

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة ابوبكر بلقايد-تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN

كلية علوم الطبيعية والحياة، وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

## MÉMOIRE

Présenté par

**BANNOUR Yosra**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

**En Sciences biologiques option Microbiologie et Contrôle de qualité**

**Thème**

**Caractérisation des bactéries sporulées mésophiles et thermophiles dans le lait cru et les poudres laitières**

Soutenu le 11/09/2022, devant le jury composé de

- |              |                            |       |                       |
|--------------|----------------------------|-------|-----------------------|
| • présidente | Pr Loukidi B.              | prof. | Université de Tlemcen |
| • encadrant  | Dr Malek F.                | MCA   | Université de Tlemcen |
| • Examineurs | Pr Belyagoubi-Benhammou N. | prof. | Université de Tlemcen |
|              | Dr Belyagoubi L.           | MCA   | Université de Tlemcen |

Année universitaire 2021-2022

## المخلص

تعتبر بكتيريا ال *Bacillus* المقاومة للحرارة من الملوثات المتكررة في مصانع الالبان والتي تتسبب في تلف الحليب المبستر وتقليل مدة صلاحيته . الهدف من هذه الدراسة التحقق من تواجد هذه البكتيريا في الحليب الخام ومسحوق الحليب في احد مصانع الالبان في منطقة تلمسان . اعتمادا على الصفات المورفولوجية و الكيمائية الحيوية تتميز السلالات المعزولة عند 30 درجة مئوية و 55 درجة مئوية علي وسط BHI بفرام ايجابي و الكتلاز الايجابي و القدرة علي تكوين البوغ و علي انتاج الانزيمات البروتياز و الليباز مما يتسبب في تغيير جودة اللبن . تم اختبار امكانيات تكوين البيوفيلم بتقنيات مختلفة وفي ثلاث اوساط حرارية مختلفة 30 درجة و 45 درجة و 55 درجة علي وسط BHIB تم الحصول عليها عن طريق قياس OD عند 580 نانو متر و قد اظهرت النتائج ان السلالات المختبرة تتميز بقدرة عالية علي الالتصاق بالزجاج وتشكيل البيوفيلم علي الواح البوليسترين . تعتبر درجة الحرارة 45 درجة مئوية هي الحرارة الامثل لتكوين البيوفيلم كما وجدنا ان المطهر المستخدم له تأثير قوى مضاد للبيوفيلم و الابواغ .

**الكلمات المفتاحية:** *Bacillus* ، حليب خام ، الحليب المسحوق ، القوة الانزيمية ، بيوفيلم ، ابواغ ، المطهر .

## Résumé

Les Bacilles thermophiles sont des contaminants fréquents de l'environnement des laiteries. elles sont impliqués dans les problèmes d'altération du lait pasteurisé ainsi de la diminution de sa durée de conservation . L'objectif de cette étude est de vérifier la subsistance des bacilles thermophiles dans le lait cru et la poudre du lait dans une laiterie de la wilaya de Tlemcen.

Sur la base des caractères morphologiques et biochimiques, les souches isolées à 30 °C et 55°C sur milieu BHI sont caractérisé par : une coloration de Gram positive, un catalase positif, une capacité de formation des spores et la révélation de pouvoirs enzymatiques déterminé par la production de la protéase et la lipase qui ont une capacité d'altérer la qualité du lait . Le potentiel de formation de biofilm est également testé par différents techniques à trois températures (30°C ; 45°C ; 55°C) sur BHIB et est obtenu par la mesure des DO à 580 nm. Les résultats ont montré que les souches testées sont caractérisées par un grand potentiel d'adhésion au verre et de formation de biofilm dans les microplaques en polystyrène . la formation de biofilm est optimale à 45°C pour les souches testés, mais elle reste possible à 30 et à 55°C.

Le désinfectant utilisé a un effet anti biofilm .

**Mots clés :** Bacilles thermophiles, Lait cru, Lait en poudre, pouvoir enzymatique, biofilm, spores, désinfectant.

## Abstract

Thermophilic bacilli are frequent contaminants of dairies environment and are involved in the problems of alteration of pasteurized milk and the decrease of its shelf life. The objective of this study is to verify the existence of thermophilic bacilli in raw milk and milk powder taken from a dairy in the region of Tlemcen.

Based on the morphology and biochemical characters, the strains isolated at 30°C and 55°C on BHI medium are characterized by: a positive Gram staining, a positive catalase, a capacity of spore formation and the revelation of enzymatic powers determined by the production of protease and lipase which have a capacity to alter the quality of milk. The potential of biofilm formation is also tested by different techniques at three temperatures (30°C; 45°C; 55°C) on BHIB and is obtained by measuring the OD at 580 nm. The results showed that the tested strains are characterized by a high potential of adhesion to glass and biofilm formation in polystyrene microplates. Biofilm formation is optimal at 45°C for the tested strains, but it remains possible at 30 and 55°C.

The disinfectant used has a powerful anti biofilm effect .

**Key words:** thermophilic bacilli, raw milk, milk powder, enzymatic power, biofilm, spores, disinfectant.

## المخلص

تعتبر بكتيريا ال *Bacillus* المقاومة للحرارة من الملوثات المتكررة في مصانع الالبان والتي تتسبب في تلف الحليب المبستر وتقليل مدة صلاحيته .

الهدف من هذه الدراسة التحقق من تواجد هذه البكتيريا في الحليب الخام و مسحوق الحليب في احد مصانع الالبان في منطقة تلمسان .

اعتمادا علي الصفات المورفولوجية و الكيمائية الحيوية تتميز السلالات المعزولة عند 30 درجة مئوية و 55 درجة مئوية علي وسط BHI بفرام ايجابي و الكتلاز الايجابي و القدرة علي تكوين البوغ و علي انتاج الانزيمات البروتياز و الليباز مما يتسبب في تغيير جودة اللبن .

تم اختبار امكانيات تكوين البيوفيلم بتقنيات مختلفة وفي ثلاث اوساط حرارية مختلفة 30 درجة و 45 درجة و 55 درجة علي وسط BHIB تم الحصول عليها عن طريق قياس OD عند 580 نانو متر و قد اظهرت النتائج ان السلالات المختبرة تتميز بقدرة عالية علي الالتصاق بالزجاج وتشكيل البيوفيلم علي الواح البوليسترين .

تعتبر درجة الحرارة 45 درجة مئوية هي الحرارة الامثل لتكوين البيوفيلم كما وجدنا ان المطهر المستخدم له تأثير مضاد للبيوفيلم.

### الكلمات المفتاحية :

*Bacillus* ، حليب خام ، الحليب المسحوق ، القوة الانزيمية ، بيوفيلم ، ابواغ ، المطهر.

# Résumé

Les Bacilles thermophiles sont des contaminants fréquents de l'environnement des laiteries. elles sont impliqués dans les problèmes d'altération du lait pasteurisé ainsi de la diminution de sa durée de conservation. L'objectif de cette étude est de vérifier la subsistance des bacilles thermophiles dans le lait cru et la poudre du lait dans une laiterie de la wilaya de Tlemcen.

Sur la base des caractères morphologiques et biochimiques, les souches isolées à 30 °C et 55°C sur milieu BHI sont caractérisé par : une coloration de Gram positive, un catalase positif, une capacité de formation des spores et la révélation de pouvoirs enzymatiques déterminé par la production de la protéase et la lipase qui ont une capacité d'altérer la qualité du lait . Le potentiel de formation de biofilm est également testé par différents techniques à trois températures (30°C ; 45°C ; 55°C) sur BHIB et est obtenu par la mesure des DO à 580 nm. Les résultats ont montré que les souches testées sont caractérisées par un grand potentiel d'adhésion au verre et de formation de biofilm dans les microplaques en polystyrène . la formation de biofilm est optimale à 45°C pour les souches testés, mais elle reste possible à 30 et à 55°C.

Le désinfectant utilisé a un effet anti biofilm.

**Mots clés :** Bacilles thermophiles, Lait cru, Lait en poudre, pouvoir enzymatique, biofilm, spores, désinfectant.

# Abstract

Thermophilic bacilli are frequent contaminants of dairies environment and are involved in the problems of alteration of pasteurized milk and the decrease of its shelf life. The objective of this study is to verify the existence of thermophilic bacilli in raw milk and milk powder taken from a dairy in the region of Tlemcen.

Based on the morphology and biochemical characters, the strains isolated at 30°C and 55°C on BHI medium are characterized by: a positive Gram staining, a positive catalase, a capacity of spore formation and the revelation of enzymatic powers determined by the production of protease and lipase which have a capacity to alter the quality of milk. The potential of biofilm formation is also tested by different techniques at three temperatures (30°C; 45°C; 55°C) on BHIB and is obtained by measuring the OD at 580 nm. The results showed that the tested strains are characterized by a high potential of adhesion to glass and biofilm formation in polystyrene microplates. Biofilm formation is optimal at 45°C for the tested strains, but it remains possible at 30 and 55°C.

The disinfectant used has an anti biofilm effect.

Key words: thermophilic bacilli, raw milk, milk powder, enzymatic power, biofilm, spores, disinfectant.

## Remerciements

Avant toute chose, nous remercions le Dieu tout puissant pour nous avoir donné le courage, la force, la patience pour achever ce modeste travail.

Ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de la faculté de Tlemcen. Je suis particulièrement honorées d'avoir profité de l'expérience prodigieuse et de l'encadrement du présent travail par Mme **FADILA Malek**, professeure à la faculté de Tlemcen de m'avoir proposée ce sujet, de m'avoir guidée, soutenue et encouragée, pour ces précieux conseils et soutien tout au long de notre travail. Je la remercie vivement pour sa disponibilité ses conseils, son soutien, ses qualités humaines, ses compétences scientifiques et ses encouragements qui m'a toujours réconfortés. Qu'elle trouve ici un témoignage de ma sincère reconnaissance.

je présente mes vifs remerciements et toute ma reconnaissance à **Madame LOUKIDI Bouchra**, pour l'honneur et l'amabilité qu'elle me fait de présider ce jury.

Je remercie vivement **Madame BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila** et **Monsieur BELYAGOUBI Larbi**, qui m'ont honoré en acceptant d'évaluer notre travail en tant qu'examineurs.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers tous les membres du laboratoire : **Monsieur YAZID Amine**, **Madame BEN Tabet Fatima zohra**, **Madame ZEKRAOUI Fatima** et **Madame HEJJAOUI Khawla** pour leurs aides, leurs disponibilités.

Je remercie mes collègues Atif et Abdallah pour leurs aides au laboratoire et surtout au souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passé ensemble.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

# Dédicaces

J'aurais l'immense plaisir de dédier ce travail à ceux qui m'ont soutenue, encouragée et qui m'ont éclairé la voie du succès et de la réussite.

A ceux qui m'ont donné un élan d'espoir tout au long de mon parcours avec le sourire, l'affection et la douceur.

A maman **Samia** qui a souhaité vivre pour longtemps juste pour nous voir qu'est-ce que nous allons devenir. Je la remercie pour son encouragement, ses conseils et ses sacrifices qui ont toujours fait preuves.

A mon père **Mondher** école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études et qui a veillé à me donner l'aide et à me protéger.

Au cadeau divin dont je suis fière, aux étoiles éclatantes, mes chères sœurs **Ameni** et **Aya**.

A tous mes cher/es ami/es En particulier à mes chères amis **chrifa ,nasr eddine,soulaymane** qui n'ont jamais cessé de me donner un coup de main et de renouveler mon énergie avec leurs optimisme et espoir que j'ai beaucoup appréciés. J'espère qu'ils trouvent dans ce travail tout l'amour que je leur porte.

A mon cher **sharaf** je tiens vraiment à vous remercier de l'aide et du support moral que vous m'avez accordé pendant tout ce temps .tu as été très significatif dans mon cheminement .

Yosra

# LISTE DES ABREVIATIONS

**A:** pourcentage d'adhésion

**ARNr 16s:** ARN ribosomique 16 S

**BHIA:** Brain heart infusion agar

**BHIB:** Brain heart infusion broth

**CIP:** Cleaning in place

**D:** désinfectant

**DO:** densité optique

**DPA :** l'acide dipicolinique

**EDS:** eau distillé stérile

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

**g/l :** Gramme par litre

**HNO<sub>3</sub> :** acide nitrique

**LC:**Lait cru

**LP0:** Lait en poudre à 0% MG

**LP26:** Lait en poudre à 0% MG

**M:** mole

**MG :** matière grasse

**NAOH :** la soude

**PAS :** des petites protéines solubles

**PCA:** Plate count agar

**S:** souche

**Spp :** abréviation de "species" (= "espèces"), pluriel de "sp.". Abréviation utilisée 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

**TSE:**Tryptone sel eau

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

**UFC:** Unité Formant une Colonie

**UHT : ultra haute température**

**V: Volume**

# Liste des figures

Figure 1 : Structure d'une spore (Durand, 2014) .....	15
Figure 2 : Cycle de sporulation et germination de <i>B. subtilis</i> (Durand, 2014).....	18
Figure 3 : Détails d'un biofilm ( $\times 1250$ ) (Branger et al., 2007).....	20
Figure 4 : Représentation schématique des étapes de formation du biofilm (Yannick et al., 2014).....	22
Figure 5 : Micrographie électronique à balayage d'un biofilm d' <i>A. Flavithermus</i> de 18 h sur la surface de l'acier inoxydable (Burgess et al., 2010).....	23
Figure 6 : Echantillons (A: lait cru dans un flacon stérile ; B: poudre du lait dans des boîte de pétrie stériles) .....	29
Figure 7 : Technique de la goutte.....	33
Figure 8 : biofilms formés dans les puits des microplaques et colorés au cristal violet .....	34
Figure 9 : concentration du biofilm à la surface des tubes avec la formation d'un anneau ....	35
Figure 10: croissance des bactéries à différentes température (A:37°C/B:45°C/ C:55°C )....	41
Figure 11 : Les différents aspects morphologiques des colonies obtenues sur gélose BHIA après une incubation de 24h .....	42
Figure 12 : observation microscopique des souches après coloration de Gram sous microscope GX100 .....	43
Figure 13 : Activité protéolytique qui se traduit par une zone claire sur gélose au lait .....	44
Figure 14 : Activité lipolytique qui se traduit par une zone de précipitation sur gélose au tween 80 .....	45
Figure 15 : Image de formation du biofilm de S5 .....	46
Figure 16 : Image d'adhésion de S5.....	46
Figure 17 : Images de formation du biofilm de S7 .....	47
Figure 18 : Formation du biofilm sur microplaque à 30 °C .....	48
Figure 19 : Formation du biofilm sur microplaque à 45°C .....	48
Figure 20 : Formation du biofilm sur microplaque à 55°C .....	49
Figure 21 : Formation du biofilm sur des tubes en verre .....	50
Figure 22 : Adhésion des 9 souches à hexadécane.....	51

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des bacilles thermophiles obligatoires (Burgess et al., 2010) ....	11
Tableau 2 : Caractéristiques des bacilles thermophiles facultatifs (Burgess et al., 2010) .....	12
Tableau 3 : Les différentes compagnes de prélèvement des échantillons.....	29
Tableau 4 : Origine des souches.....	39
Tableau 5: Les différents origines des souches.....	39
Tableau 6: Résultat du dénombrement après incubation à 30°C .....	40
Tableau 7 : Résultat du dénombrement après incubation à 55°C .....	40
Tableau 8 : Les activités enzymatiques des souches isolées .....	44
Tableau 9: Pourcentages d'inhibition du désinfectant pour la souche 6 .....	52
Tableau 10 : Pourcentage d'inhibition du désinfectant pour la souche 7.....	52

# Table des Matières

## Contenu

### Résumé

Introduction .....	1
Chapitre I : la flore microbienne des laits .....	4
1. Généralités.....	5
2. Le lait cru .....	5
2.1. La flore originelle.....	6
2.2. La flore de contamination .....	6
3. La poudre du lait .....	7
3.1. Méthodes de production de la poudre du lait .....	7
3.2. La flore originelle.....	8
3.3. La flore de contamination .....	8
Chapitre II : Les bacilles thermophiles dans le lait .....	9
1. Généralités.....	10
2. Définition .....	10
2.1. Les différents groupes de bacilles thermophiles .....	10
2.2. Les bacilles thermophiles dans le lait cru et le lait en poudre .....	13
3. Les caractéristiques des bacilles thermophiles.....	13
4. Importance des bacilles thermophiles dans la transformation des produits laitiers.....	14
4.1. Potentiel d'altération des bacilles thermophiles .....	14
4.2. La sporulation des bacilles thermophiles .....	14
Chapitre III : le biofilm des bacilles thermophiles .....	19
1. Définition .....	20
2. Composition de biofilm :.....	20
2.1. Les microorganismes.....	21
2.2. La matrice.....	21
3. Formation du biofilm .....	22
3.1. Les étapes de formation de biofilm par des bacilles thermophiles.....	22
4. Résistance du biofilm .....	25
5. Stratégies de lutte contre le biofilm de l'environnement laitier .....	26
5.1. Efficacité du nettoyage industriel sur les biofilms .....	26

Matériel et méthodes .....	28
I. Prélèvement.....	29
I. Transport des échantillons .....	29
II. Traitement des échantillons .....	30
1. Préparation des échantillons .....	30
2. Traitement thermique .....	30
3. Préparation des dilutions .....	30
4. Ensemencement.....	30
5. Enrichissement .....	31
6. Conservation des souches.....	31
7. Test de croissance à différentes températures .....	31
8. Identification phénotypique des souches.....	31
9. Etude de l'adhésion et la formation des biofilm des bacilles thermophiles .....	33
Résultats et discussions .....	38
1. Le soucier bactérien .....	39
2. Dénombrement .....	40
3. Etude de température.....	40
4. Identification phénotypique des souches.....	41
4.1. Les caractères culturaux .....	41
4.2. Caractères biochimiques .....	44
5. Formation du biofilm .....	46
5.1. Formation du biofilm sur les lames en verre :.....	46
5.2. Formation du biofilm sur les microplaques.....	47
6. Evaluation de L'hydrophobicité des spores .....	50
7. L'effet d'un désinfectant .....	51
7.1. Effet antibiofilm .....	51
Conclusion.....	54
Références .....	56
ANNEXES .....	62

# **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).

L'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb et le premier pays au monde importateur de lait et de ses dérivés . En effet, 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 62 % de la production laitière nationale, le reste (48%) étant la part du lait de vache produit localement(Malek.,2019).

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. Les bactéries sporulées les plus rencontrées appartiennent à *Bacillus* et aux genres apparentés (Malek.,2019).

Les bacilles thermophiles sporulants sont des contaminants courants des produits laitiers, bien que non pathogènes, de nombreux bacilles thermophiles formant des spores qui 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).

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).

L'objectif de ce travail est d'évaluer la contamination de la poudre de lait et du lait cru liquide par les bacilles thermophiles dans une laiterie de la région de Tlemcen.

\*Isolement et dénombrement sur plaque des bacilles thermophiles dans des échantillons de poudre de lait et de lait cru liquide.

\*Identification phénotypique des souches isolées.

\*Caractérisation des bacilles thermophiles isolés par l'étude de leur pouvoir enzymatique et leur capacité de former des biofilms.

\*étudier l'effet d'un désinfectant (l'effet anti biofilm et l'effet sporicide).

# **Chapitre I : la flore microbienne des laits**

### 1. Généralités

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum » (Konte., 1999).

Dans la plupart des civilisations humaines, le lait des animaux domestiques (vache, brebis, chèvre, jument, yak, chamelle, dromadaire, bufflonne, renne) est couramment consommé, mais l'industrialisation concerne principalement le lait de vache, et à plus petite échelle, le lait de brebis et de chèvre (Vilain., 2010).

En outre, Le lait est un fluide biologique complexe et, par sa nature, un milieu de croissance pour bon de nombreux microorganismes. En raison de la production spécifique, il est impossible d'éviter la contamination du lait des micro-organismes par conséquent, le contenu microbien du lait est un élément majeur dans la détermination de sa qualité ( Karmen et al., 2008).

### 2. Le lait cru

Le lait cru est un produit hautement nutritif sur le plan de la nutrition. Sa production doit être sévèrement contrôlée en raison des risques éventuels qu'il peut présenter pour la santé humaine. En effet, des souches pathogènes pour l'homme et l'animal, pouvant avoir acquis des résistances multiples aux antibiotiques peuvent y proliférer. (Labioui et al., 2009).

Le lait cru, ou lait n'ayant subi aucun traitement d'assainissement, peut contenir des bactéries pathogènes appartenant aux genres *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* qui peuvent causer des maladies d'origine alimentaire comme la fièvre, les vomissements, la diarrhée voire l'insuffisance rénale, et même la mort. Ignorants des bonnes pratiques d'hygiène, les acteurs de la filière laitière locale, contribuent à la dissémination et à la multiplication des germes pathogènes dans le lait lors de la traite et de la commercialisation (Kouame-Sina et al., 2010). Une évaluation de la qualité hygiénique du lait permet de rechercher la microflore naturelle et des microorganismes témoins de contaminations extra-mammaires éventuelles (Labioui et al., 2009).

### 2.1. La flore originelle

Le lait contient relativement peu de bactéries quand il est sécrété à partir de la mamelle d'un animal en bonne santé. Une faible charge microbienne (moins de 1000 ml<sup>-1</sup>), mais les charges peuvent augmenter jusqu'à à 100 fois ou plus une fois qu'il est stocké pendant un certain temps à la normale température (Aftab Uddin et al., 2011). La flore naturelle du lait cru est un facteur essentiel particulièrement à ses propriétés organoleptiques (Fotou et al., 2011). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques, mais aussi streptocoques lactiques (*Lactococcus*) et lactobacilles. Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées « lacténines » mais leur action est de très courte durée environ 1 heure. (Guiraud, 2003).

D'autres micro-organismes peuvent se retrouver dans le lait cru lorsqu'il est issu d'un animal malade, ils sont généralement pathogènes et dangereux au point de vue sanitaire. Les pathogènes pour l'homme sont les micro-organismes suivants : *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Brucella*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Coxiella burnetii*, *Campylobacter*, *Yersinia* (Bourgeois, 1996).

### 2.2. La flore de contamination

Le lait se contamine par des apports microbiens d'origines diverses (Guiraud, 2003) :

- Fèces et téguments de l'animal : Coliformes, Entérocoques, Clostridium, éventuellement des entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*).
- Sols : Streptomyces, Listeria, bactéries sporulées, spores fongiques.
- Litières et aliments : Flore banale variée, en particulier Lactobacillus, Clostridium butyriques.
- Equipement de trait et de stockage du lait : Microcoques, levures et flore lactique avec lactobacilles, Streptocoques, (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*).
- Manipulateurs : Staphylocoques, dans le cas de traite manuelle, mais aussi germe provenant d'expectorations, de contaminations fécales.
- Air et eau : Flores diverses dont *Pseudomonas*, bactéries sporulées.
- Vecteurs divers (insectes en particulier) : Flore de contaminations fécales.

### **3. La poudre du lait**

Le lait en poudre est le produit provenant de la dessiccation de lait entier ou de lait écrémé ou de lait partiellement écrémé, propre à la consommation humaine (Ndiaye- Penda. 2002).

La raison principale pour la production des poudres de lait est de prolonger leur durée de vie et faciliter le stockage et la manutention. En cas de stockage dans des conditions appropriées (c.-à.-sec et frais), tout lait en poudre a une durée de vie de 12 mois et plus de 2 ans pour la poudre de lait écrémé. La durée de conservation du lait en poudre est généralement établie pour justifier la sécurité microbiologique et de garder acceptable les caractéristiques sensorielles (par exemple la couleur, la saveur) (Esther et al., 2008).

Bien que le lait en poudre est microbiologiquement stable et acceptable, de nombreux changements physico-chimique, tels que la cristallisation du lactose, l'agglomération de particules, des réactions d'oxydation de graisse, la réaction de Maillard, peuvent se produire pendant le stockage et modifier ces propriétés physiques et fonctionnelles telles que, la fluidité, propriétés de reconstitution, propriétés émulsifiantes et moussantes des poudres.

L'ampleur de ces changements est fortement dépendante des conditions de stockage (température, humidité et temps), et une meilleure compréhension de la modification physicochimiques qui se produisent dans des conditions de stockage seront être très utiles pour prédire le comportement des poudres lors de leurs utilisation finale (Esther et al., 2001).

#### **3.1. Méthodes de production de la poudre du lait**

A l'échelle industrielle, le lait en poudre est produit par deux méthodes : le séchage sur cylindres et le séchage par atomisation (à une température de 143 °C-149°C). Dans le cas du séchage sur cylindres, le lait est réparti sur des tambours rotatifs chauffés à la vapeur. L'eau évaporée est éliminée par un courant d'air.

Cependant, pour la fabrication de poudre par atomisation, le lait subit une évaporation sous vide jusqu'à l'obtention d'environ 45 à 55 % d'extrait sec avant qu'il soit injecté dans une centrifugeuse qui tourne de 5000 à 25000 tr/min. L'atomisation donne lieu à un nuage de fines gouttelettes dont la surface effective est d'environ 700 fois plus importante (Abdenouri et al., 2008).

### 3.2. La flore originelle

Les poudres de lait sont généralement en tant que produit de bonne qualité microbiologique sans risque de détérioration, mais plusieurs facteurs peuvent contribuer à changer leurs propriétés physiques et chimiques qui réduisent la durée de vie et sa valeur commerciale. (Rajput et al., 2009). La microflore du lait en poudre dépend de nombreux facteurs, notamment le nombre et le type de bactéries présents dans le lait cru, températures de préchauffage, les conditions de fonctionnement de l'évaporateur, les sèche-linge et l'hygiène des installations (Deeb et al., 2010).

Les bactéries thermophiles et en particulier les espèces du genre *Bacillus* ou ceux qui autrefois appartenait à ce genre sont une préoccupation majeure pour les producteurs de lait en poudre parce que ces bactéries peuvent survivre au traitement thermique au cours de la production (Reginensi et al., 2011). Les réchauffeurs et évaporateurs utilisés dans le traitement peuvent fournir un environnement très adapté à la croissance des micro-organismes thermophiles, et la sporogénèse permet aux membres de ces groupes de résister à des conditions environnementales difficiles qui permettent leur survie (Reginensi et al., 2011). En effet, les bactéries thermophiles se développent rapidement au cours de la fabrication de lait en poudre. *Anoxybacillus flavithermus* et *Geohacillus sp.* sont les principaux contaminants des bacilles thermophiles dans la poudre du lait (Flint et al., 2001).

### 3.3. La flore de contamination

*Bacillus stearothermophilus* est un contaminant commun de produits laitiers, en particulier lait en poudre (Flint et al., 2001). Les principales espèces isolées à partir des salissures dues au préchauffage dans les évaporateurs sont *A. flavithermus.* et *G.stearothermophilus.* Ces deux organismes ont souvent été isolé à partir de la poudre du lait (Reginensi et al., 2011).

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

### 1. Généralités

le lait constitue un substrat très nutritif qui peut contenir une large variété de bactéries gram-négatives et gram positives ainsi que levures et moisissures (Ronimus et al.,2003).les bacilles thermophiles ont été signalés comme des contaminants importants dans les poudres de lait .les bacilles thermophiles découverts dans les poudres de lait sont principalement les espèces telles que *Bacillus licheniformis* ,*Geobacillus stearothermophilus* ,*Anoxybacillus flavithermus* (Rueckert et al .,2006).

### 2. Définition

Les bacilles aérobies thermophiles gram positives 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 (Ronimus et al .,2003 ;Nazina et al .,2001) 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(Burgess et al.,2010). Ils participent de ce fait à la dégradation de la qualité du lait pasteurisé et à la diminution de sa durée de vie (Male.,2019).

#### 2.1. Les différents groupes de bacilles thermophiles

les bacilles thermophiles peuvent être divisés en deux groupes : les thermophiles obligatoires et les thermophiles facultatifs (également connus sous le nom de micro – organismes thermotolérants ) (Crabb et al .,1974 ;Flint et al . ;2001).

##### 2.1.1. Les thermophiles obligatoires

Ils ne poussent qu'à des températures élevées (environ 40-68°C) et comprennent *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus spp* (tableau 1) (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 1 : Caractéristiques des bacilles thermophiles obligatoires (Burgess et al., 2010)**

	Anoxybacillus flavithermus	Geobacillus stearothermophilus	Geobacillus thermoleovorans
Croissance maximale T °C	65-72	65-68	70
Croissance minimale T °C	30-38	37	35-47
Anaérobie	Oui	Non	Non
Ph	6-9	6-8	5.2-8
Sporange gonflé	Oui	Oui	Oui
Position des Spores	Terminal	Terminal	Terminal
Réaction de voges-proskauer	Positif	Négatif	Négatif
Croissance dans 7% Na Cl	Non	Non	Non
Nitrate réduit en nitrite	Oui	Variable	Oui
Hydrolyse de Caséine	Oui	Varibale	Variable
Hydrolyse de Gélatine	Non	Oui	variable

### 2.1.2. 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 sporothermodurans* (tableau 2) (Burgess et al., 2010).

Tableau 2 : 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>
Croissance maximale T °C	50-55	45-55	57-61	50-55	45-55
Croissance minimale T °C	15	5-20	15-25	5-15	20
Anaérobie	oui	Non	Oui	non	Non
Ph	5.5-8.5	5.5-8.5	4-10.5	5.5-8.5	Inconnue
Sporange gonflé	non	non	Variable	non	Non
Position des Spores	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

### 2.2. Les bacilles thermophiles dans le lait cru et le lait en poudre

Les bacilles thermophiles sont en nombre faible dans le lait cru, mais peuvent atteindre un nombre relativement élevé dans les poudres résultant de biotransfert de la croissance au sein de biofilms sur les surfaces dans les évaporateurs à l'usine (Ronumus et al.,2003).

En effet, à l'origine le lait contient un nombre faible .mais les bacilles thermophiles pourraient augmenter au cours du processus de production de lait en poudre et conduisent au nombre élevé de bacilles thermophiles dans le produit final (Yuan et al .,2012).

Le nombre élevé de bacilles thermophiles dans les poudres du lait cru indique une mauvaise hygiène lors de la production du lait en poudre .En outre, les bacilles thermophiles pourraient non seulement l'altération en raison de leur production d'acides et de l'excrétion des enzymes thermostables, mais aussi causer des maladies d'origine alimentaire (Burguess et al.,2010).

### 3. 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* 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).

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

Dans le contexte de la transformation laitière, les bacilles thermophiles sont utilisés comme indicateurs d'hygiène dans les produits laitiers, c'est à cause de leur capacité de former des endospores et des biofilms. En outre, ils sont les organismes responsables d'altération.

#### 4.1. 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 protéases 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, ils ne sont pas connus comme des pathogènes 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).

Cependant, certains des thermophiles facultatifs y compris les *B.licheniformis*, *B.pumilis* et *B.subtilis* peuvent produire des toxines, bien que cela a été étudié seulement à des températures mésophiles. En des rares occasions, ces trois organismes ont été impliqués dans des incidents d'intoxication alimentaire. Cependant, on ignore si ces organismes sont capables de produire des toxines à des températures de croissance des thermophiles (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).

#### 4.2. La sporulation 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).

### 4.2.1. La structure des endospores

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 et d'autres espèces telles que *B.cereus* peu. 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 1) (Burgess et al., 2010).

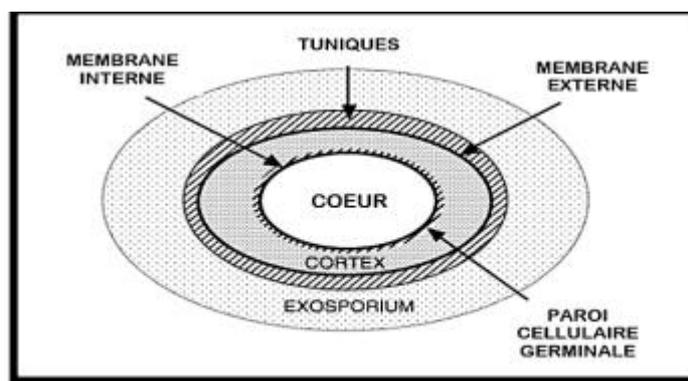


Figure 1 : Structure d'une spore (Durand, 2014)

### 4.2.2. 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).

### 4.2.3. Résistance

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

Dans le cas de bacilles mésophiles et facultativement thermophiles ,la combinaison de plusieurs propriétés participent à la résistance des spores de *Bacillus* ,y compris leur faible teneur en eau ,l'imperméabilité de la membrane interne ,la couche de spore ,le peptidoglycane ,le cortex, des petites protéines (PAS) solubles dans l'acide et l'acide dipicolinique (DPA)(Walker et al.,1961 ;pouce et al.,Luu et Stelow .,2014).

Les caractéristiques majeures des spores qui sont associées à la résistance à la chaleur sont supposées la minéralisation et la faible activité d'eau.Des minéraux sous la forme de cations divalents sont situés dans la base des spores, principalement chélatés avec DPA (Luu et Stelow.,2014). Le cation divalent prédominant chélatés ave DPA, est le  $Ca^{2+}$  (Setlow.,2014).Les spores des mutants qui étaient incapables de produire le DPA étaient également incapables d'accumuler de calcium (Walker et al.,196 ;Luu et Stelow.,2014).

La quantité de calcium dans les spores de *B.sporothermodurans* est connue pour être corrélé avec la résistance à la chaleur des spores des *Bacillus* mésophiles .le type cation divalent présent dans le noyau des spores a été montré résistante à la chaleur .

L'activité de l'eau de la spore est également importante dans les spores résistantes (Nicholson et al.,2000).

Dans le cas des bacilles thermophiles ,la résistance des spores à la chaleur varie considérablement ,les spores de *Geobacillus Spp* ont le potentiel de survivre à un traitement UHT (134-145°C pendant 1 à 10 s) (Giffel et al.,1995 ;Pouce et al.,2008 ;Postollec et al.,2010).En outre,les spores de *Bacillus* dans les produits de lait en poudre peuvent rester en dormance pendant une année si les conditions ne sont pas bonnes pour la germination(Nicholson et al.,2000 ;Gosh et Setlow.,2014).par exemple ,les spores viables de *B.subtilis* et *B.licheniformis* ont récemment été isolées à partir de 90 ans,dans le lait en poudre.

La production d'endospores résistantes à la chaleur (80-100°C pendant 10 à 30 minutes) et très résistantes à la chaleur (> 106°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).

#### 4.2.4. La 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.

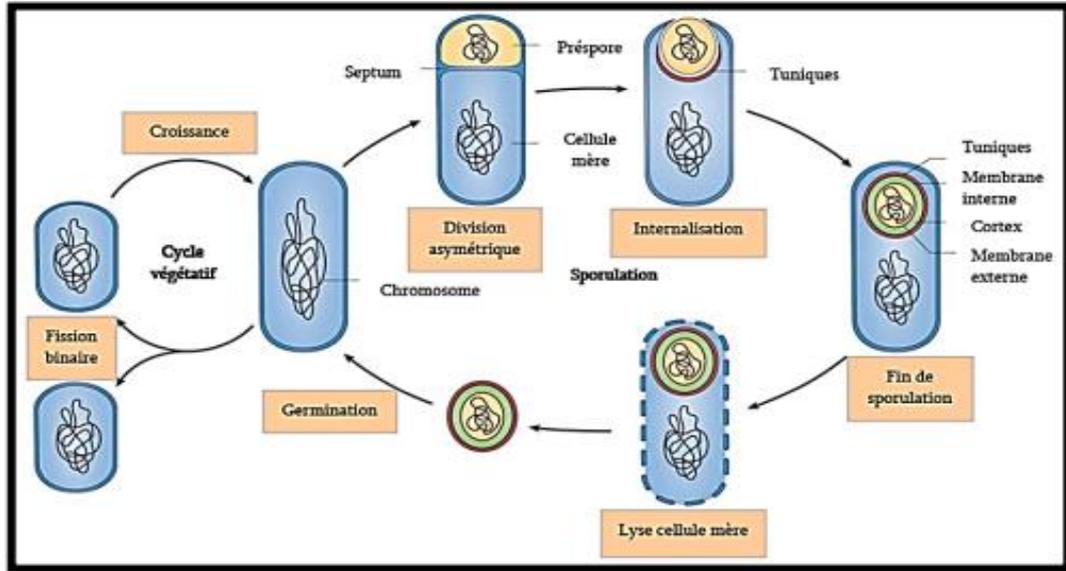


Figure 2 : Cycle de sporulation et germination de *B. subtilis* (Durand, 2014).

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'industries 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).

# **Chapitre III : le biofilm des bacilles thermophiles**

### 1. Définition

Un biofilm est ensemble des microorganismes, soit de la même espèce, soit d'espèces 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.

Ces micro colonies vont se développer et former des multicouches de cellules bactériennes intégrés dans la matrice EPS. Qui sont séparé par des canaux d'eau (Simo-es et al., 2009).

Cette matrice est formée de matières organiques et non organiques, ainsi que des macromolécules piégées du milieu environnant. Elle fournit une source de nutriments pour les des cellules bactériennes. Le procédé de fixation et de la production d'EPS rend les cellules bactériennes dans un biofilm beaucoup plus résistant que les cellules planctoniques à des conditions très dures (Burgess et al., 2010).

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 3) (Branger et al., 2007). Les biofilms constituent un mode de croissance protégé qui permet aux microorganismes de survivre dans des environnements hostiles (Simões et al., 2010).

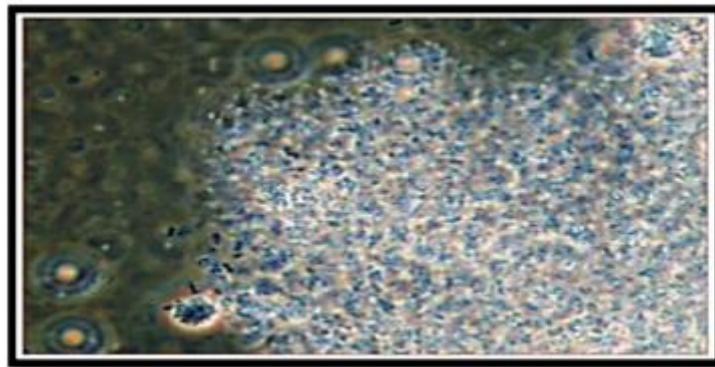


Figure 3 : Détails d'un biofilm (×1250) (Branger et al., 2007).

### 2. Composition de biofilm :

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

### 2.1. Les microorganismes

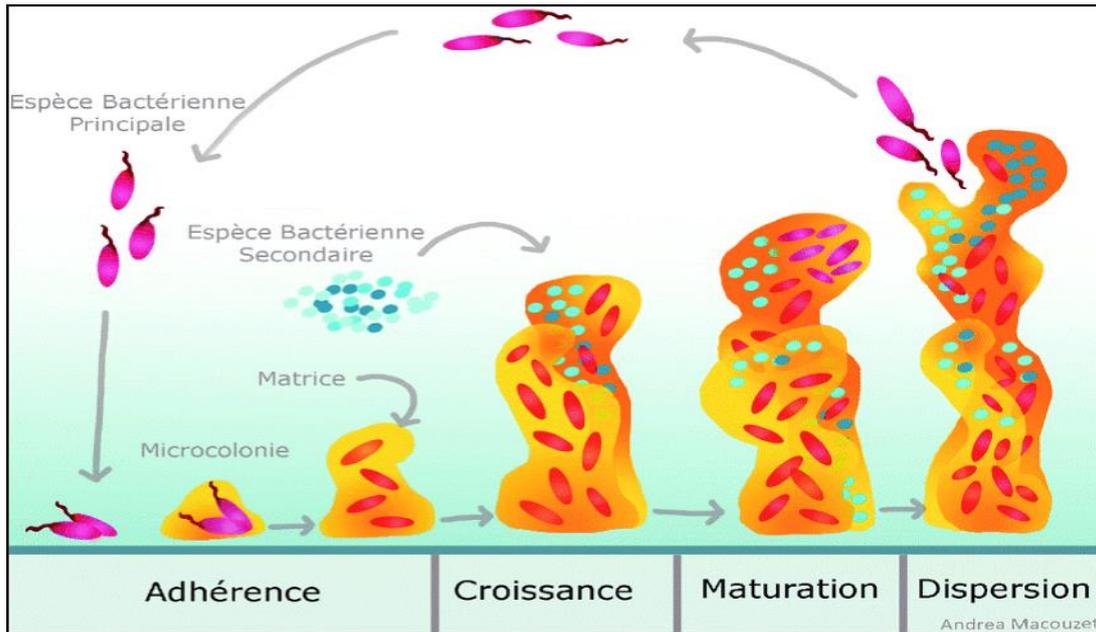
Seuls quelques biofilms sont composés d'un seul type d'organisme (ce phénomène est lié aux conditions environnantes, plus souvent qu'à la nature même des organismes). Les biofilms naturels ne sont que rarement clonaux. Mais au contraire abritent souvent de nombreux types de microorganismes : bactéries,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

### 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).

### 3. Formation du biofilm



**Figure 4 : Représentation schématique des étapes de formation du biofilm (Yannick et al., 2014)**

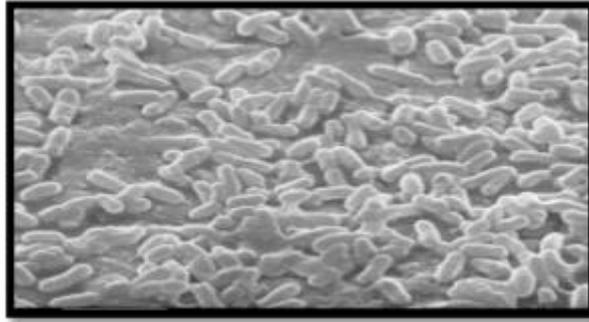
#### 3.1. Les étapes de formation de biofilm par des bacilles thermophiles

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> (Malek. ;2019).

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 5), 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 5 : Micrographie électronique à balayage d'un biofilm d'*A. Flavithermus* de 18 h sur la surface de l'acier inoxydable (Burgess et al., 2010).**

**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).

### **3.1.1. 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 physicochimiques 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).

### 3.1.2. 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 atteint 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).

### 3.1.3. 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).

#### 4. 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 (persistent cells), sont également à la base de la résistance des biofilms aux agents antimicrobien (Malek, 2019).

### 5. 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).

#### 5.1. 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).

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 nettoyeurs 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 (Parker et al., 2004).

- Le nettoyage à base d'enzymes: a. Les nettoyeurs à base de protéase tels que Paradigme, qui est un nettoyeur 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 PurastarTM, une  $\alpha$ -amylase, Cellulase, une polysaccharidase et mutanolysine, un peptidoglycane hydrolase de paroi cellulaire (Parker 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 (Parker 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 (Parker et al., 2004).

- Les auxiliaires des détergents, tels que le Tween-80 (un polysorbate synthétique) et l'acide dobanique, ont des effets tensioactifs ; ils améliorent l'accès d'autres nettoyeurs aux biofilms en augmentant leur mouillabilité (Parker et al., 2004).

# **Matériel et méthodes**

## I. Prélèvement

6 échantillons ont été prélevés durant le mois de Mars 2022 dans une laiterie de la région de Tlemcen tels que présentés dans le tableau 3 et les figures 6.

**Tableau 3 : Les différentes compagnes de prélèvement des échantillons**

Echantillon	Date de prélèvement	Code
Lait en poudre à 0% MG (France)	02/03/2022	LP0
Lait en poudre à 0% MG (Argentine)	07/03/2022	
Lait en poudre à 26% MG (Argentine)	02/03/2022	LP26
Lait en poudre à 26% MG (Argentine)	07/03/2022	
Lait de vache cru à partir de la citerne de collecte	9/03/2022	LC
Lait de vache cru à partir de la tank	14/03/2022	

1. Lait cru : les échantillons du lait cru sont prélevés à l'aide des flacons stériles.
2. Lait poudre : les échantillons du lait en poudre sont prélevés en utilisant des boîtes de pétrie stériles.



**Figure 6 : Echantillons (A: lait cru dans un flacon stérile ; B: poudre du lait dans des boîte de pétrie stériles)**

## I. Transport des échantillons

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

## II. Traitement des échantillons

### 1. Préparation des échantillons

- **La solution mère du lait cru**

1 ml du lait cru est ajouté aux tubes remplies par 9ml de tryptone -sel -eau (TSE) et agité au vortex.

- **La solution mère de lait en poudre**

Aseptiquement ,1g de poudre est posé dans un tube qui contient 9 ml du liquide de dilution tryptone -sel -eau (TSE), puis la solution est agitée au vortex.

### 2. Traitement thermique

Plus qu'un traitement direct pour isoler les germes totaux, Un traitement thermique est réalisé dans un bain marie à 80 °C pendant 12 min pour tous les différents types du lait (lait cru et lait en poudre) afin d'isoler les formes sporulées.

On a accéder pour le deuxième lot à un autre traitement thermique à 100°C pendant 30 min pour isoler les spores thermophiles hautement résistantes à la chaleur.

Les traitements à la chaleur sont suivis directement d'un refroidissement dans un béccher qui contient de la glace.

### 3. Préparation des dilutions

Des échantillons analysés (**après traitement thermique**) sont effectuées en cascades jusqu'à la dilution  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  Pour ceux qui sont analysés directement.

### 4. Ensemencement

L'ensemencement des bacilles thermophiles s'effectue en surface sur le milieu plate count agar (PCA) et brain heart infusion agar (BHIA) coulé dans des boites de pétri.

A l'aide de micropipette de 100  $\mu$ l on dépose 0.1 ml de la solution mère dans les boites de pétri préparées qui contient le milieu gélosé.

On étale uniformément cet inoculum sur la gélose par des pipettes pasteur en forme d'un râteau.

L'incubation se fait à 30°C et 55°C pendant 24 à 72 h.

Pour le 2 -ème lot l'incubation se fait qu'à 55 °C.

### **5. Enrichissement**

Un enrichissement des échantillons et de leurs dilutions est réalisé à 55 °C pendant 24H.

L'isolement des thermophiles se fait toujours sur milieu BHI .l'incubation est réalisée à la même température d'enrichissement pendant 24H .

### **6. Conservation des souches**

La conservation des souches s'effectue dans des tubes à essai contenant de la TSA inclinée. Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par des stries et incubées à 55°C pendant 36h, puis conservées à 4°C.

### **7. Test de croissance à différentes températures**

On a testé la croissance des souches à différentes températures pour identifier le caractère obligatoire ou facultatif des thermophiles.

### **8. Identification phénotypique des souches**

L'identification phénotypique des souches isolées porte sur l'étude d'un certain nombre de caractère morphologiques, physiologiques et biochimiques.

#### **8.1. Caractères morphologiques des souches**

##### **8.1.1. Aspect macroscopique**

cette étude consiste à l'observation directe à l'œil nu l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieu BHI après 48 h d'incubation en tenant compte des critères (la forme des colonies ,leur taille ,leur couleur ,l'élévation , l'opacité et la surface).

##### **8.1.2. Aspect microscopique**

l'examen microscopique permet d'observer la forme, la taille, le gram, le mode de regroupement, la mobilité, la pureté de la souche en plus la position de la spore.

- **Observation à l'état frais**

Sur une lame propre dégraissée, on étale une goutte de suspension réalisée dans l'eau physiologique à partir des colonies de 24h .puis on dépose une lamelle et on observe au G10\*100(à l'immersion).

- **Coloration de Gram**

Des frottis sont préparés à partir des cultures jeunes et observés au microscope à l'immersion après coloration de Gram.

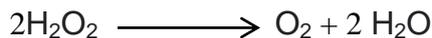
- **Recherche des spores**

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

### 8.2. Caractères biochimiques des souches

- **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. La réaction catalysée est la suivante :



Cette enzyme est mise en évidence par l'émulsion de la suspension bactérienne dans une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase (Delarras, 2014).

### 8.3. Détermination des activités enzymatiques

- **Recherche des protéases**

- **Principe**

Les protéases hydrolysent les protéines en petits fragments peptidiques et acides aminés. Les liaisons sont cassées par l'addition de l'eau entre les groupes adjacents carboxyliques et amines.

- **Technique**

L'activité protéolytique est révélée sur un milieu gélosé contenant 5 % de poudre de lait (Lanyi, 1987). Une colonie de chaque souche à étudier est ensemencée par une strie avec une anse. L'incubation se fait à 55 °C pendant 24h.

- **Lecture**

La présence de la caséinase se manifeste par la présence d'une zone claire autour des colonies. Par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture.

- **Recherche de la lipase**

- **Principe**

Les bacilles thermophiles possèdent une activité lipolytiques et estérasique qui décompose les graisses en acide gras et alcool.

- **Technique**

L'activité lipolytique est réalisée sur gélose nutritive additionnée de tween 80. L'ensemencement se fait par une seule strie pour chaque souches. L'incubation se fait à 55°C pendant 24h (Castro et al., 2005).

➤ **Lecture**

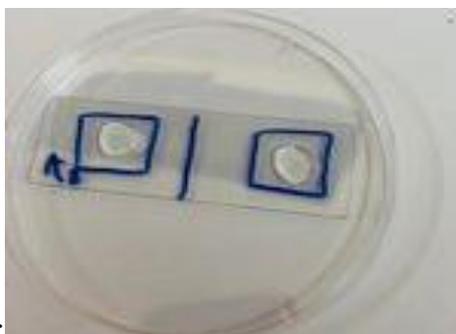
La présence de lipase se présente par un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de lipolyse.

**9. Etude de l'adhésion et la formation des biofilm des bacilles thermophiles**

**9.1. Observation microscopique des cellules adhérentes au verre**

L'adhésion des bacilles thermophiles est étudiée sur des lames de microscope en verre.

Pour cela, les cellules végétatives de cultures jeunes (moins de 24h) sont laissées adhérentes au verre selon la technique de (Malek .,communication personnelle) et sont observées au microscope optique à l'immersion .



**Figure 7 : Technique de la goutte**

**9.2. Formation des biofilms dans les microplaques de titration**

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

➤ **Technique**

Dans les puits des microplaques de titration en polystyrène stérile ,100 µl du BHIB et 20 µL de la suspension bactérienne préparée dans l'eau physiologique et ajustée à une DO de 0.6 à 0.8 nm sont introduits.

La première rangée est laissée vide pour le contrôle du lecteur et la deuxième est remplie par le milieu non ensemencé comme un témoin.

Chacune des plaques est incubée à 3 températures différentes : 37°C, 47°C ,55°C.

➤ **Coloration des biofilms au cristal violet**

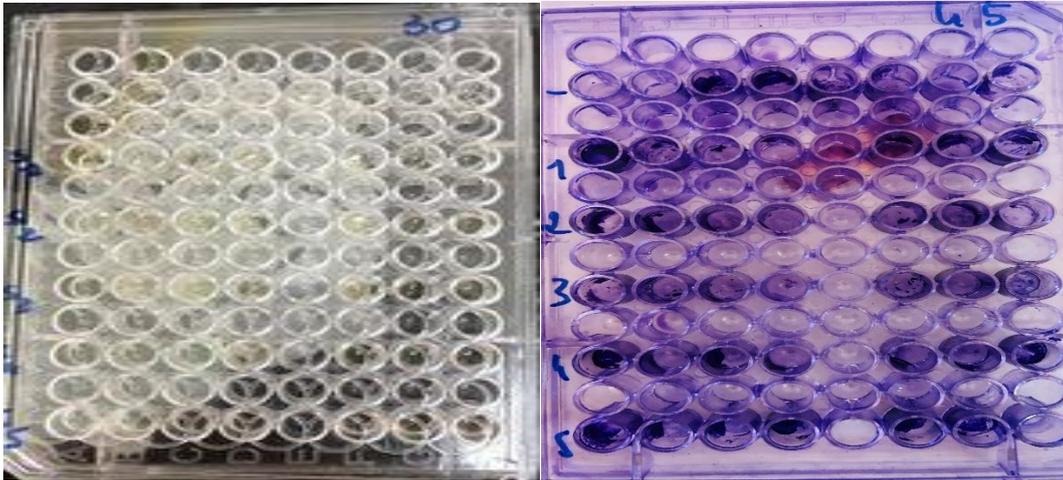
Après le temps d'incubation, les biofilms formés sur les parois des puits sont mis en évidence par coloration au cristal violet.

-Les microplaques sont d'abord vidées par la micropipette.

- Rinçage à l'eau distillé trois fois pour éliminer les cellules non adhérentes.
- Laisser sécher 10 à 15 min.
- Remplir les puits avec 200 µl de cristal violet 0.2%.
- Laisser agir 15 min puis rincer à l'EDS 3 fois.
- Séchage des plaques en position renversé.

➤ **Lecture :**

Avant la mesure de la DO au spectrophotomètre muni d'un lecteur de microplaque à 580 nm, les puits sont remplis avec une solution dissolvante constitué d'éthanol et d'acide acétique glacial dilué dans du l'eau distillé.



**Figure 8 : biofilms formés dans les puits des microplaques et colorés au cristal violet**

**9.3. Formation de biofilms dans des tubes en verre**

- préparer des suspensions homogènes en ensemençant 100 µl des cultures jeunes dans 7 ml de BHIB.
- répartir les suspensions préparées dans des tubes en verre à raison de 2 ml par tube.
- préparer des tubes témoins contenant 2 ml de bouillon de culture stérile.
- incuber tous les tubes à 45°C pendant 24h.
- après 24h, pour chaque tube éliminer la culture liquide (la phase planctonique).

-rincer 3 fois à l'eau distillée.

Révéler la biomasse fixée sur la surface interne des tubes en ajoutant 3 ml de la solution de cristal violet à 0,2 %.

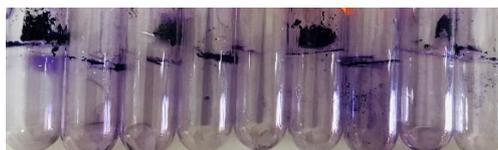
-laisser agir pendant 20 min, puis rincer à l'eau distillée.

-Egoutter et laisser sécher à l'air ambiant.

-solubiliser le colorant incorporé par les cellules ayant formé un biofilm à l'aide de la solution dissolvante (mélange éthanol, acide acétique et eau).

-laisser agir 5 à 10 min.

-mesurer l'absorbance à 580 nm.



**Figure 9 : concentration du biofilm à la surface des tubes avec la formation d'un anneau**

## 10. Mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire

### 10.1. Préparation des suspensions sporales

-revivification des souches conservées sur gélose BHI puis incubation 24h à 30 °C pour les mésophiles et 55°C pour les thermophiles.

-préparer des cultures d'enrichissement dans 7 ml de BHIB et incubé à la température optimale du germe à 24 h puis régler la DO.

-après 24h d'incubation, 200 µL de chaque culture sont étalées sur gélose BHI et incubé à 30 °C pendant 5 à 7 jours et pendant 24 h à 55°C (après à 37 °C).

-le degré de sporulation est vérifié par examen microscopique (quand le nombre de spores est supérieure à celui de des cellules végétatives). la culture est récupérée par 2 ou 3 lavages au TSE soumises à 2 ou 3 centrifugations successives (à 2000 g/ 20 min).

-les suspensions sporales ainsi obtenues subissent un traitement thermique (10 min à 80°C) pour inactiver les cellules végétatives restantes et sont conservées au froid.

Remarque : au moment de leur utilisation, ces suspensions doivent toujours être placées dans un bain de glace, pour empêcher la germination.

### 10.2. La technique MATH

Le caractère hydrophobe/ hydrophile des cellules végétatives est déterminé par la mesure de l'adhésion au solvant apolaire : l'hexadécane, selon la méthode MATH (Rosenberg, 1980).

Les suspensions de cellules précédemment préparées, après centrifugation des cultures sont ajustées à des densités optiques de 0.6-0,8 à 595 nm (A0). Des lavages de culot sont réalisés avant chaque manipulation, ensuite des aliquotes des cultures (2 ml) sont ajoutées à 400 µl de solvant et mélangées au vortex pendant 1 min à vitesse maximale.

Après un temps de repos de 15 min, permettant la séparation des deux phases, la DO (595 nm) de la phase aqueuse (A1) est lue.

Le pourcentage de spores adhérentes au solvant (A), est déduit utilisant la formule suivante

:  $A = (A0 - A1)/A0 \times 100$ . Chaque mesure est répétée au moins trois fois.

\*Pour l'hexadécane lorsque A est inférieur à 40%, la souche est dite hydrophile. Si A est compris entre 40 et 60%, la souche est dite moyennement hydrophobe. La souche est hautement hydrophobe pour  $A > 60\%$  (Simmonds et al., 2003).

### 11. L'efficacité du désinfectant sur le biofilm

Le désinfectant utilisé est NOD SAU EAS 5M (utilisé en CIP).

\*concentration : [0.5,2%] : les concentrations utilisées sont 0.5,1,1.5 et 2 .

\*Temps de contact : 5 à 30 min : les temps de contact sont 10,20 et 30 min.

\*Température : [20,60°C] : le désinfectant a été utilisé à 30,45 et 60 °C.

#### 11.1. Méthode des microplaques

-Les microplaques sont préparées comme pour la formation du biofilm puis incubation à 45°C pendant 24h.

-rinçage à l'eau distillé trois fois pour éliminer les cellules non adhérentes.

-laisser sécher 10 à 15 min.

-ajouter le désinfectant (à des concentrations, des temps de contact et des températures différentes).

-rinçage à l'eau distillée et laisser sécher.

- remplir les puits avec 200 µl de cristal violet.

-laisser agir 15 à 20 min puis rincer à l'EDS 3 fois.

-sécher les plaques en position renversées.

-avant la mesure de la DO (580 nm), les puits sont remplis avec une solution dissolvante.

### **11.2. Méthode des tubes en verre**

-préparer les tubes de formation du biofilm comme cité précédemment.

- après 24h, pour chaque tube éliminer la culture liquide (la phase planctonique).

-rincer 3 fois à l'eau distillée.

-ajouter le désinfectant.

-après le temps d'incubation, rincer 3 fois à l'EDS.

Révéler la biomasse fixée en ajoutant 3 ml de la solution de cristal violet à 0,2 %.

-laisser agir pendant 20 min, puis rincer à l'eau distillée.

-Egoutter et laisser sécher à l'air ambiant.

-solubiliser le colorant incorporé par les cellules ayant formé un biofilm à l'aide de la solution dissolvante (mélange éthanol, acide acétique et eau).

-laisser agir 5 à 10 min.

-mesurer l'absorbance à 570 nm.

### **11.3. Méthode de la goutte sur lames (effet sporicide)**

-les lames sont d'abord rincées et stérilisées.

-les lames sont préparées comme cité précédemment dans la méthode de la formation du biofilm.

- rinçage à l'eau distillé trois fois pour éliminer les cellules non adhérees.

- laisser sécher 10 à 15 min.

- ajouter le désinfectant.

-rinçage à l'eau distillée et laisser sécher.

-ajouter le cristal violet, laisser agir puis rincer à l'EDS.

- les lames sont observées au microscope optique à l'immersion.

# **Résultats et discussions**

### 1. Le soucier bactérien

Le soucier bactérien construit de l'analyse des différents échantillons de la poudre du lait (0% et 26%) et du lait cru est constitué de l'isolement de 9 souches de bacilles mésophiles et thermophiles. les différentes origines des souches sont mentionnées dans le tableau. Ces souches ont été isolées sur milieu BHIA.

**Tableau 4 : Origine des souches**

Origine	Nombre des souches isolées à 30°C	Nombre des souches isolées à 55°C
Lait cru	1	2
Poudre du lait 0%	1	2
Poudre du lait 26%	1	2

**Tableau 5: Les différentes origines des souches**

Souche	Conditions
Souche 1	Lait cru après traitement A
Souche 2	Lait cru après traitement B
Souche 3	Lait en poudre 0% après traitement A
Souche 4	Lait en poudre 0% après traitement B
Souche 5	Lait en poudre 26% après traitement A
Souche 6	Lait en poudre 26% après traitement B
Souche 7	Lait poudre 26% après traitement A
souche 8	Lait cru après traitement A
Souche 9	Lait poudre 0% après traitement A

A : température 80°C pendant 12 min / B :température 100°Cpendant 30 min

## 2. Dénombrement

**Tableau 6: Résultat du dénombrement après incubation à 30°C**

Type de souche (30°C)	N (UFC/ ml)
LCA	19*10 <sup>6</sup>
LP0A	9*10 <sup>6</sup>
LP26 A	11*10 <sup>6</sup>

**Tableau 7 : Résultat du dénombrement après incubation à 55°C**

Type de souche (55°C)	N (UFC/ml)
LP0A	13*10 <sup>3</sup>
LP0B	6*10 <sup>4</sup>
LP26A	8*10 <sup>5</sup>
LP26B	9*10 <sup>5</sup>
LCA	9*10 <sup>3</sup>
LCB	7*10 <sup>5</sup>

A: Température 80°C pendant 12 min / B : Température 100°C pendant 30 min

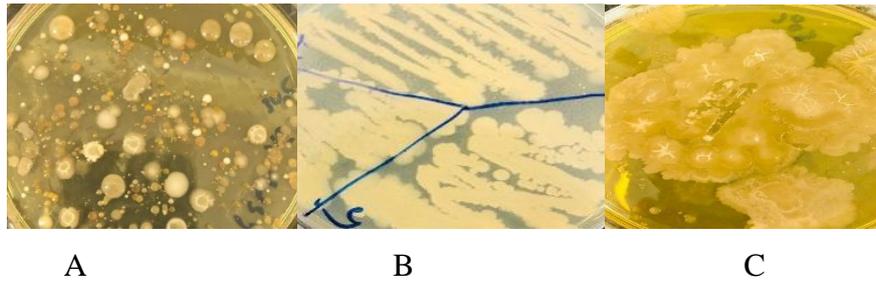
On constate que le lait en poudre surtout LP26% est plus riche en bacilles thermophiles que le lait cru.

Ces résultats confirment celles qui ont montré que Les bacilles thermophiles sont en nombre faible dans le lait cru, mais peuvent atteindre un nombre relativement élevé dans les poudres résultant de biotransfert de la croissance au sein de biofilms sur les surfaces dans les évaporateurs à l'usine (Ronumus et al.,2003).

En effet ,à l'origine le lait contient un nombre faible .mais les bacilles thermophiles pourraient augmenter au cours du processus de production de lait en poudre et conduisent au nombre élevé de bacilles thermophiles dans le produit final (Yuan et al .,2012).

## 3. Etude de température

Pour étudier le caractère obligatoire ou facultatif des bacilles thermophiles on a ensemencé les souches à différentes températures.



**Figure 10: croissance des bactéries à différentes température (A:37°C/B:45°C/ C:55°C )**

On a constaté que les souches se développent à différentes températures (37°C ,45°C et 55°C) (figure 14) alors ces souches sont des thermophiles facultatifs. Mais ils ne se développent pas à 65 °C.

En effet, d'une manière générale, les bacilles thermophiles sont capables de croître dans les sections où la température est comprise entre 40 et 65°C (Ronimus et al .,2003 ;Nazina et al .,2001) .

#### 4. Identification phénotypique des souches

Les isolements des échantillons du lait cru et du lait en poudre ont été réalisés à deux températures : 30°C et 55°C sans enrichissement ou après enrichissement 24h à 55°C.

L'identification apportée sur l'étude des caractères, culturels, microscopiques et biochimiques.

##### 4.1. Les caractères culturels

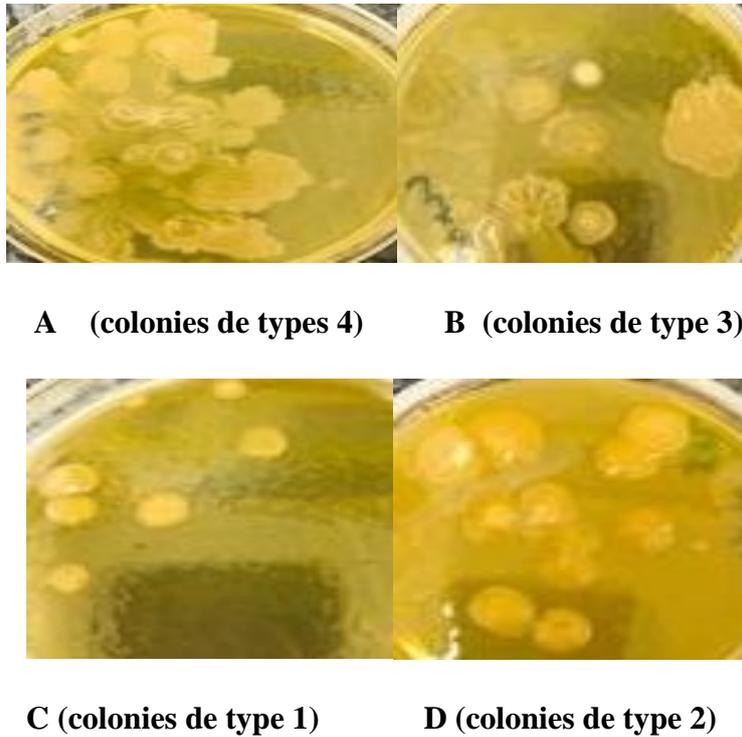
Tel que montré par les figures, l'aspect des colonies des souches sur le milieu BHIA après une incubation de 24h permet de distinguer différentes colonies :

**Colonies de type 1:** les souches présentent des colonies rondes, planes à contours circulaires, réguliers, à surface crémeuse ou lisse, de couleur blanchâtre, opaque ou translucide (figure 15C).

**Colonies de type 2:** les souches présentent des colonies irrégulières ,bombées ,à bord filamenteux ,lobé circulaire ou crénelé ,à surface dure et sèche ,lisse ,crémeuse ou visqueuse, opaque ou translucide de couleur beige ou blanchâtre (figure 15D).

**Colonies de type 3:** les souches présentent des colonies rondes ,bombées, à bord rhizoïdes ou circulaire ,à surface crémeuse ,rugueuse et sèche ou visqueuse et lisse ,opaque ou translucide ,blanchâtre ,incolore ou beige( figure 15B).

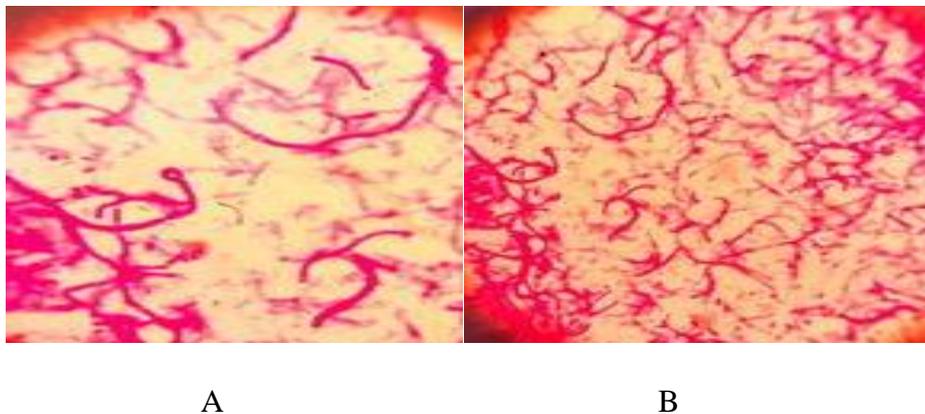
**Colonies de type 4:** les souches présentent des colonies irrégulières planes à contour rhizoïdes ou lobé, à surface visqueuse ou sèche et rugueuse, opaque ou translucide, à couleur beige ou blanchâtre (figure 15A).,



**Figure 11 : Les différents aspects morphologiques des colonies obtenues sur gélose BHIA après une incubation de 24h**

### Morphologie cellulaire

L'aspect microscopique observé aussi bien à l'état frais qu'après coloration de Gram a permis de révéler que toutes les souches se présentent sous forme de bâtonnets de taille variable droits à extrémités arrondies et regroupés sous forme de diplobacille, palissade ou en chaînettes, à Gram positif (figure 16), mobiles ou immobiles avec une endospore ovale centrale ou sub-terminal non déformante ou bien des bacilles fins et longs à spore ovale terminale déformant le sporange. Les résultats sont conformes aux traits généraux du genre *Bacillus* et autres genres proches, notamment les bacilles thermophiles décrits dans la littérature de (VOS et al., 2009) et (Madigan et al., 2006).



**Figure 12 : observation microscopique des souches après coloration de Gram sous microscope GX100**

L'identification phénotypique comprenant la morphologie des colonies, la forme, le Gram et la mobilité des souches, la production des endospores (figure 17), en plus du caractère de catalase lie les souches au genre *Bacillus* et principalement aux groupes 3 de la classification de Gordon qui est basé sur la morphologie de la spore et du sporange. (Gordan et al., 1973).

La production d'endospores résistantes à la chaleur (80-100°C pendant 10 à 30 minutes) et très résistantes à la chaleur (> 106°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).

## 4.2. Caractères biochimiques

### 4.2.1. L'étude du type respiratoire

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

### 4.2.2. Etude des activités enzymatiques

Une recherche de l'activité enzymatique a été réalisée et les résultats sont présentés dans le tableau et les figures

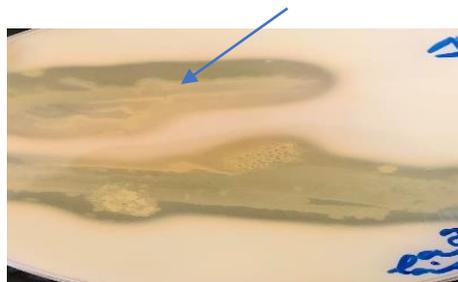
**Tableau 8 : Les activités enzymatiques des souches isolées**

Souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
<b>Protéase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Lipase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ :résultat positif

- :résultat négatif

#### ➤ **Activité protéolytique :**



**Figure 13 : Activité protéolytique qui se traduit par une zone claire sur gélose au lait**

Toutes souches présentent la caséinase qui est révélée par l'apparition d'une zone de clarification. La production de cette protéase par la flore de contamination du lait est responsable d'altération et de défaut de goût et d'arôme, ou elle forme la para caséine k et micellaire qui provoque la déstabilisation et la coagulation du lait (Chen et al.,2003). Les bacilles thermophiles produisent des protéases thermostables (Atasoy et al.,2011).

#### ➤ **Activité lipolytique :**

Toutes souches étudiées ont la capacité d'hydrolyser le tween 80 qui se traduit par un halo d'opacification autour de la culture.



**Figure 14 : Activité lipolytique qui se traduit par une zone de précipitation sur gélose au tween 80**

La lipolyse est également une activité qui provoque des altérations de la qualité organoleptique des produits laitiers. Dans ce contexte, il a été montré une diversité d'enzymes lipolytiques thermostables telle que les estérases chez les espèces thermophiles du genre *Bacillus* qui sont diversifiées dans leurs propriétés et des spécificités de substrat (Miettinen et Zhang.,2005). En outre, Shamsuzzaman et al(1987) découvrent les lipases thermostables de *Bacillus* .sp et de *Geobacillus* restent actives dans le lait en poudre même après un séchage par atomisation du lait écrémé.

Les espèces du genre *Bacillus* ou des genres proches peuvent synthétiser une grande variété d'enzymes extracellulaires thermostables telles que les protéases, les lipases et les amylases durant la phase stationnaire avant la sporulation (Priesr.,1997 ;Chen et al .,2003). Ces enzymes provoquent la détérioration des produits finaux au cours du stockage même si la bactérie est sporulée. Actuellement, il existe des techniques chromatographiques permettant la détection de l'activité.

En outre, 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 é enzymatique dans le lait et les poudres du lait au court du stockage (Chen et al .,2003).

## 5. Formation du biofilm

### 5.1. Formation du biofilm sur les lames en verre :

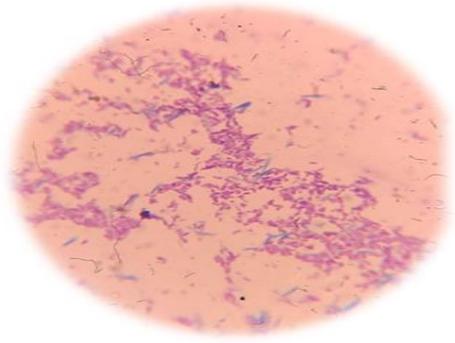


Figure 16 : Image d'adhésion de S5

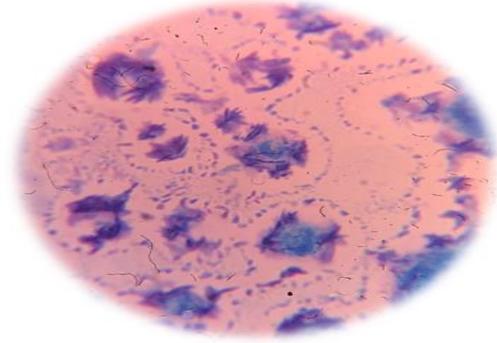
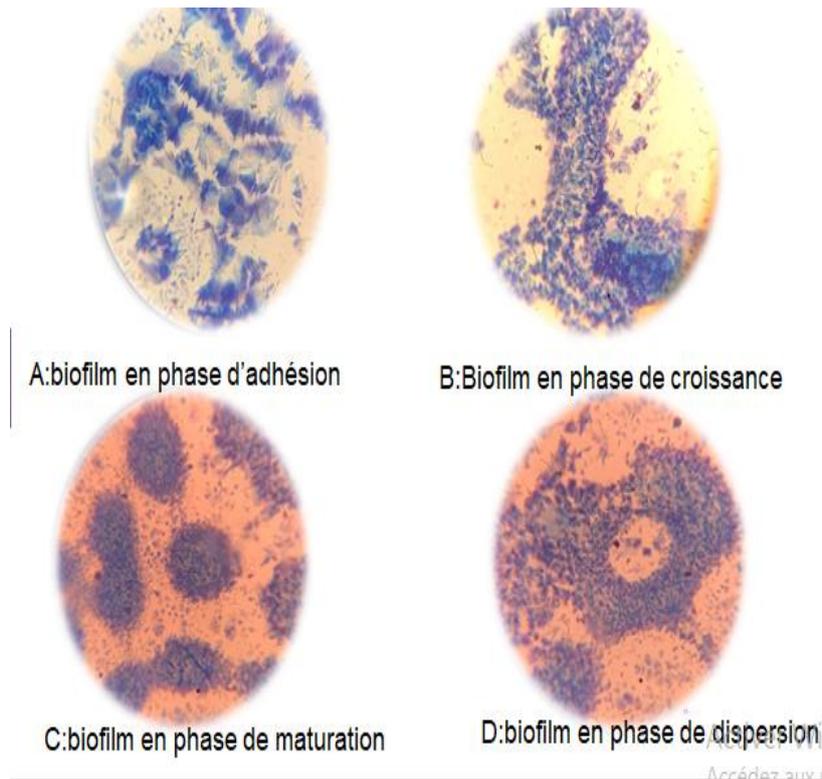


Figure 15 : Image de formation du biofilm de S5



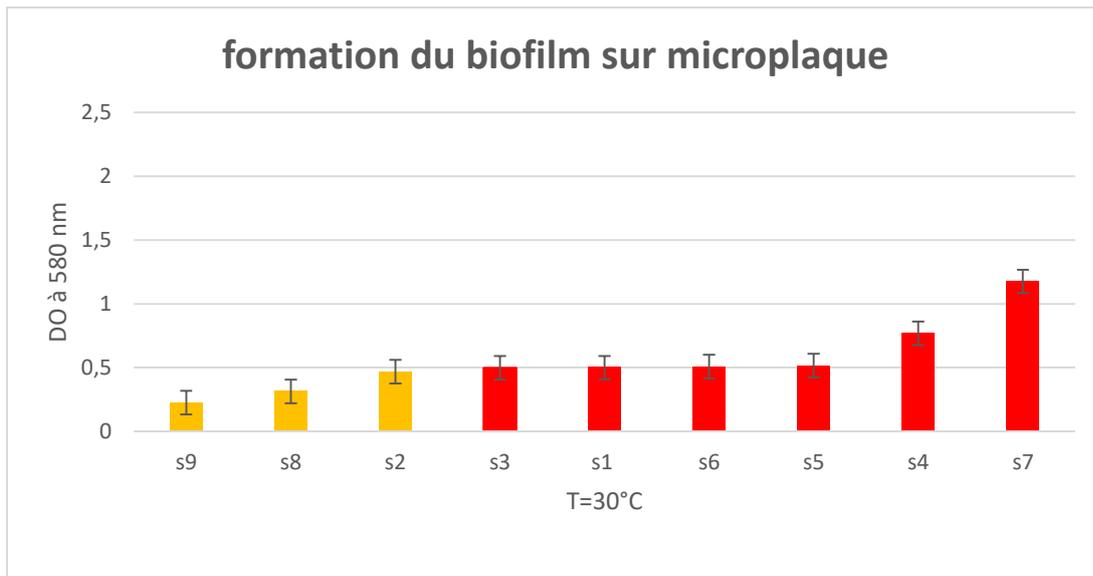
**Figure 17 : Images de formation du biofilm de S7**

\*les souches 5,6 et 7 sont bien formatrices de biofilm. Ce sont les souches de LP26%.

### **5.2. Formation du biofilm sur les microplaques**

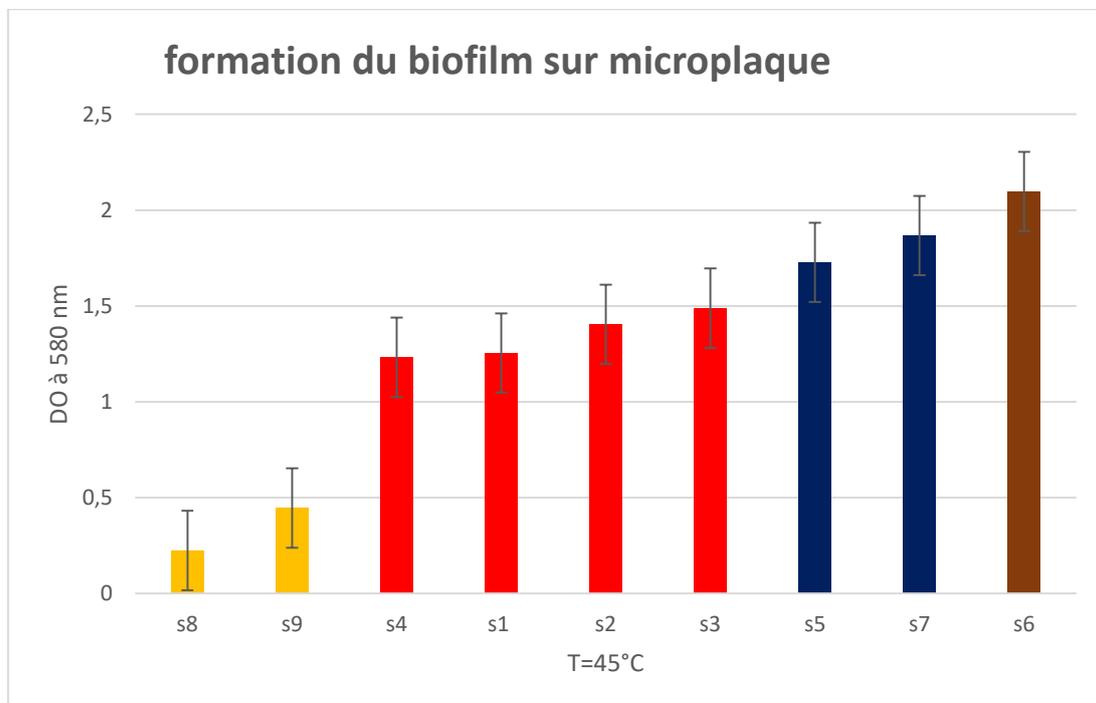
Le taux de formation de biofilm par les souches à trois températures (30°C; 45°C; 55°C) sur BHIB est obtenu par la mesure des DO à 600 nm au lecteur des microplaques et la valeur seuil égale à une DO de l'ordre de 0,5 est définie pour les producteurs de biofilm séparés des non- producteurs de biofilm. 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:  $1,5 < DO < 2$  : Fortement productrice de biofilm.
- Classe 4:  $DO > 2$  : Hyper productrice.



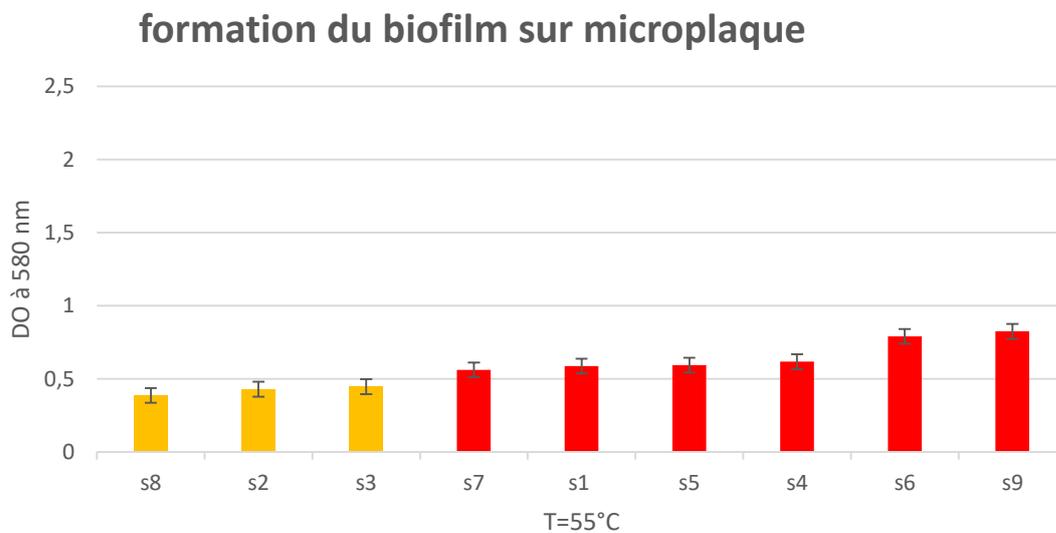
**Figure 18 : Formation du biofilm sur microplaque à 30 °C**

À température 30 °C : Les souches se répartissent en deux catégories, la première comprend trois souches : (2,8,9) dont les DO de formation des biofilms sont < 0,5, elles ont un pouvoir d'adhésion faible, la deuxième comprend six souches : (1,3,4,5,7) qui ont des DO inférieur à 1.5, elles peuvent être considérée comme des producteurs moyens de biofilm (figure 23).



**Figure 19 : Formation du biofilm sur microplaque à 45°C**

**À température 45 °C :** Les souches sont regroupée en quatre classes, la première comprend deux souches : (8,9) dont les DO de formation des biofilms sont  $< 0,5$ , elles sont faiblement productrices de biofilm, la deuxième comprend quatre souches (1,2,3,4) 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 ,7) dont les DO de formation de biofilm sont entre  $1,5 < DO < 2$  sont considérés comme fortement productrice de biofilm. La quatrième classe comprend une seul souche (6) représenté la DO supérieure à 2et donc elle peut la considère comme une hyper productrice de biofilm (figure 24).



**Figure 20 : Formation du biofilm sur microplaque à 55°C**

**À température 55 °C :** Les souches se répartissent en deux catégories, l'une comprend trois souches (2,3,8) qui ont des  $DO < 0,5$  elles sont faiblement productrices de biofilm. L'autre catégorie comprend six souches (1,4,5,6,7,9) qui sont moyennement productrices du biofilm (figure 25) .

\*les souches les plus formatrices du biofilm sont S5, S6 (thermophiles) et S7 (mésophile).

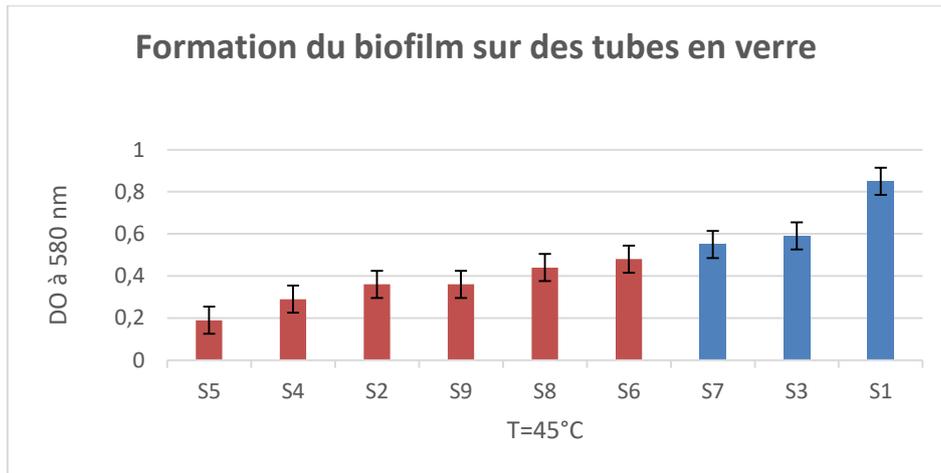
\*\*on peut conclure que la température optimale pour la formation du biofilm est 45°C.

Ceci peut être expliqué par le fait que Les cellules de Bacillus cultivées à 45 °C contenaient significativement des teneurs en amyloïde plus élevée que celles cultivées à 30 °C. la croissance du biofilm à des températures plus élevées a été médiée par une augmentation de production d'EPS et de fibres amyloïdes (Rajitha et al., 2020b).

\*\*\*les bacilles du lait en poudre 26% sont plus productrices du biofilm que celles du lait cru et lait poudre 0%. 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 ces résultats. 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...

### 5.3. Formation du biofilm sur des tubes en verre

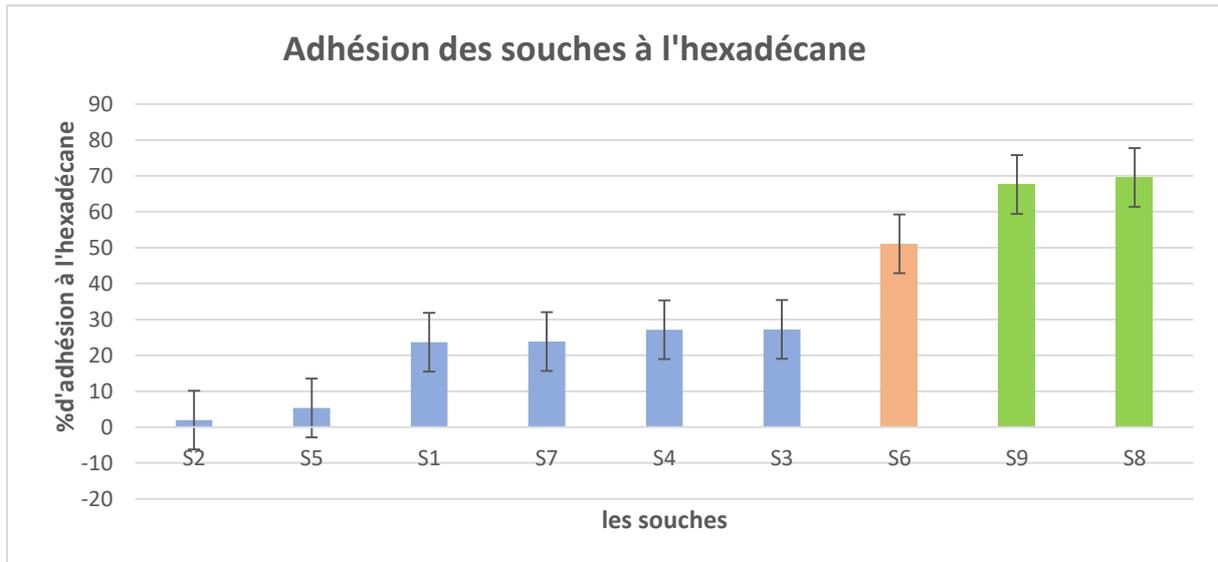


**Figure 21 : Formation du biofilm sur des tubes en verre**

\*les souches les plus formatrices du biofilm sur les tubes en verre sont S1, S3 et S7 (figure26).

Alors les souches S3 et S1 forment du biofilm en verre plus que sur polystyrène.

### 6. Evaluation de L'hydrophobicité des spores



**Figure 22 : Adhésion des 9 souches à hexadécane**

Le caractère hydrophobe/hydrophile des bactéries est déterminé à l'aide de la méthode MATH qui repose sur l'affinité des micro-organismes à un hydrocarbure « l'hexadécane ». Les résultats sont exprimés en pourcentage d'adhésion au solvant selon la formule suivante :

$$A(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 * 100.$$

D'après les résultats du test d'adhésion (figure 27), on remarque une variabilité chez les spores de 9 souches de *Bacillus* dans l'adhésion au solvant apolaire : l'hexadécane. Ce taux d'adhésion varie de 1,9 % à 69,54%. 5 souches (s2, s5, s1, s7, s4, s3) montrent une affinité inférieure à 40%. Ces spores sont hydrophiles selon Tauveron et al, (2006), la souche S6 est hydrophobe avec la valeur 51,05%. Les souches S8 et S9 sont hautement hydrophobes avec des valeurs de l'ordre de 69,54% et 67,56%.

Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par Faille et al, (2010) qui ont trouvé une variabilité dans le taux d'adhésion de différentes souches de *Bacillus* à l'hexadécane.

Dans une autre étude, (Simmonds et al, 2003), le taux d'adhésion trouvé chez des spores de *Bacillus* isolés à partir d'équipements laitiers, varie de 14,1 à 86,5%. D'après ces résultats, 5 souches ont été considérées comme hydrophobes, 3 souches avaient une hydrophobicité moyenne et une souche s'est révélée hydrophile.

## 7. L'effet d'un désinfectant

### 7.1. Effet antibiofilm

- Méthode des microplaques

Pour la souche S6 ,à un temps de contact 10 min et à 30°C,on a obtenu les pourcentages d'inhibition suivantes :

**Tableau 9: Pourcentages d'inhibition du désinfectant pour la souche 6**

Concentration du désinfectant (%)	% d'inhibition
0.5	79,53
1	83,47
1.5	83,46
2	80,82

Pour la souche S7, à un temps de contact 20 min et à 45°C, on a obtenu les pourcentages d'inhibition suivante.

**Tableau 10 : Pourcentage d'inhibition du désinfectant pour la souche 7**

Concentration du désinfectant (%)	% d'inhibition
0.5	69,91
1	77,34
1.5	83
2	77,07

\*On peut conclure que le désinfectant a un effet puissant sur les bacilles thermophiles et mésophiles.

\*La souche 7(mésophile) est plus résistante au désinfectant que la souche 6 (thermophile).

- **Méthode des tubes en verres**

Pour confirmer les résultats de la méthode précédente, on a fait recours à cette technique.

On a constaté que pour les souches S6 et S7, le désinfectant possède une activité anti biofilm très importante (pourcentage d'inhibition presque égale à 100%) à différentes concentrations et températures et à des temps de contact différents.

# Conclusion

Les bacilles thermophiles constituent un groupe important de contaminants dans l'industrie laitière, leur présence dans les produits laitiers est un indicateur de mauvaise hygiène.

Sur la base des caractères morphologiques et biochimiques, les souches isolées à 30 °C et 55°C sur milieu BHI sont caractérisé par : une coloration de Gram positive, un catalase positif, une capacité de formation des spores et la révélation de pouvoirs enzymatiques déterminé par la production de la protéase et la lipase qui ont une capacité d'altérer la qualité du lait . Le potentiel de formation de biofilm est également testé par différents techniques (technique des microplaques ,technique de la goutte ,technique des tubes en verre) à trois températures (30°C ; 45°C ; 55°C) sur BHIB et est obtenu par la mesure des DO à 580 nm. Les résultats ont montré que les souches testées sont caractérisées par un grand potentiel d'adhésion au verre et de formation de biofilm dans les microplaques en polystyrène . la formation de biofilm est optimale à 45°C pour les souches testés, mais elle reste possible à 30 et à 55°C.

Les souches les plus productrices de biofilm sur polystyrène sont les souches (s5, s6 et s7) appartenant au lait en poudre 26 %.

Mais les souches s8 et s9 (souche du lait cru et lait en poudre 0% respectivement ) sont les plus productrices de biofilm sur verre.

On a testé l'effet antibiofilm par la technique des microplaques et la technique des tubes en verre et l'effet sporicide du désinfectant par la technique de la goutte.

On a constaté que cet désinfectant utilisé a un effet anti biofilm puissant et même une activité sporicide.

# Références

1. AFNOR,, 1995. XP V 08-058. Microbiologie des aliments-dénombrement de *Bacillus Cereus* par comptage des colonies à 30<sup>0</sup>C.
2. Auger A,Ramarao N,FaiIle C,Fouet A,Aymerich S,Gohar M,2009.,biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of *bacillus cereus* group.american society for microbiology:6616-6618.
3. Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., Gohar, M. (2009). Biofiim Formation and Ceil Surface Properties among Pathogenic and Nonpathogenic Strains of the *Bacillus cereus* Group. *Applied and environmental microbiology* 75(20), 6616-6618.
4. 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. ∞
5. 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.
6. 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
7. BRANGER Alain, Richer Marie-Madeleine, Roustel Sébastien., (2007). *Microbiochimie et alimentation*, © Educagri éditions, Dijon. 343 pages. ISBN : 978-2-84444-558-2.
8. Burgess, S. A., Flint, S. H., & Lindsay, D. (2014). Characterization of thermophilic bacilli from a milk powder processing plant. *Journal of applied microbiology*, 116(2), 350-359.
9. Burgess, S. A., Lindsay, D., & Flint, S. H.,2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* 144, 215225.
10. Burgess, S-A. Brooks, J-D. akonjacr, 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.

11. 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.
12. 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.
13. Chen, L., Tim Coolbear, and Roy M. Daniel. "Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines." *International dairy journal* 14.6 (2004): 495-504. 19.
14. Chen, X. G., Stabnikova, O., Tay, J. H., Wang, J. Y., & Tay, S. T. L. (2004). Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. *Extremophiles*, 8(6), 489-498.
15. De Jonghe, V.D. Coorevits, A., Block, J.D., Coillie, E.V., Grijspeerdt, K., Herman, L., Vos, P.D., Heyndrickx, M., 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 136, 318-325.
16. De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology*. 10, 851-865.
17. Deeb, Azza, M, M., Al-Hawary, I, I., Aman, I, M., Shahine, Douaa, M, H., 2010. Bacteriological investigation on milk powder in the Egyptian market with emphasis on its safety. *Global veterinarian* 4, 424-433.
18. 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.
19. Drapeau, Arnold-J et JANKOVIC, Stevan., (1977). *Manuel de microbiologie de l'environnement*, © Organisation mondiale de la santé, Genève. 249 pages. ISBN : 92 4 254 058
20. 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
21. Faille, C., Julien, C., Fontaine, F., Belon-Fontaine, M.N., Slomianny, C., Benezech, T. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 728- 738. 15.

22. Faille, C., Sylla, Y., Le Gentil, C., Bénézech, T., Slomianny, C., Lequette, Y. (2010). Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. *Food Microbiology* 27, 769 -776.
23. Flint, S., Walker, K., Waters, B., Crawford, R., 2006. Description and validation of a rapid (1 h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders. *Journal of applied microbiology* 102, 909—915.
24. Flint, S.H. P. J. Bremer, J. D. Brooks. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, Vol. 11, issue 1: 81-.
25. Flint, S.H. P. J. Bremer, J. D. Brooks. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, Vol. 11, issue 1: 81-
26. Flint, s.H., Palmer, .J., Bloemen, K., Brooks, J., Crawford, R., 2001. The growth of *Bacillus stearotherophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 90, 151-157.
27. Guiraud,J-P,,2003.Microbiologie alimentaire. I ére édition .Dunod,paris,p136-137.
28. K. Rajitha a,b, Y.V. Nancharaiyah a,b,\*, V.P. Venugopalan b,c. Temperature induced amyloid production, biofilm formation and fitness in marine *Bacillus* sp. *International Biodeterioration&Biodegradation*161(2021)105229.Journalhomepage [www.elsevier.com/locate/ibiod](http://www.elsevier.com/locate/ibiod).
29. Kim, E.H.-J., Chen, X.D., Pearce, D., 2009. Surface composition of industrial spraydried milk powders. 1. Development of surface composition during manufacture. *Journal of Food Engineering* 94, 163-168.
30. Konte,M,. 1999. le lait et les produits laitiers, Développement de systèmes de production Intensive en Afrique de l'ouest. *Isrmjpv-lne*, 2-25.
31. Malek 2019 . Bactéries sporulées et biofilms : un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombiné pasteurisé. *Can. J. Microbiol.* 65: 1–16 (2019) [dx.doi.org/10.1139/cjm-2018-0435](https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0435).
32. Malek F., B.Moussa-Boudjemaa., F.Khaouani-yousfi., A.Kalai and M.el,,2012.Microflora of biofilm on algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. *African Journal of Microbiology Research* 6, 3863-3844.
33. Malek, F., Boudjemaa, B. M., Aouar-Métri, A., & Kihal, M. (2013). Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. *Dairy Science & Technology*, 93(1), 73-82.

34. Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433-446.
35. Norme Marocaine,. 2004. 08.0.109. Microbiologie alimentaire -Dénombrement des Enterobacteriaceae par comptage des colonies à 30°C.
36. Palmer J., Flint S., Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 577–588.
37. Parkar, S. G., Flint, S. 11., Brooks, J. D.,. 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 96,110-116.
38. Parkar, S. G., S. H. Flint, J. S. Palmer, and J. D. Brooks. 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *J. Appl. Microbiol.* 90:901–908.
39. Rajitha, K., Nancharaiah, Y.V., Venugopalan, V.P., 2020b. Acid soluble extracellular matrix confers structural stability to marine *Bacillus haynesii* pellicle biofilms. *Colloids Surf., B* 194, 111160.
40. Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. W. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International journal of food microbiology*, 85(1), 45-61.
41. Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Rqckert, A., Morgan, H.W., 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology* 85, 45—61.
42. Ronimus, R.S., Rueckert, A., Morgan, H.W., 2006. Survival of thermophilic sporeforming bacteria in a 90+ year old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds Hut in Antarctica. *Journal of Dairy Research* 73, 235-243.
43. Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.

44. Simoes, M., Simoes, L.C., Vieira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43, 573-583.
45. Vos P.D., Logan, N.A. (2009). *Bacillus*. Bergey's Manual of systematics of Archaea and Bacteria.
46. Yuan, D.D., Liu, G.H., Ren, D.V., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C.P., Yang, Y.Z., Ma, W., Li, Y., Zhang, L, B., 2012. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. • *Food control* 25, 752-757.

# **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)	<b>1 g</b>
Chlorure de sodium	<b>8.5 g</b>
<b>Ph= 7,0</b>	

**Annexe 2 : Plate count agar (PCA)**

\*Composition chimique du milieu de culture : La formule théorique de ce milieu en g / L d'eau purifiée est:

Tryptone	<b>5g</b>
extrait de levure	<b>2.5g</b>
glucose	<b>1g</b>
Agar	<b>15g</b>
<b>Ph=7</b>	

Ce milieu est disponible en milieu déshydraté.

Poudre déshydraté	<b>23.5g</b>
Eau distillée	<b>1000ml</b>

**Annexe 3 : 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)	<b>15 g</b>
Peptone de soja	<b>5 g</b>
Chlorure de sodium	<b>5 g</b>
Agar	<b>15 g</b>
Ph=7,3	
Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120 °C	

Ce milieu est disponible en milieu déshydraté.

Poudre déshydraté	<b>40g</b>
Eau distillée	<b>1000ml</b>

**Annexe 4 : Brain heart infusion agar (BHIA):gélose pour infusion cœur cerveau)**

\*Composition chimique du milieu de culture La formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifiée est :

<b>Infusion cœur-cervele</b>	<b>8g</b>
<b>Digestion peptique de tissu animal</b>	<b>5g</b>
<b>Digestion pancréatique de caséine</b>	<b>16g</b>
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5g</b>
<b>Glucose</b>	<b>2g</b>
<b>Phosphate d'hydrogène disodique</b>	<b>2g</b>
<b>Gélose</b>	<b>13.5g</b>
<b>Ph=7.4</b>	

Ce milieu est disponible en milieu déshydraté.

Poudre déshydraté	52g
Eau distillée	1000ml

**Conseil pratique :** Dès réception ,conserver les boites de pétrie dans l'obscurité entre 2 et 8°C dans leur emballage d'origine jusqu'au moment de leur utilisation.ne pas congeler ni surchauffer.

#### **Annexe 5 : Brain heart infusion broth (BHIB):bouillon Coeur cerveau:**

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

<b>Extrait de cœur</b>	<b>5g</b>
<b>Extrait de cerveau</b>	<b>12.5g</b>
<b>Peptone</b>	<b>10g</b>
<b>Glucose</b>	<b>2g</b>
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5g</b>
<b>Phosphate disodique</b>	<b>2.5g</b>
<b>Ph final à 25°C =7.4</b>	

Ce milieu est disponible en milieu déshydraté.

Poudre déshydraté	<b>37g</b>
Eau distillée	<b>1000ml</b>

#### **Annexe 6 : Gélose au lait**

Préparation du milieu de culture :

-on met 10g du lait en poudre dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir le lait écrémé à 10%.(solution A)

-le lait subit deux traitements thermiques :

\*1<sup>er</sup> traitement :80°C pendant 30 min puis refroidissement.

-mettre à l'étuve 30 °C pendant 1h.

\*2eme traitement :100°Cpendant 30min puis refroidissement.

-pour obtenir 200ml du gélose au lait à 1 %, on mélange 20 ml de la solution A avec la solution d'agar.

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

**Annexe 7 : Gélose au tween 80 (0.1%) :**

Milieu de culture TSA	<b>200ml</b>
Tween	<b>200µl</b>

**Conseil pratique :** Le tween est stérilisé séparément et ajouté au milieu après autoclavage (Belhamra, Z., 2017).

**Annexe 8 : Solution dissolvante :**

Ethanol	<b>200ml</b>
Acide acétique glacial	<b>50ml</b>
Eau distillée	<b>250ml</b>

**Annexe 9 : Cristal violet :**

Cristal violet	<b>2g</b>
Eau distillée	<b>100ml</b>

**Annexe 10 :Le désinfectant :Nod Sau EAS (5M)**

**Solution mère :5ml dans 100 ml**

<b>Concentration</b>	<b>Volume à prélever</b>	<b>Volume à ajouter</b>
<b>D0.5%</b>	<b>0.5 ml</b>	<b>4.5ml</b>
<b>D1%</b>	<b>1ml</b>	<b>4ml</b>
<b>D1.5%</b>	<b>1.5ml</b>	<b>3.5ml</b>
<b>D2%</b>	<b>2ml</b>	<b>3ml</b>