



République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMEN

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de
l'Univers
Département de Biologie

MÉMOIRE

Présenté par

M^{elle} Ouissi Fatima Zohra

M^{elle} Nouali Rawida

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER en Biologie

Option : Microbiologie et contrôle de qualité

Thème

**Caractérisation de la flore de contamination du lait
pasteurisé**

Soutenu le 29/06/2022 devant le jury composé de :

| | | | |
|------------|---------------------|-----|-----------------------|
| Présidente | Dr Benariba Nabila | MCA | Université de Tlemcen |
| Promotrice | Dr Malek Fadila | MCA | Université de Tlemcen |
| Examineur | Dr Belyagoubi Larbi | MCA | Université de Tlemcen |

Année universitaire 2021/2022

Remerciement

Nous remercions tout d'abord ALLAH le tout puissant et le miséricordieux de nous avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Nous exprimons notre profonde gratitude à Mme MALEK F. maître de conférences de classe A au département de biologie, université de Tlemcen d'avoir accepté de diriger ce travail. Nous la remercions profondément pour sa constante disponibilité, ses pertinents conseils et son sens aigu de responsabilité. Son soutien et son encouragement jusqu'au bout de ce mémoire nous ont permis de finaliser cette expérience et de nous préparer à notre future carrière d'étude. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

Nous tenons à remercier très vivement Mme BENARIBA N. maître de conférences de classe A au département de biologie de l'université de Tlemcen pour le grand honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury.

Nos chaleureux remerciements s'adressent également à Mr. BELYAGOUBI L. maître de conférences de classe A au département de biologie d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Nous tenons à témoigner nos sincères remerciements et gratitude à tous les ingénieurs de laboratoire du pôle de microbiologie faculté SNV-STU qui nous ont facilité le travail au laboratoire et nous ont aidé pour la réalisation de ce modeste travail spécialement Mr. Yazid Amine.

Nous remercions chaleureusement Melle Latti Nawel, doctorante au LAMAABE (Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire au biomédical et à l'environnement) pour son aide précieuse dans l'identification des souches bactériennes par galerie API 20 E ainsi que pour sa générosité et ses grandes qualités humaines.


Nous assurons de nos sincères remerciements et de notre profonde gratitude Mr Attab Djamal, président directeur général et Mr. Bounaceur Chakib, ingénieur de laboratoire, pour nous avoir facilité l'accès de la laiterie et permis d'effectuer notre stage en entreprise dans les meilleures conditions.

Enfin nous adressons nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicaces


Grâce à Dieu j'ai pu réaliser ce travail, et c'est avec une joie immense et le cœur ému que je dédie ce mémoire



À Mes parents, les êtres les plus chers au monde pour l'amour qu'ils m'ont porté, pour leurs sacrifices, leurs encouragements et leur soutien moral tout au long de mes études, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments d'amour et de reconnaissances. Que Dieu leur préserve longue vie et bonne santé.

Mes sœurs Hanane et Douaa-lilia

Mon frère zahreddine



A ma tante lila et Toute ma famille, et spécialement je souhaite remercier chaleureusement mes défunts grands-parents pour leur affection inépuisable et leur précieux conseils, ils n'ont cessé de prier pour moi durant mon cursus scolaire et m'ont encouragé régulièrement. Ils restent dans mon cœur même s'ils ne sont plus dans ma vie.

A mon binôme OUISSI Fatima Zohra, pour son soutien moral, Sa patience et sa compréhension tout au long de ce mémoire.

Enfin, à toutes mes amis les plus fidèle Feriel ,Sofiane,chihab,Ghizlen, , Fayrouz ,Ikrem , ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail et spécialement a ma très chère amie ma troisième sœur AKABLI Soulef merci de m'offrir le support dont j'ai besoin quand ça ne va pas .Merci pour ton écoute .Pour tes conseils et pour cette amitié.



J Rawida

Dédicace

Grâce à **ALLAH** j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à...

Mes parents, les êtres les plus chers au monde pour l'amour qu'ils m'ont porté, pour leurs sacrifices, leurs encouragements et leur soutien moral tout au long de mes études, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments d'amour et de reconnaissances. Que Dieu leur préserve longue vie et bonne santé.

À mon très cher frère Amir

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

Je tiens à remercier mes ami(e)s Ghizlene, Marwa, Kawther, Feryel, Soufyane, Chihab qu'été toujours à mes côtés et surtout mon binôme **Nouali Rawida** ma douce copine qui a eu la patience de me supporter durant ce mémoire, et qui m'a soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles vécus.

A mon très cher fiancé

Qu'**ALLAH** réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A la mémoire de mon grand-père maternel **Dendane Sid' Ahmed**, j'aurai voulu que tu assistes à l'aboutissement de ces années de dur labeur, Dieu en a décidé autrement. Que Dieu t'accorde la paix éternelle et t'accueille dans son paradis.

Et à tous les membres de ma famille, de près et de loin

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

Fatima Zohra

الملخص

يلعب الحليب دورًا مهمًا في تغذية الإنسان، ولكن يمكن أن يشكل خطرًا صحيًا محتملاً على المستهلك لأنه شديد التعرض للتلوث الميكروبي.

في هذه الدراسة، أظهر التحليل الميكروبيولوجي للحليب المبستر المعبأ مستويات عالية نسبيًا من التلوث، والتي تتراوح من 10^4 إلى 10^6 ufc/ml. على الرغم من تطبيق المعالجة بالبسترة. تم التعرف على السلالات المعزولة مع سلالات (*Bacillus*) و (*Lactobacillus*)، أربعة سلالات وثلاثة على التوالي. أتاح معرض API 20 E تحديد نوعين من بكتيريا الجرام المعزولة من نوع *Aeromonas hydrophila* gr2 وأنواع *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* يجب التأكيد على هيمنة البكتيريا موجبة الجرام.

تتميز السلالات المعزولة بقدرتها على إنتاج إنزيمات خارج الخلية بروتياز وأمياز، مما يعكس دورًا محتملاً في تغيير الحليب وتدهور جودته الحسية. تختلف احتمالية تكوين الأشرطة الحيوية الرقيقة اعتمادًا على السلالات المعزولة. تختلف DO المسجلة من 0.2 إلى 2.5. يعكس تكوين الأشرطة الحيوية الرقيقة مشكلة صحية واستمرار التلوث على الأسطح الصناعية.

تثير هذه النتائج مرة أخرى المشاكل التي تسببها الجراثيم غير المرغوب فيها في صناعة الأغذية والتي يجب التعامل معها من أجل ضمان منتجات نهائية صحية يمكن أن تحافظ على الصحة العامة.

الكلمات المفتاحية:

حليب مبستر، فلوراتلوث، التعرف، القدرة الإنزيمية، أشرطة حيوية، بكتيريا.

Résumé

Le lait joue un rôle important dans la nutrition humaine, mais peut présenter un risque sanitaire potentiel pour le consommateur car il est très vulnérable à la contamination microbienne.

Dans cette étude, l'analyse microbiologique du lait pasteurisé conditionné a permis de montrer des niveaux de contaminations relativement élevés, qui varient de 10^4 à 10^6 ufc/ml, malgré l'application du traitement de pasteurisation. Les souches isolées ont été identifiées aux genres *Bacillus* et *Lactobacillus*, quatre et trois souches respectivement. La galerie API 20 E a permis d'identifier les deux bactéries Gram- isolées à l'espèce *Aeromonas hydrophila* gr 2 Et l'espèce *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*. La dominance des bactéries à Gram positives est à souligner.

Les souches isolées sont caractérisées par leur pouvoir de production d'enzymes extracellulaire, protéases et amylases, traduisant un rôle potentiel dans l'altération du lait et la dégradation de sa qualité organoleptique. Le potentiel de formation de biofilm varie en fonction des souches isolées. Les DO enregistrées varient de 0,05 à 2,6. La formation de biofilm traduit un problème d'hygiène et de persistance des contaminations sur les surfaces industrielles.

Ces résultats soulèvent de nouveau les problèmes causés par les germes indésirables en industrie agroalimentaire auxquels il faut faire face pour garantir des produits finis sains permettant de préserver la santé publique.

Mot clés :

Lait pasteurisé, flore de contaminations, identification, potentiel enzymatiques, biofilm, bactéries.

Abstract

Milk plays an important role in human nutrition, but may present a potential health risk to the consumer as it is very vulnerable to microbial contamination.

In this study, the microbiological analysis of pasteurized packaged milk showed relatively high levels of contamination, ranging from 10^4 to 10^6 ufc/ml, despite the application of pasteurization treatment. The isolated strains were identified to the genera *Bacillus* and *Lactobacillus*, four and three strains respectively. The API 20 E gallery identified the two isolated Gram- bacteria to the species *Aeromonas hydrophila* gr 2 and *Klebsiella pneumonia* ssp *pneumonia* species. The dominance of Gram-positive bacteria is to be underlined.

The isolated strains are characterized by their power to produce extracellular enzymes, proteases and amylases, reflecting a potential role in the alteration of milk and the degradation of its organoleptic quality. The potential for biofilm formation varies according to the strains isolated. The recorded OD ranged from 0.2 to 2.5. The formation of biofilm reflects a problem of hygiene and persistence of contamination on industrial surfaces.

These results raise again the problems caused by undesirable germs in the food industry that must be addressed to ensure safe end products to preserve public health.

Key words:

Pasteurized milk, contamination flora, identification, enzymatic potential, biofilm, bacteria.

Table des matières

| | |
|---|----|
| Introduction | 1 |
| Chapitre I : Technologie et microbiologie du lait pasteurisé | 3 |
| 1. Le lait dans l'alimentation humaine : | 3 |
| 2. Le lait pasteurisé : | 3 |
| 2.1. Technologie du lait pasteurisé : | 3 |
| 2.1.1. Le lait frais du cheptel local : | 3 |
| 2.1.1.1. Acidité : | 3 |
| 2.1.1.2. La filtration : | 4 |
| 2.1.1.3. Le procédé de la pasteurisation du lait : | 4 |
| 2.1.1.4. Refroidissement : | 4 |
| 2.1.1.5. Conditionnement : | 5 |
| 2.1.1.6. Stockage : | 5 |
| 2.1.2. Le lait en poudre d'importation: | 5 |
| 2.2. Microbiologie du lait : | 7 |
| 2.2.1. Flore originelle : | 7 |
| 2.2.2. Flore de contamination: | 7 |
| 2.2.2.1. Germes d'altération : | 7 |
| 2.2.2.2. Germes pathogènes : | 9 |
| 2.2.3. Sources de contamination du lait : | 10 |
| 2.2.3.1. Contaminations par la matière première: | 10 |
| 2.2.3.2. Contaminations à partir des équipements: | 10 |
| 2.2.3.3. Contamination par l'eau : | 11 |
| 2.2.3.4. Contamination par les manipulateurs : | 11 |
| 2.3. Les altérations microbiennes du lait et des produits dérivés : | 12 |
| 2.3.1. Acidification : | 12 |
| 2.3.2. Protéolyse : | 12 |
| 2.4.3. Lipolyse : | 12 |
| Chapitre II : Le biofilm en industrie laitière | 14 |
| 1. Généralité sur les biofilms | 14 |
| 1.1. Définition du biofilm : | 14 |
| 1.2. Composition : | 14 |

| | |
|--|----|
| 1.3. Les microorganismes :..... | 14 |
| 1.4. La matrice :..... | 14 |
| 2. Étapes de formation du biofilm :..... | 15 |
| 2.1. Film de conditionnement :..... | 15 |
| 2.2. Adhésion réversible des bactéries :..... | 16 |
| 2.3. Adhésion irréversible :..... | 16 |
| 2.4. Formation de microcolonies :..... | 17 |
| 2.5. Maturation :..... | 17 |
| 2.6. Détachement et dispersion du biofilm :..... | 18 |
| 3. Biofilm dans l'industrie laitière :..... | 19 |
| 3.1. Composition du biofilm laitier :..... | 20 |
| 3.1.1. Bactéries psychrotropes :..... | 20 |
| 3.1.2. Bactéries mésophiles :..... | 20 |
| 3.1.3 Bactéries thermophiles :..... | 21 |
| 3.1.3.1. Sporulation des bacilles mésophiles et thermophiles:..... | 22 |
| 3.1.3.2. Résistance des spores :..... | 22 |
| 3.2. Le biofilm et la contamination croisée :..... | 23 |
| Matériel et méthodes | 26 |
| 1. Prélèvements :..... | 26 |
| 1.1. Transport des échantillons :..... | 26 |
| 1.2. Traitement des échantillons :..... | 26 |
| 1.2.1. Préparations des dilutions décimales :..... | 26 |
| 1.2.2. L'ensemencement :..... | 27 |
| 2. Identification morphologique des souches :..... | 28 |
| 2.1. Caractères cultureux :..... | 28 |
| 2.2. Morphologie cellulaire :..... | 28 |
| 2.3. Conservation des souches :..... | 29 |
| 3. Identification biochimique :..... | 29 |
| 3.1. Test de catalase :..... | 29 |
| 3.2. Test d'oxydase :..... | 29 |
| 3.3. Identification par galerie API 20 E :..... | 29 |
| 3.4. Détermination des activités enzymatiques :..... | 30 |
| 3.5. Croissance à différentes températures :..... | 30 |
| 4. Détermination du potentiel d'adhésion et de formation du biofilm :..... | 30 |
| 4.1. Formation de biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits..... | 30 |
| 4.2. Formation de biofilm dans les tubes en verre :..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 4.3. Caractérisation microscopique de l'adhésion et de la formation de biofilms :..... | 32 |
| 4.3.1. Observation microscopique de lames colorées au cristal violet :..... | 33 |
| 4.4. Evaluation quantitative des biofilms dans les microplaques de titration :..... | 33 |
| 4.5. Détermination de la biomasse des biofilms formés dans les tubes en verre :..... | 34 |
| Résultats et discussion | 36 |
| 1. Résultats du dénombrement et de l'isolement des souches :..... | 36 |
| 2. Résultats de l'identification phénotypique des souches isolées : | 36 |
| 2.1 Caractéristiques culturaux :..... | 37 |
| 2.2. Caractères morphologiques : | 38 |
| 2.2 Caractères biochimiques :..... | 39 |
| 3. Caractérisation des souches isolées :..... | 42 |
| 3.1 Détermination des activités enzymatiques : | 42 |
| 3.2. Croissance des bactéries à différentes températures : | 43 |
| 4. Détermination du potentiel de formation de biofilm :..... | 44 |
| 4.1. Formation de biofilm dans les microplaques de titration :(96 puits)..... | 44 |
| 4.2. Formation de biofilm dans les tubes en verre :..... | 48 |
| 4.3. Caractérisation microscopique de l'adhésion et de la formation de biofilm sur les lames en verres : | 50 |
| Conclusion et perspectives | 53 |
| Références bibliographiques | 55 |
| Annexe | 64 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Diagramme de fabrication de lait reconstitué/recombiné pasteurisé..... | 6 |
| Figure 2 : Bactéries lactiques | 8 |
| Figure 3 : Photos au microscope à contraste de phase représentant des cultures de <i>B. cereus</i> en phase de sporulation | 9 |
| Figure 4 : Les étapes du processus de formation d'un biofilm bactérien..... | 15 |
| Figure 5 : Architecture de biofilm de <i>Bacillus cereus</i> | 18 |
| Figure 6 : Représentations schématiques de la dispersion passive et active du biofilm. | 19 |
| Figure 7 : Morphologie cellulaire de <i>B. sporothermodurans</i> observée au microscope à contraste de phase..... | 23 |
| Figure 8 : Différents styles de dispersion du biofilm dans les lactoducs. Chaque style de dispersion est représenté par des images ESEM de biofilms in vitro de 20 h de <i>B. cereus</i> (a et b) ou de biofilms de sept jours formés in situ à l'intérieur de conduites de lait (c et d) (Malek, 2018). | 24 |
| Figure 9 : Représentation schématique du protocole expérimental de l'analyse microbiologique du lait pasteurisé | 27 |
| Figure 10 : Les lames de microscopies en verre | 32 |
| Figure 11 : Détermination de la biomasse des biofilms formé dans les microplaques de titration | 34 |
| Figure 12 : Aspect des colonies de la flore de contamination du lait sur milieu PCA..... | 37 |
| Figure 13 : Observation microscopique des cultures après coloration de Gram (G ×100)..... | 38 |
| Figure 14 : Observation microscopique des spores après coloration à la fuchsine (G x 100 à immersion). | 39 |
| Figure 15 : Test de catalase, (+) : résultats positifs. (-) : résultats négatifs..... | 40 |
| Figure 16 : Résultat de la croissance des colonies sur milieu Mac Conkey | 40 |
| Figure 17 : Photo de la galerie API 20E du biotype 1 et du biotype 2 respectivement | 41 |
| Figure 18 : Activité protéolytiques sur gélose au lait (A) et activité lipolytique sur gélose au Tween 80 (B)...... | 43 |
| Figure 19 : Biofilms formés dans les puits des microplaques et colorés au cristal violet (a) concentration du biofilm à la surface avec la formation d'un anneau fortement coloré (b) croissance sur toute la paroi du puit | 45 |
| Figure 20 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 37°C..... | 46 |
| Figure 21 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 45°C..... | 47 |
| Figure 22 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 55°C..... | 48 |
| Figure 23 : Biofilms formés dans les tubes en verre et colorés eu cristal violet..... | 48 |
| Figure 24 : Mesure de la formation de biofilm dans les Tubes à hémolyses à 37°C | 49 |
| Figure 25 : Mesure de la formation de biofilm dans les Tubes à hémolyses à 45°C | 49 |
| Figure 26 : Photos représentant l'adhésion d'une culture de <i>Bacillus</i> | 50 |
| Figure 27 : Observation des biofilms formés par les souches isolées après coloration au cristal violet. (1 et 2) : <i>Bacillus</i> , (3) : <i>Lactobacillus</i> , (4) : <i>Aeromonashydrophilagr2</i> | 51 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Caractéristiques de quelques bacilles thermophiles d'intérêt laitier | 22 |
| Tableau 2 : Résultat du dénombrement et répartition des souches selon leur origine | 36 |
| Tableau 3 : Identification des souches isolées. | 41 |
| Tableau 4 : Résultats des activités protéolytique et lipolytique des souches isolées..... | 42 |
| Tableau 5 : Résultats des températures de croissances des souches | 44 |

Liste des abréviations

CIP: Clean-in-place (nettoyage en place)

DO: Densité optique

EPS: Exo-polysaccharides (substances polymériques extracellulaires)

ESEM: The environmental scanning electron microscope

FAO: Organisation pour l'alimentation et l'agriculture

HTST: High-température–short-time

MGLA: Matière grasse de lait anhydre

OMS: l'organisation mondiale de la santé

PCA: Plate Count Agar

PIA: Polysaccharide intercellular adhesin

PNAG: Polysaccharide poly-N-Acetylglucosamine

NaOH: Hydroxyde de sodium

HNO₃: l'acide nitrique

LP: Le lait de vache pasteurisé en sachet

LPR: Le lait reconstitué pasteurisé en sachet

TSA: Gélose trypticase soja ou gélose tryptone soja

Galerie API: Analytical profile index (Appareils et procédés d'identification)

µl: Microlitre

ml: Millilitre

H₂O₂: Eau oxygénée

TSB: Trypton-soybroth

Nm: Nanomètre

EDS: Eau distillée stérile

UFC: Unité formant les colonies

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Assay

Introduction

Introduction

Le lait est un bon milieu de croissance pour les microorganismes en raison de sa teneur élevée en eau, de son pH proche de la neutralité et de sa composition en nutriments. De ce fait, il est le siège du développement d'une flore de contamination variée, dont l'importance dépend des conditions d'hygiène et des traitements que subit le lait. La pasteurisation, est un traitement thermique modéré qui peut réduire les formes végétatives mais n'a aucun effet sur les spores bactériennes. Le lait reconstitué dont la matière première est la poudre de lait est un cas particulier. Celle-ci est obtenue par séchage et déshydratation du lait, à haute température (> 130°C), qui aboutit à la sélection d'une flore thermophile de bactéries sporulées résistant à la chaleur. Ces bactéries thermorésistantes sont impliquées dans les problèmes d'altération de la qualité et de la réduction de la durée de conservation du lait pasteurisé (**In Malek, 2019**).

La persistance des contaminations microbiennes sur les surfaces industrielles est due à la formation du biofilm défini comme étant un complexe multicellulaire dynamique qui permet aux bactéries de se lier entre elles et à une surface, tout en étant entourées d'une matrice protectrice composée d'une substance exopolymérique qui les protège des attaques extérieures (**Wijman et al., 2007**). Ces édifices microbiens sont largement impliqués dans les problèmes de contamination croisée et sont caractérisés par leur résistance aux environnements hostiles, qui les fait échapper aux mesures de contrôle appliquées dans les unités de transformations des aliments (**Malek, 2019 ; Palmer et al., 2007**). En effet, la résistance des biofilms aux procédures de nettoyage-désinfection est un problème crucial auquel se heurte l'industrie laitière. Leur élimination requiert des traitements sévères avec de puissants oxydants et nécessite une identification rigoureuse des principales flores de contamination (**Malek, 2019**).

Cette étude s'inscrit dans ce cadre précis et a pour objectif d'isoler, d'identifier et de caractériser la flore de contamination du lait pasteurisé, conditionné. Le plan expérimental de ce travail est le suivant :

1. Isolement de bactéries thermophiles et mésophiles à partir de laits pasteurisés reconstitués et frais (lait de vache).
2. Identification phénotypique des souches isolées.
3. Caractérisation de leur potentiel enzymatique (activité protéolytique et lipolytique).

4. Caractérisation de leur potentiel à former le biofilm par deux approches :
microscopique et spectrophotométrique.

Synthèse bibliographique
Chapitre I : Technologie et
microbiologie du lait
pasteurisé

Chapitre I : Technologie et microbiologie du lait pasteurisé

1. Le lait dans l'alimentation humaine :

Le lait est un aliment essentiel dans la nutrition humaine. Il est une source essentielle de Ca, P, de la riboflavine, la vitamine B12, et une grande majorité de protéine, sucre, lipides de qualité. Tous ces éléments nutritifs font de lui une matière nécessaire en nutrition humaine (Kaan-Tekinsen et al., 2007).

2. Le lait pasteurisé :

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

2.1. Technologie du lait pasteurisé :

La technologie du lait pasteurisé est simple, sa production et surtout sa commercialisation doivent respecter des normes précises pour éviter toute détérioration et tout risque pour le consommateur. (M'boya et al., 2001). La chaîne de production du lait pasteurisé est la même quelle que soit la matière première utilisée, toutefois, avant la pasteurisation, le lait est soumis à des opérations qui varient selon qu'il soit obtenu à partir de lait frais ou de lait en poudre.

2.1.1. Le lait frais du cheptel local :

Le lait de vache recueilli à la ferme par traite mécanique ou manuelle, soit directement transporté au centre de ramassage où il est réfrigéré, soit stocké dans des réservoirs réfrigérés avant le transport dans le cas d'exploitations importantes, dans ces conditions, la flore microbienne est stabilisée (Guiraud, 1998). Le lait doit provenir d'une vache saine, soumise à un contrôle vétérinaire, d'une préparation (traite, conditionnement, stockage) effectuée dans des conditions hygiéniques satisfaisantes (Mahaut et al., 2005). Le lait cru est soumis à des analyses qui permettent de vérifier certains critères de qualité physico-chimiques et microbiologiques.

2.1.1.1. Acidité :

Les caséines et la lactalbumine, les substances minérales telles que les phosphates, l'acide citrique et CO₂ sont les éléments responsables de l'acidité naturelle (Amiot et al.,

2002), l'acidité est exprimée en degrés DORNIC, c'est à dire en décigrammes d'acide lactique par litre (Veisseyre, 1979). Sous l'effet des bactéries lactiques, le taux d'acide lactique augmente et donne une nouvelle acidité appelée acidité développée. A la réception, l'acidité DORNIC du lait frais est mesurée.

2.1.1.2. La filtration :

La filtration est réalisée dans afin de débarrasser le lait des impuretés physiques éventuelles et des cellules somatiques, le lait est filtré à travers un filtre pressé. (VEISSEYRE. 1979).

2.1.1.3. Le procédé de la pasteurisation du lait :

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

- Soit à une température de 63° C pendant une durée de 30 minutes à basse température cette pasteurisation est presque abandonnée.
- Soit à une température de 85° C pendant une durée de 15-20 secondes (HTST/température moyenne).
- Soit encore instantanément à une température de 95° C HTST (haute température courte durée) (arrêté; 1993). Ce dernier type de pasteurisation, est très répandu ces dernières années, où les deux préoccupations de sécurité alimentaire et le désir de prolonger la durée de conservation du lait liquide (Ranieri et al., 2009).

2.1.1.4. Refroidissement :

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

2.1.1.5. Conditionnement :

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

2.1.1.6. Stockage :

Un stockage prolongé du lait pasteurisé à des températures de réfrigération stimule la croissance des bactéries psychrotrophes, qui sont capables de causer des problèmes majeurs de qualité dans l'industrie laitière. *Pseudomonas* est identifié comme étant le principal type de bactéries de contamination du lait pasteurisé, à la fin de sa durée de conservation, s'il est stocké à la température de 4°C (Smithwell et Kailasapathy, 1995).

2.1.2. Le lait en poudre d'importation:

Dans les pays où la production laitière est insuffisante, le lait pasteurisé est obtenu à partir du lait en poudre entier ou écrémé, d'importation. Dans ce cas, le lait pasteurisé est le produit des technologies de reconstitution/recombinaison des poudres laitières, qui impliquent des opérations supplémentaires dans la chaîne de fabrication (Malek, 2019). Selon la législation sur les aliments et drogues, la poudre de lait est un produit qui résulte de l'enlèvement partiel de l'eau contenant dans le lait. On les répartit en trois catégories : la poudre de lait entière, la poudre de lait partiellement écrémée et la poudre de lait écrémée (Michel et al., 2002).

2.1.2.1. Technologie de reconstitution/recombinaison :

La poudre de lait est un produit microbiologiquement stable, lié à une activité de l'eau de 0,3- 0,4, ce qui est trop faible pour soutenir la croissance de micro-organismes. Cependant, après que le lait en poudre soit reconstitué, il est susceptible à la croissance microbienne et l'altération (Augustin et al., 2003). La matière grasse laitière anhydre est le produit obtenu exclusivement à partir du lait, de beurre ou de crème au moyen de procédés entraînant l'élimination quasi-total de l'eau et de l'extrait sec non gras. (Boularak, 2005). L'eau utilisée pour préparer le lait reconstitué, doit être potable et répond aux caractéristiques bactériologiques, en dehors des autres paramètres de potabilité d'eau. Les étapes de fabrication du lait reconstitué ou reconstitué sont résumées ci-après:

- **Reconstitution** : La reconstitution est l'opération où on mélange de l'eau et la poudre de lait en vue de rétablir: un rapport eau/matière sèche du produit initial. (**Jean-Christian et al., 2003**).
- **Recombinaison**: La recombinaison est un mélange de lait reconstitué et de matière grasse de lait anhydre (MGLA) en vue d'obtenir un produit dont les caractéristiques ressemblent au lait de vache. Le mélange matière grasse et lait reconstitué subit une homogénéisation à une température de 60 à 65°C afin d'éviter la remontée de la matière grasse dans le produit puis le lait doit être pasteurisé et refroidi. (**Boularak, 2005**).

Les unités de productions laitières qui traitent le lait en poudre sont équipées d'un atelier de reconstitution/recombinaison. Le lait reconstitué ou recombéné est soumis aux mêmes opérations que le lait frais à savoir la pasteurisation, le conditionnement et le stockage à 4°C.

La figure1 présente le diagramme de fabrication de lait reconstitué/recombéné pasteurisé.

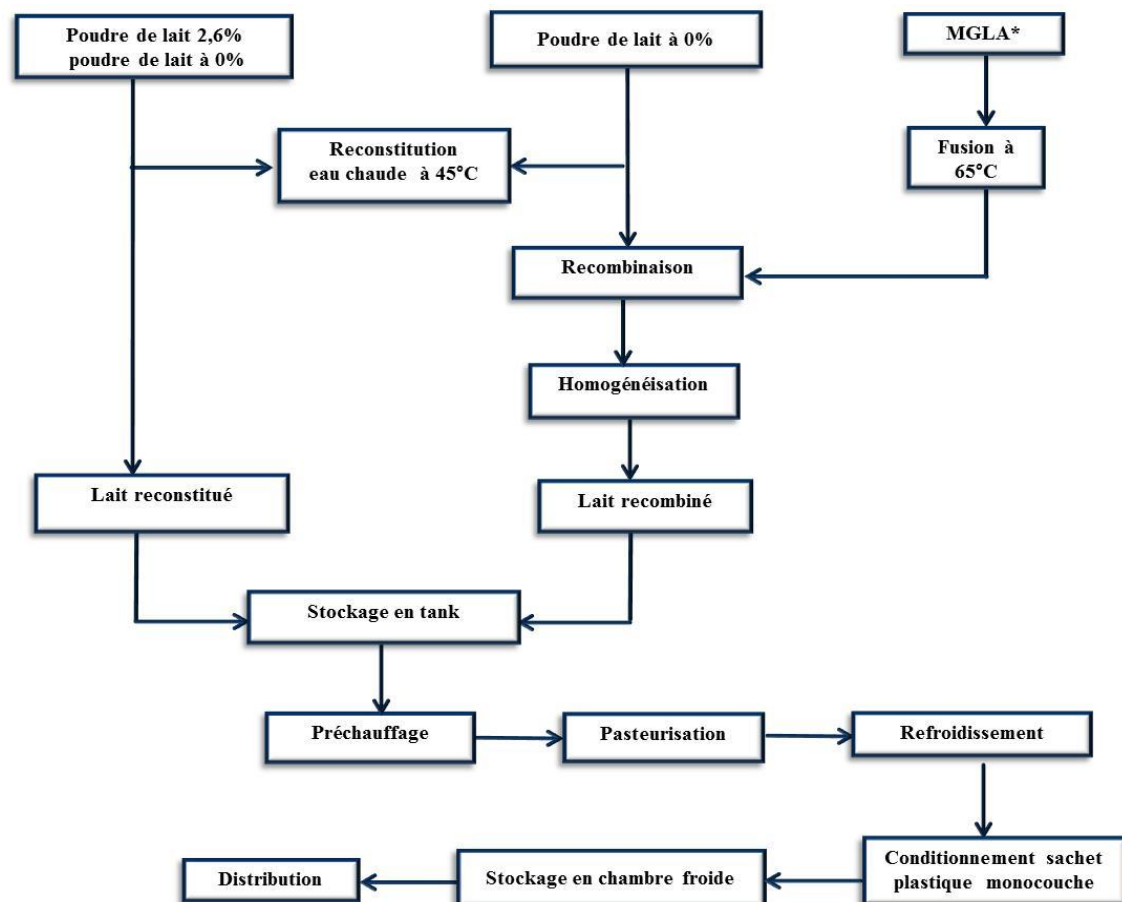


Figure 1 : Diagramme de fabrication de lait reconstitué/recombéné pasteurisé (**Malek, 2019**).

2.2. Microbiologie du lait :

Le lait est un aliment complet qui contient des matières grasses, lactose, protéines, sels minéraux, des vitamines et de 87% d'eau. Son pH est de 6.7. Il est également un excellent substrat pour la croissance microbienne. **(Guiraud, 1998)**. Les microorganismes du lait, selon leurs importances, sont répartis en deux grandes classes: la flore indigène ou originelle et la flore de contamination. Cette dernière est divisée en deux sous classes: la flore d'altération et la flore pathogène **(Vignola, 2002)**.

2.2.1. Flore originelle :

La flore originelle se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés à la sortie du pis, qui n'a aucun effet significatif sur la production du lait et sur sa qualité **(Vignola, 2002)**. En effet, le lait contient peu de Microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, à partir d'un animal sain. Il s'agit essentiellement des germes saprophytes: microcoques, streptocoques lactiques, lactobacilles. Des germes pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire peuvent être présents lorsque le lait est issu d'un animal malade qui sont des agents des mammites et peut s'agir aussi de germes d'infection. **(Guiraud, 2003)**.

2.2.2. Flore de contamination:

A cause de sa richesse en glucides, protéines, lipide vitamines et sels minéraux, le lait peut représenter un danger pour le consommateur, lorsqu'il est contaminé par des microorganismes et des résidus des substances antimicrobiennes. De ce fait le contrôle d'hygiène du lait pasteurisé est très important, **(Aggad & al., 2009)**.

La microflore survivante se compose principalement de bactéries sporulantes, de microcoques et de lactobacilles. **(Frank et Hassan, 2002)**. Elle peut se composer d'une flore d'altération qui peut causer des défauts sensoriels, ce qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse d'un point de vue sanitaire **(Vignola, 2002)**.

2.2.2.1. Germes d'altération :

Ce sont des germes apportés par la contamination, qui provoque des défauts sensoriels du goût, d'arôme et d'apparence (la détérioration des produits), sans nécessairement avoir une incidence sur la santé du consommateur, car leur présence en grande quantité est visible par

l'état du produit (changement d'aspect, odeur indésirable...) (**Simonet, 2006**). Ils regroupent les flores suivantes :

- **Le groupe des coliformes :**

Les coliformes sont des Entérobactéries (bacilles à Gram-, non sporulés, oxydase- et aérobies ou anaérobies facultatifs), qui comprennent les genres *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Citrobacter* (**Billon et Sauve, 2009**). Leur présence dans le lait est l'indice d'une contamination fécale qui peut représenter un risque d'intoxications alimentaires (**Simonet, 2006**).

- **Les Streptocoques lactiques et les Lactobacilles :**

Les Streptocoques lactiques et les Lactobacilles sont des bactéries lactiques à Gram+ ayant des formes en coques ou en bâtonnets. Elles ont une grande importance dans l'industrie laitière notamment pour l'attention qu'elles reçoivent dans la fabrication du fromage mais aussi pour leur capacité à acidifier le lait, ce qui provoquera par la suite sa coagulation (**Kouame, 2013**). (Figure 02).

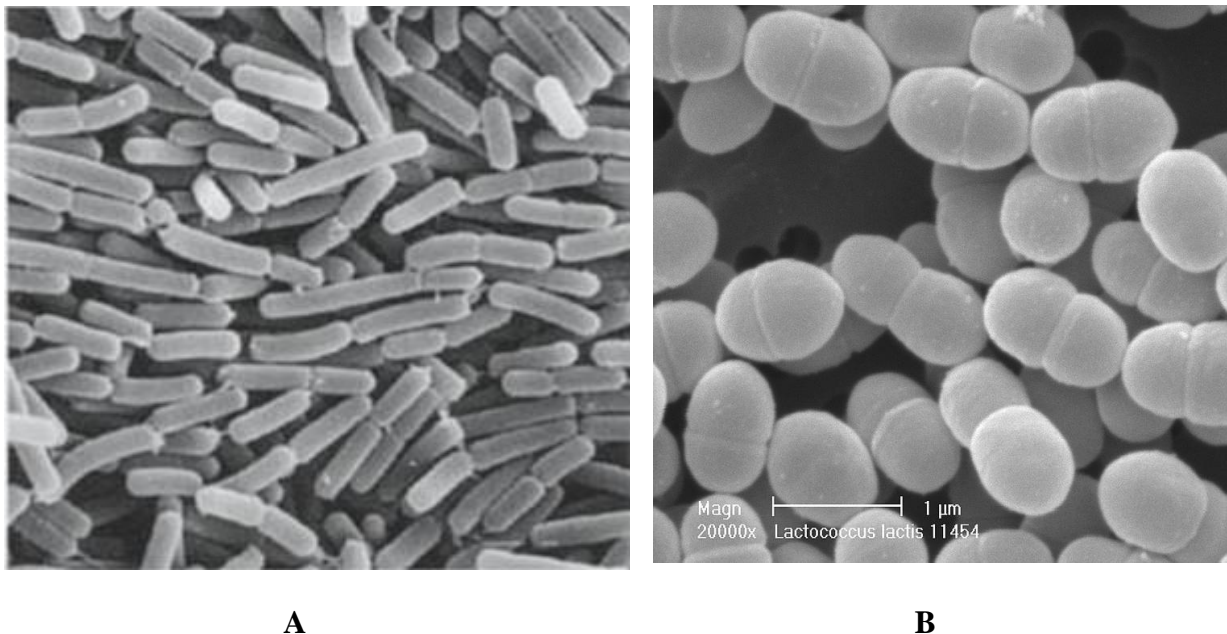


Figure 2 : Bactéries lactiques

(A) : *lactobacillus acidophilus* (B) : *lactococcus lactis*

- ***Bacillus cereus* :**

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste qui peut être isolé à partir d'aliments, des végétaux, des tissus animaux et du sol. Ce sont des bactéries à Gram+, aérobies ou anaérobies facultatives, mobiles ou immobiles. Les symptômes provoqués par *Bacillus cereus* lors d'une

contamination alimentaire sont manifestés par des troubles du tube digestif dus à l'ingestion de la bactérie (Upasana, 2015).

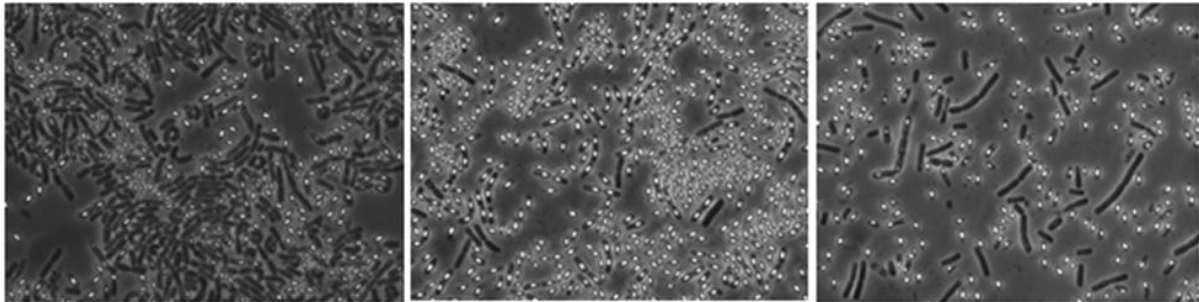


Figure 3 : Photos au microscope à contraste de phase représentant des cultures de *B. cereus* en phase de sporulation (Malek, 2013)

Sa capacité à former des endospores permet à *B. cereus* de persister dans les conditions environnementales difficiles telles que la déshydratation, les températures élevées et la carence nutritionnelle ce qui pose de graves problèmes dans les industries agroalimentaires notamment les industries laitières (Lepsanovic et al., 2018; Malek, 2019). Ainsi que son pouvoir à s'adhérer aux surfaces en acier inoxydable et à former un biofilm la rend plus résistante aux antimicrobiens et aux désinfectants (Kumari et Sarkar, 2016).

La quasi omniprésence de *Bacillus cereus* dans l'environnement laitier est attribuée au grand pouvoir d'adhésion des spores, leur capacité de formation du biofilm sur les surfaces en acier inoxydable et leur résistance à la désinfection chimique (Peng et al., 2002; Shaheen et al. 2010; Faille et al., 2013).

2.2.2.2. Germes pathogènes :

La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, suite à une excrétion mammaire de l'animal malade ou bien d'origine exogène, suite à un contact direct avec des troupeaux infectés, ou d'un apport de l'environnement (eaux) (Si Tayeb, 2018). Les germes les plus souvent évoqués sont:

- **Bactéries infectieuses :**

Ce sont des bactéries qui peuvent provoquer le dérèglement du système une fois ingérées. Elles doivent être vivantes dans l'aliment lors de sa consommation pour agir et avoir de l'effet. Apparaissent alors divers symptômes, tels que la diarrhée, les vomissements, les maux de tête...etc. (Kizi et Makdoud, 2014). Les principaux microorganismes infectieux sont : *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* (Prescott et al., 2010).

- **Bactéries toxinogènes :**

Ce sont des bactéries qui produisent une toxine au niveau de l'aliment qui est responsable de l'intoxication. Parmi les principaux microorganismes toxinogènes on peut citer comme exemple l'espèce : *Staphylococcus aureus* (**Kizi et Makdoud, 2014**). Ce sont des germes ubiquistes que l'on retrouve dans l'air, les eaux et le sol, et ils appartiennent à la flore commensale de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux (**Titouche, 2018**). Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des Cocci Gram positif, non sporulés, regroupés en amas, immobiles et anaérobies facultatifs. La présence des staphylocoques dans les aliments représente un risque pour la santé humaine, puisque certaines souches appartenant principalement à l'espèce *S. aureus* produisent des entérotoxines dont l'ingestion cause une toxi-infection alimentaire qui se manifeste par des vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et maux de tête (**Brisabois, 2016**).

2.2.3. Sources de contamination du lait :

Les sources de contamination du lait sont nombreuses et variées, elles comprennent Fèces et téguments de l'animal : Coliformes, Entérocoques. Sol : *Streptomyces*, bactéries sporulées. L'air et l'eau : Flores diverses, bactéries sporulées, ainsi que le personnel et les équipements laitiers, (**Guiraud, 2003**).

2.2.3.1. Contaminations par la matière première:

Les flores de contaminations du lait frais liquide ou en poudre influence sur la qualité microbiologique du lait pasteurisé (**Malek, 2013**). A cause de cela, les organismes gouvernementaux et les laboratoires ont développé des limites microbiologiques ou des spécifications qui s'appliquent à certains groupes de micro-organismes qui peuvent être présents dans le lait cru et en poudre. Ces spécifications peuvent concerner les apports des matières premières à la qualité du lait et l'hygiène lors de la fabrication et du stockage. (**Augustin et al., 2003**). D'une manière générale, les niveaux de contamination de ces matières premières doivent être les plus faibles possibles (**Malek, 2019**).

2.2.3.2. Contaminations à partir des équipements:

Elle est souvent caractérisée par la formation des biofilms laitiers qui sont dominés par différentes bactéries. La formation de ces biofilms sur les équipements peut provoquer de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques dues à la détérioration des aliments et à la dépréciation des équipements (**Flint et al., 1997**). Les micro-organismes dans les biofilms catalysent les réactions chimiques et biologiques causant la corrosion des métaux dans les tuyauteries et les réservoirs, et ils peuvent réduire l'efficacité de transfert de chaleur s'ils deviennent suffisamment épais (**Simoès et al., 2009**).

Les facteurs qui peuvent influencer la durée de conservation du lait pasteurisé peuvent être résumés selon **Petrus et al., (2009)**:

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

2.2.3.3. Contamination par l'eau :

- L'eau utilisée au cours des opérations de production primaire doit être salubre pour son utilisation prévue et ne devrait présenter aucun danger de contamination du lait (**FAO et OMS, 2011**).

- L'eau doit être potable et notamment répondre aux standards fixés par l'organisation mondiale de la santé (OMS). Sur le plan microbiologique, elle ne doit contenir aucun germe pathogène. Sur le plan physicochimique, elle ne doit pas contenir des pesticides, ni nitrates et doit avoir une dureté totale comprise entre 0 et 15 et un pH voisin de la neutralité (**FAO, 1995**).

2.2.3.4. Contamination par les manipulateurs :

- La contamination peut provenir aussi de personnes saines ou malades ou guéries (porteurs sains).
- Les contaminations par manipulation sont d'abord des contaminations de contact ; essentiellement au niveau des mains.

- Le manque d'hygiène peut entraîner la présence sur la peau de bactéries intestinales (contamination fécale : Salmonella).
- Des contaminations par aérosols (toux, éternuement...). Par ailleurs, la contamination peut être liée aux vêtements (**Guiraud, 2012**).

2.3. Les altérations microbiennes du lait et des produits dérivés :

2.3.1. Acidification :

Un tel processus conduit à la coagulation de la caséine et à la prise en masse du lait. Selon la température du lait et les bactéries impliquées, le phénomène de la coagulation sera plus ou moins rapide : de 10°C à 37°C, le germe le plus fréquemment retrouvé est *Streptococcus lactis* avec plus rarement association avec des coliformes, entérocoques, microcoques et lactobacilles. Au-dessus de 37°C, les germes en cause sont *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* et *Lactobacillus bulgaricus*. A des températures inférieures à 10°C, le processus est plus lent, la prise en masse nécessite un délai relativement important. Le caillot peut être dégradé dans une seconde étape par les espèces psychrotrophes protéolytiques : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *microcoques* ... (**Guiraud et Galzy, 1980 ; Leyral et Vierling, 2007**).

2.3.2. Protéolyse :

Au cours de leurs activités métaboliques, certains microorganismes, grâce à l'action de leurs protéases, ils dégradent des fractions protéiques du lait. Ce phénomène produit la libération de sous-produits très variés, dont des peptides à courte ou longue chaîne à l'origine des goûts amers. Les germes incriminés sont *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* (**Vignola, 2002 ; Guiraud, 2003**).

2.4.3. Lipolyse :

C'est une réaction enzymatique de dégradation de la matière grasse qui se traduit dans le lait par une augmentation de la teneur en acides gras libres. Au-delà de certains seuils, cette augmentation peut provoquer l'apparition de défauts de goûts (rance) dans les produits laitiers (**Heuchel et al., 2003**). Dans un lait cru réfrigéré, la flore dominante est représentée par les psychrotrophes. 70% ou plus de cette population possèdent une activité lipolytique. Cependant, elle n'est perceptible au goût qu'à partir des teneurs de 10⁶ à 10⁷ germes/ml, c'est-à-dire pour des laits crus considérés comme très pollués (**Richard, 1983 ; Chilliard et Lamberet, 1984**).

Chapitre II

Le biofilm en industrie laitière

Chapitre II : Le biofilm en industrie laitière

1. Généralité sur les biofilms

1.1. Définition du biofilm :

Le biofilm est une communauté de microorganismes incorporés dans une matrice de polymères organiques autoproduits et adhérant à une surface. L'organisation des communautés microbiennes du biofilm en consortium fonctionnel et la nature de la surface, sont précisées (**Costerton et al., 1995**). De plus, les biofilms matures sont des structures bien organisées dans lesquelles les canaux d'eau sont dispersés et peuvent fournir des passages d'air et l'échange des nutriments, métabolites et produits inutilisés (**Akbas, 2015**).

1.2. Composition :

Le biofilm est constitué principalement de microorganismes et de la matrice qu'ils synthétisent. Les microorganismes représentent 2 à 5 % de la matrice du biofilm selon l'espèce concernée alors que la matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm (**Costerton, 1999**).

1.3. Les microorganismes :

Seuls quelques biofilms sont constitué d'un seul type de microorganisme. Ce phénomène est lié aux conditions environnantes, plus souvent qu'à la nature même des microorganismes, bien que les biofilms naturels sont fréquemment composés de nombreux types de microorganismes bactéries, protozoaires, algues, mycètes, chaque groupe exécutant des fonctions métaboliques spécialisées (**Branger et al., 2007; Alanasouri, 2010**). Les biofilms mono-espèce sont le plus souvent le résultat de la pression de la sélection exercée par les conditions de processus technologique (**Flint et al., 1997**).

1.4. La matrice :

La formation de la matrice est un processus dynamique qui dépend de la disponibilité nutritive, la synthèse et la sécrétion de matière extracellulaire (**Flemming et al., 2016**). Cette matrice peut être constituée non seulement de polysaccharides, mais elle comprend aussi des protéines, des acides nucléiques, des agents tensioactifs, des lipides, des glycolipides et des cations. Cette composition est variée selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (**Tremblay et al., 2014**). Elle apporte aux microorganismes des avantages structurels et fonctionnels, résumé selon (**Flemming et al., 2016**), comme suit :

- L'hydratation
- La capture de ressource
- La capacité digestive
- La protection et la résistance aux agents antimicrobiens
- Les interactions réciproques intercellulaires qui peuvent améliorer la capacité du métabolisme de cellules dans le biofilm.

2. Étapes de formation du biofilm :

La formation de biofilm est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes comme illustré dans la figure 4

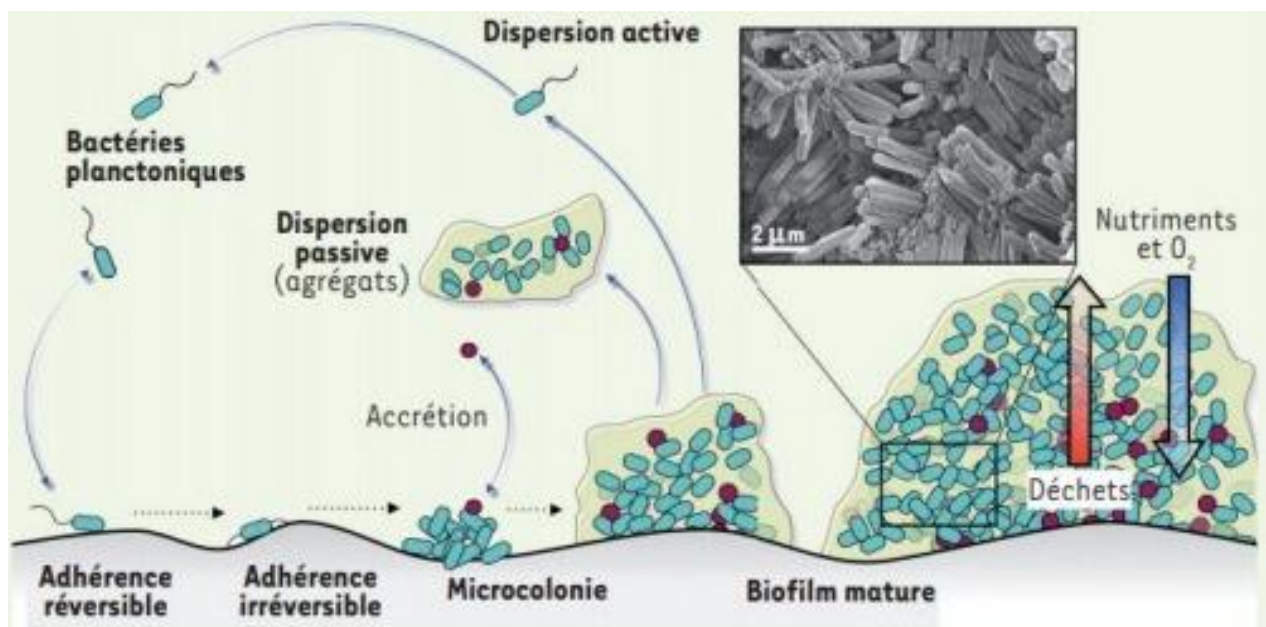


Figure 4 : Les étapes du processus de formation d'un biofilm bactérien (Lebeaux et Ghigo, 2012).

2.1. Film de conditionnement :

D'une façon générale, la surface d'un support exposé à un milieu aqueux sera inévitablement et presque immédiatement conditionnée ou recouverte de polymères provenant de ce milieu. L'adsorption de ces molécules provoquera des modifications des propriétés physico-chimiques de la surface du support et affecte l'adhésion bactérienne qui sera ainsi favorisée ou inhibée. Le film de conditionnement joue un rôle très important dans les surfaces en contact avec les aliments (Malek *et al.*, 2013).

2.2. Adhésion réversible des bactéries :

Les cellules bactériennes sous forme planctonique vont venir s'associer à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire de transport passif (ex : sédimentation) ou alors de transport actif en faisant notamment intervenir des structures particulières de la surface des bactéries tels que : flagelles chez *Pseudomonas aeruginosa*, et PNAG (Polysaccharide poly-N-acetylglucosamine) ou PIA (Polysaccharide intercellularadhesin) ; Quelles est la signification de ces deux éléments qui présentent la molécule d'adhésion la plus importante chez les staphylocoques (Goetz et al., 2016).

En outre dans le cas de *B.cereus*, il a été montré que les flagelles ont aussi un rôle important dans l'initiation du biofilm dans des conditions statiques à l'interface air-liquide. (Houry et al., 2010). Il s'en suivra une adhésion réversible qui correspond à un attachement faible des cellules bactériennes à la surface déclenchée, lorsque les microorganismes arrivent sur le support à une certaine distance, et faisant intervenir des forces non covalentes ou des interactions faibles de type forces de Van der Waals et liaisons électrostatiques (Bos et al., 1999 ; Akbas, 2015 ; Goetz et al., 2016).

2.3. Adhésion irréversible :

Lors de cette étape des interactions de courte distance et forte amplitude interviennent, des réactions spécifiquement moléculaires deviennent prédominantes entre les structures de la surface des bactéries et la surface du substrat (in Malek et al., 2013). La bactérie acquiert de nouvelles structures (flagelles latéraux, fimbriae, adhésines, exopolymères) et modifie son phénotype en réponse au contact avec la surface. Les bactéries vont s'ancrer au support par l'intermédiaire d'appendices cellulaires, les pili. Chez *Klebsiella pneumoniae*, les pili de type III ont un rôle important dans la colonisation des surfaces (Di Martino et al., 2003). L'adhésion est également renforcée par la production des substances polymériques extracellulaires (EPS). Ces structures macromoléculaires sont à l'origine de nouvelles interactions entre la bactérie et le support comme des liaisons chimiques (électrostatiques, covalentes, hydrogène), des interactions dipôles et des interactions hydrophobes (Millsap et al., 1997 ; Donlan, 2002; Simões et al., 2008).

Il est important de remarquer que certaines bactéries commencent la formation d'un biofilm parfois sans fixation à une surface par l'agrégation de cellules planctoniques. La fixation ultérieure de ces agrégats préformés sur une surface solide entraîne la formation d'un véritable biofilm (Melaugh et al., 2016).

2.4. Formation de microcolonies :

Durant cette étape, lorsque l'attachement irréversible des bactéries à la surface sera définitif, elles vont s'agréger entre elles et se diviser en utilisant les nutriments présents dans le film de conditionnement et l'environnement liquide. Ceci mène à la formation des microcolonies qui s'élargissent et s'unissent pour former une couche cellulaire qui couvre la surface (Otto, 2013; Mogha et al., 2014; Goetz et al., 2016). Les microcolonies forment des structures dynamiques bidimensionnelles à mesure que le nombre de cellules augmente, ce qui constitue la première étape vers l'organisation structurale sur la surface choisie (Pilchová et al., 2014). Au cours de cette phase, les cellules microbiennes commencent à communiquer entre elles par la production de signaux auto-inducteurs qui vont permettre l'expression des gènes spécifiques au biofilm (Davies et al., 1998 ; Vasudevan, 2014). Dans cette phase, le microorganisme sécrète une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) afin de stabiliser le réseau du biofilm (Rasamiravaka et al., 2015).

2.5. Maturation :

Les microcolonies dans le biofilm sont souvent constituées de communautés microbiennes diverses. Ces micro-consortiums multi-espèces fonctionnent de manière relativement complexe et coordonnée. Leur étroite proximité favorise la distribution des produits métaboliques, l'échange de substrats et l'élimination des produits finaux toxiques (Davey et O'toole, 2000). La maturation, entraîne la génération d'une architecture tridimensionnelle complexe, multicouche sous forme de champignon (mushroom-like), et contenant des canaux aqueux qui permettent l'acheminement d'oxygène et de nutriments dans les parties enfouies du biofilm, ainsi que l'évacuation des déchets (Stoodley et al., 2002). Au cours de cette étape le biofilm s'adapte aux conditions extérieures en modifiant sa structure, sa physiologie et son métabolisme (Gupta et al., 2015).

Contrairement aux cultures classiques réalisées en milieux liquides agités, le biofilm n'est pas un environnement homogène parce qu'il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, qui présentent des valeurs de pH différentes. Les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (Costerton et al., 1994).

Le développement de l'architecture de biofilm est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire qui est autoproduite par les bactéries et contient des exo-

polysaccharides (EPS), des acides nucléiques et des protéines (**Racha et al., 2016**). La figure 5 représente un biofilm formé par *B. cereus*

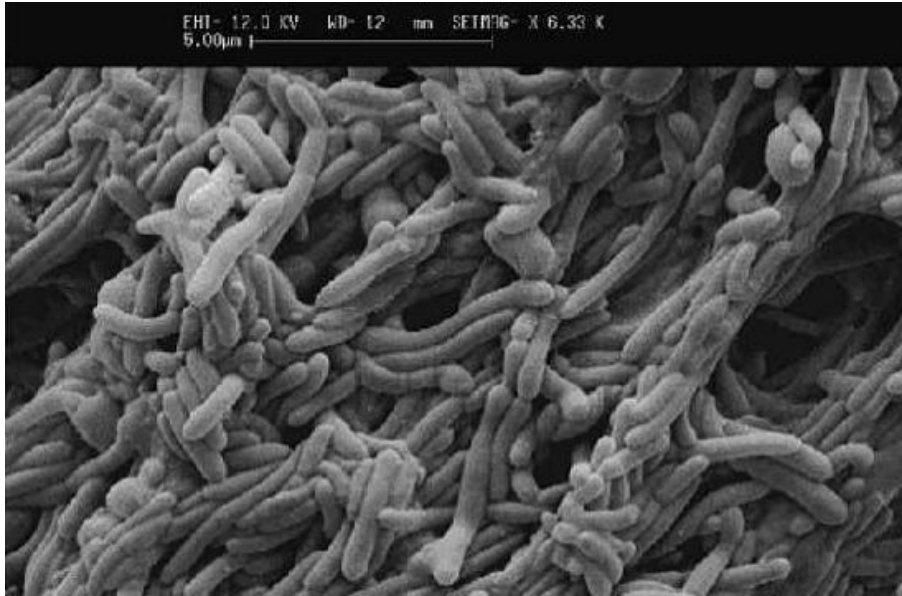


Figure 5 : Architecture de biofilm de *Bacillus cereus* (**Simoes et al., 2010**)

2.6. Détachement et dispersion du biofilm :

Une fois le biofilm atteint la taille maximale, les bactéries sessiles, afin de survivre et coloniser de nouveaux créneaux doivent pouvoir se détacher et se disperser du biofilm (**Mogha et al., 2014**). Le détachement de cellules de surface peut être régulé par quorum sensing, et que ceci aura une influence sur les différentes étapes de la formation du biofilm (**Tremblay et al., 2014 ; Akbas., 2015**). Principalement, les cellules sessiles retrouvent leur mobilité due au flagelle, et se détachent activement du biofilm : c'est la dispersion active. Les bactéries détachées retournent à l'état planctonique, trouvent de nouvelles surface et recommencent un nouveau cycle de formation du biofilm (**Srey et al., 2013; Akbas, 2015**).

Le détachement ou dispersion passive serait dû à divers facteurs tels que : la perturbation mécanique (ex : forces de cisaillement), les dynamiques des fluides, une dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire (ex : DNase) (**Mogha et al., 2014 ; Goetz et al., 2016**). Le détachement de biofilm a été divisé en 3 mécanismes :

1. L'érosion : est le résultat des forces de cisaillement dans un milieu liquides
2. L'abrasion (la collision de particules) : se réfère au détachement continu de cellules simples ou bien des petits groupes cellulaires et affecte la surface totale du biofilm.

3. Sloughing : correspond à la perte instantanée des grandes parties du biofilm, affectant donc non seulement le biofilm entier mais aussi la surface du biofilm (Mogha et al., 2014).

La figure 6 illustre les deux modes de dispersion du biofilm

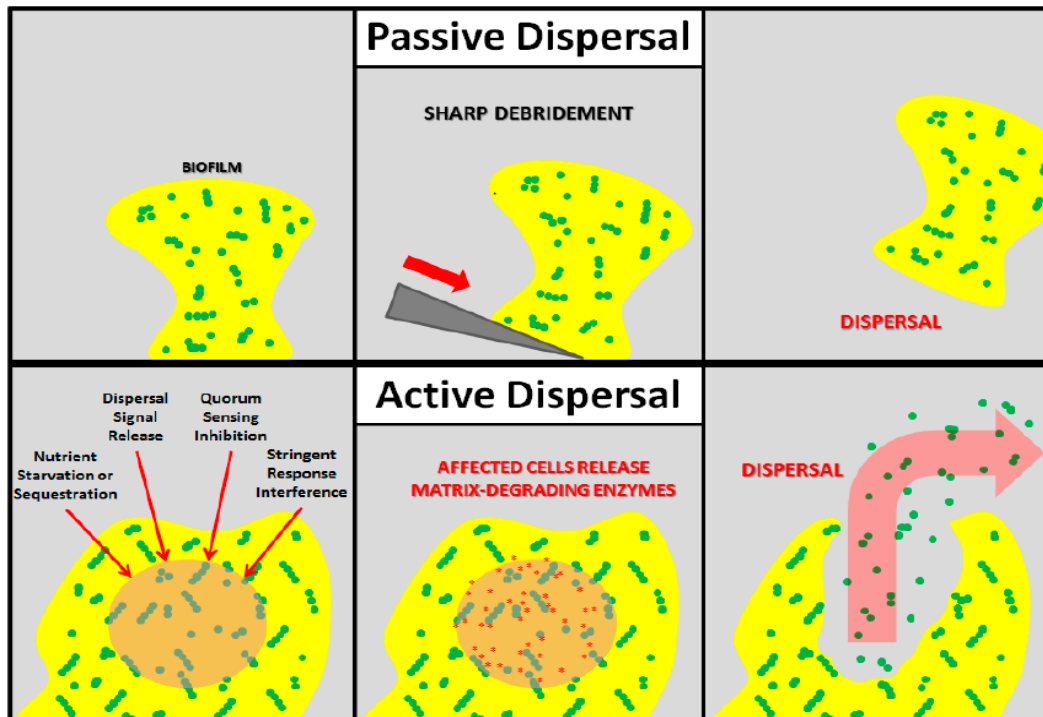


Figure 6 : Représentations schématiques de la dispersion passive et active du biofilm (Fleming et Rumbaugh, 2017).

La dispersion du biofilm a un impact crucial en ce qui concerne la contamination croisée et la transmission des maladies (Malek et al., 2013).

3. Biofilm dans l'industrie laitière :

La capacité de certains micro-organismes à former des biofilms continue d'entraîner un problème majeur pour différentes industries. Cependant toutes les branches de l'industrie alimentaire sont remises en cause par les problèmes des biofilms en libérant des bactéries qui compromettent la sécurité et la qualité du produit fini. (Parkar et al., 2004 ; Srey et al., 2013). En effet les principales sources de contamination des produits laitiers sont souvent dues au manque désinfection d'équipement et /ou mauvais nettoyage (Srey et al., 2013). Dans les conditions favorables, un biofilm dans un environnement de traitement de lait se développe initialement par le biais de l'accumulation de la matière organique sur une surface en métal, qui est alors envahi par les bactéries (Marchand et al., 2012). En effet, le lait est considéré comme un bon milieu pour la croissance des micro-organismes en raison de son pH

(presque neutre) et sa large variété en éléments nutritifs disponibles, ainsi que la présence des stimulants de croissance (Mogha et al., 2014). Le biofilm laitier se développe très rapidement (8-12 h), avec des nombres bactériens souvent supérieurs à 10^6 bactérie/cm² (Malek, 2013).

On peut retrouver deux types de biofilms dans l'industrie laitière. D'abord, les biofilms environnementaux qui sont ceux qui se développent lentement sur toutes les surfaces humides (planchers, murs, plafonds). À l'inverse des biofilms de procédé qui se développent sur les surfaces internes des équipements et sont généralement peu diversifiés et se développent beaucoup plus rapidement (Chamberland, 2018).

3.1. Composition du biofilm laitier :

La formation de biofilm peut avoir lieu dans les différents sites de la chaîne de transformation du lait; les équipements laitiers, principalement les tanks de stockage du lait et le système de canalisation ainsi que les appareils de traitement tels que les pasteurisateurs. La flore microbienne constitutive du biofilm en industrie laitière peut-être variée et comprendre de nombreux groupes bactériens aussi bien Gram-positif que Gram négatif, tels que les genres *Staphylococcus*, *Listeria*, *Pseudomonas* et certaines entérobactéries (Sharma et Anand 2002). Parmi les bactéries Gram positives, les bacilles sporulés aussi bien mésophiles que thermophiles sont caractérisées par un grand potentiel de formation de biofilm sur les équipements laitiers (Malek, 2019).

La composition microbienne du biofilm dépend fortement de la température de l'environnement dans lequel ils se développent. Il est possible de diviser les bactéries en trois groupes d'après leur température optimale de croissance: les psychrotropes, les mésophiles et les thermophiles (Stoica et al., 2018 ; Bokulich et mills, 2013).

3.1.1. Bactéries psychrotropes :

Jusqu'à sa transformation, le lait sera maintenu à 4 °C pour ralentir sa vitesse de dégradation par les microorganismes. Cette température favorise la croissance des bactéries psychrotropes telle que les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella...*) (Champagne et al., 1994 ; Von Neubeck et al., 2015).

3.1.2. Bactéries mésophiles :

Ce sont des bactéries caractérisées par une température optimale de croissance d'environ 45 °C et une température minimale de 10 °C. Plusieurs bactéries pathogènes sont considérées comme mésophiles: *B.cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, ou

Staphylococcus aureus, ... etc. Certaines bactéries mésophiles sont particulièrement résistantes aux traitements thermiques; ces bactéries sont appelées thermorésistantes. C'est le cas des *Streptococcaceae* tels que *Streptococcus thermophilus*, qui résistent à la pasteurisation du lait mais dont la température optimale de croissance se trouve environ de 35 °C (Quigley et al., 2013 ; Maher et al., 2001).

3.1.3 Bactéries thermophiles :

Ce sont des bactéries qui peuvent croître dans les environnements chauds (entre 45 °C et 70 °C) et qui ne présente pas une abondance dans le lait cru. Peu diversifiées au sein de l'industrie laitière, ces bactéries forment généralement des biofilms mono espèce. Étant très résistantes à de nombreux stress, elles survivent tout au long du parcours des fluides laitiers dans l'usine et se développent là où les autres n'ont pas la capacité pour. De ce fait, elles dominent les surfaces des sorties de ligne de pasteurisation ou celles d'entrée des évaporateurs et des tours de séchage (Mcguiggan et al., 2002; Burgess et al., 2010).

Dans l'industrie laitière, les bacilles thermophiles sont généralement énumérés en utilisant la méthode standard des germes aérobies (PCA) incubé à 55 C. Ceux qui ont été isolés à partir de produits laitiers à cette température d'incubation peuvent être divisés en deux groupes :

•Les thermophiles obligatoires :

Ils ne poussent qu'à des températures élevées (Environ 40 à 68°C) et comprennent *Anoxybacillus flavithermus* et les espèces au genre *Geobacillus* (Flint et al., 2001 ; Ronimus et al., 2003).

• Les thermophiles facultatifs :

Également connu sous le nom micro-organismes thermotolérants. (Burgess & al., 2010). Appartiennent au genre *Bacillus* et ont la capacité de croître à deux températures mésophiles et thermophiles, en fonction de la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans* et *Bacillus subtilis* (Flint et al., 2001 ; Moreno Switt., 2014). Le tableau 1 résume les principales caractéristiques des bacilles thermophiles d'intérêt laitier (Malek, 2019).

Tableau 1 : Caractéristiques de quelques bacilles thermophiles d'intérêt laitier (**adapté de Burgess et al, 2010**).

| | <i>Anoxybacillus flavithermus</i> | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | <i>Geobacillus thermoleovorans</i> | <i>Bacillus licheniformis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus coagulans</i> | <i>Bacillus pumilus</i> |
|--|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Température maximale de croissance (° C) | 65-72 | 65-68 | 70 | 50-55 | 45-55 | 57-61 | 50-55 |
| Température minimale de croissance (° C) | 30-38 | 37 | 35-47 | 15 | 5-20 | 15-25 | 5-15 |
| Thermorésistance des spores ^a | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Caractère thermophile | Obligatoire | Obligatoire | Obligatoire | Facultatif | Facultatif | Facultatif | Facultatif |

^a+++, très résistante; ++, modérément résistante.

3.1.3.1. Sporulation des bacilles mésophiles et thermophiles:

La sporulation est un processus naturel dans le cycle de croissance de certains groupes de bactéries tel que les espèces des *Bacillus*. Il s'agit d'un mécanisme de survie, généralement considérée comme un processus qui se produit lorsque l'organisme est en situation de stress. Dans l'environnement des produits laitiers, les bacilles mésophiles et thermophiles sont caractérisés par la formation rapide de spores (**Burgess et al., 2010**).

3.1.3.2. Résistance des spores :

Les spores sont résistantes à la chaleur, une rupture mécanique et une large variété de produits chimiques, ce qui rend très difficile de les détruire dans les produits laitiers lors du processus de fabrication. Dans le cas des bacilles mésophiles et thermophile facultatifs, des combinaisons de plusieurs propriétés pourraient contribuer à l'ensemble de la résistance des spores de *Bacillus*, notamment leur faible teneur en eau, l'imperméabilité de la membrane interne, la couche de spores, le peptidoglycane. (**Burgess et al., 2010**).

Les spores de certaines espèces mésophiles, comme *Bacillus sporothermodurans* sont plus thermorésistantes que les spores des espèces thermophiles (**Petersson et al., 1996**, **Owusu-Darko et al., 2019**). Cette espèce est caractérisée par une morphologie cellulaire particulière en longues formes filamenteuses sur milieux de cultures (Figure 7).

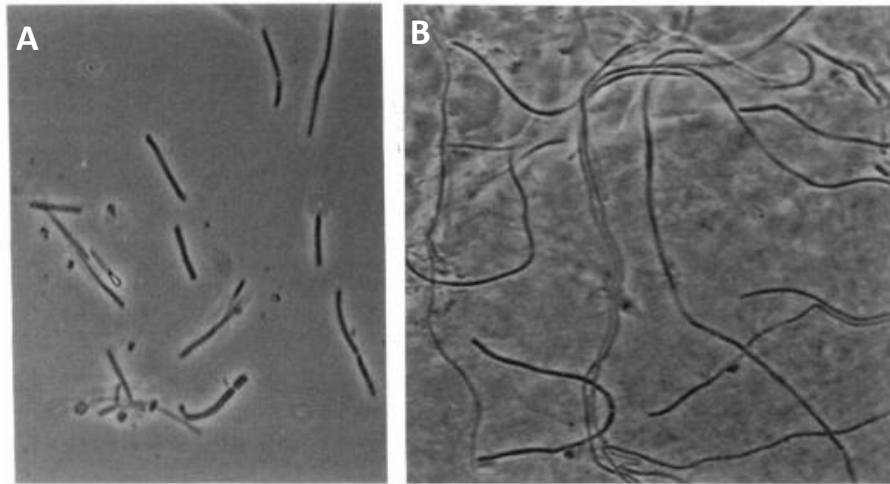


Figure 7 : Morphologie cellulaire de *B. sporothermodurans* observée au microscope à contraste de phase (Petersson *et al.*, 1996).

3.2. Le biofilm et la contamination croisée :

Les biofilms de l'environnement laitier sont responsables de la contamination du lait et de la diminution de sa durée de conservation ainsi que de la dégradation des conditions d'hygiène dans les entreprises de production laitière. La contamination croisée désigne le transfert des bactéries détachées du biofilm à l'aliment transformé, et constitue la principale source de contamination du produit fini et affecte alors sa qualité hygiénique et sanitaire, Ceci constitue un gros problème économique et sanitaire dans les industries agro-alimentaire (Malek, 2019).

Le détachement est une étape clé dans la transmission et la persistance des contaminations dues au biofilm car ce phénomène provoque la dissémination des cellules planctoniques qui vont coloniser d'autres surfaces (Gotze *et al.*, 2016). A titre d'exemple, les souches de *B.cereus* se caractérisent par une dispersion rapide qui se produit en moins de 20 heures), est impliquée dans les problèmes des contamination croisées (Malek, 2016 ; 2018). La figure 8 montre les différents styles de dispersion de cet agent pathogène qui peuvent se produire dans les lactoducs.

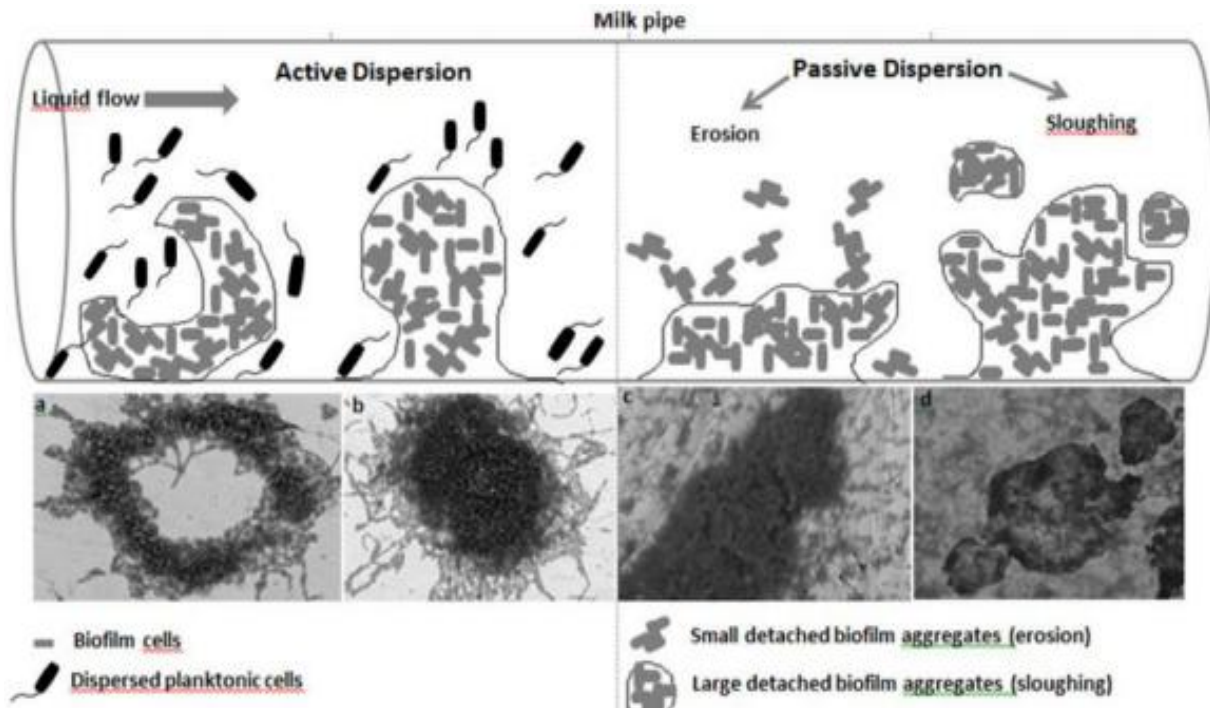


Figure 8 : Différents styles de dispersion du biofilm dans les lactoducs. Chaque style de dispersion est représenté par des images ESEM de biofilms in vitro de 20 h de *B. cereus* (a et b) ou de biofilms de sept jours formés in situ à l'intérieur de conduites de lait (c et d)

(Malek, 2018).

3.3. Résistance du biofilm aux procédures de nettoyage :

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. Pour s'en débarrasser, il faut des traitements sévères aux oxydants forts et nécessite le développement de nouvelles stratégies d'hygiène. De plus, 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, 2019).

Parmi les mécanismes de résistance des biofilms, la matrice organique qui protège les bactéries, les rendant inaccessibles à l'action des agents antimicrobiens, joue un rôle très important. Les procédures de nettoyage devraient permettre une bonne dissolution de la matrice organique, en renforçant le nettoyage alcalin, notamment par l'utilisation des détergents enzymatique. Pour améliorer l'hygiène industrielle, le système CIP doit être complété par une étape de désinfection, permettant de neutraliser la flore résiduelle adhérente (Malek, 2019).

Matériel et méthode

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au pôle de microbiologie de la faculté SNV-STU, de l'université de Tlemcen. L'objectif de notre étude est d'identifier et de caractériser la flore de contamination du lait pasteurisé produit par une laiterie de la région de Tlemcen. Le plan expérimental de ce travail est le suivant :

- Dénombrement et isolement de la flore de contamination du lait pasteurisé reconstitué ou issu du cheptel local.
- Identification phénotypique des souches isolées par l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques.
- Caractérisation du pouvoir enzymatique des isolats bactériens (protéolyse et lipolyse).
- Caractérisation du potentiel d'adhésion et de formation de biofilms des isolats.

1. Prélèvements :

Trois échantillons ont été prélevés durant le mois de Mars à partir des différents lots de lait pasteurisé, conditionné à savoir :

- Le lait de vache pasteurisé en sachet (LP)
- Le lait reconstitué pasteurisé en sachet (LPR)

1.1. Transport des échantillons :

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

1.2. Traitement des échantillons :

1.2.1. Préparations des dilutions décimales :

Une fois l'échantillon au laboratoire, près du bec bunsen, on essuie une extrémité du sachet de lait pasteurisé avec un coton imbibé d'alcool, et par un ciseau bien stérile, on coupe l'une des extrémités. Le lait est analysé directement ou après enrichissement. Une fois le sachet est ouvert, 1000 µl de lait sont prélevés avec la micropipette et versé dans un tube en verre stérile qui contient 9 ml de TSE. Les dilutions décimales sont réalisées jusqu'à la dilution 10⁻³

L'enrichissement du lait pasteurisé est réalisé à la température ambiante ou à 55°C pendant 24h. Pour cela deux tubes de 10 ml de lait sont placés dans les deux différentes conditions de température et après 24 h d'incubation subissent les traitements suivants :

- Les échantillons du lait pasteurisé incubé à 55 ° C sont agités au vortex pour réaliser des dilutions décimales.
- Les échantillons laissés à la température ambiante subissent d'abord un traitement thermique à 80°C pendant 12 minutes dans un bain marie.

1.2.2. L'ensemencement :

L'ensemencement s'effectue en surface sur le milieu (PCA) coulé dans les boites de Pétri. Grace à des micropipettes on dépose 100 µl de la solution mère et de chaque dilution dans les boites de Pétri préparées qui contiennent le milieu gélosé.

On utilise des pipettes pasteur en forme d'un râteau pour étaler uniformément cet inoculum sur la gélose. Les boites seront incubées à 30°C et 55°C pendant 24 à 48h. La figure 9 résume le protocole expérimental de l'analyse microbiologique du lait pasteurisé.

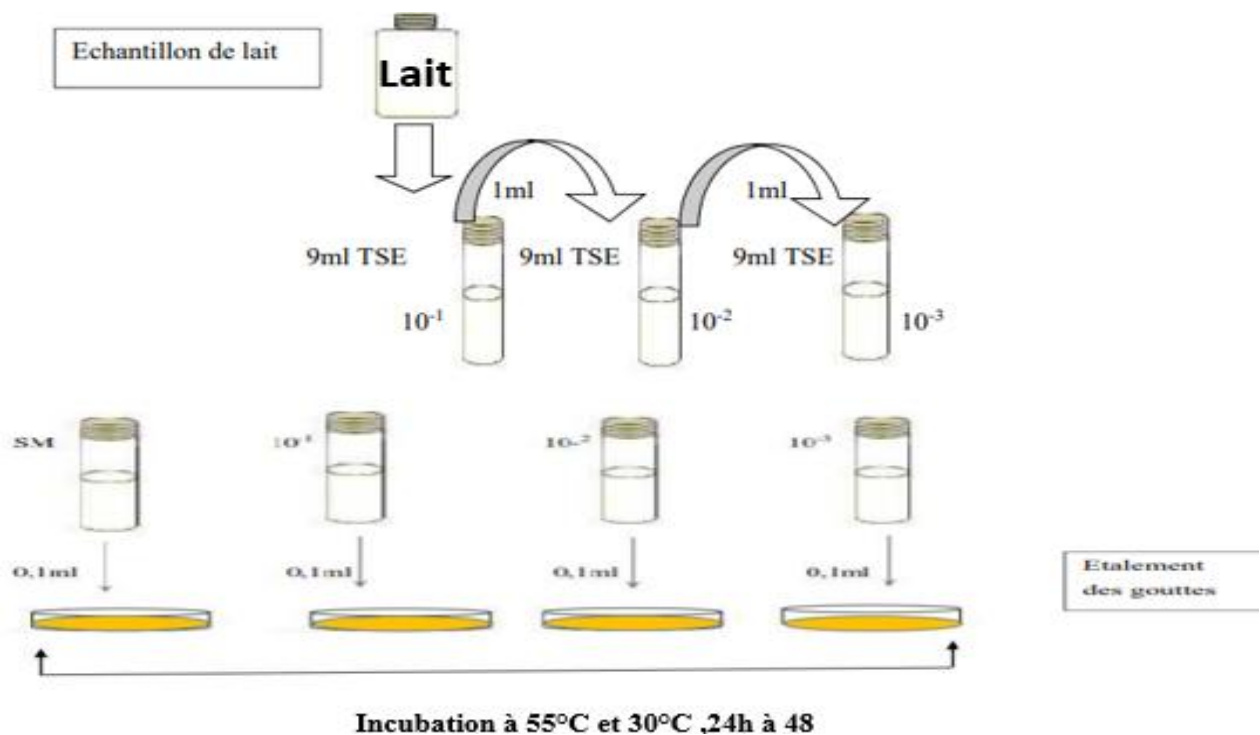


Figure 9 : Représentation schématique du protocole expérimental de l'analyse microbiologique du lait pasteurisé

2. Identification morphologique des souches :

Celle-ci porte sur l'étude des caractères cultureux des isolats bactériens et de leur morphologie cellulaire après coloration de Gram.

2.1. Caractères cultureux :

Cette étude consiste en l'observation directe à l'œil nu de l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieu PCA après 24 à 48h d'incubation en tenant compte des critères suivants : La taille, la forme des colonies, l'aspect des contours, et la couleur.

2.2. Morphologie cellulaire :

L'observation microscopique des cellules est réalisée après la coloration de gram, selon le protocole suivant :

- Mettre une goutte d'eau distillée sur une lame stérile
- Avec une anse de platine stérile on étale une culture sur la goutte
- Sécher le frottis en passant trois fois dans la flamme (ou au-dessus du bec)
- Recouvrir le frottis de violet de gentiane oxalaté: Laisser agir une minute
- Recouvrir la lame de Lugol pendant une minute puis rincer à l'eau distillé
- Décolorer à l'alcool, entre 15 et 30 secondes puis rincé très bien à l'eau distillé
- Contre colorer à la Fuschine phénolée pendant une minute
- Sécher le frottis avec/sur un papier joseph (**In Malek, 2019**).

• Observation de la préparation:

Observer le frottis à l'huile à immersion (objectif $\times 100$), il faut noter la forme, la taille et le mode de groupement. Les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries Gram négative se colorent en rose.

• Recherche des spores :

La coloration au violet de gentiane de cultures âgée de plus de 48 h, permet la mise en évidence de la présence ou l'absence de la spore.

Sur un frottis bactérien correctement fixé à la chaleur on fait couler la solution de violet de gentiane après un temps de réaction d'une minute, on rince abondamment à l'eau. Puis le frottis bactérien est séché par du papier Joseph ensuite l'observation au microscope au

grossissement x 100. Les spores apparaissent comme un vide réfringent à l'intérieur de la cellule.

2.3. Conservation des souches :

Les souches isolées sont conservées dans des tubes à essai contenant du milieu (TSA) incliné.

Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par des stries, puis incubées à 30 et à 55°C pendant 24h, et conservés à 4°C.

3. Identification biochimique :

3.1. Test de catalase :

Sur une lame en verre bien nettoyée on met une goutte d'eau distillée, Avec l'anse de Platine bien stérile on dissocie un fragment de culture bactérienne, en formant une suspension et on ajoute une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂). Le dégagement d'oxygène se traduit par effervescence qui est un résultat positif visible à l'œil nu, l'absence d'effervescence est un résultat négatif.

3.2. Test d'oxydase :

A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et cotonnée on dépose une colonie bactérienne pure sur un disque à l'oxydase. Le virage de couleur vers le bleu-mauve traduit l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes. L'absence de coloration est un résultat négatif. Uniquement les souches Gram- sont testées.

3.3. Identification par galerie API 20 E :

Une souche Gram négative et oxydase négative est soumise à une détermination du biotype par la galerie API 20 E, réalisé conformément au guide API 20 E :

➤ Préparation de l'inoculum :

- ✓ A l'aide d'une pipete prélever une colonie de 24h bien isolée sur milieu gélosé.
- ✓ Réaliser une suspension bactérienne dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis homogénéiser la suspension au vortex.

➤ **Inoculation et lecture de la galerie :**

La galerie est inoculée et lue selon le guide API 20 E. A cause de la déshydratation les plaques ont été incubées à 30°C.

3.4. Détermination des activités enzymatiques :

• **Activité protéolytique:**

La recherche de l'activité protéolytique est utile pour mettre en évidence les espèces qui peuvent hydrolyser la caséine. Elle est effectuée sur une gélose au lait, dont la composition est donnée en annexe,ensemencée par une seule strie pour chaque souche à tester ensuite incubé à 45° C pendant 24h. Les zones d'éclaircissement du milieu autour des colonies traduisent un résultat positif, l'absence de la zone exprime par un résultat négatif.

• **Activité lipolytique:**

Elle est réalisée sur milieu TSA à 0,1% de tween 80, après préparation et autoclavage, le milieu de culture est réparti en boîtes de Pétri pour la solidification puis ensemencé en une seule strie pour chaque souche. L'incubation se fait à 30° et à 45° C pendant 24h, selon la température d'isolement du germe. L'apparition d'un halo opaque autour des colonies exprime la présence d'une estérase.

3.5. Croissance à différentes températures :

Pour déterminer le caractère thermophile obligatoire ou facultatif des souches isolées à 55°C, celles-ci sont ensemencées sur milieu (TSA) en boîtes de Pétri, puis mises en incubation à 37°C, 45°C et 65°C pendant 24 h.

4. Détermination du potentiel d'adhésion et de formation du biofilm :

Le potentiel de formation du biofilm chez les bactéries testées est déterminé par la méthode de cristal violet selon la technique **d'Auger et al, (2006)**.

4.1. Formation de biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits

• **Préparation des souches :**

À partir de souches repiquées sur les boîtes, nous avons préparé une préculture de 24 h dans le milieu TSB (trypton-soybroth). Après 24h d'incubation, une dilution décimale a été préparée

dans le même bouillon de culture pour avoir une densité optique (D.O) comprise entre 0.6 à 0.8 à 600 nm.

- **Ensemencement :**

Après une agitation des tubes en vortex ,100 µl de suspension bactérienne sont déposés dans chaque puits de la microplaque stérile. Le milieu non ensemencé est utilisé comme témoin. Les plaques sont numérotées correctement, en indiquant la température d'incubation et le code précis pour chaque souche.

Chacune des plaques est incubée à trois températures : 37°C, 45°C et 55° C pendant 24h, dans des étuves saturées en humidité.

- **Coloration au cristal violet**

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

- ✓ Les plaques sont d'abords vidés pour éliminer la phase liquide
- ✓ Rinçage à l'EDS trois fois pour éliminer les cellules non adhérees
- ✓ Laisser sécher à l'air libre 10 à 15 min
- ✓ Remplir les puits avec 200 µl de cristal violet à 0.5% (qui permet la coloration et la révélation des biofilms formés dans les puits des microplaques)
- ✓ Le temps de coloration est 20 à 30 min
- ✓ Rinçage a L'EDS 3 fois
- ✓ Séchage des plaques en positions renversé
- ✓ La lecture des plaques se fait avec une observation visuelle et l'intensité des couleurs est notée (+) (++) (+++)

4.2. Formation de biofilm dans les tubes en verre :

- **Préparation des tubes :**

- ✓ On prépare une suspension bactérienne homogène, en ensemencant 100 µl des cultures jeunes (24 h) dans 10 ml de milieu TSB
- ✓ On répartit les suspensions préparées dans des tubes à hémolyses en verre à raison de 2 ml par tube
- ✓ On prépare un tube témoin contenant 2 ml de bouillon de culture stérile
- ✓ On incube tous les tubes à 30, 45 et 55°C pendant 24 h

- **Révélation des biofilms dans les tubes en verre :**

- ✓ Après 24 h, pour chaque tube on élimine la culture liquide (la phase planctonique)
- ✓ On rince trois fois à l'eau distillée
- ✓ On révèle la biomasse fixée sur la surface interne des tubes en ajoutant 3 ml de la solution de cristal violet à 0,5%.
- ✓ On laisse agir pendant 20 à 30 min, puis on rince à l'eau distillée
- ✓ On égoutte et laisse sécher à l'air ambiant
- ✓ On observe l'intérieur des tubes et note les remarques.

4.3. Caractérisation microscopique de l'adhésion et de la formation de biofilms :

Des biofilms sont préparés sur des lames en verre, selon la technique de Maris (1992) pour leur observation au microscope ordinaire.

- **Préparation des lames pour les tests d'adhésion et de formation de biofilms :**

Les lames de microscopies en verre sont lavées (immersion dans un mélange d'alcool et d'acétone, pendant 1h suivie d'un rinçage à l'eau distillée), en vue de leur utilisation pour les tests d'adhésion et de formation de biofilm.

- Les lames séchées sont partagées en deux portions égales, marquée chacune en son centre par un carré de 1,5 cm de côté, puis stérilisées. (Figure 10).



Figure 10 : Les lames de microscopies en verre

A : adhésion, **B :** biofilm

- **Préparation de l'inoculum :**

- ✓ On introduit les lames en verre (A et B) préalablement nettoyée, et stérilisée dans des boîtes de pétri stériles
- ✓ A l'aide de la micropipette, on prélève 100 μ L de la culture bactérienne.

- ✓ On place cet inoculum au centre du carré tracé sur la lame, on incube à l'étuve en atmosphère saturée en humidité pendant 3 h, pour permettre aux cellules d'adhérer à la surface de la lame en verre
- ✓ Après incubation, on rince les lames 3 fois à l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules faiblement attachées
- **Obtention d'un biofilm sur lame en verre**
- ✓ On place le lot des lames d'adhésion (B) dans des boîtes de pétri stériles
- ✓ A l'aide de la micropipette verser 100 µl du milieu liquide TSB
- ✓ On incube à 30°C pendant 24 h en atmosphère saturée en humidité

4.3.1. Observation microscopique de lames colorées au cristal violet :

• Lames d'adhésion (A) :

- ✓ Placer le lot des lames sur la grille de coloration et recouvrir les deux zones d'adhésion avec une solution de cristal violet à 0,5%
- ✓ Laisser agir entre 20 et 30 min, puis rincer à l'eau distillée, laisser sécher à l'air
- ✓ Recouvrir d'une goutte d'huile à immersion et observer au microscope
- ✓ Les observations sont notées et l'adhésion au verre des souches est comparée.

• Lames de biofilm (B) :

- ✓ Après 24 h, retirer les boîtes de pétri contenant les lames portant les biofilms, de l'étuve
- ✓ Rincer les lames à l'eau distillée, laisser sécher
- ✓ Recouvrir les zones de biofilm avec une solution de cristal violet à 0,5%
- ✓ Laisser agir pendant 20 min, puis rincer à l'eau distillée, laisser sécher à l'air
- ✓ Recouvrir d'une goutte d'huile à immersion et observer au microscope
- ✓ Les observations sont notées et les biofilms formés par les différentes souches sont comparés.

4.4. Evaluation quantitative des biofilms dans les microplaques de titration :

Pour la mesure de la DO des biofilms au spectrophotomètre muni d'un lecteur de microplaque, avec une micropipette stérile, on remplit les puits avec 200 microlitre de la solution dissolvante constituée d'éthanol et d'acide acétique glacial dilué dans de l'eau distillé. (**Composition en annexe**). La solution est laissée agir 5 à 10 min pour permettre la solubilisation des biofilms colorés.

4.5. Détermination de la biomasse des biofilms formés dans les tubes en verre :

- ✓ On solubilise 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
- ✓ On mesure l'absorbance à 570 nm
- ✓ On note et interprète les résultats

La figure 11 résume les étapes de la détermination de la biomasse des biofilms formés dans les microplaques de titration.

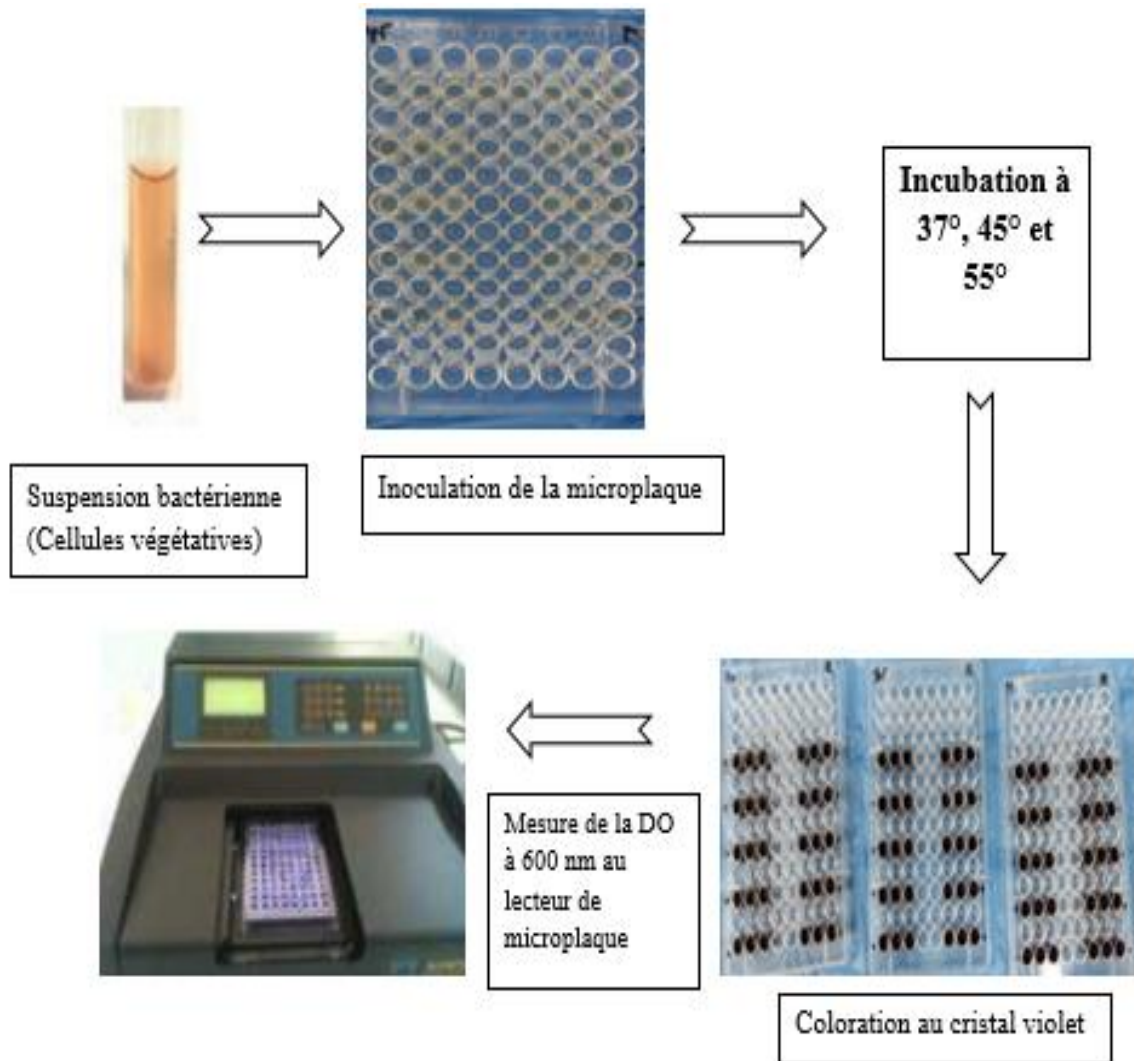


Figure 11 : Détermination de la biomasse des biofilms formé dans les microplaques de titration (**In Malek, 2019**).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Résultats du dénombrement et de l'isolement des souches :

L'analyse des différents échantillons isolés à partir de différents types de laits : lait pasteurisé reconstitué et frais (lait de vache) a permis l'isolement de 10 souches, à 30°C sans enrichissement et après enrichissement 55°C afin de favoriser la sélection des bactéries thermophiles. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Résultat du dénombrement et répartition des souches selon leur origine

| Origine | Nombre d'ufc/ml | Code des souches |
|----------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Lait pasteurisé Reconstitué (E1) | $10,5 \cdot 10^6$ | S6 |
| Lait pasteurisé Reconstitué (E2) | $8 \cdot 10^4$ | S1, S2 |
| Lait de vache Pasteurisé (E3) | $11 \cdot 10^4$ | S2, S3, S4, S5, S8, S9, S10 |

Le dénombrement de la microflore totale a été effectué sur le milieu PCA, afin de vérifier la charge microbienne totale dans les échantillons. Après 24h d'incubation à 30°C et à 55 °C, les colonies développées sont dénombrées. Le nombre de germes par ml est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution. Selon les résultats obtenus on peut conclure que la charge microbienne est importante dans tous les échantillons analysés.

2. Résultats de l'identification phénotypique des souches isolées :

L'identification a porté sur l'étude des caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

2.1 Caractéristiques culturaux :

L'observation des boîtes de pétri a permis de noter plusieurs types de colonies d'un échantillon à l'autre. Toutefois, comme le montre la figure 12, la contamination est homogène au sein d'un même échantillon, un type morphologique unique ou dominant est observé dans la même boîte de pétri. Les colonies diffèrent par la forme, la taille, la consistance, la couleur et la régularité des contours. Des colonies rhizoïdes envahissantes ont été notée dans certaines boîtes.

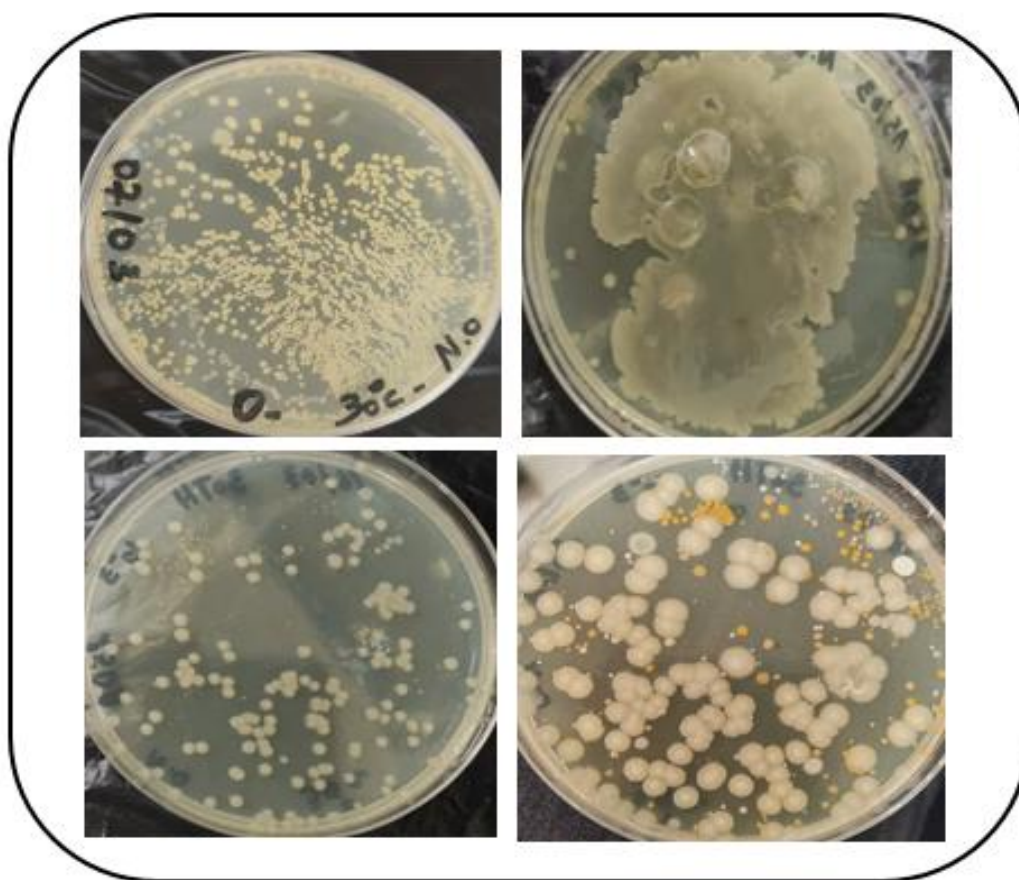


Figure 12 : Aspect des colonies de la flore de contamination du lait sur milieu PCA

- **Dénombrement des colonies :**

Après 24h d'incubation à 30°C et à 55 °C, les colonies développées sont dénombrées. Le nombre de germes par 4cm² est déterminé en calculant la moyenne Arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule (**Marchal et Bourdon, 1982**).

On a trouvé à 30°C dans le premier échantillon $1,05 \times 10^5$ UFC/ml/cm², et 8×10^4 UFC/ml/cm² dans le deuxième échantillon alors qu'on a trouvé 11×10^4 UFC/ml/cm² dans le troisième à 55°C.

Selon les résultats obtenus on peut conclure que la charge microbienne est importante et la flore est riche. Le nettoyage et la désinfection des équipements sont insuffisants et peuvent être un support pouvant recevoir et héberger à la fois des salissures et des micro-organismes.

2.2. Caractères morphologiques :

L'observation microscopique a été réalisée suivant 2 étapes : coloration de Gram, recherche et coloration de spores.

L'observation des frottis colorés sous microscope optique nous permet de distinguer les formes cellulaires bactériennes de nos isolats. L'identification morphologique des isolats a permis d'obtenir 4 bacilles Gram+ sporulés, 3 bacilles Gram+ asporulés, 2 bacille gram- et une forme en Cocci Gram+, la figure 14 montre les cultures de *Bacillus* à l'état de spores libre.



Figure 13 : Observation microscopique des cultures après coloration de Gram (G \times 100)

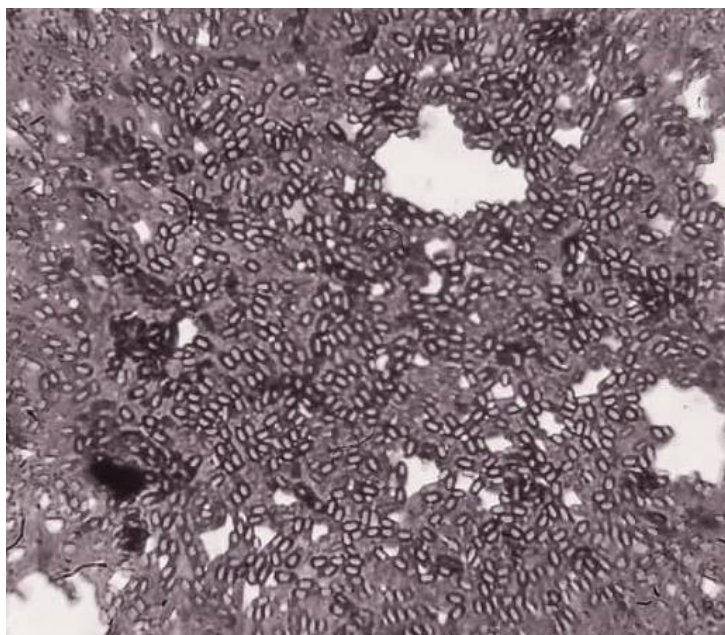


Figure 14 : Observation microscopique des spores après coloration à la fuchsine (G x 100 à immersion).

Les caractères morphologiques et le type de Gram ont permis d'orienter l'identification microscopique de la souche 9 vers le genre *Staphylococcus* constitué de Cocci à Gram positif, asporulées et regroupées en grappe de raisin (**Bhunja, 2018**). Les souches S1, S2, S3, S4 sont orientées vers le genre *Bacillus* constitué de bâtonnets à Gram positif produisant des spores centrales ou terminale (**Granum et Lindbäck, 2013**).

2.2 Caractères biochimiques :

- **Test de la catalase:**

La réaction se traduit par le dégagement immédiat des bulles d'oxygène (Figure15).

Les résultats du test de la catalase ont montré que toutes les souches sont catalase positive sauf les souches S5, S6, S7.

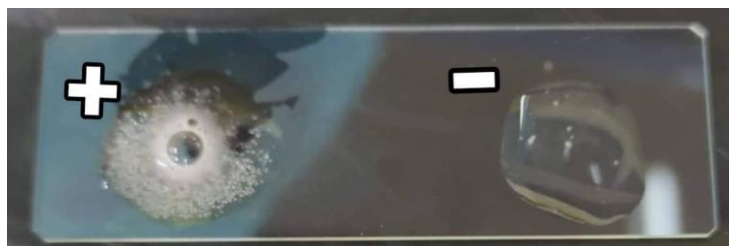


Figure 15 : Test de catalase, (+) : résultats positifs. (-) : résultats négatifs.

Les souches S1, S2, S3, S4 sont orientées vers le genre *lactobacille* constitué de bâtonnets à Gram positif et catalase négative.

- **Test de l'oxydase :**

Après avoir déposé les colonies des souches sur les disques d'oxydase on a observé un virage de couleur mauve chez la souche 8 donc Oxydase (+) et une absence de la couleur mauve chez la souche 10 donc Oxydase (-).

- **Résultats de l'identification des bactéries à Gram négatif :**

Les bactéries à Gram (-) souches 8 et 10 sont réensemencées sur milieu Mac Conkey qui est un milieu sélectif pour l'isolement des entérobactéries (Figure 16). En effet, il contient des agents sélectifs qui freinent le développement des bactéries à Gram positif: cristal violet et sels biliaries.



Figure 16 : Résultat de la croissance des colonies sur milieu Mac Conkey

• **Détermination du biotype :**

Les résultats de l'identification par galerie API 20E des souches 8 et 10 sont mentionnés dans la figure 17. La souche 8 est identifiée à l'espèce *Aeromonas hydrophila* à 99,5 % (biotype 1) et la souche 10 à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* à 93,8 % (biotype 2)



Figure 17 : Photo de la galerie API 20E du biotype 1 et du biotype 2 respectivement
Le tableau 3 regroupe les résultats de l'identification de l'ensemble des souches isolées.

Tableau 3 : Identification des souches isolées.

| Souches | Affiliation taxonomique et code |
|---------|--|
| S1 | <i>Bacillus sp</i> : B1 |
| S2 | <i>Bacillus sp</i> : B2 |
| S3 | <i>Bacillus sp</i> : B3 |
| S4 | <i>Bacillus sp</i> : B4 |
| S5 | <i>Lactobacillus sp</i> : L1 |
| S6 | <i>Lactobacillus sp</i> : L2 |
| S7 | <i>Lactobacillus sp</i> : L3 |
| S8 | <i>Aeromonas hydrophila gr2</i> : Ah |
| S9 | <i>Staphylococcus sp</i> : St |
| S10 | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i> : Kp |

3. Caractérisation des souches isolées :

3.1 Détermination des activités enzymatiques :

Les résultats de la mise en évidence des activités protéolytique et lipolytique sont illustrés dans le tableau 4. Chez les souches qui possèdent une protéase et/ou la caséinase ; enzyme qui hydrolyse la caséine du lait, cette activité enzymatique est mise en évidence par la formation d'un halo clair autour des colonies justifiant la dégradation de la caséine par ces souches, comme montré par la figure 18. Il est important de remarquer l'absence d'activité enzymatique chez plus que la moitié des souches isolées. En effet, seuls 3 souches ; une appartenant au genre *Bacillus* et 2 au genre *Lactobacillus* sont douées d'activité protéolytique et lipolytique. La 3^{ème} souche de *Lactobacillus* est protéase -, lipase +.

Tableau 4 : Résultats des activités protéolytique et lipolytique des souches isolées.

| Souches | Activité protéolytique | Activité lipolytique |
|-----------|------------------------|----------------------|
| B1 | - | - |
| B2 | + | + |
| B3 | - | - |
| B4 | - | - |
| L1 | - | + |
| L2 | + | + |
| L3 | + | + |
| Ah | - | - |
| St | - | - |
| Kp | - | - |

Les activités enzymatiques de la flore de contaminations du lait pasteurisé contribuent à la dégradation des caséines et des lipides et l'altération de sa qualité organoleptique.

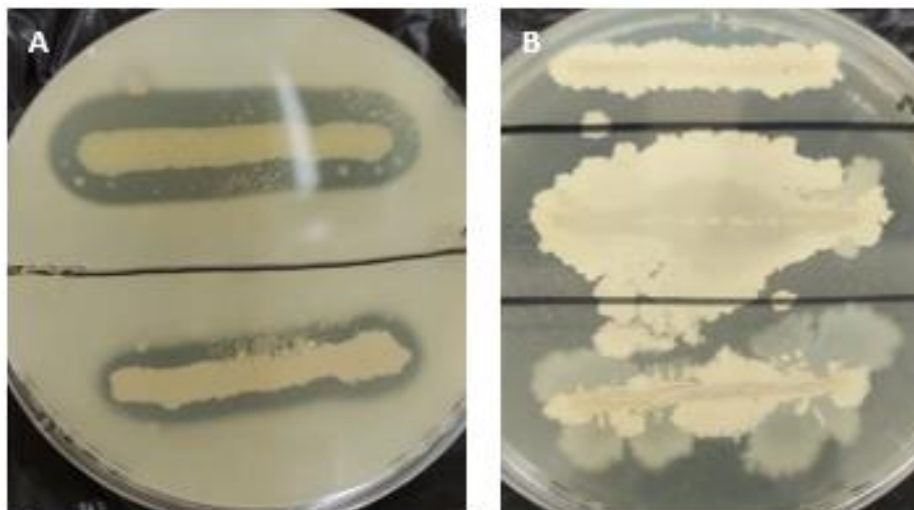


Figure 18 : Activité protéolytiques sur gélose au lait (A) et activité lipolytique sur gélose au Tween 80 (B).

3.2. Croissance des bactéries à différentes températures :

Les résultats obtenus ont montré que souches isolées du lait se répartissent en différents types thermiques (Tableau 5).

Deux souches de *Bacillus* et 2 souches de *Lactobacillus* ont pu se développer a toutes les températures testées .la croissance à 37°C et 55°C traduit le caractère thermophile facultatif de ces souches. Les souches restantes (*Bacillus* B3 et B4 et *Lactobacillus* L3) Se caractérise par une certaine thermo tolérance (croissance à 45°C). Les espèces *A.Hydrophila*, *Staphylococcus*, *K.pneumoniae*, Se sont développées uniquement à 37°C, Ce qui montre bien leur caractère mésophile.

Tableau 5 : Résultats des températures de croissances des souches

| Températures Souches | 37°C | 45°C | 55°C |
|-------------------------|------|------|------|
| B1 | + | + | + |
| B2 | + | + | + |
| B3 | + | + | - |
| B4 | + | + | - |
| L1 | + | + | + |
| L2 | + | + | + |
| L3 | + | + | - |
| Ah | + | - | - |
| SE | + | - | - |
| Kp | + | - | - |

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries mésophiles des bactéries thermophiles facultatives et obligatoires (Leveau *et al.*, 1991). Le rôle de la température en industrie laitière est déterminant pour la croissance des différents groupes de microorganismes.

4. Détermination du potentiel de formation de biofilm :

4.1. Formation de biofilm dans les microplaques de titration :(96 puits)

La figure 19 montre la formation de biofilms de quelques souches sur une surface hydrophobe (polystyrène) après coloration au cristal violet.

La formation de biofilm dans des microplaques de titration à 96 puits a été analysée en visualisant simplement les puits à l'œil nu après coloration au cristal violet. Il s'agit d'une technique indirecte utilisée pour estimer les rendements de biofilm sur différents substrats (Djordjevic *et al.*, 2002).

- **Observation des puits colorés au cristal violet :**

Après 24 heures d'incubation à (30°C ; 45°C ; 55°C), la formation de biofilm se produit préférentiellement aux bords des puits par la formation d'un anneau variables d'une souche à l'autre dans l'interface air – Liquide (Figure19). La masse des biofilms est liée à l'intensité de la coloration des anneaux formés (les couleurs foncées indiquent que les souches sont de fortes productrices de biofilms et vice versa).

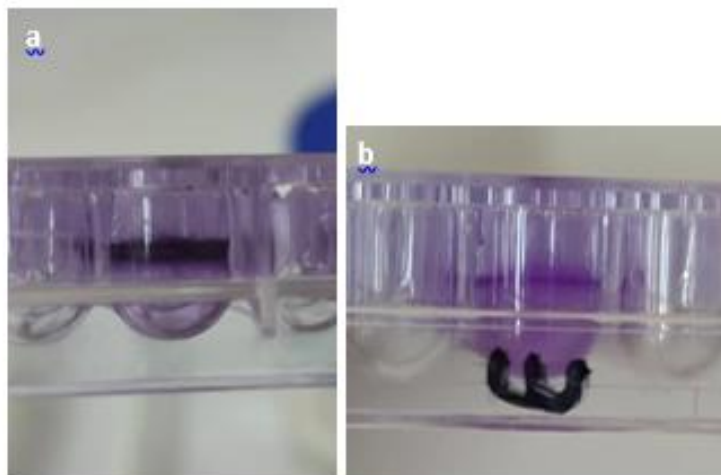


Figure 19 : Biofilms formés dans les puits des microplaques et colorés au cristal violet (a) concentration du biofilm à la surface avec la formation d'un anneau fortement coloré (b) croissance sur toute la paroi du puit

- **Mesure de la croissance en biofilm :**

L'estimation quantitative du taux de formation de biofilm par les mésophiles et thermophiles et les souches de références est obtenue par la mesure de la DO à 600 nm au lecteur de microplaque (ELIZA). Les résultats obtenus sont présentés dans les figures (20,21 et 22).

Les mesures de D.O ont montré des résultats variables en fonction des souches et de la température d'incubation. Les valeurs de D.O enregistrées peuvent être supérieures à 2,5. En prenant la valeur de 0,5 comme une valeur seuil pour être considéré comme un producteur de biofilm, **selon Auger et al (2009)**, il est possible de définir 4 classes :

Classe 1 : $DO < 0,5$: Faiblement productrice du biofilm.

Classe 2 : $0,5 < DO < 1,5$: Moyennement productrice du biofilm.

Classe 3 : $1,5 < DO < 2,5$: Fortement productrice de biofilm.

Classe 4 : $2,5 < DO$: Hyper productrice.

Les résultats correspondant sont repartis dans les Figure (20, 21, 22).

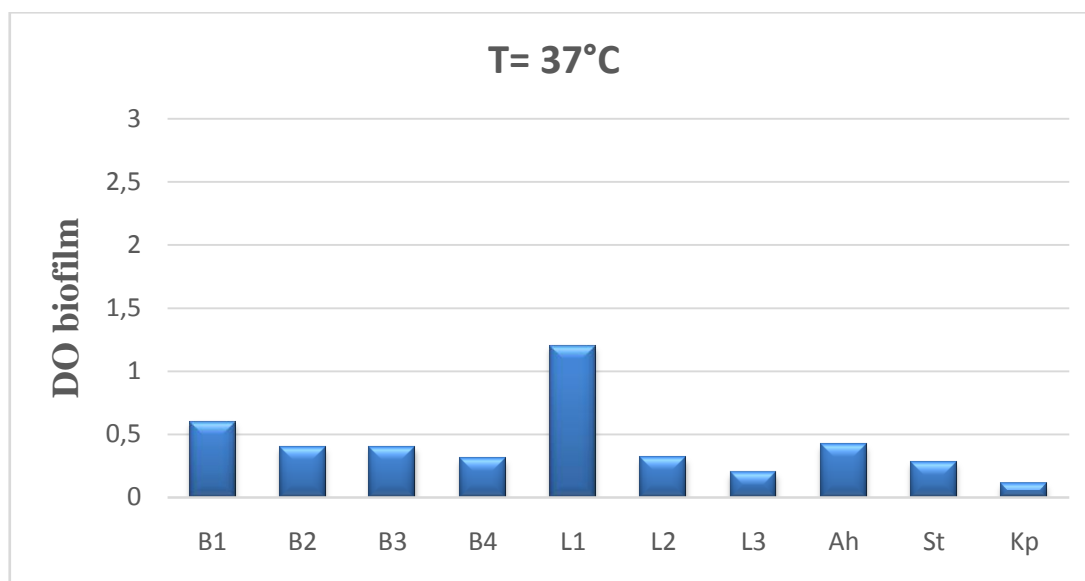


Figure 20 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 37°C

A 37°C : A cette température la majorité des souches (B2, B3, B4, L2, L3, Ah, St, Kp) montrent des DO inférieures à 0,5 donc elles sont faiblement productrices de biofilm. Les deux souches (S5, S6) présentent des valeurs comprises entre 0,5 et 1,5 et sont considérées comme producteurs moyen de biofilm.

La température de 37 °C n'est pas favorable à la formation de biofilm chez les souches testées même les souches à caractère uniquement mésophile. Il semblerait que la température optimale de croissance n'est pas celle qui permet une croissance optimale en biofilm.

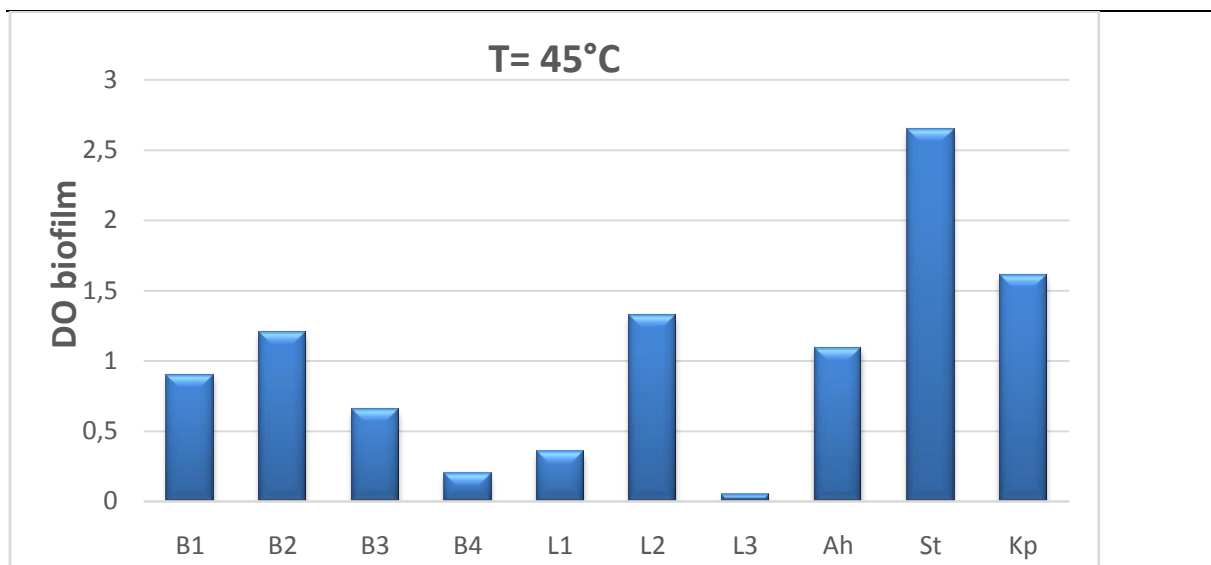


Figure 21 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 45°C

A 45°C : les souches (B4, L1, L3) ont montré des valeurs inférieures à 0,5 donc elles sont faiblement productrices de biofilm, les souches (B1, B2, B3, L2, Ah) présentent des valeurs comprises entre 0,5 et 1,5 et sont considérés comme producteurs moyen de biofilm. La souche Kp présente une valeur de DO supérieure à 1,5 et peut être considérée comme une souche fortement productrice de biofilm alors que la souche St avec une valeur supérieure à 2,5 est une souche hyper productrice de biofilm.

Les souches St et Kp ont montré une DO supérieure à 1,5. Ce sont de puissants producteurs de biofilms. En revanche, les mêmes souches ont produit moins de biofilm à 37°C et à 55°C. D'après ces résultats, 45°C est une température plus favorable à la formation de biofilm que les deux autres.

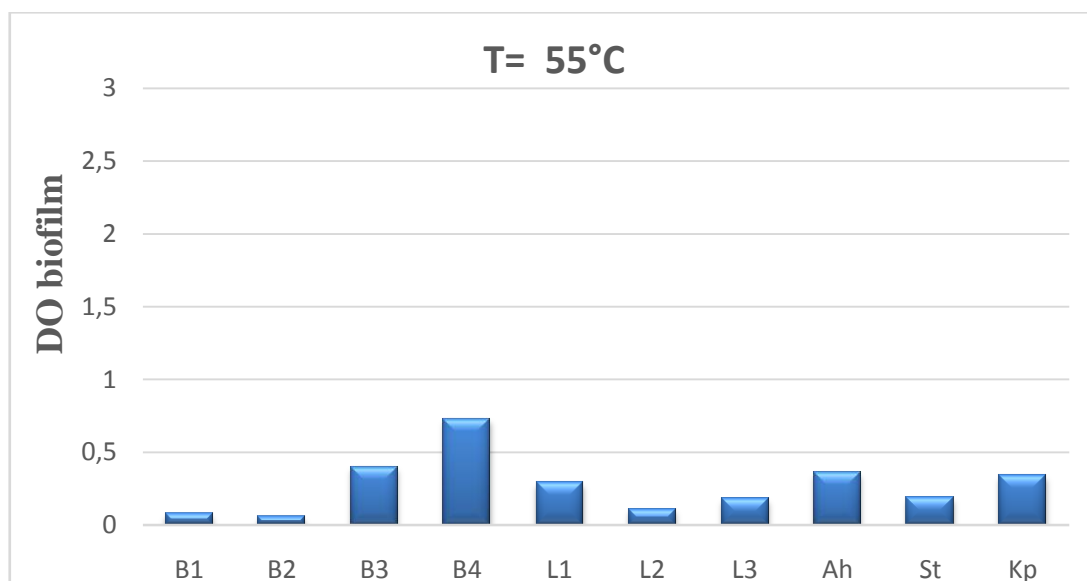


Figure 22 : Mesure de la formation de biofilm dans le TSB à 55°C

A cette température la majorité des souches montrent des DO inférieures à 0,5 donc elles sont faiblement productrices de biofilm, à part la souches B4 qui présente une valeur comprise entre 0,5 et 1 donc elle est considérée comme productrice moyenne de biofilm. La production de biofilm chez les souches St et Kp diminue à cette température, les DO de biofilm sont de l'ordre de 0,2 et 0,3.

4.2. Formation de biofilm dans les tubes en verre :

La mise en évidence de la formation de biofilm basée sur l'appréciation visuelle de l'adhérence cellulaire a une surface lisse en verre et présenté dans la figure 23. Après une période d'incubation de 24h à 30°C et 45°C et après coloration, nous avons remarqué que certaines souches ont une adhérence faible, avec formation d'un film à peine visible à la surface interne des tubes à hémolyse par contre la majorité des autres souches ont une forte adhérence de biofilm sur la surface avec une apparence d'un anneau fortement coloré.



Figure 23 : Biofilms formés dans les tubes en verre et colorés eu cristal violet

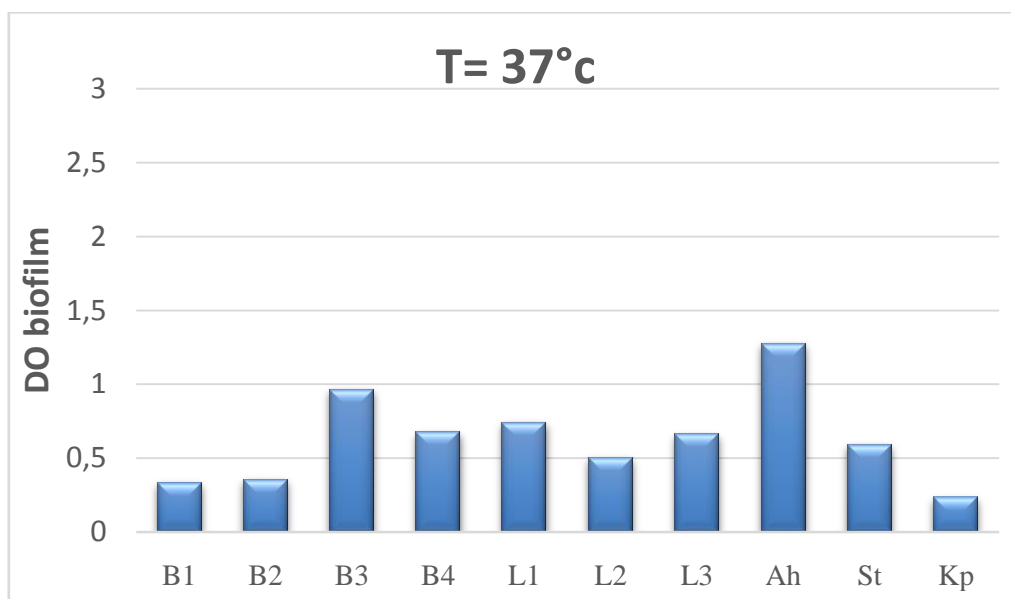


Figure 24 : Mesure de la formation de biofilm dans les Tubes à hémolyses à 37°C

À 37°C : les souches (B1, B2, L2, Kp) ont montré des valeurs inférieures à 0.5 et sont donc faiblement productrices de biofilm, les souches restantes ont montré des DO supérieures à 0,5 ils sont considérés comme producteurs moyen de biofilm.

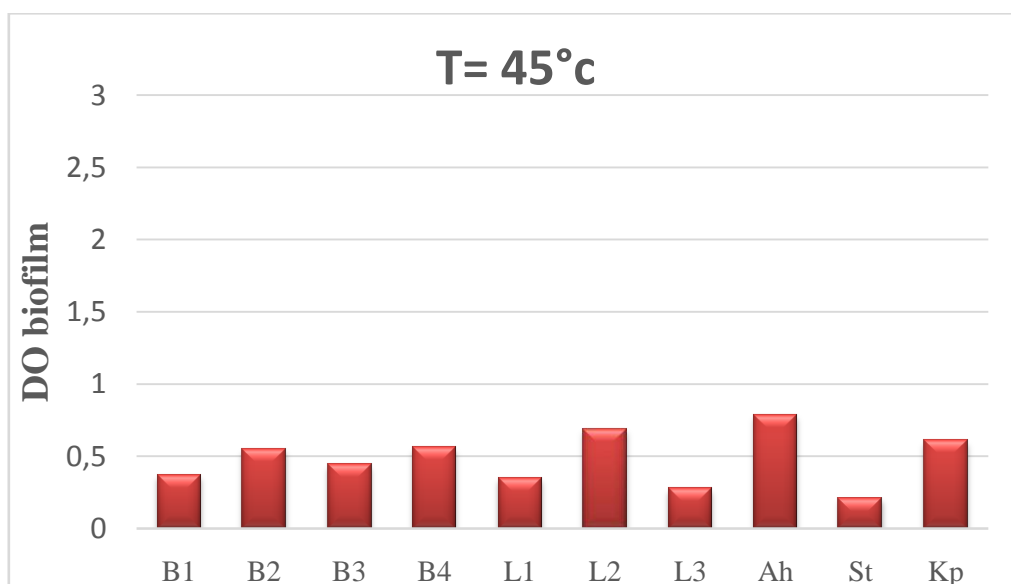


Figure 25 : Mesure de la formation de biofilm dans les Tubes à hémolyses à 45°C

A 45 °C : On remarque que les souches (B1, B3, L1, L3, St) présentent des valeurs inférieures à 0.5 donc sont faiblement productrices de biofilm, par contre les 5 souches (B2,

B4, L2, Ah, Kp) ont montré des DO comprises entre à 0,5 et 1,5 qui constitue une formation de biofilm moyenne.

La formation de biofilm sur la surface en verre à 37C est plus important que sur la surface en polystyrène (microplaque de titration).

A l'inverse à 45°C, la formation de biofilm sur le polystyrène est plus importante que sur en verre. L'influence de la température et de la nature de la surface sur la formation de biofilm à souligner.

4.3. Caractérisation microscopique de l'adhésion et de la formation de biofilm sur les lames en verres :

- Observations microscopiques des lames d'adhésions :

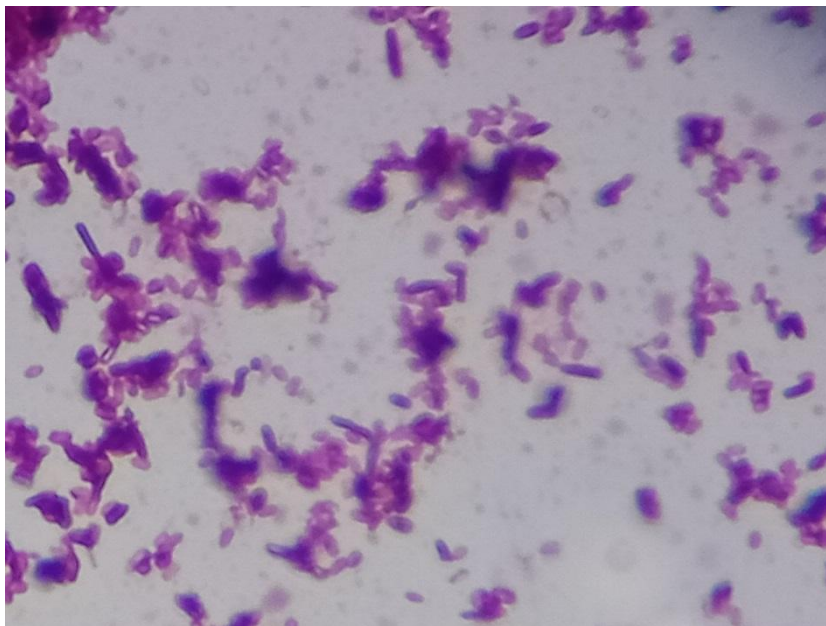


Figure 26 : Photos représentant l'adhésion d'une culture de *Bacillus*

La figure 26 montre l'adhésion des spores et des cellules végétatives d'une culture âgée de *Bacillus*. La forme sporulée est dominante. Les spores de *Bacillus* sont caractérisées par leur grand pouvoir d'adhésion aux surfaces inertes comparées aux cellules végétatives (**Kumari et Sarkar, 2016**). Ce qui explique leur persistance et la formation de biofilm sur les équipements laitiers. De même l'orientation des cellules durant la phase d'adhésion détermine le type architectural du biofilm formé (**Flemming et al., 2016**).

- Observations microscopiques des lames de biofilms :

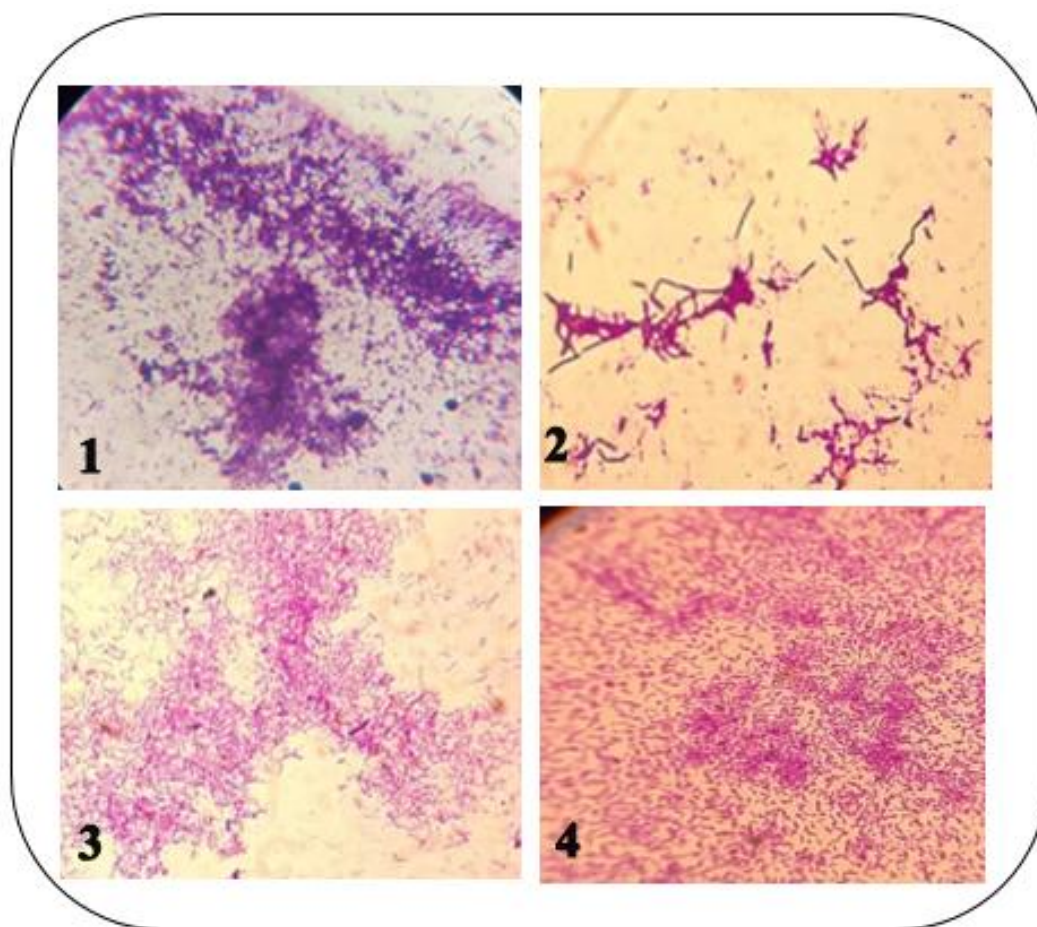


Figure 27 : Observation des biofilms formés par les souches isolées après coloration au cristal violet. (1 et 2) : *Bacillus*, (3) : *Lactobacillus*, (4) : *Aeromonashydrophilagr2*

L'observation au microscope des lames colorées au cristal violet montre des différences dans la morphologie des biofilms et leur stade de développement. Le nombre de cellules adhérentes est très important chez la souche 8 qui montre ainsi le plus grand potentiel d'adhésion et de formation de biofilms. Le biofilm de la souche 3 est en phase de dispersion active, où il est possible de voir le détachement des cellules planctoniques dans les cavités formées au centre du biofilm. Ce qui indique un grand potentiel et une rapidité dans le processus de formation du biofilm. *B. cereus* est caractérisé par un grand pouvoir de formation de biofilms et une dispersion précoce qui se produit en moins de 24 h (Wijman et al., 2007 ; Malek, 2019). L'image 2 peut résulter soit d'un biofilm à un stade avancé de dispersion active, ou bien un biofilm dans les premiers stades de formation. Le microscope optique ne permet pas de visualiser l'architecture tridimensionnelle des biofilms.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La caractérisation de la contamination microbiologique du lait pasteurisé a été réalisée à travers plusieurs étapes. L'isolement des souches bactériennes à partir d'échantillons de lait pasteurisé reconstitué ou non, a été effectué sur milieu PCA et TSA. Leur identification a porté sur l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques. La détermination de leurs pouvoirs enzymatiques et leur potentiel de formation des biofilms, constitue la dernière étape de cette caractérisation microbiologique.

Les résultats obtenus ont montré une contamination du lait par une flore microbienne variée, composée essentiellement par des bactéries à Gram+. La caractérisation phénotypique des dix souches retenues a révélé que 8 souches sont des bâtonnets à Gram positif, capable de croître à 30°C, 45°C et à 55°C. Elles sont biochimiquement différentes mais partagent quelques caractères entre elles, et sont identifiées aux genres *Bacillus* et *Lactobacillus*. Les deux souches restantes sont des bacilles à Gram-, Oxydase- et ont été identifiées par galerie API 20 E à l'espèce *Aeromonas hydrophila* gr 2, et à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae*.

A travers cette étude, nous avons pu mettre en évidence la présence des bactéries thermophiles et mésophiles, dans les deux types de lait pasteurisé.

Les souches isolées sont également caractérisées par leur capacité à produire différents enzymes protéolytiques ou lipolytiques extracellulaires, importantes qui provoquent la dégradation du lait au court du stockage. La détermination du potentiel de formation de biofilm chez les souches isolées a permis de les répartir en en trois classes : fortement productrice, moyennement productrice, et faiblement productrice du biofilm. En effet, une meilleure compréhension du potentiel de formation des biofilms des espèces thermophiles et mésophiles dans l'environnement de transformation du lait, est nécessaire pour développer de meilleures mesures de contrôle.

Pour cela des mesures de contrôle doivent être prises pour lutter contre les spores et les biofilms de cette flore thermophile et mésophile de contamination, notamment :

- Contrôle de la chaîne de fabrication de la matière première jusqu'à produit fini et évaluation du risque microbiologique
- Une identification rigoureuse des principaux contaminants
- Amélioration de système de nettoyage et de désinfection appliqué par l'unité de production en tenant compte des caractéristiques du contaminant dominant

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Aggad.HMahouzi F, Ammar VA, Kihal M., (2009).** Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien *Revue Méd. Vét.*, 160, 12, 590-595.
2. **Akbas, M. Y. (2015).** Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. PP 383-394.
3. **Alanasouri, M. (2010)** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'en Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France *Appl. Environ. Microbiol* 52:3242-246.
4. **Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P., Simpson, R., Turgeon, H. (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait in *Science et technologie du lait –Transformation du lait*, Éditions École polytechnique de Montréal.
5. **Ammar Boularak, (2005).** Guide des déterminations analytiques des laits et produits laitiers, Direction Général du contrôle Economiques Et de la Répression des Fraudes.Direction des laboratoires d'Essais et d'analyse de la qualité p 5.
6. **Arrêté interministériel (1993).** D'après le journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire. N°69 correspondant aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. P 2-5.
7. **Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., &Gohar, M. (2006).**Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 937-941.
8. **Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., Gohar, M. (2009).** Biofilm Formation and Ceil Surface Properties among Pathogenic and Nonpathogenic Strains of the *Bacillus cereus* Group. *Applied and environmental microbiology* 75(20), 6616-6618.
9. **Augustin M A, Clarke P T, Craven H., (2003).** *Characteristics of Milk Powders* Elsevier Science Ltd.4703.
10. **Bhunja A.K. (2018).** *Staphylococcus aureus*. in *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis* (New York, NY Springer). Pp.181-192.
11. **Billon P., Sauve O. (2009).** *Traite des vaches laitières*. 3ème édition, France, 555 p. biologiques et physico-chimiques. Volume 1. Ed. Tec. & Doc., Lavoisier, 95–151.
12. **Bokulich N.A., Mills D.A. (2013).** Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheese making Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 17(79), 5214-5223.

13. **Bos, R., Mei, H. C., & Busscher, H. J. (1999).** Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 179-230.
14. **Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007).** Quelque système microbien les biofilms. Dans: *Microbiochimie et alimentation*. Educagri éditions, Dijon. p.131-164.
15. **Brisabois A., Lafarge V., Thorel M. F. (2016).** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Revue scientifique et technique. Off. int. Epiz*, 16 (1): 452-471.
16. **Burgess SA, Lindsay D, Flint SH., (2010).** Thermophilic Bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* 144: 215-225.
17. **Burgess, S.A., Lindsay, D. et Flint, S.H. 2010.** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *Int. J. Food Microbiol.* 144: 215–225. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027. PMID:21047695.
18. **Champagne C.P., Laing R.R., Roy D., Mafu A.A., Griffiths M.W. (1994).** Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34: 1-30.
19. **Chilliard Y et Lamberet G. (1984).** La lipolyse dans le lait : les différents types, mécanismes, facteurs de variations, signification pratique. *Le lait* 64. Pp: 544-578.
20. **Costerton J. W., Z lewandowski, D.E. Caldwell, D. R. Corber, H.M. Lappin-Scott. (1995).** Microbial biofilms. *Annual reviews of microbiology*, 49: 711-745.
21. **Costerton J.W. (1999).** Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11:217-721.
22. **Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., et Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.(New.York,.,N.Y.)*,.280(5361) :295–298. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>.
23. **Djordjevic D., Wiedmann M. and Mclandsborough L.A. (2002).** Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied And Environnemental Microbiology* ,68(6),2950– 2958.
24. **F. Malek, B. Moussa Boudjema, A. Aouar-Métri & M. Kihal. 2013.** Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria *Dairy Science & Technology Official journal of the Institut National de la Recherche Agronomique* 93:75-76.
25. **FAO. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. p : 130-271

26. **Fleming D, Rumbaugh K P. (2017).** Approaches to Dispersing Medical Biofilms Microorganisms. 5, 15; doi:10.3390/microorganisms5020015.
27. **Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016).** Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
28. **Flint B, Brooks JD., (1997):** Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control 54:81-97.
29. **Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., & Crawford, R. (2001).** The growth of *Bacillus stearotherophilus* on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, 90(2), 151-157.
30. **Frank, J.F, Hassan, AN., (2002).** Microorganisms associated with milk. in thèse: - analyse du microbiote du lait par les méthodes moléculaires. Département des sciences des aliments et de nutrition faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université Laval Québec.
31. **Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F., & Jacques, M. (2016).** Intramammaires chez la vache laitière : Une revue bibliographique. *Revue Méd. Vét.*, 14.
32. **Granum P., et Lindbäck T. (2013).** *Bacillus cereus*. In Doyle M, Buchanan R (ed), *Food Microbiology*. p 491-502 ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555818463.ch19.
33. **Guiraud J. P. (2003).** *Microbiologie Alimentaire*. Edition Dunod. Paris, 136-139.
34. **Guiraud J., Galzy P. (1980).** *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. Edition l'usine, 119 pp.
35. **GUIRAUD, Joseph-Pierre., (2012).** *Microbiologie alimentaire*, © Dunod, Paris. 652 pages. ISBN : 978-2-10-057008-9.
36. **Guiraud, J-P. (1998).** *Microbiologie Alimentaire*. Éditions Dunod, Paris
37. **Heuchel V, Chatelin YM, Breau S, Sobolewski F, Blancard N, Baraton Yet Ayerbe A. (2003).** Lipolyse du lait de vache et qualité organoleptique des produits laitiers. *Renc. Tech. Ruminant n°10*. pp: 223-226.
38. **Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., & Gohar, M. (2010).** Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, 156(4), 1009-1018.
39. **Irchhaiya R, Kumar A, yadav A, Gupta N, Kumar S, Gupta N, Kumar S, Yadav V, Prakash A and Gurjar H (2015).**

40. **Irchhaiya R, Kumar A, yadav A, Gupta N, Kumar S, Gupta N, Kumar S, Yadav V, Prakash A and Gurjar H (2015).**
41. **Jean-Christan M'boya, Cécile Broutin, Philippe Dudez, (2001).** Le lait pasteurisé. GRE-Agridoc: un réseau d'information et de documentation financé par ministère français des affaires étrangères p-4-5.
42. **KaanTekinsen K, Elmali M, Ulukanli z., (2007).** Microbiological Quality of UHT Milk Consumed in Turkey. Journal of Food Safety, Vol.7, p. 45-48.
43. **KABIR, Ahmed., (2015).** Contraintes de la production laitière en Algérie et évaluation de la qualité du lait dans l'industrie laitière (constats et perspectives). Thèse de doctorat : en sciences en microbiologie alimentaire. Université d'Oran 1(Ahmed Ben Bella), Algérie, 174 pages.
44. **Kizi N., Makdoud S. (2014).** Analyse physico-chimique et microbiologiques du lait cru collecté au niveau de deux régions Akbou et Sidi Aich (Bejaia). Mémoire d'ingénieur d'Etat en Génie Biologique. Université Abderrahmane Mira de Bejaia, 61pp.
45. **Kouma S.S.M. (2013).** Contribution à la gestion des risques de contamination microbienne et diversité génotypique des espèces du genre *Bifidubactérium* isolées de la chaîne de production du lait local à Aidjan. Thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Nangui Aragoua.125pp.
46. **Kumari, S., et Sarkar, P. K. (2016).***Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing. environment. Food.Control,69 :20–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.012>
47. **Lepsanovic, Z., Djordjevic, V., Lakicevic, B., Savic, D., Velebit, B., Josic, D., etKarabasil, N. (2018).** Detection of toxin genes and randomly amplified polymorphic DNA typing of *Bacillus cereus* isolates from infant milk formulas. Journal of Food Safety, 38(4):1- 7. <https://doi.org/10.1111/jfs.12474>
48. **Leveau J-Y., BouixMrielle, De Roissart H, 1991.** La flore lactique In Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Bourgeois C.M., Leveau - Y. Tec & Doc, Lavoisier, pp: 152-186
49. **Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G., et Schuck, P. (2005).** Les produits industriels laitiers. Éditions Lavoisier, Paris.
50. **Maher M.M., Jordan K.N., Upton M.E., Coffey A. (2001).**Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. Journal of Applied Microbiology, 90: 201-207

51. **Malek F., B. Moussa-Boudjema., F. Khaouani-yousfi., A. Kalai and M. Kihel, (2012).**Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. African Journal of Microbiology Research 6, 3863-3844.
52. **Malek, F. (2013).** Le biofilm en industrie laitière : caractérisation facteur de développement et élimination cas du biofilm de *Bacillus cereus* dans quelques laiteries de la région de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen.
53. **Malek, F. (2018).** Control of spore forming bacteria biofilms in the dairy environment. Understanding microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research 127 (Enrique Torres-Hergueta and A. Méndez-Vilas, Eds.). FormatexResearch Center S.L. Pages 127-133.
54. **Malek, F. (2019).** Bactéries sporulées et biofilms : Un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombiné pasteurisé. Canadian Journal of Microbiology, 65(6):405-420. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0435>
55. **MALEK, Fadila., (2019).**Bactéries Sporulées Et Biofilms : Un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombiné pasteurisé. Canadian journal of microbiology. Volume: 65. Numéro: 6, pages : 405 à 420.
56. **Marchand, S. J. De Block, V.e De Jonghe, A. Coorevits, M. Heyndrickx, L. Herman. (2012).** Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11: 133-147.
57. **Martino P., Cafferini N., Joly B. and Darfeuille-Michaud A. 2003.***Klebsiellapneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. Research in Microbiology.154: 9-16.
58. **Mcguiggan J.T.M., McCleery D.R., Hannan A., Gilmour A. (2002).** Aerobic sporeforming bacteria in bulk raw milk: Factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores. International Journal of Dairy Technology, 55: 100-107.
59. **Melaugh G., Hutchison J., Kragh K. N., Irie Y., Roberts A., Bjarnsholt, T., Diggle S. P., Gordon V. D., et Allen R. J. (2016).** Shaping the Growth Behaviour of Biofilms Initiated from. Bacterial. Aggregates. PloS.one, 11(3),1-18.
60. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.014683>
61. **Michel, J-C., Pouliot, M., et Richard, J. (2002).** Science et technologie du lait. Edition : Ed: Tec et Toc, Lavoisier, Paris.

62. **Millsap K. W., Reid G., van der Mei H. C., Busscher H. J. 1997.** Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow. *Biomater.* 18: 87–91.
63. **Mogha, K. V., Shah, N. P., Prajapati, J. B., & Chaudhari, A. R. (2014).** Biofilm a threat to dairy industry. *Indian Journal of Dairy Science*, 67(6).
64. **Otto, M. (2013).** Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 64, 175-188.
65. **OuId Mustapha, A., N'diyae D., OuId Kory B., (2012).** Etude de la qualité du lait pasteurisé des industries laitières situées à Nouakcote (Mauritanie) *Sciences du vivant Biologie*. Editions Mersenne: Volume 4 N 0120804 ISSN 2111 - 4706.
66. **Petrus R., Loiola C., Silva C., Oliveira C., (2007).** Microbiological and Sensory Stability of Pasteurized Milk in Brazil. *Chemical engineering transactions* Volume 17, 2009.
67. **Pilchová, T., Hernould, M., Prévost, H., Demnerová, K., Pazlarová, J., et Tresse, O. (2014).** Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 35: 366–372. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.021.
68. **Prescott L.M., Harley J., Klein D.A. (2010).** Microbiologie 2ème édition. De Boeck, paris, p. 979.
69. **Quigley L., Sullivan O.O., Stanton C., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Cotter P.D. (2013).** The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37: 664-698.
70. **Ranieri ML, Huck JR, Sonnen M, Barbano DM, Boor KJ., (2009).** High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 92(10): 4823-4832.
71. **Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., et El Jaziri, M. (2015).** The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* : A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*, 2015, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
72. **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.
73. **Sharma, M. et Anand, S.K. 2002.** Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol.* 19: 627–636. doi:10.1006/fmic.2002.0472.

74. **Si Tayeb S. (2018).** Etude de la qualité hygiénique et microbiologique du lait cru de vache de la ferme de HassiMameche. Master en biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie), 77pp.
75. **Simoès M, Simoès LC, Vieira MI, (2010).**A review of current and emergent biofilm control. strategies. Food Sci. Technol., 43: 573-583.
76. **Simões, M., Simões, L.C. et Vieira, M.J. 2010.**A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT - Food Sci. Technol. 43: 573–583. doi:10.1016/j.lwt.2009.12.008.
77. **Simonet R. (2006).** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique du lait dans la filière artisanale au Sénégal. Thèse de doctorat d'état vétérinaire. Université Cheikh AntaDiop de DEKAR, 164pp.
78. **Srey, S., Jahid, I. K., and Ha, S. (2013).** Bio film formation in food industries: a food safety concern. Food Control 31, 572–585. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.12.001
79. **Stoica I.M., Vitzilaiou E., Van Den Berg F. (2018).**Biofouling on RO-membranes used for water recovery in the dairy industry. Journal of water process Engineering, 24: 1-10.
80. **Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., etCosterton, J. W. (2002).** Biofilms as Complex Differentiated. Communities. Annual.Review.of. Microbiology,56(1):187-209.https://doi.org/10. 1146/annurev.micro.56.012302.160705.
81. **Titouche Y. (2018).** Risque de contamination microbienne du lait cru produit dans la Wilaya de TiziOuzou: Caractérisation phénotypique et génotypique de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat en science biologique. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 114pp.
82. **Tremblay, Y. D. N., Hathroubi, S., et Jacques, M. (2014).** Les biofilms bactériens : Leur importance en santé animale et en santé publique. The Canadian Journal of Veterinary Research, 78:110-116.
83. **Upasana H. (2015).**Enterotoxigenic*bacillus cereus* and *bacillus thuringieusis* Spores in U.S Retail Spices. Mémoire de master en science alimentaire. Université Masschusells in partial fulfillment, 55pp.
84. **Vasudevan R (2014)** Biofilms: microbial cities of scientific significance. Journal of Microbiology & Experimentation,1(3):84-98. DOI: 10.15406/jmen.2014.01.00014
85. **Vesseyre, R. (1979).** Technologie du lait : constitution récolte, traitement et transformation du lait. Editions la maison rustique, Paris.
86. **Vignola C. (2002).** Science et Technologie du lait: Transformation du Lait. Edition Presses InternationalesPolytechnique, Canada, 3-75.

87. **Von Neubeck M., Baur C., Krewinkel M., Stoeckel M., Kranz B., Stressler T., Fischer L., Hinrichs J., Scherer S., Wenning M., (2015).** Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*, 211: 57-65.

Annexe

Annexe

➤ **Trypticase soja agar (TSA)**

Poudre déshydraté 40g

Eau distillée 1000 ml

➤ **Tryptone-sel-eau (TSE)**

Eau distillée 1000 ml

Naci 8.5g

Tryptone 1g

➤ **Eau physiologique**

Eau distillée 1 000ml

Naci 1g

➤ **Solution dissolvante**

Ethanol 200 ml

Acide acétique glacial 50 ml

Eau distillé 250ml

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

Poudre de lait 5 g

Eau distillée 50 ml

(Stérilisé à 80°C pendant 30 minutes ==> 1)

Agar 2g

Eau distillée 50 ml

(Stérilisé à 120°C pendant 30 minutes ==> 2)

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

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

Milieu TSA 200ml

Tween 0.2ml

➤ **Cristal violet**

Cristal de violet 2 g

Eau distillé 100ml

Tableau : Aspect morphologique des colonies isolées sur PCA après incubation de 24 à 48 heures à 30°C et 55°C

| Souch e | Taill e (mm) | Forme | Elévatio n | Aspect | Opacité | Consistanc e | couleur |
|------------|--------------------|-----------------|----------------|-------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 1 | 15 | Circulaire | Plate | lisse | Opaque | Crémeuse | transparent e |
| 2 | 10 | Circulaire | Plate | Rugueu x | Opaque | Crémeuse | transparent e |
| 3 | 10 | Circulaire | Plate | lisse | Opaque | Crémeuse | transparent e |
| 4 | 10 | Circulaire | Plate | Rugueu x | Opaque | Crémeuse | blanche |
| 5 | 58 | Circulaire | Demi- bombé | Rugueu x | translucid e | Visqueuse | beige |
| 6 | 15 | Irrégulièr e | Plate | Rugueu x | Opaque | Crémeuse | beige |
| 7 | 15 | Irrégulièr e | Plate | Rugueu x | Opaque | Crémeuse | transparent e |
| 8 | 5 | Circulaire | Plate | lisse | Opaque | Crémeuse | transparent e |
| 9 | 6 | Circulaire | bombé | Rugueu x | translucid e | Visqueuse | Orange |
| 10 | 15 | Circulaire | Demi- bombé | lisse | translucid e | Visqueuse | blanche |

الملخص

يلعب الحليب دورًا مهمًا في تغذية الإنسان، ولكن يمكن أن يشكل خطرًا صحيًا محتملاً على المستهلك لأنه شديد التعرض للتلوث الميكروبي. في هذه الدراسة، أظهر التحليل الميكروبيولوجي للحليب المبستر المعبأ مستويات عالية نسبيًا من التلوث، والتي تتراوح من 10^4 إلى 10^6 ufc/ml، على الرغم من تطبيق المعالجة بالبسترة. تم التعرف على السلالات المعزولة مع سلالات (*Bacillus*) و(*Lactobacillus*)، أربعة سلالات وبتلاتش على التوالي. أتاح معرض API 20 E تحديد نوعين من بكتيريا الجرام المعزولة من نوع *Aeromonas hydrophila gr2* وأنواع *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* يجب التأكيد على هيمنة البكتيريا موجبة الجرام. تتميز السلالات المعزولة بقدرتها على إنتاج إنزيمات خارج الخلية بروتياز وأمياز، مما يعكس دورًا محتملاً في تغيير الحليب وتدهور جودته الحسية. تختلف احتمالية تكوين الأشرطة الحيوية الرقيقة اعتمادًا على السلالات المعزولة. تختلف DO المسجلة من 0.2 إلى 2.5. يعكس تكوين الأشرطة الحيوية الرقيقة مشكلة صحية واستمرار التلوث على الأسطح الصناعية. تثير هذه النتائج مرة أخرى المشاكل التي تسببها الجراثيم غير المرغوب فيها في صناعة الأغذية والتي يجب التعامل معها من أجل ضمان منتجات نهائية صحية يمكن أن تحافظ على الصحة العامة.

الكلمات المفتاحية:
حليب مبستر، فلورا تلوث، التعرف، القدرة الإنزيمية، أشرطة حيوية، بكتيريا.

Résumé

Le lait joue un rôle important dans la nutrition humaine, mais peut présenter un risque sanitaire potentiel pour le consommateur car il est très vulnérable à la contamination microbienne. Dans cette étude, l'analyse microbiologique du lait pasteurisé conditionné a permis de montrer des niveaux de contaminations relativement élevés, qui varient de 10^4 à 10^6 ufc/ml, malgré l'application du traitement de pasteurisation. Les souches isolées ont été identifiées aux genres *Bacillus* et *Lactobacillus*, quatre et trois souches respectivement. La galerie API 20 E a permis d'identifier les deux bactéries Gram- isolées à l'espèce *Aeromonas hydrophila gr 2* Et l'espèce *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*. La dominance des bactéries à Gram positives est à souligner. Les souches isolées sont caractérisées par leur pouvoir de production d'enzymes extracellulaire, protéases et amylases, traduisant un rôle potentiel dans l'altération du lait et la dégradation de sa qualité organoleptique. Le potentiel de formation de biofilm varie en fonction des souches isolées. Les DO enregistrées varient de 0,05 à 2,6. La formation de biofilm traduit un problème d'hygiène et de persistance des contaminations sur les surfaces industrielles. Ces résultats soulèvent de nouveau les problèmes causés par les germes indésirables en industrie agroalimentaire auxquels il faut faire face pour garantir des produits finis sains permettant de préserver la santé publique.

Mot clés :
Lait pasteurisé, flore de contaminations, identification, potentiel enzymatiques, biofilm, bactéries.

Abstract

Milk plays an important role in human nutrition, but may present a potential health risk to the consumer as it is very vulnerable to microbial contamination. In this study, the microbiological analysis of pasteurized packaged milk showed relatively high levels of contamination, ranging from 104 to 106 ufc/ml, despite the application of pasteurization treatment. The isolated strains were identified to the genera *Bacillus* and *Lactobacillus*, four and three strains respectively. The API 20 E gallery identified the two isolated Gram- bacteria to the species *Aeromonas hydrophila gr 2* and *Klebsiella pneumonia ssp pneumonia* species. The dominance of Gram-positive bacteria is to be underlined. The isolated strains are characterized by their power to produce extracellular enzymes, proteases and amylases, reflecting a potential role in the alteration of milk and the degradation of its organoleptic quality. The potential for biofilm formation varies according to the strains isolated. The recorded OD ranged from 0.2 to 2.5. The formation of biofilm reflects a problem of hygiene and persistence of contamination on industrial surfaces. These results raise again the problems caused by undesirable germs in the food industry that must be addressed to ensure safe end products to preserve public health.

Key words:
Pasteurized milk, contamination flora, identification, enzymatic potential, biofilm, bacteria.