prélèvements
S1	Poudre de lait	14-05-2013
S2	Poudre de lait	27-05-2013
S3	Lait de vache	30-04-2013
S4	Lait de vache	27-05-2013
S5	Poudre de lait	27-05-2013
S6	Poudre de lait	27-05-2013
S7	Lait de vache	05-05-2013
S8	Poudre de lait	14-05-2013
S9	Lait de vache	14-05-2013
S10	Lait de vache	14-05-2013

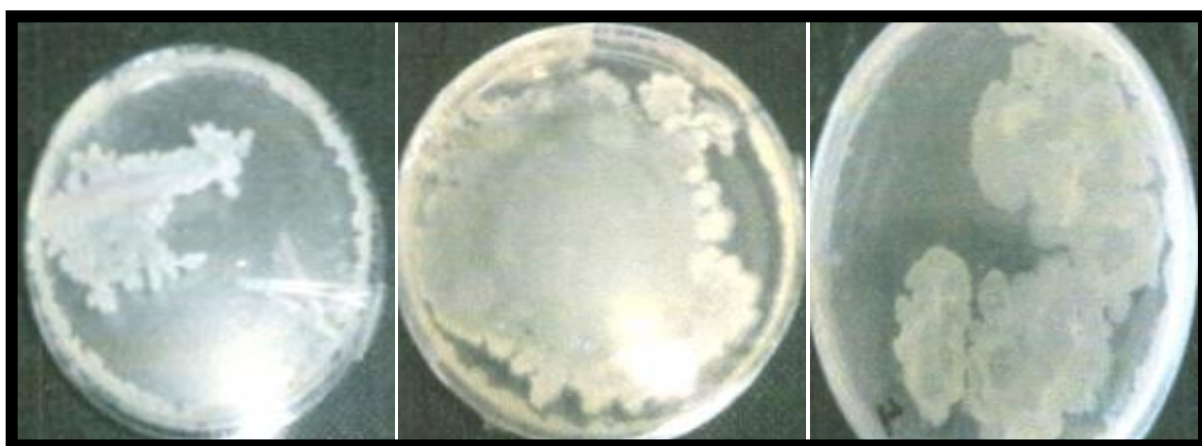
## 2. Détermination des caractéristiques phénotypiques

### 2.1. Caractéristiques cultureux

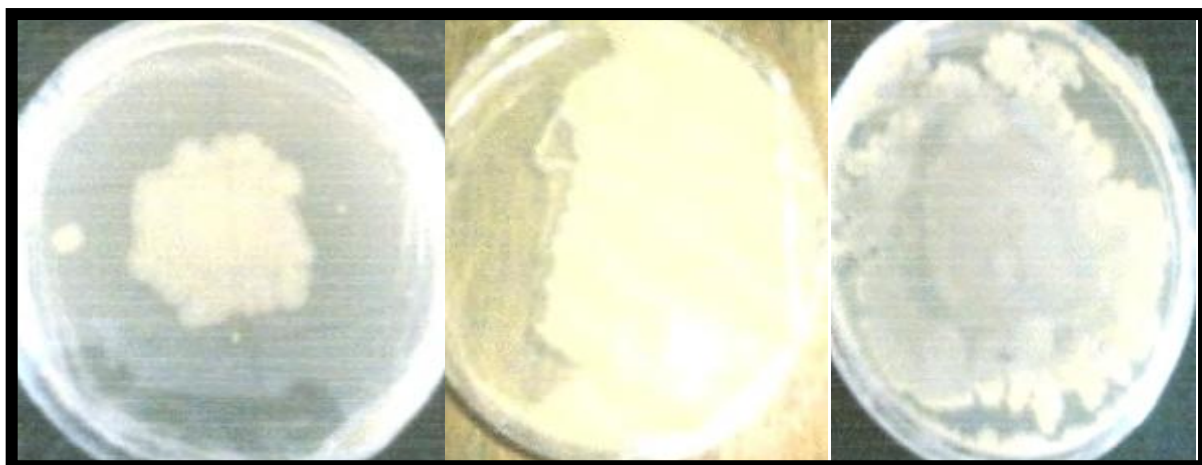
D'après (**Chouiti, 2013**), l'aspect macroscopique obtenu montre des colonies différentes qui forment de grosses colonies envahissantes et irrégulières (dentelées), légèrement convexes, ainsi des colonies moyennes à bord circulaire crémeuse (**Figure 13**). Par contre l'aspect des souches d'après (**Benyahia, 2013**) a permis de révéler des colonies de plusieurs formes : lisse, visqueuse, dentelée à bord irrégulier de couleur crème (**Figure 14**). En outre d'après (**Bensafi, 2013**), l'aspect des souches a montré leur capacité de former des colonies en plusieurs formes : lisse, visqueuse, sèches, de bord régulier et irrégulier, rhizoïde, envahissante, dentelé, de couleur opaque et transparente (**Figure 15**).



**Figure 13.** Aspect des colonies sur TSA (Chouiti, 2013).



**Figure 14.** Les photos montrant différent aspect macroscopiques (Benyahia, 2013).



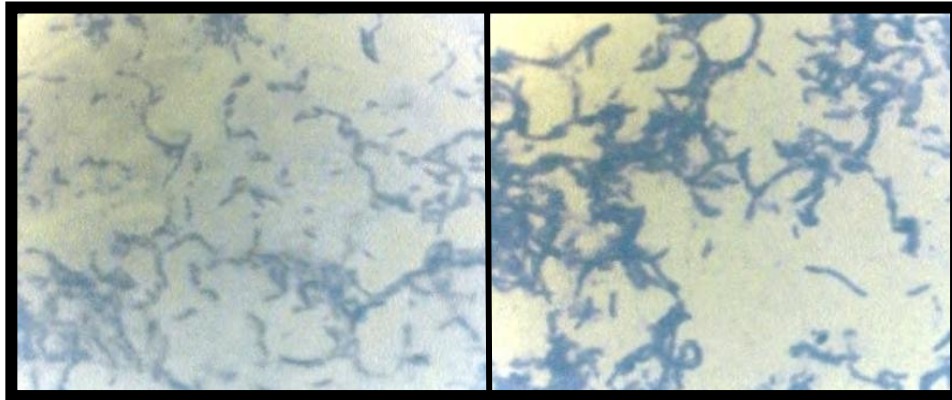
**Figure 15.** Aspect des colonies sur la gélose TSA (Bensafi, 2013).

## 2.2. Caractères morphologiques

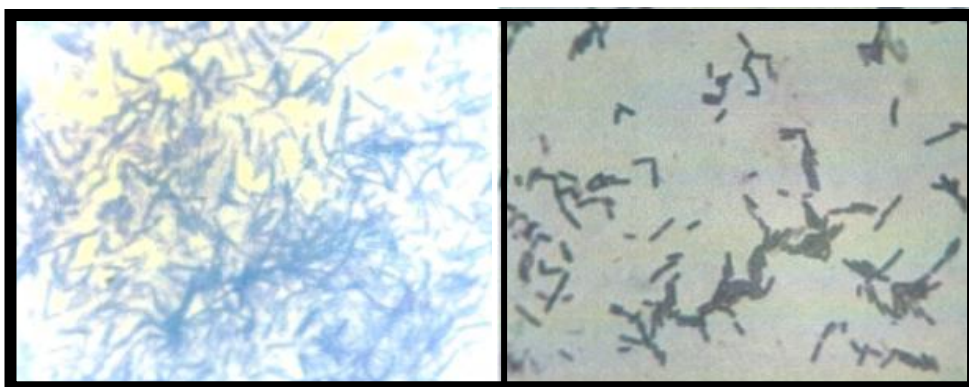
### 2.2.1. Coloration de Gram

D'après (Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013): La coloration de Gram est en violet, c'est-à-dire à Gram positif de toutes les souches isolées de différents échantillons et sont de forme des bacilles ou bien bâtonnets, isolés ou arrangées en chaînes (Figure 16; 17; 18).

Les bactéries à gram positif possèdent une paroi de structure plus épaisse et de composition chimique particulière riche en peptidoglycane, composant qui empêche l'alcool d'emporter le violet de gentiane, en effet, la paroi s'interpose comme une barrière pour empêcher l'accès du cytoplasme (sur lequel se fixerait le colorant).

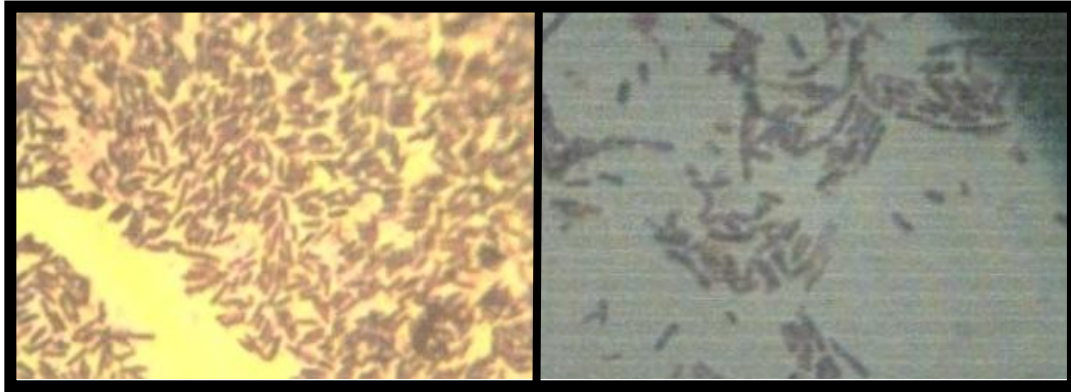


**Figure 16.** Observation au microscope optique de frottis bactérien après coloration de Gram (X100) (Chouiti, 2013).



**Figure 17.** Les photos présent avec microscope optique d'une souche isolée (G x 100) (Benyahia, 2013).





**Figure 18.** Les photos présent au microscope optique ( $G \times 100$ ) (**Bensafi, 2013**).

### 2.2.2. Recherche des spores

Selon l'observation des (**Figures 19; 20; 21**) qui ont réalisé par (**Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013**) on montre que :toutes les souches sont capables de former des endospores ovale centrale ou sub-terminale non déformante, d'autre sont des bacilles fins, long à spore terminale déformante (en tête d'épingle) ou bien des bacilles fins et longs à spore ovale terminale déformant le sporange (en raquette de tennis), les traits généraux du genre *Bacillus*.



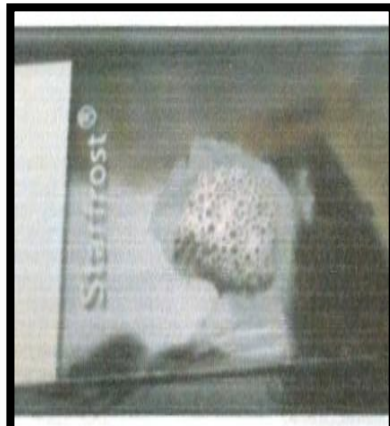
<p><b>Figure 19.</b> Observation au microscope optique de la spore après coloration de violet de gentiane (X 100) (<b>Chouiti, 2013</b>).</p>	<p><b>Figure 20.</b> Observation microscopique d'une spore au grossissement (x 100) (<b>Benyahia, 2013</b>).</p>	<p><b>Figure 21.</b> Observation microscopique d'une spore centrale (<b>Bensafi, 2013</b>).</p>

Les bactéries appartenant à certains genres, notamment le genre *Bacillus*, *Geobacillus*... Si on place les bactéries dans des conditions défavorables de vie, les bacilles à gram positif forment des spores très résistantes avec conservation de toutes les aptitudes génétiquement déterminées. Si on place les spores dans des conditions favorables, elles retournent à l'état de bactéries fonctionnelles.

### 3. Caractères physiologiques

#### 3.1. Test de catalase

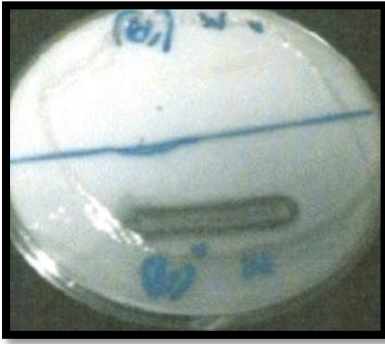

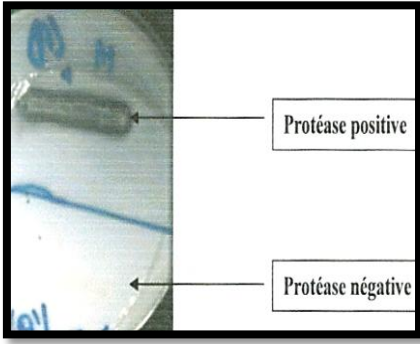
Toutes les souches étudiées par (Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013) : Ont un catalase positif (Figure 22; 23; 24), ce qui se traduit par la formation de bulles de gaz. Ces résultats confirment l'identité des bacilles thermophiles qui font partie de la flore sporogone aérobie.

		
<b>Figure 22.</b> Photo d'une souche catalase positif (Chouiti, 2013).	<b>Figure 23.</b> Photo d'une souche a catalase positive (Benyahia, 2013).	<b>Figure 24.</b> Une souche bactérienne de la catalase positif (Bensafi, 2013).

La catalase décompose l'eau oxygénée selon la réaction :  $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ . C'est enzyme sert de système de sécurité en neutralisant l'excès de  $H_2O_2$  puisque ce produit est toxique et tue les bactéries. La discrimination entre les bactéries à gram positif se fait par la recherche de la catalase.


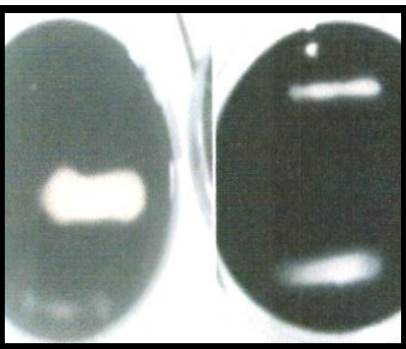
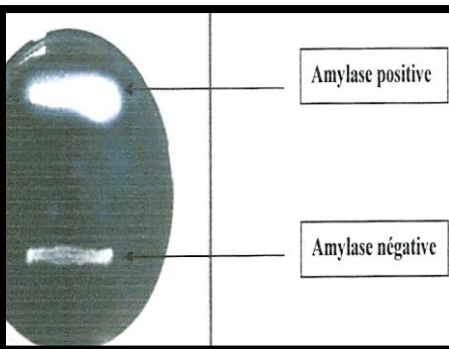
#### 3.1. Test d'hydrolyse de la caséine (Activité protéolytique)

La révélation de l'activité protéolytique sur la gélose au lait a donné des zones d'éclaircissement autour de la culture ce qui traduit la présence de la protéase (Figures 25; 26; 27). D'après (Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013) : La majorité des souches testées possèdent la caséinase (protéase).

		
<p><b>Figure 25.</b> Activité protéolytiques des souches sur gélose au lait (Chouiti, 2013).</p>	<p><b>Figure 26.</b> Photo montrant la production de protéase sur la gélose au lait (Benyahia, 2013).</p>	<p><b>Figure 27.</b> Activité protéolytiques des souches sur gélose au lait (Bensafi, 2013).</p>

### 3.2. Test d'hydrolyse de l'amidon (Activité amylolytique)

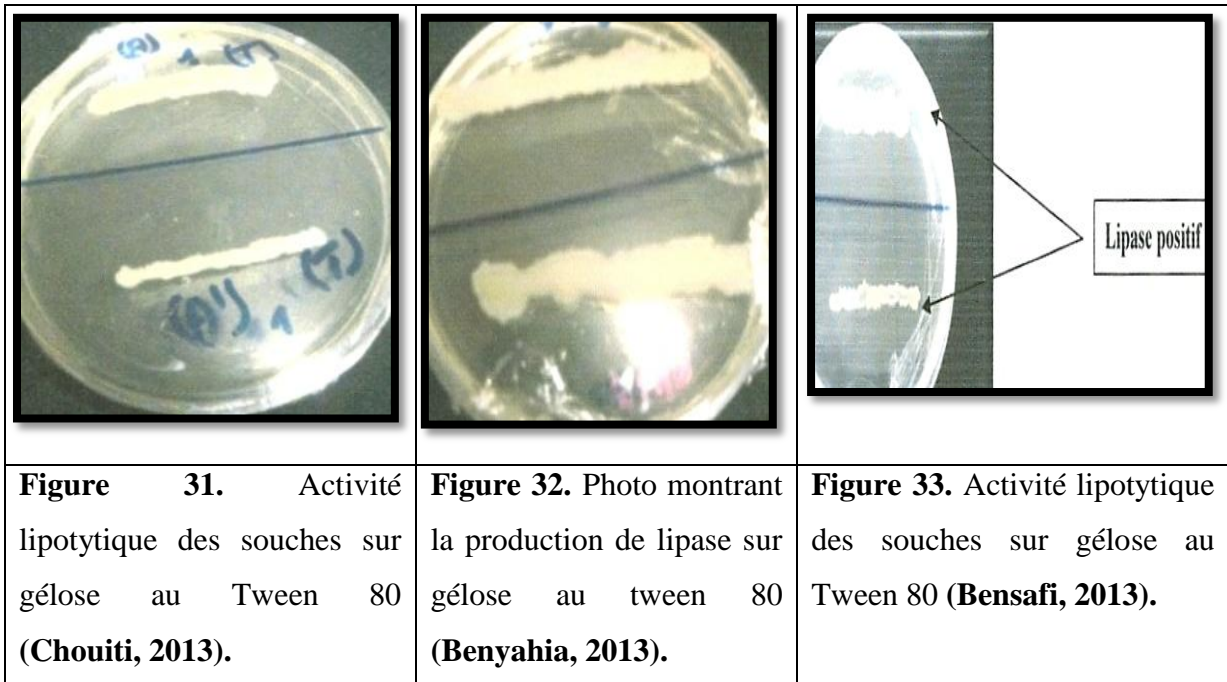
La révélation de la production d'amylase par le lugol sur la gélose à l'amidon a permis de voir un halo d'éclaircissement (zone claire) autour des colonies, pas de coloration noire qui indique l'absence d'amidon donc le test est positif (Figures 28; 29; 30), correspond aux résultats des tests réalisés par (Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013).

		
<p><b>Figure 28.</b> Activité amylolytique des souches sur gélose à l'amidon (Chouiti, 2013).</p>	<p><b>Figure 29.</b> Activité amylolytique des souches sur gélose à l'amidon (Benyahia, 2013).</p>	<p><b>Figure 30.</b> Activité amylolytique sur gélose à l'amidon (Bensafi, 2013).</p>

### 3.3. Test de tween 80 (Activité lipolytique)

L'activité lipolytique se traduit par la formation d'une zone d'opacification autour de la strie d'ensemencement. La majorité des résultats des tests réalisés par (Chouiti, 2013;

**Benyahia, 2013; Bensafi, 2013**), possèdent la lipase (estérase) et sont présentés respectivement dans les **figures 31; 32; 33**.



Les résultats obtenus par (**Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013**) concernant les activités hydrolytiques (activité protéolytique, amylolytique et lipolytique) des isolats sont présentés dans les **tableaux (10; 11; 12)**.

**Tableau 10.** Comparaison des activités enzymatiques des souches de bacilles thermophiles (**Chouiti, 2013**).

Souches	Caséine	Tween 80	Amidon
<b>S1</b>	+	+	+
<b>S2</b>	-	+	+
<b>S3</b>	+	+	+
<b>S4</b>	+	+	-
<b>S5</b>	+	+	+
<b>S6</b>	+	+	+
<b>S7</b>	+	+	-
<b>S8</b>	+	+	-
<b>S9</b>	+	+	-
<b>S10</b>	+	+	-

**Tableau 11.** Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires des isolats (**Benyahia, 2013**).

Souches	Amidon	Tween 80	Caséine
S1	-	+	+
S2	++	+	+
S3	+	+	+
S4	+++	+	+
S5	-	+	+
S6	+	+	+
S7	+	+	+
S8	+	-	+
S9	-	+	-
S10	+	+	-

**Tableau 12.** Tableau résume les activités enzymatiques (**Bensafi, 2013**).

Souches	Activité protéolytique	Activité amylolytique	Activité lipolytique
S1	+	+	+
S2	+	-	+
S3	-	+	+
S4	+	+	+
S5	+	+	+
S6	+	+	+
S7	+	+	+
S8	+	-	+
S9	-	+	+
S10	+	+	+

Selon les **tableaux (10; 11; 12)**. Il est intéressant de remarquer que :

Pour l'activité protéolytique toutes les souches testées par (**Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013**) produisent des protéases, sauf deux souches testées par (**Benyahia, 2013; Bensafi, 2013**) et une seule souche testée par (**Chouiti, 2013**) ont une activité caséolytique négative. Concernant l'activité amylolytique toutes les souches testées par (**Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013**) produisent des amylases à l'exception de cinq souches testées par (**Chouiti, 2013**), trois souches par (**Benyahia, 2013**) et deux souches par (**Bensafi, 2013**) ne produisent pas l'amylase. Pour l'activité lipolytique toutes les souches testées par (**Chouiti, 2013; Bensafi, 2013**) produisent des estérases (lipases), alors que toutes les souches testées par (**Benyahia, 2013**) produisent des estérases à l'exception d'une souche qu'été estérase négatif.

La caractérisation des isolats sélectionnés a indiqué que la plupart des souches sélectionnées produisaient différentes enzymes (protéases, lipases et amylases), ce qui est préoccupant en hygiène alimentaire en raison de leurs activités hydrolytiques sur les composants alimentaires. Il est bien connu que dans le lait pasteurisé, ces enzymes provoquent une dégradation des protéines et des graisses au cours du stockage et produisent des arômes indésirables (Malek *et al.*, 2012).

**4. Caractéristique biochimique**

❖ **La galerie API 20 E**

Les 12 premiers tests de la galerie API 20 E sont utilisés pour l’identification au genre *Bacillus* et autres genres proches. La fermentation des sucres par ces bactéries est étudiée en utilisant la galerie API 50 CH (Batahri, 2015), à cause de manque de matériel on utilise seulement la galerie API 20 E. Sur cette base on détermine les caractères des souches comme suit :

D’après (Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013) : Les résultats des différents caractères biochimiques des souches par la galerie sont résumés dans les tableaux (13; 14; 15).

**Tableau 13.** Détermination des profils biochimiques des souches par galeries API 20E (Chouiti, 2013).

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

**Tableau 14.** Résultat de l'identification par galerie API 20 E (**Benyahia, 2013**).

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

**Tableau 15.** Les résultats des tests biochimiques des souches (**Bensafi, 2013**).

SOUCHES	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
S6	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
S7	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
S8	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+

Les dix souches de (**Chouiti, 2013**) se répartissent normalement dans 9 biotypes mais elle mentionnée seulement 8 biotypes dans le **tableau 16**. Ces biotypes comprennent : deux souches (5; 6) pour le première biotype et une seule souche (1; 2; 3; 4; 7; 8; 9; 10) pour chaqu'un des autres biotypes. Par contre les dix souches de (**Benyahia, 2013**) se répartissent dans 5 biotypes comprennent : deux souches (1; 2) pour le première, trois souches (3; 4; 5) pour le deuxième, pour le 3<sup>ème</sup> biotype deux souches (6; 7) et le 4<sup>ème</sup> biotype aussi deux souches (8; 10), ainsi que une seule souche (9) pour le 5<sup>ème</sup>. En outre les dix souches de (**Bensafi, 2013**) se répartissent dans quatre biotypes comprennent : trois souches (1; 2; 3) pour

le première, quatre (5; 6; 8; 10) pour le 2<sup>ème</sup>, une seule souche (7) pour le 3<sup>ème</sup> et deux souches (4; 9) pour le 4<sup>ème</sup>.

Selon le **tableau 13** de (Chouiti, 2013) : Les deux souches (5 ; 6) : possèdent la β-galactosidase, arginine dihydrolase, utilisent le citrate comme source de carbone et produisent l'acétoïne ainsi possèdent la gélatinase et nitrate réductase (**Figure 34**). Les souches 5 et 6 forment un biotype (1) identique c'est-à-dire les même caractères biochimiques, elles donnent une orientation vers les espèces *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium* (**Tableau 16**).



**Figure 34.** Photo de la galerie API 20 E du biotype 1 (Chouiti, 2013).

Par contre la souche (1; 2) qui sont dans le biotype 2 et 3 respectivement : possèdent la gélatinase et nitrate réductase, pour la souche 3 possèdent la β-galactosidase, arginine dihydrolase, utilisent le citrate comme source de carbone ainsi possède l'uréase, la gélatinase et nitrate réductase.

Les deux souches (4; 7) qui sont dans le biotype 5 et 6 respectivement : possèdent la β-galactosidase, arginine dihydrolase, produisent l'acétoïne ainsi possèdent la gélatinase et réduisent les nitrates

Pour les souches (9; 10) possèdent la β-galactosidase, arginine dihydrolase, utilisent le citrate comme source de carbone, ainsi possèdent la gélatinase et nitrate réductase mais la souche 10 dans les résultats ne complète pas son orientation par API web pour voir les espèces. La souche 8 qui reste malheureusement ne possède pas une lecture de sa galerie dans les résultats de (Chouiti, 2013), mais son orientation est complète dans le **Tableau 16**.

**Tableau 16.** Les différents biotypes et orientation de l'identification taxonomique des bacilles thermophiles (Chouiti, 2013).

Biotypes	Nombre de souche	Orientation par API web
1	5 ; 6	<i>Bacillus licheniformis</i> / <i>Bacillus subtilis</i> / <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>Bacillus megaterium</i>
2	1	<i>Brevibacillus choshinensis</i> / <i>Brevibacilluscentrosporus</i> / <i>Brevibacillus brevis</i> / <i>Bacillus firmus</i> / <i>Bacillus sphaericus</i> /



		<i>Bacillus fusiformis</i> / <i>Bacillus badius</i> / <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<b>3</b>	<b>2</b>	<i>Bacillus smithii</i> / <i>Geobacillus thermoglucosidiasus</i> / <i>Brevibacillus agri</i> / <i>Bacillus firmus</i>
<b>4</b>	<b>3</b>	<i>Bacillus lentus</i> / <i>Brevibacillus choshinensis</i> / <i>Brevibacillus centrosporus</i> / <i>Brevibacillus brevis</i> / <i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i>
<b>5</b>	<b>4</b>	<i>Bacillus megaterium</i> / <i>Bacillus firmus</i> / <i>Brevibacillus choshinensis</i> / <i>Brevibacillus centrosporus</i> / <i>Brevibacillus brevis</i> / <i>Bacillus licheniformis</i>
<b>6</b>	<b>7</b>	<i>Bacillus licheniformis</i> / <i>Bacillus subtilis</i> / <i>Bacillus megaterium</i> / <i>Bacillus pimus</i>
<b>7</b>	<b>8</b>	<i>Bacillus lentus</i> / <i>Geobacillus thermoglucosidiasus</i> / <i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i>
<b>8</b>	<b>9</b>	<i>Brevibacillus choshinensis</i> / <i>Brevibacillus centrosporus</i> / <i>Brevibacillus brevis</i> / <i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i>

Selon les résultats de (Benyahia, 2013) (Tableau 14). Les deux souches (1; 2) dans le biotype 1 possèdent l'arginine dihydrolase, la gélatinase et nitrate réductase (Figure 35).



**Figure 35.** Photo montrant une galerie API 20 E de biotype 1 (Benyahia, 2013).

Les souches (3; 4; 5) de biotype 2 possèdent la  $\beta$ -galactosidase, arginine dihydrolase, la gélatinase et le nitrate réductase (Figure 36).



**Figure 36.** Photo montrant une galerie API 20 E de biotype 2 (Benyahia, 2013).

Pour les souches (6; 7) qui sont dans le biotype 3 possèdent la  $\beta$ -galactosidase, l'arginine dihydrolase, la gélatinase, le nitrate réductase et produisent l'acétoïne (Figure 37).



Figure 37. Photo montrant une galerie API 20 E de biotype 3 (Benyahia, 2013).

Concernant les souches (8; 10) dans le biotype 4 produisent l'acétoïne et réduisent les nitrates. Enfin la souche 9 de biotype 5 possède le nitrate réductase (Tableau 17).

Tableau 17. Identification présomptive (Benyahia, 2013).

Biotypes	Souches	Orientation de logiciel
1	1 ; 2	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
2	3 ; 4 ; 5	<i>Bacillus licheniformis</i>
3	6 ; 7	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Brevibacillus laterosporus</i>
4	8 ; 10	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
5	9	<i>Bacillus firmus</i>

Selon les tableaux (15; 18) de (Bensafi, 2013) : Les trois souches (1; 2; 3) dans le biotype 1 possèdent la gélatinase et le nitrate réductase (Figure 38).



Figure 38. Photo de la galerie API 20 E du biotype 1 (Bensafi, 2013).

Les souches (5; 6; 8; 10) qui sont dans le biotype 2 possèdent la  $\beta$ -galactosidase, arginine dihydrolase, la gélatinase, le nitrate réductase et utilisent le citrate comme source de carbone la gélatinase, réduisent les nitrates (Figure 39).

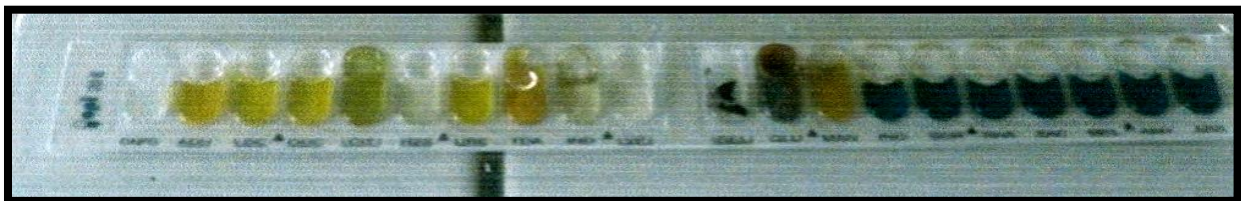


Figure 39. Photo de la galerie API 20 E du biotype 2 (Bensafi, 2013).

Par contre la souche 7 dans le biotype 3 possède la  $\beta$ -galactosidase, l'arginine dihydrolase, l'uréase et le nitrate réductase (**Figure 40**), en outre les souches (4; 9) dans le biotype 4 réduisent les nitrates (**Figure 41**).



**Figure 40.** Photo de la galerie API 20 E du biotype 3 (Bensafi, 2013).



**Figure 41.** Photo de la galerie API 20 E du biotype 4 (Bensafi, 2013).

**Tableau 18.** Tableau récapitulatif des biotypes (Bensafi, 2013).

Biotypes	Souches	Orientation dans logiciel
1	1 ; 2 ; 3	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
2	5 ; 6 ; 8 ; 10	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Virgibacillus pantothenicus</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus megaterium</i>
3	7	<i>Brevibacillus choshinensis</i> <i>Brevibacillus centrosporus</i> <i>Brevibacillus brevis</i> <i>Bacillus sphaericus</i> <i>Bacillus fusiformis</i> <i>Bacillus badius</i> <i>Bacillus firmus</i>
4	4 ; 9	<i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i> <i>Brevibacillus choshinensis</i> <i>Brevibacillus centrosporus</i> <i>Brevibacillus brevis</i> <i>Brevibacillus laterosporus</i>

## 5. Détermination du potentiel de formation de biofilm

D'après (Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013) : Le taux de formation de biofilm par les souches thermophiles à trois températures (30°C; 42°C; 55°C) et sur deux

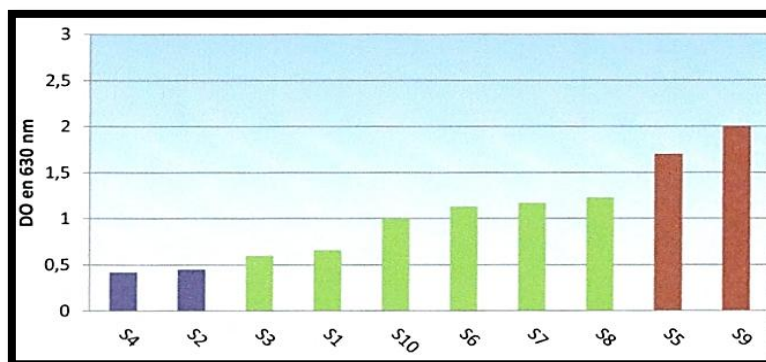
milieux différent (TSB et lait écrémé) est obtenu par la mesure des DO à 630 nm au lecteur des microplaques et la valeur seuil égale à une DO de l'ordre de 0,5 est définie pour les producteurs de biofilm séparés des non- producteurs de biofilm. Sur cette base nous avons défini les classes suivantes :

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

#### **Sur le milieu de culture TSB**

Les résultats de (Chouiti, 2013) correspondant sont repartis dans les **figures (42; 43; 44)**.

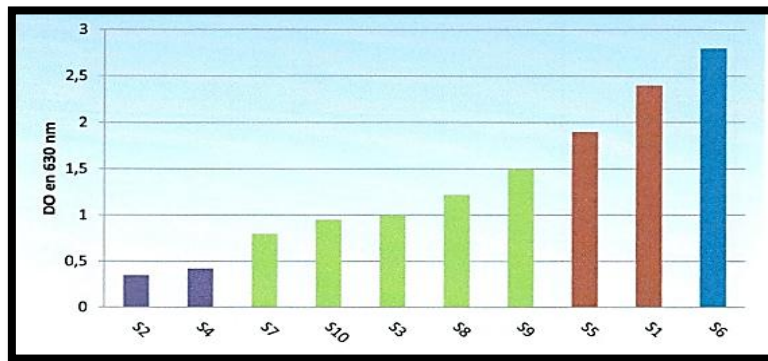
**À température 30 °C** : Les souches se répartissent en trois catégories, la première comprend deux souches : (2; 4) dont les DO de formation des biofilms sont < 0,5, elles sont un pouvoir d'adhésion faible, la deuxième comprend six souches : (3; 1; 10; 6; 7; 8) qui ont des DO inférieur à 1.5, elles peuvent être considérée comme des producteurs moyens de biofilm. Par contre la troisième comprend deux souches : (5; 9) dont les DO de formation de biofilm sont supérieur à 1.5 ce et donc elles sont fortement producteur de biofilm (**Figure 42**).



**Figure 42.** Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 30°C (Chouiti, 2013).

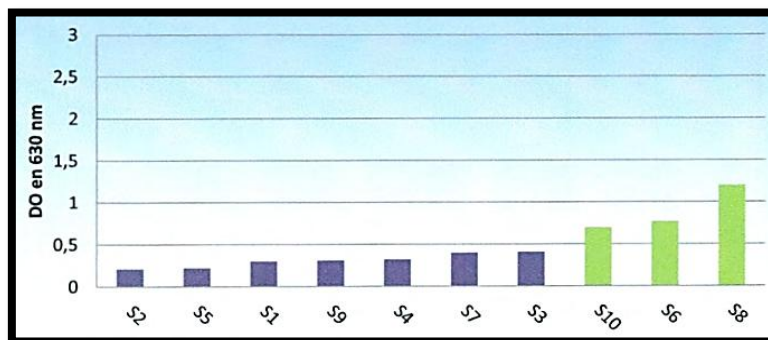
**À température 42 °C** : Les souches sont regroupée en quatre classes, la première comprend deux souches : (2; 4) dont les DO de formation des biofilms sont < 0,5, elles sont faiblement productrices de biofilm, la deuxième comprend cinq souches (7; 10; 3; 8; 9) qui ont des DO comprises entre 1 et 1.5 et peuvent être considérée comme moyennement productrice du biofilm. Tandis que la troisième classe : comprend deux souches (5 ; 1) dont les DO de formation de biofilm sont entre 1,5 < DO < 2,5 sont considérés comme fortement productrice de biofilm. La quatrième classe comprend une seul souche (6) représenté la DO

supérieur à 2.5 et donc elle peut la considérer comme une hyper productrice de biofilm (Figure 43).



**Figure 43.** Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 42°C (Chouiti, 2013).

À température 55 °C : Les souches se répartissent en deux catégories, l'une comprend sept souches (2; 5; 1; 9; 4; 7; 3) qui ont des DO < 0,5 elles ont montré que ce sont des faiblement productrices de biofilm. L'autre catégorie comprend trois souches (10; 6; 8) ont des DO presque de 0.77 qui indiquent l'augmentation de production de biofilm dont jusqu'à DO >1 chez la souche (8) (Figure 44).



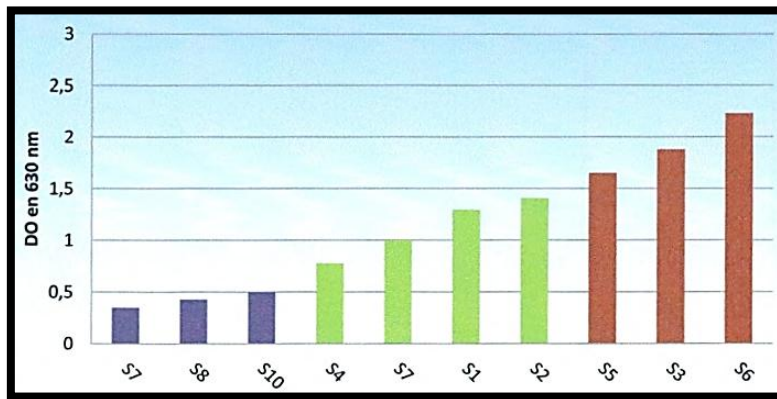
**Figure 44.** Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 55°C (Chouiti, 2013).

#### ✚ Sur le lait écrémé

Les résultats de (Chouiti, 2013) correspondant sont répartis dans les figures (45; 46; 47).

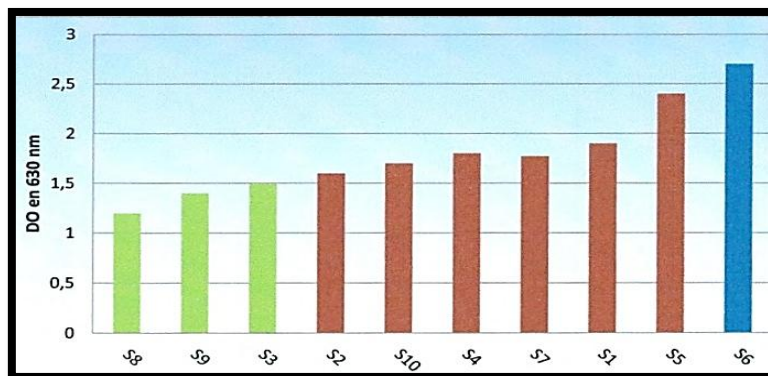
À température 30 °C : Les souches sont regroupées en trois catégories, la première comprend trois souches (7; 8; 10), elles représentent des DO < 0,5 qui indiquent leurs productions faibles des biofilms, la deuxième comprend quatre souches (4; 7; 1; 2) qui ont des DO de formation de biofilm entre 0,5 < DO < 1,5 preuve de leur production moyenne de

biofilm. Tandis que la troisième comprend trois souches (5; 3; 6) dont les DO de formation de biofilm sont supérieur à 1.5 qui présentent une bonne formation de biofilm (**Figure 45**).



**Figure 45.** Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé à 30°C (Chouiti, 2013).

**À température 42 °C :** Les souches se répartissent en trois catégories, la première comprend trois souches (8; 9; 3) dont les DO de formation des biofilms sont entre  $0,5 < DO \leq 1,5$  et elles considèrent comme moyennement productrice du biofilm, la deuxième comprend six souches (2; 10; 4; 7; 1; 5) qui ont des DO comprises entre  $1,5 < DO < 2,5$  donc elles sont fortement productrice de biofilm. Par contre la troisième catégorie comprend une seule souche (6) a un DO supérieur à 2.5 donc elle peut la considère comme une hyper productrice de biofilm (**Figure 46**).



**Figure 46.** Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé à 42°C (Chouiti, 2013).

**À température 55 °C :** Les souches se répartissent en trois catégories, la première comprend deux souches (4; 8) qui ont des  $DO \leq 0,5$ , elles sont donc faiblement productrice du biofilm, la deuxième comprend quatre souches (2; 9; 3; 1) dont les DO de formation des biofilms sont entre  $0,5 < DO \leq 1,5$  et elles considèrent comme moyennement productrice du biofilm. La dernière catégorie comprend quatre souches (10; 7; 5; 6) dont les DO de

formation de biofilm sont entre  $1,5 < DO < 2,5$  elles sont fortement productrice de biofilm (Figure 47).

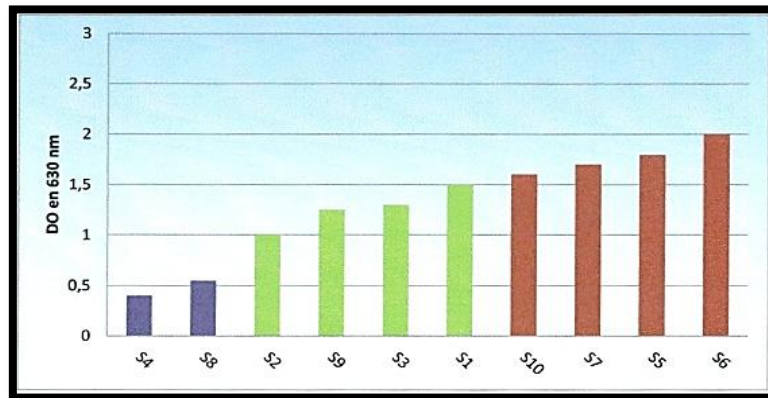


Figure 47. Mesure de la formation de biofilm dans le lait écrémé 55°C (Chouiti, 2013).

#### Sur le milieu de culture TSB

Les résultats de (Benyahia, 2013) correspondant sont repartis dans les figures (48; 49; 50).

À température 30 °C : Les souches se répartissent en 3 catégories, la première comprend six souches (9; 2; 3; 7; 1; 6) dont les DO de formation de biofilm sont  $< 0.5$ , ce qui indique un faible pouvoir de production de biofilm. Les deux souches de la deuxième catégorie (8; 5) ont des DO comprises entre 0.5 et 1, et peuvent être considérée comme des producteurs moyens de biofilm et la dernière catégorie comprenant la souche (4) dont les DO de formation de biofilm sont supérieur à 1.5 ce et donc elles sont fortement producteur de biofilm (Figure 48).

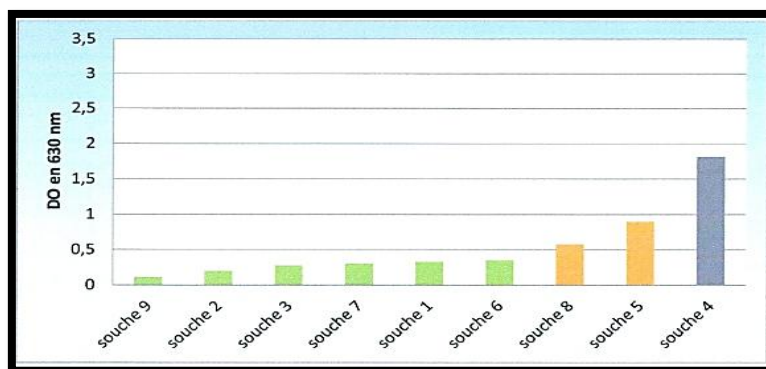
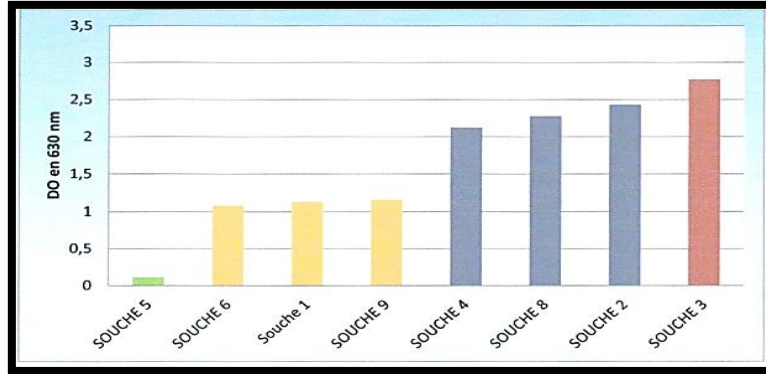


Figure 48. Formation de biofilm sur le milieu TSB à 30°C (Benyahia, 2013).

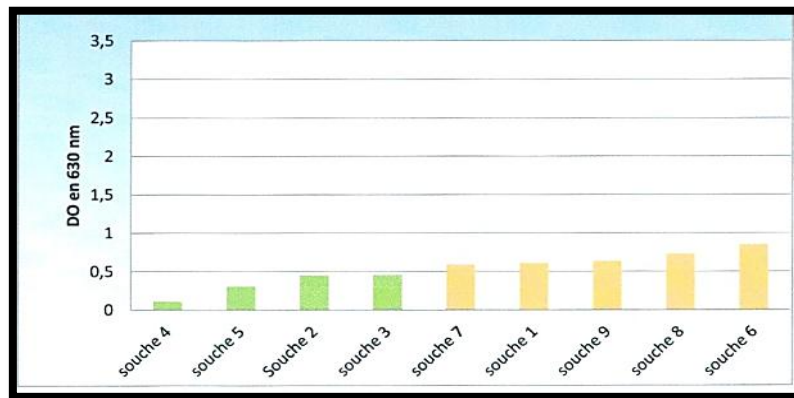
À température 42 °C : à l'exception de la souche 5, sa formation de biofilm est très faible, mais les trois souches (6; 1; 9) ont données des valeurs de DO supérieur à 1, elles sont

donc de bons producteurs de biofilm. En outre trois souches (4;8; 2) ont des DO comprises entre 2 et 2,5, elles sont donc caractérisées par le potentiel forte de formation du biofilms, aussi la souche (3) est considérée comme hyper productrice de biofilm car elle donne une valeur de DO supérieure à 2,5 (**Figure 49**).



**Figure 49.** Formation de biofilm sur le milieu TSB à 42°C (**Benyahia, 2013**).

**À température 55 °C :** Les souches se répartissent en deux catégories. Quatre souches (4; 5; 2; 3) avec des DO < 0.5 qui indiquent leurs productions faibles des biofilms et cinq souches (7; 1; 9; 8; 6) comprises entre 0.5 et 1, donc la formation de biofilm est de production moyenne (**Figure 50**).



**Figure 50.** Formation de biofilm sur le milieu TSB à 55°C (**Benyahia, 2013**).

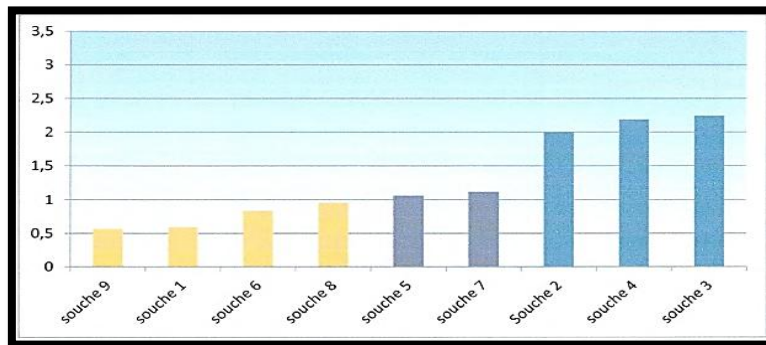
#### **Sur le lait écrémé**

Les résultats de (**Benyahia, 2013**) correspondant sont repartis dans les **figures (51; 52; 53)**.

**À température 30 °C :** Les souches se répartissent en deux catégories (il y a un faux de couleur dans le graphe), la première comprend six souches (9; 1; 6; 8; 5; 7) qui ont des DO comprises entre 0.5 et 1,5 donc ont peut la considère cette catégorie comme producteurs

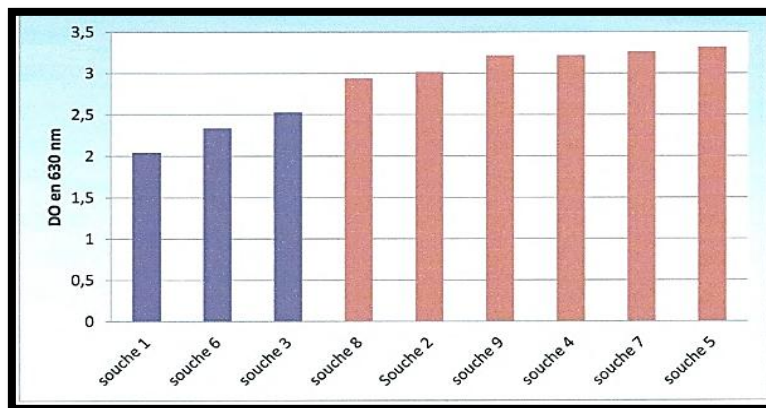


moyenne du biofilm, par contre la dernière catégorie comprend trois souches (2; 4; 3) leur DO est entre  $1,5 < DO < 2,5$ , ces souches sont fortement productrices de biofilm (**Figure 51**).



**Figure 51.** Formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 30°C (Benyahia, 2013).

À température 42 °C : Toutes les souches ont une DO comprise entre 2 et 3.5 donc la formation de biofilm est très élevée (**Figure 52**).



**Figure 52.** Formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 42°C (Benyahia, 2013).

À température 55 °C : Les souches sont regroupées en trois classes: la première classe comporte 5 souches (3; 6; 4; 7; 1) dont leurs DO égale ou supérieure à 0.5 et inférieure à 1.5 et sont moyennement productrice de biofilm, la deuxième classe comporte les souches (8 et 5) dont le DO est supérieure à 1.5, elles sont donc fortement productrice de biofilm. Par contre la souche 9 de la dernière classe est hyper productrice de biofilm car leur DO entre 2 et 2,5 (**Figure 53**).

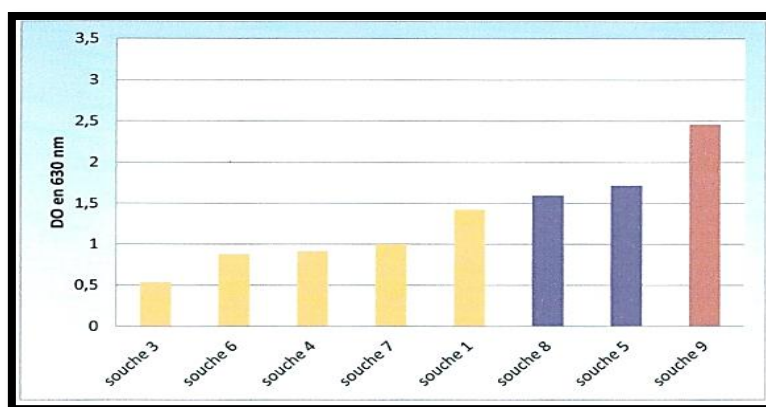


Figure 53. Formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 55°C (Benyahia, 2013).

#### Sur le milieu de culture TSB

Les résultats de (Bensafi, 2013) correspondant sont repartis dans les figures (54; 55; 56).

À température 30 °C : Les 5 souches (1; 3; 6; 2; 9) révèlent des pouvoirs de production de biofilm relativement faible avec la DO est inférieure à 0,5, tandis que les souches (4; 10; 7) montrent des DO comprises entre 0,5 et 1 et peuvent être classées dans la catégorie moyennement productrice de biofilm, par contre les souches (5 et 8) sont fortement productrice du biofilm et leurs DO est supérieure à 1,5 (Figure 54).

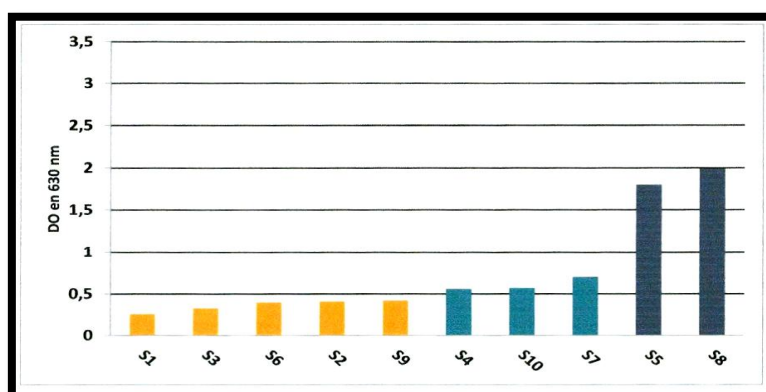
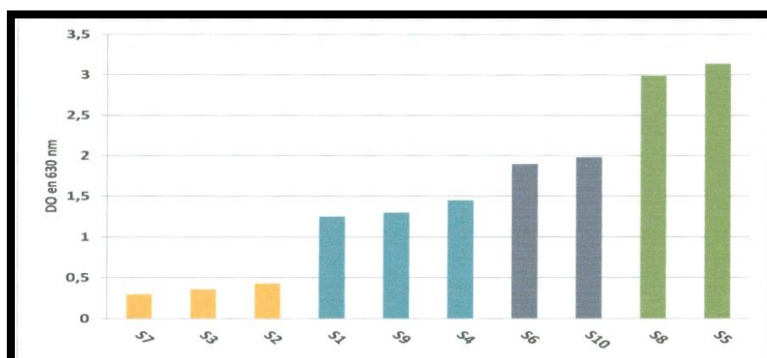


Figure 54. Formation du biofilm sur milieu TSB à 30°C (Bensafi, 2013).

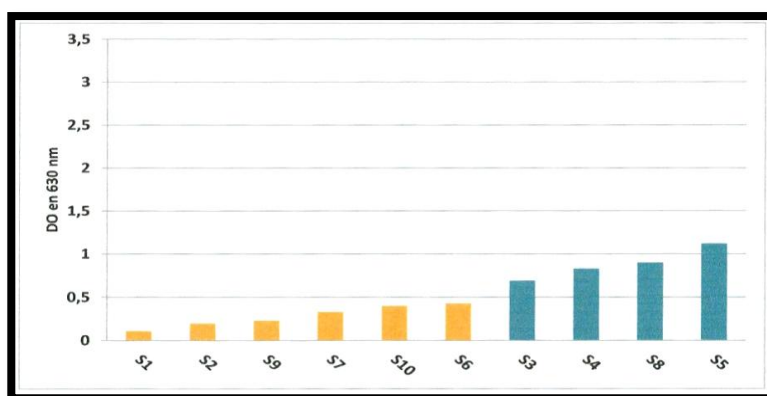
À température 42°C : Les souches sont regroupées en quatre classes la première comprenant trois souches (7; 3; 2) dont la DO est inférieure à 0,5 ce qui traduit les pouvoirs de production de biofilm relativement faible. La deuxième comprend trois souches (1; 9; 4) leurs DO <1.5 et elles moyennement productrice du biofilm, tandis que la troisième classe regroupe deux souches (6 et 10) et leurs DO est supérieur de 1.5, elles sont donc fortement productrice

du biofilm, la dernière classe qui comprend les souches (8; 5) sont des hyper productrices des biofilms car leurs DO est supérieure de 2,5 (**Figure 55**).



**Figure 55.** Formation du biofilm sur milieu TSB à 42°C (Bensafi, 2013).

**À température 55 °C :** Les souches (1; 2; 9; 7; 10; 6) ont des DO inférieure 0,5 sont faiblement productrice de biofilm et les 4 souches (3; 4; 5; 8) sont moyennement productrice de biofilm à cause de leurs DO qui est comprise entre 0,5 et 1,5 (**Figure 56**).



**Figure 56.** Formation du biofilm sur milieu TSB à 55°C (Bensafi, 2013).

#### Sur le lait écrémé

Les résultats de (Bensafi, 2013) correspondant sont repartis dans les **figures (57; 58; 59)**.

**À température 30 °C :** Les souches sont regroupées dans trois catégories la première comporte les souches (7; 4; 3) de DO 0,5 sont faiblement productrice de biofilm, la deuxième comporte quatre souches (2; 6; 9; 1) dont leurs DO < 1.5 sont moyennement productrice de biofilm et pour la dernière catégorie comprenant (10; 5; 8) sont fortement productrice de biofilm car elles ont des DO de formation de biofilm comprise entre 1.5 et 2.5 (**Figure 57**).

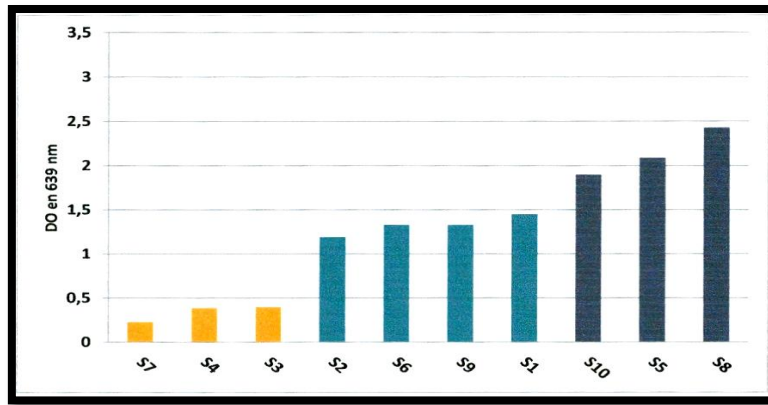


Figure 57. Formation du biofilm sur le milieu lait écrémé à 30°C (Bensafi, 2013).

À température 42 °C : Les souches sont regroupée en quatre classes, la première comprend une seule souche : (3) qui a une DO de 0,5 ce qui traduit cette souche est faiblement productrice de biofilm. La deuxième comporte trois souches (2; 9; 1) dont leurs  $DO < 1.5$ , elles sont moyennement productrice de biofilm. La troisième classe regroupe quatre souches : (6; 4; 7; 10) donc elles sont fortement productrices de biofilm à cause de leurs DO est entre  $1.5 < DO \leq 2.5$ . La quatrième classe comporte deux souches (8; 5) dont leurs DO est supérieur de 3 qui considérer comme des hyper productrices de biofilm (Figure 58).

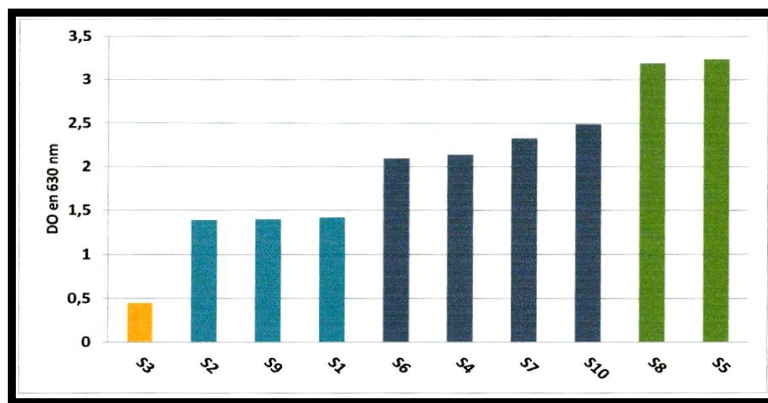
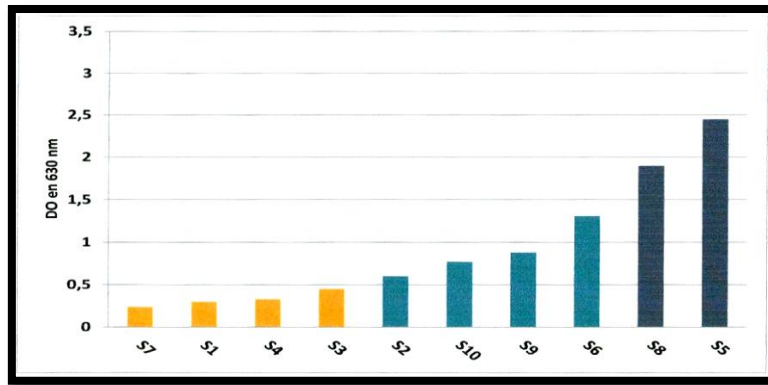


Figure 58. Formation du biofilm sur le milieu lait écrémé à 42°C (Bensafi, 2013).

À température 55 °C : Les souches de la première classe (7; 1; 4; 3) sont considérés faiblement productrice de biofilm leurs  $DO < 0.5$ , ainsi 4 souches (2; 10; 9; 6) sont dans la deuxième classe moyennement productrice de biofilm et de  $DO < 1.5$ , aussi deux souches de la dernière classe (8; 5) sont classées comme fortement productrice de biofilm car leurs DO comprise entre  $1.5 < DO < 2.5$  (Figure 59).



**Figure 59.** Formation du biofilm sur milieu lait écrémé à 55°C (Bensafi, 2013).

Les résultats obtenus pour toutes les souches testés par (Chouiti, 2013; Benyahia, 2013; Bensafi, 2013) qui concernent le pouvoir du potentiel de formation du biofilm dans les températures (30, 42, 55°C) sur les milieux TSB et lait écrémé indiquent que les valeurs de DO les plus élevées enregistrer dans la température 42°C. Ces résultats sont conformes avec ceux de qui ont montré qu'un manque en éléments nutritives d'un milieu à l'autre conduit à une diminution de la formation de biofilm c'est-à-dire le pouvoir d'adhésion de formation de biofilm est influencé par la composition de milieu de culture ceci explique les résultats différent du lait écrémé au TSB. Donc la capacité de formation du biofilm varie en fonction des espèces bactériennes, elle dépend également de diverses conditions telles que la disponibilité des nutriments et la température...

# *Conclusion*

Les bacilles thermophiles, en particulier comme *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus spp*, constituent un groupe important de contaminants dans l'industrie laitière, leur présence dans les produits laitiers est un indicateur de mauvaise hygiène, parce qu'ils sont capables de former des spores, ils sont difficiles à éliminer et présentent un taux de croissance rapide et ont tendance à former facilement des biofilms. La présence de spores dans l'environnement de ces laiteries est préoccupante sachant le rôle des biofilms dans leur dissémination, ce qui crée des réseaux de contamination en boucle dont il est difficile d'en assurer le contrôle. En effet le système CIP adopté dans ces laiteries bien que correct ne permet pas une élimination efficace des biofilms de la flore sporulée. En outre, les spores non éliminées par le CIP deviennent plus résistantes aux produits chimiques utilisés. Elles peuvent aussi réadhérer et former de nouveau le biofilm. L'amélioration du statut hygiénique de ces laiteries doit cibler non seulement l'éradication du biofilm mais d'abord celle de la flore sporulée introduite essentiellement via la poudre de lait d'importation.

L'implantation de bactéries sporulées peut-être empêchée en :

- Limitant leur entrée dans les ateliers de production par le maintien de la contamination de la poudre de lait à un niveau le plus bas possible. Des mesures doivent être prises chez le fournisseur d'abord, puis au niveau des laiteries.
- Choissant une méthode appropriée de leur élimination : déclenchement de la germination des spores ou son inhibition, ou adoption d'un procédé non thermique tel que la microfiltration.

Le contrôle du biofilm doit passer par l'amélioration du système de nettoyage–désinfection en :

- Renforçant l'étape du nettoyage alcalin par un traitement enzymatique permettant un meilleur décrochement du biofilm.
- Utilisation de formulations désinfectantes à base de produits naturels (huile essentielle) dans le programme CIP aux fins de l'éradication du biofilm.

*Références  
bibliographiques*



- ❖ **AIT-SAADA, Djamel. SELSELET-ATTOU, Ghalem. BOUDEROUA. Kaddour et BENTAHAR. Mohamed-cherif., (2008).** Simulation d'une démarche HACCP au cours de la fabrication d'un lait pasteurisé. Université Djillali Liabes Sidi Bel-Abbes, pages:1-15.
  
- ❖ **AUGUSTIN, Mary-Ann., CLARKE P-T et CRAVEN, H., (2003).** POWDERED MILK | Characteristics of Milk Powders. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, pages: 4703-4711.
  
- ❖ **BATAHRI, Narimane-Imane., (2015).** Propriété d'adhésion et pouvoir enzymatique des bacilles thermophiles isolés du lait liquide et en poudre. Mémoire de master en microbiologie : université Aboubekr Belkaid Tlemcen, Algérie. 56 pages.
  
- ❖ **BELHAMRA, Zineb., (2017).** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires. Thèse de doctorat en Microbiologie : Université Ferhat Abbas Sétif 1. 147 pages.
  
- ❖ **BENDIMERAD, Nahida., (2013).** Caractérisation phénotypique, technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'ouest algérien. Essai de fabrication de fromage frais type « Jben ». Thèse de doctorat : microbiologie alimentaire. Université Aboubekr Belkaid Tlemcem. Algérie, 264 pages.
  
- ❖ **BENSAFI, Meriem-Amel., (2013).** Recherche et caractérisation des bacilles thermophiles dans le lait cru et la poudre du lait. Mémoire de master en microbiologie : université Aboubekr Belkaid Tlemcen, Algérie. 63 pages.
  
- ❖ **BENYAHIA, Nassima-Ilhem., (2013).** Recherche et caractérisation des bacilles thermophiles dans les équipements laitiers. Mémoire de master en microbiologie : université Aboubekr Belkaid Tlemcen, Algérie. 67 pages.
  
- ❖ **BOULTIF, Latifa., (2015).** Détection et quantification des résidus de terramycine et de pénicilline dans le lait de vache par chromatographie liquide haute performance (HPLC)- optimisation des paramètres d'analyse –adaptation des méthodes d'extraction des molécules d'antibiotiques-comparaison de quelques résultats obtenus sur le lait de la région de Constantine et le lait importé (reconstitué). Thèse de doctorat en science : hygiène des denrées alimentaires d'origines animales. Université des frères mentouri de Constantine institut des sciences vétérinaires, Algérie, 113 pages.
  
- ❖ **BRANGER Alain, RICHER Marie-Madeleine, ROUSTEL Sébastien., (2007).** Microbiochimie et alimentation, © Educagri éditions, Dijon. 343 pages. ISBN : 978-2-84444-558-2.
  
- ❖ **BURGESS, S-A. BROOKS, J-D. RAKONJAC, J. WALKER, K-Met FLINT, S-H., (2009).** The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, volume: 107, numéro: 3, pages: 1012-1018.

- ❖ **BURGESS, Sara A. LINDSAY, Denise et FLINT, Steve-H., (2010).** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International journal of food microbiology*, volume: 144, numéro: 2, pages: 215-225.
- ❖ **BURGESS, Sara A. LINDSAY, Denise et FLINT, Steve-H., (2014).** Biofilms of thermophilic bacilli isolated from dairy processing plants and efficacy of sanitizers. *Microbial Biofilms*, volume: 1147, pages: 367-377.
- ❖ **CHILLET, Pascal., (2011).** La pasteurisation, © Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, France. 109 pages. ISBN : 978-2-86617-595-5.
- ❖ **CHOPRA, A-K. et MATHUR, D-K., (1984).** Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, volume: 57, pages: 263-271.
- ❖ **CHOUITI, Fadia., (2013).** Recherche et caractérisation des bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé de vache et le lait recombinaé. Mémoire de master en microbiologie : université Aboubekr Belkaid Tlemcen, Algérie. 62 pages.
- ❖ **CISSE, Serigne Abdoulaye., (1997).** Contribution à l'étude de la pasteurisation du lait : faisabilité technique et contrôle de la qualité dans la région de kolda. Thèse de doctorat : école inter-états des sciences et médecine vétérinaires : université cheikh antadiop de dakar, Sénégal, 143 pages.
- ❖ **COLERI CIHAN, Arzu. KARACA, Basar. OZEL, Beste-Piril et KILIC, Tugba., (2017).** Determination of the biofilm production capacities and characteristics of members belonging to Bacillaceae family. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, volume : 33, numéro : 6, pages : 1-13.
- ❖ **DE JONGHE, Valerie. COOREVITS, An. DE BLOCK, Jan. VAN COILLIE, Els. GRIJSPEERDT, Koen. HERMAN, Lieve. DE VOS, paul et HEYNDRICKX, Marc., (2010).** Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, volume: 136, numéro: 3, pages: 318-325.
- ❖ **DELARRAS, CAMILLE., (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures, © Lavoisier, Paris. 741 pages. ISBN : 978-2-7430-1565-7.
- ❖ **DRAPEAU, Arnold-J et JANKOVIC, Stevan., (1977).** Manuel de microbiologie de l'environnement, © Organisation mondial de la santé, Genève. 249 pages. ISBN : 92 4 254 058 7.

- ❖ **DURAND, Loïc., (2014).** Ecologie et diversité des bactéries thermophiles formant des spores dans les conserves alimentaires. Thèse de doctorat : Biotechnologie, Microbiologie : Université Montpellier II, 190 pages.
  
- ❖ **FAO et OMS., (2011).** Lait et produits laitiers (Deuxième édition), © FAO et OMS : Organisation Mondiale De La Santé et Organisation Des Nations Unies Pour L'alimentation Et L'agriculture, Rome (Italie). 266 pages. ISBN 978-92-5-205837-3.
  
- ❖ **FAO., (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, © FAO : Organisation Des Nations Unies Pour L'alimentation Et L'agriculture, Rome (Italie). 272 pages. ISBN : 92-5-20534-6.
  
- ❖ **FERNANE-BOUMEDINE, Habiba., (2017).** Etude des bactéries thermorésistantes dans le lait. Thèse de doctorat en sciences: sciences de la nature et de la vie : Université Mustapha Stambouli Mascara. Algérie, 127 pages.
  
- ❖ **FLINT, S. PALMER, J. BLOEMEN, K. BROOKS, J. et CRAWFORD, R., (2001).** The growth of *bacillus stearotherophilus* on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, volume: 90, numéro: 2, pages: 151-157.
  
- ❖ **GEM RCN., (2009).** Lait et produits laitiers. Groupe d'étude des marches de restauration collective et de nutrition. Spécification technique, direction des affaires juridiques, observatoire économique de l'achat public.
  
- ❖ **GÉNIN, G., (1935).** Pasteurisation du lait : ses avantages et ses inconvénients (1) : Méthode de pasteurisation basse. Un rapport d'université de Bristol, *The Milk Industry*, volume : 15, numéro : 150, pages : 1101- 1103.
  
- ❖ **GUIRAUD, Joseph-Pierre., (2012).** Microbiologie alimentaire, © Dunod, Paris. 652 pages. ISBN : 978-2-10-057008-9.
  
- ❖ **KABIR, Ahmed., (2015).** Contraintes de la production laitière en Algérie et évaluation de la qualité du lait dans l'industrie laitière (constats et perspectives). Thèse de doctorat : en sciences en microbiologie alimentaire. Université d'Oran 1(Ahmed Ben Bella), Algérie, 174 pages.
  
- ❖ **LECLERCQ-PERLAT, Marie-Noëlle., (1986).** étude du nettoyage des échangeurs à plaques destinés à la pasteurisation et à la stérilisation à ultra-haute température du lait. Thèse de doctorat en chimie. Université des sciences et techniques de Lille I, 187 pages.
  
- ❖ **LESEUR, R et MALIK, N., (1985).** Lait et produits laitiers (vache. Brebis. Chèvre) 2 les produits laitiers : transformation et technologies, © techniques et documentation (Lavoisier), Paris. 630 pages. ISBN : 2-85206-274-7.

- ❖ **MALEK, F. MOUSSA-BOUDJEMAA, B. KHAOUANI-YOUSFI, F.KALAI, A et KIHHEL, M., (2012).** Microflora of biofilm on algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. *African Journal of Microbiology Research* volume : 6, numéro : 17, pages : 1-9.
  
- ❖ **MALEK, Fadila., (2013).** Le biofilm en industrie laitière : caractérisation, facteur de développement et élimination. Cas du biofilm de *Bacillus cereus* dans quelques laitières de la région de Tlemcen. Thèse de doctorat : Microbiologie. Université de Abou Bekr Belkaid Tlemcem. Algérie, 218 pages.
  
- ❖ **MALEK, Fadila., (2019).** Bactéries Sporulées Et Biofilms : Un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombinaison pasteurisé. *Canadian journal of microbiology*. Volume : 65. Numéro : 6, pages : 405 à 420.
  
- ❖ **M'BOYA, Jean-Christan. BROUTIN, Cécile. DUDEZ, Philippe., (2001).** Le lait pasteurisé. GRE-Agridoc : un réseau d'information et de documentation financé par ministère français des affaires étrangères, GRET : Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques, paris, France. E-mail : fca@gret.org - Site web : www.gret.org, p-4-5.
  
- ❖ **PARKAR, S-G. FLINT, S-H. et BROOKS, J-D., (2004).** Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, volume: 96, numéro: 1, pages: 110-116.
  
- ❖ **RAMEH, Hala., (2018).** Instrumentation optimale pour le suivi des performances énergétiques d'un procédé industriel. Thèse de doctorat en sciences des métiers de l'ingénieur. Spécialité énergétique et procédés. Université de recherche paris sciences et lettres, 162 pages.
  
- ❖ **ROMAIN, Jeantet. THOMAS, Croguennec. MICHEL, Mahaut. PIERRE, Schuck et GERARD, Brulé., (2008).** Les produits laitiers 2<sup>e</sup> édition, © Lavoisier, paris. 183 pages. ISBN : 978-2-7430-1032-4.
  
- ❖ **RUECKERT Andreas, RONIMUS Ron S, W. MORGAN Hugh., (2006).** Development of a real-time PCR assay targeting the sporulation gene, spo0A, for the enumeration of thermophilic bacilli in milk powder. *Food Microbiology*, volume: 23, numéro: 3, pages: 220-230.
  
- ❖ **SADIQ, Faizan A. FLINT, Steve. YUAN, Lei. LI, Yun. LIU, TongJie et HE, GuoQing, (2017).** Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, volume: 262, pages:89-98.

- ❖ **SIMÕES, Manuel. C-SIMÕES, Lúcia et J-VIEIRA, Maria., (2010).**A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*. Volume: 43, numéro: 4, pages: 573-583.
  
- ❖ **SINA, Laurent., (1992).** Contrôle de qualité du lait et des produits laitiers fabriqués par la soca. Thèse de doctorat : école inter-états des sciences et médecine vétérinaires : université cheikh antadiop de dakar, Sénégal, 245 pages.
  
- ❖ **TASARA, Taurai. MORACH, Marina. KLUMPP, Jochen et ROGER, Stephan.,(2017).** Complete Genome Sequence of *Anoxybacillus flavithermus* Strain 52-1A Isolated from a Heat-Processed Powdered Milk Concentrate. *American society for microbiology (annonce du génome)*, volume: 5, numéro: 32, pages: 1-2.
  
- ❖ **TEH, Koon Hoong. FLINT, Steve. BROOKS, John et KNIGHT, Geoff., (2015).** Biofilms in the Dairy Industry. © John wiley and sons Ltd. 253 pages. ISBN: 978-1-118-87621-3.
  
- ❖ **THOMAS, Croguennec. ROMAIN, Jeantet et GERARD Brulé., (2008).** Fondements physicochimiques de la technologie laitière, © Lavoisier, Paris. 155 pages. ISBN : 978-2-7430-1033-1.
  
- ❖ **VELEZ, Alix-Arielle-Sarah., (2017).** Étude bibliographique du rapport bénéfices-risques de la consommation de lait cru de vache. Thèse de doctorat vétérinaire : faculté de médecine de Créteil : école nationale vétérinaire d'al fort, 86 pages.
  
- ❖ **VINOLA, Carole-L., (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait, © presses internationales polytechnique, canada. 600 pages. ISBN : 978-2-553-01552-6.
  
- ❖ **VOS, Paul. GARRITY, George. JONES Dorothy. KRIEG, Noel-R. LUDWIG, Wolfgang. Rainey, FRED-A. SCHLEIFER, Karl-Heinz et WHITMAN, William B., (2009).**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition: Volume 3: The Firmicutes, ©Bergey's Manual Trust, Springer-Verlag New York.1423 pages. ISBN: 978-0-387-95041-9.

# *Annexes*

▪ **Annexe 1 : Tryptone sel eau (TSE)**

❖ **Composition chimique du milieu de culture :**

La formule théorique de ce milieu en g / L d'eau purifiée est:

Peptone de caséine (bovin)	1 g
Chlorure de sodium	8.5 g
pH 7,0	

▪ **Annexe 2 : Trypticase soja agar (TSA)**

❖ **Composition chimique du milieu de culture**

La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifiée est :

Peptone de caséine (bovin)	15 g
Peptone de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
pH 7,3	
Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120 °C	

Ce milieu est disponible en milieu déshydraté.

Poudre déshydraté	40 g
Eau distillée	1000 ml

▪ **Annexe 3 : Gélose à l'amidon**

**Préparation du milieu de culture**

- Préparer 1000 ml de gélose nutritive à partir d'un milieu déshydraté en incorporant avant chauffage 10 g d'amidon de pomme de terre.
- Lorsque le milieu est prêt, le répartir en tubes ou en flacons et le stériliser à l'autoclave à  $121 \pm 1$  °C pendant 15 minutes (**Delarras, C., 2014**).

▪ **Annexe 4 : Gélose au lait**

**Préparation du milieu de culture**

- Préparer 100 ml d'une solution d'agar à 3% dans de l'eau distillée et 100 ml de lait écrémé et stériliser à l'autoclave aux températures recommandées (15 minutes à 121°C pour l'agar et 15 minutes à 115°C pour le lait) ;

- Ramener les deux préparations à 45°C, les mélanger et couler en boîtes de Pétri. (Delarras, C., 2014).

▪ **Annexe 5 : Gélose au tween 80**

Milieu de culture TSA	200 ml
Tween	80 gouttes

❖ **Conseil pratique :**

Le tween est stérilisé séparé parement et ajouté au milieu après autoclavage (Belhamra, Z., 2017).

▪ **Annexe 6 : Trypticase soja bouillon (TSB)**

La formule théorique du milieu de culture en g / L d'eau purifiée est:

Peptone de caséine (bovin)	17g
Peptone de soja	3g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2.5g
Glucose	2.5g
pH 7,3	
Stérilisation à l'autoclave à 120 °C pendant 15 minutes	

▪ **Technique générale des dilutions**

Procéder comme suit :

- Agiter vigoureusement l'échantillon (eau, autre produit liquide) ou la suspension mère (aliment) à analyser afin d'obtenir une suspension homogène des bactéries.
- Prélever 1ml de l'échantillon ou de la suspension mère avec une pipette de 1ml stérile à usage unique (sans introduire la pipette dans la suspension mère de plus de 1 cm) et mélanger à 9 ml de milieu pour dilution (tube n° 1) ; dilution au 1 / 10.
- Transférer 1ml de la dilution au 1/10 dans 9 ml de milieu de dilution (tube n° 2) ; agiter la dilution au 1/100.
- Transférer 1ml de la dilution au 1/100 dans 9 ml, de milieu pour dilution (tube n° 3); agiter la dilution au 1/1000.



- Les dilutions sont, en général arrêtées au 1/1000; continuer éventuellement avec d'autres dilutions si cela est nécessaire (**Delarras, C., 2014**).

❖ **Conseil pratique :**

Eviter tout contact entre la pipette contenant l'inoculum et le diluant stérile; bien homogénéiser chaque dilution pendant 5 à 10 secondes en utilisant de préférence un agitateur mécanique (type Vortex<sup>®</sup>); changer de pipette entre chaque dilution (**Delarras, C., 2014**).

▪ **Eau physiologique :**

Eau distillée	1000 ml
Na Cl	1g

▪ **Solution dissolvante**

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

▪ **Cristal violet**

Cristal violet	2 g
Eau distillée	100 ml



▪ **Lait écrémé**

Poudre de lait écrémé	50 g
Eau distillée	500 ml

▪ **Matériel, colorants et produits chimiques utilisés**

- Une glacière.
- Bec bunsen.
- Les flacons stériles.
- Pipette gradué.
- Tubes en verre stériles à 10 ml.
- L'anse de platine.
- Agitateur magnétique.
- L'étuve.
- Boites de pétri.

- Micropipette.
- Pipettes pasteurs.
- Une loupe binoculaire ou bien une loupe compte-fils.
- Pissette d'eau distillée.
- Microscope optique.
- Une platine chauffante.
- Lame et lamelle.
- Le spectrophotomètre.
- Les microplaques de titration 96 puits.
- Cristal violet.
- Lugol (solution iodo-iodurée).
- L'alcool à 95 °C.
- Safranine ou bien la fuchsine de Ziehl.
- Une solution aqueuse verte de malachite à 0,5%.
- L'eau oxygénée  $H_2O_2$ .
- Une gélose à l'amidon.
- Une gélose au lait.
- Milieu de Trypticase soja agar (TSA).
- Milieu de Tryptone sel eau (TSE).
- Milieu TSA à base de tween 80.
- La galerie API<sup>®</sup> 20 E.
- L'huile de paraffine.
- Le méthanol à 95%.
- Une solution dissolvante (constituée d'éthanol et d'acide acétique glacial dilué dans de l'eau distillé).

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E					
Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	$\beta$ -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' $\alpha$ -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> / N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> )	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Les bacilles thermophiles sont des contaminants fréquents de l'environnement des laiteries se sont impliqués dans les problèmes d'altération du lait pasteurisé ainsi de la diminution de sa durée de vie. L'objectif de cette étude est vérifier la subsistance des bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé recombinaison ou issu de lait de vache local, les équipements laitiers et la poudre de lait dans une laiterie de la région de Tlemcen.

Sur la base de caractères morphologiques et biochimiques, les souches isolées à 55°C sur milieu TSA sont caractérisé par : une coloration de Gram positive, un catalase positif, une capacité de formation des spores et une forte diversité phénotypique tels que montré par les biotypes obtenue par galerie API 20E et la révélation de pouvoirs enzymatiques déterminé par la production de la protéase, l'amylase, et la lipase qui ont une capacité d'altérer le lait pasteurisé. Le potentiel de formation de biofilm est également testé par la technique des microplaques de titration 96 puits à trois températures (30°C ; 42°C ; 55°C) sur deux milieux différent (TSB et lait écrémé) et est obtenu par la mesure des DO à 630 nm. Les résultats ont montré que la formation de biofilm est optimale à 42°C pour les souches testés, mais elle reste possible à 30 et à 55°C.

**Mot clés** : Bacilles thermophiles, Altération, Lait pasteurisé, Lait recombinaison, Spores, Pouvoirs enzymatiques, Biofilm, Biotype.

العصيات المحبة للحرارة هي ملوثات متكررة لبيئة الألبان تشارك في مشاكل تلف الحليب المبستر وكذلك تقليل مدة صلاحيته. الهدف من هذه الدراسة هو التحقق من وجود العصيات المحبة للحرارة في اللبن ال مؤتلف أو في حليب البقر المحلي وفي معدات الألبان ومسحوق الحليب في أحد معامل الألبان في منطقة تلمسان.

على أساس الخصائص المورفولوجية والكيميائية الحيوية ، تتميز السلالات المعزولة عند 55 درجة مئوية في وسط TSA بما يلي: صبغة جرام إيجابية ، وكتلاز إيجابي ، والقدرة على تكوين الأبوغ ، وتنوع مظهري مرتفع كما هو موضح في الأنماط الحيوية التي تم الحصول عليها من خلال معرض API 20E والكشف عن القوى الأنزيمية التي تتعدد بإنتاج البروتياز ، الأميلاز ، والليباز والذين لديهم القدرة على تغيير الحليب المبستر. يتم أيضاً اختبار إمكان طيت تكوين الأغشية الحيوية من خلال تقنية microplaque de titration 96 puits عند ثلاث درجات حرارة ( 30 درجة مئوية ، 42 درجة مئوية ، 55 درجة مئوية) على وسيطين مختلفين (TSB والحليب منزوع الدسم) ويتم الحصول عليها عن طريق القياس الكثافة البصرية المقدره ب 630 نانومتر. أظهرت النتائج أن تكوين الأغشية الحيوية الرقيقة يكون مثاليًا عند 42 درجة مئوية للسلالات المختبرة، لكنه يظل ممكنًا عند 30 و 55 درجة مئوية.

**الكلمات المفتاحية:** عصيات محبة للحرارة ، تغيير ، حليب مبستر ، حليب مؤتلف ، ابوغ ، قوى إنزيمية ، غشاء حيوي ، النوع الحيوي.

Thermophilic bacilli are frequent contaminants in the dairy environment and have been implicated in the problems of spoilage of pasteurized milk as well as the reduction of its shelf life. The objective of this study is to verify the subsistence of thermophilic bacilli in recombined pasteurized milk or milk from local cow's milk, in dairy equipment and in milk powder in a dairy in the region of Tlemcen.

On the basis of morphological and biochemical characteristics, the strains isolated at 55°C on TSA medium are characterized by: positive Gram stain, positive catalase, spore-forming capacity and high phenotypic diversity as shown by the biotypes obtained by the API 20E gallery and the revelation of enzymatic powers determined by the production of protease, amylase, and lipase which have a capacity to alter pasteurized milk. The potential for biofilm formation is also tested by the 96-well titration microplate technique at three temperatures (30°C; 42°C; 55°C) on two different media (TSB and skim milk) and is obtained by measuring the OD at 630 nm. The results showed that biofilm formation is optimal at 42°C for the strains tested, but is still possible at 30 and 55°C.

**Keywords:** Thermophilic bacilli, Alteration, Pasteurized milk, Recombined milk, Spores, Enzymatic powers, Biofilm, Biotype.