

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 – TLEMCEM

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

Melle. SAIDOUNI Yamina

Melle. SAIDANI Asmae

*En vue de l'obtention du*

Diplôme de MASTER en Sciences biologiques

Option : Microbiologie et contrôle de qualité

Thème

**Evaluation de la qualité microbiologique du yaourt et identification des principales sources de contamination dans une laiterie de la région de Tlemcen**

Soutenue le 14 /06/2023, devant le jury composé de :

Présidente

Pr. Bekhechi Chahrazed

Professeur Université de Tlemcen

Encadrant

Dr. Malek Fadila

M.C.A Université de Tlemcen

Examineur

Pr. Ziane Mohamed

Professeur Université d'Ain Temouchent

Année universitaire : 2022-2023



# **Remerciements**

*Avant tout, nous remercions **ALLAH** tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience, le courage et la volonté de mener à bien ce modeste travail.*

*Nous sommes particulièrement honorées d'avoir profité de l'expérience prodigieuse et de l'encadrement du présent travail par **Mme. MALEK Fadila**, 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, ses qualités humaines, ses compétences scientifiques et ses encouragements. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien. Qu'elle trouve ici un témoignage de notre sincère reconnaissance et notre respect.*

*Nous tenons à remercier très vivement **Mme. Bekhchi Chahrazed** Professeur 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. Ziane Mohamed** Professeur à l'université d'Ain Temouchent d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.*

*Nous tenons à témoigner nos sincères remerciements et gratitude à tous les ingénieurs des laboratoires du 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** et **Melle. kherbache Atika** pour leur aide précieuse et surtout pour leurs encouragement.*

*Veillez trouver dans ce travail nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicace*

*Merci mon dieu de m'avoir donné la force de continuer et réaliser ce travail.*

*je dédie ce mémoire :*

*A mon très **cher père** , tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux , honnête ,je tiens à honorer l'homme que tu es , grâce à toi j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité.*

*A ma **chère mère** , la femme qui a souffert sans me laisser souffrir , qui n'a jamais dit non à mes exigences .*

*A ma **chère sœur** et mes **chers frères** qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que dieu les protèges et leurs offre la santé et le bonheur.*

*A mes **chères amies** Douaa, Djihène, Amina, Chorouk, Ikram , Khawla, Bouchra, Nadjat, Aya, Ines et Fatima .*

*A mon binôme **Saidani Asmae** ma 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 tous les membres de ma famille, de près et de loin  
Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon  
Affection.*



*Yamina*

# Dédicace

*Au début, je tiens à remercier Dieu de m'avoir donné du courage et de la patience afin de réaliser ce modeste travail.*

*Je dédie ce mémoire*

*A mes chers parents **Mohamed et Zolikha**, les êtres les plus chers au monde , pour l'amour qu'ils m'ont porté, pour leurs sacrifices, leurs encouragements et leurs soutien moral tout au long de mes études.*

*A mes chers frères **Smail, Lahcene, Mohamed et Faïssel**, leurs femmes et et leurs enfants, Merci d'être toujours à mes côtés.*

*Chère meilleure amie et binôme **Saidouni Yamina**, merci pour toutes les années et les choses que nous avons vécues ensemble, pour ta compréhension tout au long de ce mémoire.*

*A mes meilleures amies **Yousra, Ayae ,Soumia** , je vous souhaite beaucoup de réussite dans votre vie.*

*Et enfin, à tous ceux qui m'ont aidée et soutenue de près ou de loin, même d'un mot.*



**ASMAE**

## Résumé

Le yaourt est considéré comme le produit laitier fermenté le plus consommé dans le monde, en raison de sa haute valeur nutritive et ses propriétés thérapeutiques. Bien que les produits laitiers fermentés soient généralement considérés comme sûrs, en raison de leur nature acide, des contaminations microbiennes peuvent se produire et diminuer leur qualité microbiologique, et leur durée de conservation.

Dans ce travail, la qualité microbiologique du yaourt produit dans une laiterie dans de la wilaya de Tlemcen, a été évaluée. Bien que le pH et l'acidité dornic soient conformes aux normes, l'analyse microbiologique des échantillons a permis de montrer des niveaux de contamination relativement élevés dans les yaourts stockés, à 25, 30 et 37°C. Les levures et les moisissures, dont le nombre varie entre  $8.10^3$  et  $1.6.10^6$  ufc/ml, représentent la flore dominante. Les isolats fongiques sont caractérisés par une grande diversité morphologique et la dominance des levures de genre *Geotrichum*.

Sur la base des caractères morphologiques et biochimiques, les bactéries isolées sur milieu Chapman et Mac conkey sont Gram positives ou négatives, et catalase positives ou oxydase négatives. La galerie API 20E a permis d'identifier les 4 souches d'entérobactéries isolées à *Enterobacter aerogenes*, *Serratia fonticola* et *Kluyvera* spp. La galerie API Staph a permis d'identifier 3 cocci à Gram positif à *Micrococcus* spp, *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus aureus*, qui représente un risque sanitaire. Le potentiel de formation de biofilm est également testé par différents techniques, il varie selon les souches isolées. La formation de biofilm traduit un problème d'hygiène et de persistance des contaminations sur les surfaces industrielles. Ces résultats soulignent la nécessité d'appliquer des méthodes efficaces de prévention contre la contamination bactérienne et fongique dans les industries laitières.

### Mots clés:

Yaourt, flore bactérienne, flore fongique, Biofilm, Prévention

## Abstract

Yogurt is considered the most widely consumed fermented dairy product in the world because of its high nutritional value and therapeutic properties. Although fermented dairy products are generally considered safe, due to their acid nature, microbial contamination can occur and decrease their microbiological quality and shelf life.

In this work, the microbiological quality of yogurt produced in a dairy in Tlemcen wilaya, was evaluated. Although the pH and dornic acidity are in accordance with the standards, microbiological analysis of the samples showed relatively high levels of contamination in yogurt stored at 25, 30 and 37°C. Yeast and mould, whose number varies between  $8.10^3$  and  $1.6.10^6$  cfu/ml are dominant microflora. Fungal isolats are characterized by a high morphological diversity and dominance of *Geotrichum* yeast.

Based on morphological and biochemical characteristics, bacteria isolated on Chapman and Mac conkey medium are Gram positive or negative, and catalase positive or oxidase negative. The API 20E gallery identified 4 strains of enterobacteria with *Enterobacter aerogenes*, *Serratia fonticola* and *Kluyvera* spp. The Staph API gallery identified 3 gram-positive cocci at *Micrococcus* spp, *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus* which represents healthy risk. The potential for biofilm formation is also tested by different techniques, it varies according to the isolated strains. Biofilm formation reflects a problem of hygiene and persistence of contamination on industrial surfaces. These results highlight the need for effective prevention methods against bacterial and fungal contamination in dairy industries.

### Keywords:

Yogurt, bacterial flora, fungal flora, biofilm, prevention

## الملخص

يعتبر الزبادي أكثر منتجات الألبان المخمرة استهلاكاً في العالم بسبب قيمته الغذائية العالية وخصائصه العلاجية . على الرغم من أن منتجات الألبان المخمرة تعتبر آمنة بشكل عام، نظراً لطبيعتها الحمضية، يمكن أن يحدث التلوث الميكروبي ويقلل من الجودة الميكروبيولوجية والعمر الافتراضي.

في هذا العمل، تم تقييم الجودة الميكروبيولوجية للزبادي المنتج في منتجات الألبان في ولاية تلمسان .على الرغم من أن درجة الحموضة وحموضة التي تم اختبارها تتوافق مع المعايير، أظهر التحليل الميكروبيولوجي للعينات المحفوظة على درجة الحرارة 25 , 30 , 37 مستويات عالية نسبياً من التلوث. تمثل الخميرة والعفن الكتلة السائدة والتي يتراوح عددها بين  $8.10^3$  و  $1.6.10^6$  cfu/ml. تتميز العزلات الفطرية بالتنوع المورفولوجي العالي وهيمنة خميرة *Geotrichum*.

بناءً على الخصائص المورفولوجية والكيميائية الحيوية، فإن البكتيريا المعزولة على وسط تشابمان وماك كوني إيجابية أو سلبية، وتحفز إيجابية أو سلبية أكسيداز . حدد معرض API 20E 4 سلالات من البكتيريا المعوية مع *Enterobacter aerogenes* و *Serratia fonticola* و *Kluyvera spp.* حدد معرض 3 Staph API *Staphylococcus aureus* كوكسي إيجابي جرام في *Micrococcus spp* و *Staphylococcus xylosum* و *Staphylococcus* . يتم اختبار إمكانية تكوين الأغشية الحيوية أيضاً من خلال تقنيات مختلفة، وهي تختلف وفقاً للسلالات المعزولة . يعكس تكوين الأغشية الحيوية مشكلة النظافة واستمرار التلوث على الأسطح الصناعية . تسلط هذه النتائج الضوء على الحاجة إلى طرق وقائية فعالة ضد التلوث البكتيري والفطري في صناعات الألبان.

## الكلمات الرئيسية:

الزبادي، النباتات البكتيرية، النباتات الفطرية، الأغشية الحيوية، الوقاية

## Liste des abreviations

**µl:** microlitre

**Abs:** absence

**AFNOR:** association française de normalisation

**BPF:** bonnes pratiques de fabrication

**BPH:** bonnes pratiques d'hygiène

**C°:** degré celsius

**CIP:** Cleaning in place

**D°:** degré dornic

**DO:** densité optique

**E:** échantillon

**EDS:** eau distillé stérile

**ESEM:** microscope électronique à balayage environnemental

**FMAT:** flore mésophile aérobie totale

**g:** gramme

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

**HACCP:** Hazard analysis critical control point

**IND:** indinombrable

**ISO:** organisation international de normalisation

**JORA:** Journal officiel de la république algérienne

**LAB:** Lactic acid bacteria

**ml:** millilitre

**MSA:** mannitol salt agar

**NaOH:** Hydroxyde de sodium

**PDA:** Potato dextrose agar

**S:** souche

**SM:** solution mère

**Spp** : abréviation de "species" (= "espèces"), pluriel de "sp.". Abréviation utilisée pour désigner toutes les espèces se référant à un genre

**TSA** : Trypticase soja agar

**TSB**: Trypton-soybroth

**TSE**:Tryptone sel eau

**UFC/g**: Unité Formant une Colonie par gramme

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

**UFC**: Unité Formant une Colonie

**UHT** : ultra haute température

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : <i>S. thermophilus</i> observée au microscope électronique. ....	6
<b>Figure 2</b> : <i>L.bulgaricus</i> observée au microscope électronique. ....	6
<b>Figure 3</b> : Processus de la fabrication du yaourt (yaourt ferme et yaourt brassé) . ....	10
<b>Figure 4</b> : Exemples de surfaces mal nettoyées en industrie laitière : biofilms matures formés in-situ sur des lames en inox placées à l'intérieur de conduites de lait pendant 7 jours et observées au microscope électronique à balayage environnemental (ESEM), après application du système de nettoyage (CIP). A gauche : segment de pré-pasteurisation, à droite: segment de post-pasteurisation .....	20
<b>Figure 5</b> : Observation macroscopique (à gauche) et microscopique (à droite) des genres <i>Aspergillus</i> , <i>candida</i> et <i>geotrichum candidum</i> respectivement .....	26
<b>Figure 6</b> : Adhésion et formation de biofilm sur les lames de microscopie en verre. ....	42
<b>Figure 7</b> : Aspect des colonies de la flore de contamination du yaourt sur les différents milieux de culture. ....	49
<b>Figure 8</b> : Observation microscopique des cultures après coloration de Gram (G ×100). ....	50
<b>Figure 9</b> : Observation microscopique des spores après la coloration de Gram (G×100). ....	50
<b>Figure 10</b> : Résultats des tests des enzymes respiratoires. A droite oxydase négative, à gauche catalase positive. ....	51
<b>Figure 11</b> : Biofilms formés dans les tubes en verre et colorés au cristal violet. ....	59
<b>Figure 12</b> : Observation au microscope optique des biofilms formés sur des lames en verre après coloration au cristal violet. ....	60

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1:</b> Défauts et altérations microbiologiques et organoleptiques du yaourt	16
<b>Tableau 2 :</b> Normes microbiologiques du yaourt .....	17
<b>Tableau 3 :</b> Diversité des levures et moisissures isolées à partir de lait et produits laitiers contaminés. ....	26
<b>Tableau 4 :</b> Description des échantillons de yaourt analysés .....	32
<b>Tableau 5 :</b> Mesure du pH et de l'acidité dornic des échantillons de yaourt. ....	44
<b>Tableau 6 :</b> Dénombrement de la flore de contamination du yaourt. ....	45
<b>Tableau 7 :</b> Détermination du biotype de la souche S14 par galerie API 20 E..	52
<b>Tableau 8 :</b> Détermination du biotype des souches S15 et S16 par galerie API 20 E. ....	53
<b>Tableau 9 :</b> Détermination du biotype de la souche S18 par galerie API 20 E..	54
<b>Tableau 10 :</b> Détermination du biotype de la souche S8 par galerie API Staph.	55
<b>Tableau 11 :</b> Détermination du biotype de la souche S9 par galerie API Staph.	56
<b>Tableau 12 :</b> Détermination du biotype de la souche S13 par galerie API Staph.	56
<b>Tableau 13 :</b> Diversité morphologique des levures et moisissures isolées du yaourt et de l'environnement laitier. ....	58

## Table des matières

<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>المخلص</b>	
<b>Liste des abreviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des Tableaux</b>	
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	3
<b>Chapitre 01: Le yaourt</b> .....	4
1. Définition du yaourt .....	5
2. Les bactéries du yaourt .....	5
2.1. L'espèce <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	5
2.2. L'espèce <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .....	6
3. Matières premières et ingrédients du yaourt .....	7
3.1. Le lait .....	7
3.2. Eau de reconstitution .....	8
3.3. Sucre .....	8
3.4. Arôme .....	8
4. Différents types de yaourt .....	8
4.1. Yaourt ferme ou étuvé .....	9
4.2. Yaourt brassé .....	9
4.3. Yaourt liquide .....	9
5. Procédé de fabrication du yaourt .....	9
5.1. Réception du lait .....	10
5.2. Standardisation .....	11
5.3. Homogénéisation .....	11
5.4. Traitement thermique .....	11
5.5. Fermentation lactique .....	12
5.6. Conditionnement et stockage .....	12
<b>Chapitre 2 : Qualité microbiologique de yaourt</b> .....	14
1. Définition du qualité microbiologique .....	15
2. Défauts et altérations microbiologiques du yaourt .....	15
3. Normes microbiologiques du yaourt .....	16
4. Contrôle microbiologique du yaourt .....	18
5. La flore de contamination du yaourt .....	18
5.1. Sources de contamination .....	18
5.1.1. Le Lait et les autres ingrédients .....	18
5.1.2. Les biofilms des équipements laitiers .....	19
5.1.3. Le personnel .....	20
5.1.4. L'air ambiant .....	21
5.1.5. Le matériel d'emballage .....	22
5.2. Flore de contamination .....	22

5.2.1. La flore totale aérobie mésophile .....	23
5.2.2. Les coliformes et autres Entérobactéries .....	23
5.2.3. <i>Salmonella</i> .....	24
5.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
5.2.5. Les bactéries sporulées aérobies .....	24
5.2.6. Les levures et moisissures .....	25
5.3. Stratégies de lutte contre les contaminations microbiennes dans l'environnement laitier .....	27
5.3.1. Conservateurs chimiques .....	27
5.3.2. Bioprotecteurs .....	27
5.3.3. Décontamination de l'air .....	28
5.3.4. Matériaux nanostructurés .....	29
<b>Matériel et méthodes</b> .....	30
1. Échantillonnage .....	31
2. Analyses physico-chimiques .....	32
2.1. Mesure de pH .....	32
2.2. Détermination de l'acidité titrable (dornic) .....	32
3. Analyses microbiologiques .....	33
3.1. Préparation de dilutions .....	33
3.2. Ensemencement .....	33
3.3. Recherche des germes de contamination .....	33
3.4. Contrôle de l'air ambiant .....	34
4. Identification des bactéries isolées .....	35
4.1. Les bactéries .....	35
4.1.1. Identification morphologiques .....	35
4.1.2. Identification biochimiques .....	36
4.2. Les levures et moisissures .....	38
5. Détermination du potentiel de formation du biofilm .....	40
5.1. Formation de biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits .....	40
5.2. Formation de biofilm dans les tubes en verre .....	40
5.3. Caractérisation microscopique de la formation de biofilms .....	41
<b>Résultats et discussion</b> .....	43
1. Résultats des analyses physico-chimiques .....	44
2. Résultats des analyses microbiologiques .....	45
2.1. Résultats du dénombrement et isolement des souches .....	45
2.2. Résultats de l'identification phénotypique des bactéries isolées .....	47
2.2.1. Caractères culturaux .....	47
2.2.2. Caractères microscopiques .....	49
2.2.3. Caractères biochimiques .....	51
3. Résultats de l'identification morphologique des levures et moisissures .....	57
4. Résultats de la caractérisation des biofilms bactériens .....	57
4.1. Caractérisation des biofilms dans les microplaques de titration en polystyrène .....	57
4.2. Caractérisation des biofilms dans les tubes en verre .....	59

4.3. Caractérisation microscopique de la formation de biofilm.....	60
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	61
<b>Références bibliographiques</b> .....	64
<b>Annexes</b> .....	75

# **Introduction**

Le lait est un composant majeur de notre diète quotidienne; il occupe une place stratégique dans notre alimentation (**Bourlioux et al., 2011**). L'Algérie est le plus grand consommateur du lait et des produits laitiers au niveau maghrébin, avec près de trois milliards de litres par an (**Hamiroune et al., 2014**).

L'industrie laitière représente l'une des principales industries alimentaire qui commercialise une large gamme de différents produits laitiers tels que le yaourt. Ce dernier est largement apprécié pour ses qualités nutritives et ses propriétés sensorielles (**Nagaoka, 2019**). Il contient des nutriments essentiels et constitue une matrice riche en probiotiques, protéines, acides gras, fibres, vitamines et minéraux (**Shori, 2020**). Ce qui le rend aussi un excellent milieu de croissance pour de nombreux types de micro-organismes.

La production industrielle et la conservation au froid du yaourt soulèvent des problèmes de viabilité des ferments lactiques. Ce qui entraîne la diminution de leur effet bioprotecteur et expose le produit aux problèmes de la contamination microbienne et de l'altération de la qualité hygiénique et des caractéristiques organoleptiques (**Guergour et Maache, 2021**).

D'autre part, une mauvaise hygiène des équipements laitiers résulte eu la persistance des contaminations microbiennes et la formation de biofilm. Ces derniers sont impliqués dans les problèmes de contamination croisée qui affectent la qualité des produits transformés et limitent leur durée de conservation (**Malek, 2019**).

En outre, le respect de la chaîne de froid est essentiel pour prévenir le développement de micro-organismes indésirables dans le yaourt et garantir sa sécurité et sa qualité tout au long de sa durée de conservation et de sa distribution. L'augmentation de la température du yaourt crée des conditions favorables à la croissance des micro-organismes indésirables, tels que les bactéries et les champignons contaminants.

Le produit fini doit répondre, d'une part, à des critères de pureté et de stabilité bien précis conformément aux normes requises pour protéger le consommateur et d'autre part, répondre aux exigences demandées par ce dernier (**Delacharlerie et al., 2009**).

Dans le but d'évaluer la qualité microbiologique d'un yaourt produit dans une laiterie de la région de Tlemcen et d'identifier les sources de contamination potentielle, cette étude a été entreprise :

- Analyse de quelques paramètres physico-chimiques : le pH et l'acidité titrable.
- Dénombrement et isolement de la flore bactérienne et fongique de contamination du yaourt, à la production et après conservation dans les conditions simulant au mauvais stockage par rapport à la température.
- Identification phénotypique des souches isolées par l'étude des caractères cultureux, morphologiques et biochimiques.
- Détermination du caractère persistant ou transitoire des isolats bactériens par la caractérisation de leur potentiel de formation de biofilm.

## **Synthèse bibliographique**

# **Chapitre 01: Le yaourt**

## 1. Définition du yaourt

Selon le Codex alimentarius, le yaourt est un produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* du lait frais et du lait pasteurisé avec ou sans addition d'autres matières (lait en poudre, protéines, etc.). Les micro-organismes dans le produit fini doivent être viables et abondants (**Ministère de l'économie et des Finances, 2009**). Le yaourt est fabriqué à partir du lait frais liquide, du lait en poudre ou d'un mélange des deux.

## 2. Les bactéries du yaourt

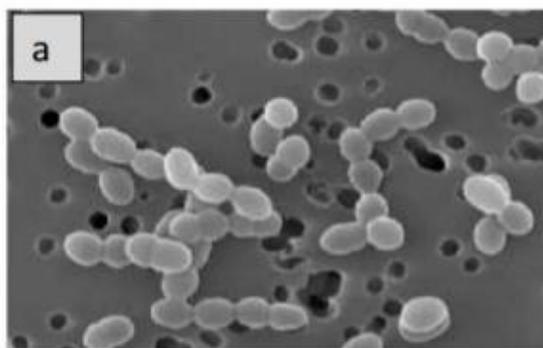
Ce sont des bactéries lactiques, appartenant au groupe des bactéries bénéfiques. Elles sont des bactéries procaryotes, gram positives, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont généralement immobiles, non sporulées, catalase négatives et oxydase négatives, bien que ce soient des micro-organismes anaérobies, elles tolèrent l'oxygène dans certaine mesure (**Tailliez, 2001 ; Pissang, 1992**). Elles comprennent des coques et des bacilles et leur principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (**Mahi, 2010**).

*S. thermophilus* et *L. bulgaricus* sont deux bactéries lactiques sélectionnées pour leur capacité à produire un ferment permettant d'obtenir un yaourt avec des caractéristiques organoleptiques spécifiques. Pour ce faire, une caractérisation antécédente des souches pures est nécessaire sur la base de critères bien définis (**Luquet et Corrien, 2005**).

### 2.1. L'espèce *Streptococcus thermophilus*

*S. thermophilus* est une bactérie Gram positive largement utilisée dans les fermentations lactières pour la production de yaourt et de fromage. Elle montre des cellules ovoïdes se produisant par paires ou en courtes chaînes (**Figure 1**). C'est une bactérie thermophile avec une température de croissance optimale de 42 °C et un organisme anaérobie tolérant aux aérosols (**Ophélie et al., 2017**). Le rôle de *S. thermophilus* dans la fermentation du lait est dû à sa conversion

rapide du lactose en acide lactique, provoquant une diminution rapide du pH et la production de métabolites importants pour leurs propriétés technologiques (**Delorme, 2008**).

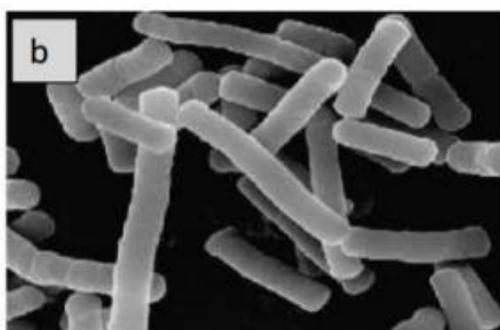


**Figure 1 :** *S. thermophilus* observée au microscope électronique (**Makhloufi, 2011**).

## 2.2. L'espèce *Lactobacillus bulgaricus*

*L. bulgaricus* est une bactérie en forme de bâtonnet ou de chaîne (**Figure 2**), gram positif, immobile, asporulé et micro-aérophile. Elle a un métabolisme strictement homofermentaire, produisant principalement de l'acide lactique.

*L. bulgaricus* est une bactérie thermophile nécessite des quantités élevées de calcium et de magnésium pour sa croissance optimale, qui se situe autour de 42°C (**Bouhanna et Boussaa, 2017**). Cette bactérie joué un rôle important dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt (**Marty-Teyesset et al., 2000**).



**Figure 2:** *L..bulgaricus* observée au microscope électronique (**Makhloufi, 2011**).

### 3. Matières premières et ingrédients du yaourt

#### 3.1. Le lait

La principale matière première pour la fabrication des yaourts est le lait dont, pour l'essentiel, le lait de vache. Il est constitué d'environ 88% d'eau et 12% de matière sèche contenant de glucides, des protéines, des lipides et des minéraux (**Lannabi et Sal, 2015**).

Toutefois, dans les pays où la production laitière est insuffisante, le lait en poudre peut être utilisé comme matière première unique ou en mélange avec le lait frais liquide (**Malek, 2019**).

Le lait en poudre est un produit solide obtenu par élimination de l'eau du lait, du lait entièrement ou partiellement écrémé, de la crème ou d'un mélange de ces produits, et dont la teneur en eau n'excède pas 5 % en poids du produit fini.

On distingue les laits en poudre suivants :

- Le lait en poudre riche en matières grasses ou poudre de lait riche en matières grasses : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre entier ou poudre de lait entier : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 26 % et moins de 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre partiellement écrémé ou poudre de lait partiellement écrémé : lait déshydraté dont la teneur en matières grasses est, en poids, est supérieure à 1,5 % et inférieure à 26 %.
- Le lait en poudre écrémé ou poudre de lait écrémé : lait déshydraté contenant, en poids, au maximum 1,5 % de matières grasses (**Vignola, 2002**).

### 3.2. Eau de reconstitution

L'eau est l'une des matières premières de tous les types de produits laitiers reconstitués et recombinaés. Elle doit être une eau potable de bonne qualité, dépourvue des micro-organismes pathogènes.

Une teneur excessive en matière inorganique menace l'équilibre des sels du produit reconstitué ou recombinaé qui à son tour pose des problèmes au niveau de la pasteurisation, et de la stérilisation ou du traitement UHT (**Soudaki et Attaf, 2009**).

### 3.3. Sucre

Les sucres conférant une saveur spécifique peuvent être ajoutés au yaourt dans la limite de 30 % en poids du produit fini. Il est préférable d'ajouter le sucre avant la pasteurisation du lait, car le traitement thermique du lait sucré détruit les levures et les moisissures osmophiles présentes dans le sucre par ailleurs la consistance du yaourt s'en trouve améliorée (**Lamontagne, 2002**).

### 3.4. Arôme

L'arôme désigne tout produit ou substance, destiné à être ajouté dans les denrées alimentaire pour leur donner une odeur, un gout ou les deux en même temps (**Djouani et Mehennaoui, 2005**). Il existe des arômes différentes tels que : fraise, vanille, pêche, banane, citron, framboise (**Das et al., 2019**).

## 4. Différents types de yaourt

La technologie du yaourt est essentiellement basée sur la fermentation lactique. Cependant, en fonction des caractéristiques liées à la texture du yaourt (ferme, semi-liquide ou liquide), le procédé de fermentation se déroule en pot ou en cuve sous agitation). Il en résulté les trois types de yaourt qui se retrouvent sur le marché.

#### 4.1. Yaourt ferme ou étuvé

La fermentation se déroule dans les pots après conditionnement pour permettre l'obtention d'un caillé responsable de la texture ferme du produit fini. La température d'incubation de ce type de yaourt est entre 42 et 44°C. Il est refroidi dans l'emballage final (en pot) et se caractérise par une texture ferme rassemblant à de la gelée, ce sont généralement des yaourts nature ou aromatisés (Aswal et *al.*, 2012).

#### 4.2. Yaourt brassé

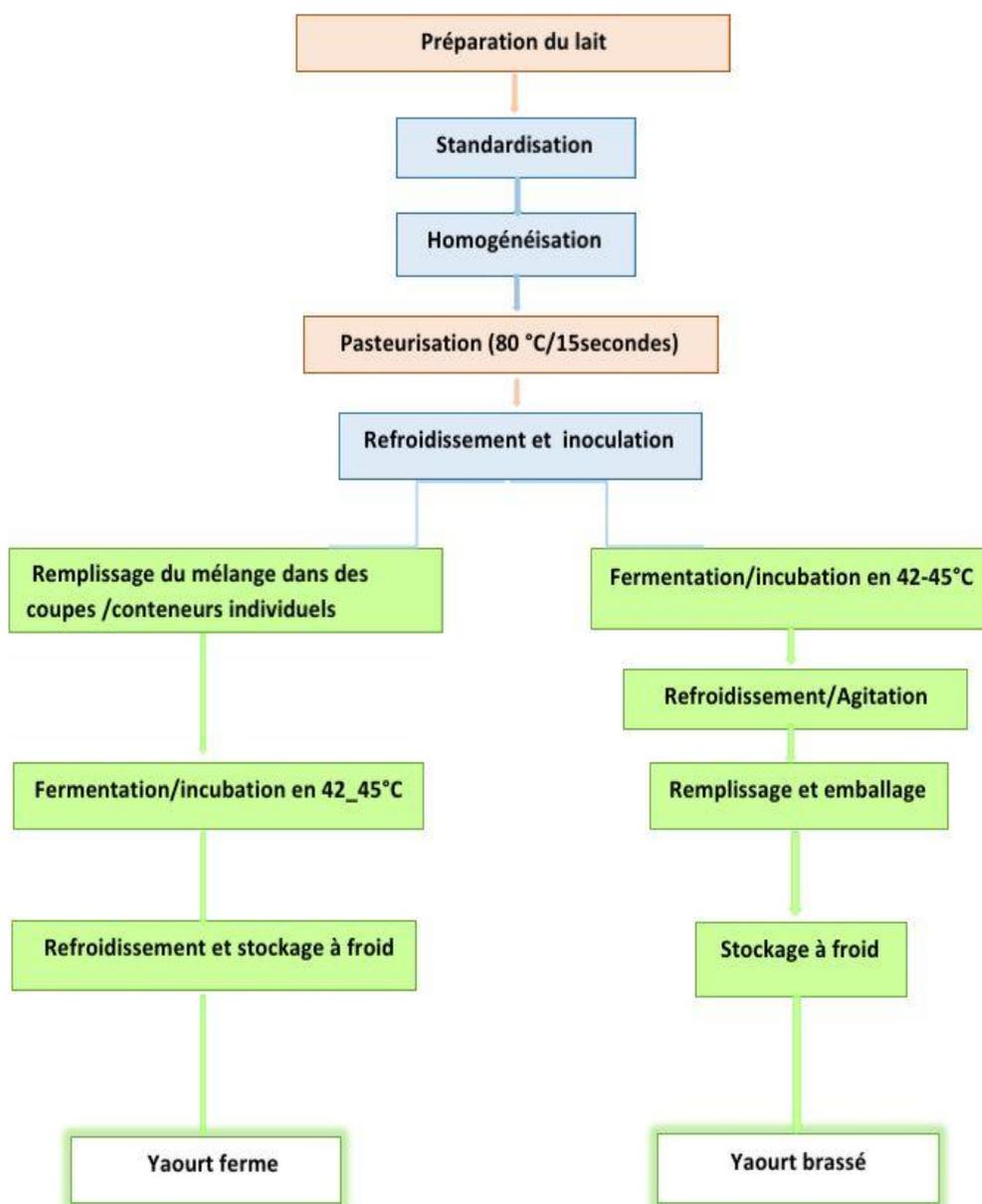
Le processus de formation de ce yaourt implique une incubation dans une cuve à une température comprise entre 42 et 45°C. Une fois terminée, le coagulum final est brisé par agitation avant d'être refroidi et conditionné. Le résultat obtenu est un yaourt brassé qui présente initialement une texture presque fluide, mais qui devient crémeux après la coagulation. Ces yaourts sont généralement aromatisés aux fruits ou naturellement veloutés (Aswal et *al.*, 2012).

#### 4.3. Yaourt liquide

Ce type de yaourts est similaire au type brassé mais le coagulum est réduit à l'état liquide avant conditionnement donc leur texture est liquide. Il est plutôt consommé comme une boisson rafraîchissante que comme un aliment (Aswal et *al.*, 2012).

### 5. Procédé de fabrication du yaourt

Le procédé de fabrication du yaourt comprend plusieurs étapes qui sont résumées dans la figure (**Figure 3**). Toute défaillance pouvant être enregistrée dans cette chaîne de fabrication contribue à l'altération de la qualité du produit fini, et doit être diagnostiquée systématiquement afin d'apporter les actions correctives adéquates.



**Figure 3:** Processus de la fabrication du yaourt (yaourt ferme et yaourt brassé)  
(Weerathilake et *al*, 2014).

### 5.1. Réception du lait

Le lait destiné à la production de yaourt doit être de haute qualité bactériologique, le contenu doit être faible en bactéries et autres substances qui peuvent réduire l'effet du levain du yaourt. Le lait ne doit pas contenir des bactériophages et des antibiotiques (Sodini et Béal, 2012).

Le lait est contrôlé dès sa réception, des méthodes et procédures rapides et simples permettant de détecter les anomalies et les pertes possibles. (Amellal-Chibane, 2008).

## 5.2. Standardisation

Cette phase a pour but d'ajuster la quantité de matière grasse et de lait en poudre afin de respecter les normes standards recommandées pour un yaourt. Selon ces normes, un yaourt doit contenir au minimum 2.7% de protéines et au maximum 15% de matière grasse. La teneur en matière grasse est souvent ajustée en ajoutant de la crème ou du beurre ou la poudre de lait entier. De plus, l'acidité titrable exprimée en pourcentage d'acide lactique, ne doit pas être inférieure à 0,3% (Weerathilake et al., 2014).

## 5.3. Homogénéisation

Une étape cruciale de ce processus consiste à utiliser un homogénéisateur pour traiter le lait. Dans cet appareil, le lait est poussé à travers de petites ouvertures à haute pression, ce qui permet de rompre les globules gras et de réduire leur diamètre. Cette action garantit une répartition uniforme de la matière grasse, empêche la formation d'une couche crémeuse distincte à la surface du yaourt et améliore ainsi sa consistance (Kaur et al, 2017).

## 5.4. Traitement thermique

Après la préparation du lait, qui comprend la standardisation et l'homogénéisation, une étape suivante consiste à traiter le lait destiné à la fabrication du yaourt. Ce traitement thermique ou pasteurisation peut être effectué de manière continue ou discontinue, pendant une durée prédéterminée. Son objectif est de détruire les micro-organismes pathogènes et résistants présents dans le lait (Weerathilake et al, 2014).

Le traitement thermique a un impact considérable sur les caractéristiques physiques du yaourt. Il provoque la dénaturation des protéines de lactosérum, ce qui améliore la

texture du produit final. De plus, il joue un rôle significatif en favorisant le processus de fermentation. En effet, il libère les composés essentiels à la croissance des bactéries du ferment et élimine l'oxygène dissous auquel elles sont sensibles (**Das et al., 2019**).

### 5.5. Fermentation lactique

Après avoir été soumis à un traitement thermique, le yaourt doit être refroidi à une température comprise entre 43 et 46°C. Cette plage de température est optimale pour favoriser l'activité des souches thermophiles utilisées lors de la fermentation. Ensuite, un ferment contenant *S.thermophilus* et *L.delbruckii subsp.bulgaricus* est ajouté au yaourt à une concentration d'environ 2 à 3%. Le mélange est ensuite dirigé vers une chambre d'incubation ou de maturation où il est maintenu pendant plusieurs heures à une température contrôlée (**Ayar et Gurlin, 2014**).

L'inoculation est généralement réalisée dans des cuves hygiéniques en acier inoxydable ou dans des récipients individuels, en fonction du type de yaourt, qu'il soit ferme ou brassé (**Weerathilake et al., 2014**).

### 5.6. Conditionnement et stockage

Lorsque le yaourt a atteint le niveau d'acidité souhaité (pH 4,5 -4,6), le processus de fermentation est stoppé en refroidissant rapidement le produit. Cela permet d'arrêter le développement des bactéries lactiques et la production d'acide lactique. Le refroidissement se déroule en deux phases : d'abord, la température est rapidement réduite à moins de 10°C puis à moins de 20°C, avant d'être finalement abaissée à 5°C, la température de stockage. Dans le cas du yaourt brassé, le refroidissement est effectué après l'agitation de coagulum dans la cuve (**Weerathilake et al., 2014 ; Kaur et al., 2017**).

Une fois la production terminée, toutes les machines utilisées sont automatiquement nettoyées grâce à une méthode appelée « cleaning in place CIP » (**Tsarouhaba et Arvanitoyannis , 2014**).

## **Chapitre 2 : Qualité microbiologique de yaourt**

## 1. Définition de la qualité microbiologique

Selon l'Organisation internationale de normalisation ISO 8402, la qualité est "l'ensemble des caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confère la capacité de satisfaire des besoins explicites ou implicites". D'un point de vue microbiologique, ce critère comprend la réponse à un besoin exprimé par le marché et le besoin implicite qui est la non-toxicité du produit sur la santé des consommateurs. La qualité est décrite dans la règle des 4S (Satisfaction, Sécurité, Service, Santé) pour un produit alimentaire (**Lannabi et Sal, 2015**).

La qualité du yaourt est une combinaison souhaitable physico-chimique, textural, microbiologique, nutritionnel, des propriétés fonctionnelles et sensorielles (**Dias et Rathnayaka, 2019**). La qualité microbiologique des aliments comme le yaourt est souvent évaluée à l'aide d'organismes indicateurs dont la charge est habituellement associée à des risques pour la santé.

## 2. Défauts et altérations microbiologiques du yaourt

La détérioration des aliments est le processus par lequel les aliments deviennent impropres à la consommation. La raison de ce processus est due à de nombreux facteurs externes tels que les effets secondaires du type de produit et la manière dont le produit est emballé et stocké. Différentes bactéries et champignons peuvent provoquer une détérioration avec de graves conséquences pour les consommateurs (**Garcha, 2018**).

Étant donné que la production de yaourt implique plusieurs étapes critiques, les variations de goût, d'apparence et de texture sont courantes et certaines même préjudiciable à la qualité finale du produit (**Benmammam et al ., 2016**)

Le tableau (**Tableau 1**) résume certains défauts susceptibles de survenir lors de la production du yaourt et d'avoir un impact direct sur sa qualité microbiologique et organoleptique.

**Tableau 1:**Défauts et altérations microbiologiques et organoleptiques du yaourt (**Lannabi et Sal, 2015**)

Défauts	Causes
<b>Production de gaz</b>	Contamination par des levures et des coliformes.
<b>Colonies en surface</b>	Contamination par des levures et moisissures.
<b>Rancidité</b>	Contamination par les germes lipolytiques.
<b>Amertume</b>	Contamination par des germes protéolytiques.
<b>Goût levuré</b>	Contamination par des moisissures.
<b>Goût aigre</b>	Contamination par une flore lactique sauvage-coliformes.
<b>Absence d'arôme</b>	Déséquilibre de la flore (trop de streptocoques)

### 3. Normes microbiologiques du yaourt

Selon les normes internationales sur le yaourt, ce produit devrait contenir au moins  $10^7$  ufc de ferment lactique par gramme (**Saviano et Hotkins, 2021**) fournies principalement par *L.bulgaricus* et *S. thermophilus*. Le yaourt peut également contenir d'autres micro-organismes indésirables, parfois pathogènes, provenant de l'environnement, des pots, des additifs et des emballages...etc. Cela nécessite un contrôle microbiologique pour confirmer sa qualité microbiologique (**Pal et al., 2015**).

D'après la norme nationale de 2017, n°39 parue dans le journal officiel (**J.O.R.A, 2017**) (**Tableau 2**), le yaourt ne doit pas contenir un germe pathogène tel que

*salmonella*. Les autres critères microbiologiques pris en considération sont les entérobactériaceae, les staphylocoques à coagulase + et *listeria monocytogenes*. Le traitement thermique appliqué sur le lait avant la fabrication du yaourt est suffisant pour détruire les micro-organismes non sporulés pathogènes ou non. Leur présence dans le yaourt ne peut être que de manière accidentelle, le pH acide du yaourt le rend hostile aux germes indésirables. Par conséquent, les principaux contaminants et agents de détérioration du lait fermenté tels que le yaourt sont les champignons (Pei et al., 2021).

**Tableau 2 :** Normes microbiologiques du yaourt (J.O.R.A, 2017).

Micro-organismes	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g ou ufc/ml)	
	n	c	M	M
<b>Enterobacteriaceae</b>	5	2	10	10 <sup>2</sup>
<b>Staphylocoques à coagulase +</b>	5	2	10	10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100	

- **n** : Nombre d'unités constituant l'échantillon.
- **m** : Nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur en dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante.
- **M** : Nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable.
- **c** : Nombre maximal d'unités d'échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser «m» tout en étant inférieur à «M» sans que le lot ne soit rejeté.

#### 4. Contrôle microbiologique du yaourt

Le contrôle de la qualité du yaourt est important. Il a pour but de prévenir les risques chimiques et biologiques dus aux différentes contaminations possibles. Parmi les divers paramètres qui indiquent la qualité et l'innocuité du yaourt, les plus importants sont ceux qui limitent les propriétés chimiques et microbiologiques (**Gahruie et al., 2015**). Ces contrôles sont effectués sur les matières premières et les produits finis, ainsi que pendant la fabrication et sur les équipements. Ils visent à assurer la commercialisation de produits sûrs (sans risques microbiologiques, chimiques ou physiques). De plus, les contrôles garantissent que le yaourt a les qualités requises et attendues par le consommateur (saveur, odeur, texture et couleur) et que ses propriétés sont stables tout au long de la période de commercialisation (**Béal et Helinck, 2019**).

#### 5. La flore de contamination du yaourt

##### 5.1. Sources de contamination

##### 5.1.1. Le Lait et les autres ingrédients

Les micro-organismes présents dans le lait et les produits laitiers ont des origines différentes, notamment l'environnement, les matières premières, le personnel, les additifs et les matériaux d'emballage. Ainsi, la contamination du lait et des produits

laitiers est un défi pour les producteurs en raison de facteurs humains et de conditions malsaines (Singh *et al.*, 2011).

Le yaourt est un excellent milieu de croissance pour de nombreux types de micro-organismes, car il fournit une riche source de nutriments pour les micro-organismes. L'exposition du yaourt à la contamination microbienne pendant le traitement, l'entreposage et le transport sans pratiques d'hygiène de base et de gestion de la température peut rapidement détériorer le produit et le rendre impropre à la consommation humaine (Mohammed et Abdullah, 2015).

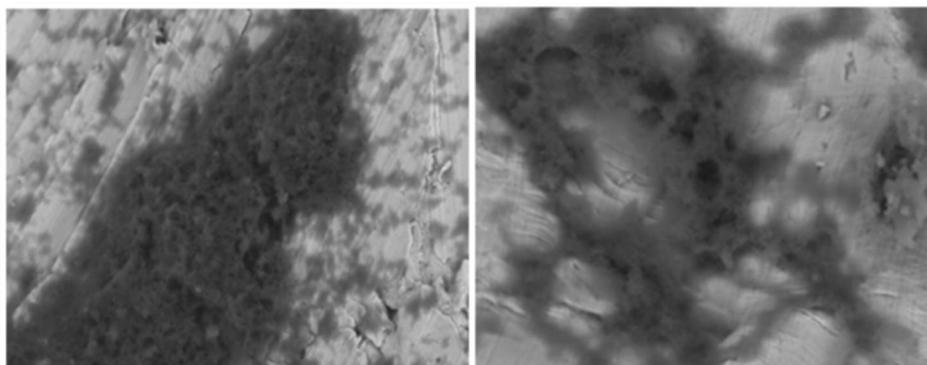
### 5.1.2. Les biofilms des équipements laitiers

Les équipements laitiers sont la deuxième source de contamination du lait et produits laitiers par les micro-organismes. La flore résiduelle qui reste sur les équipements et les installations suite à une mauvaise hygiène, est responsable des altérations du lait et des produits laitiers et de la réduction de leur durée de conservation. Cette flore résiduelle peut s'organiser en biofilm et être à l'origine de la persistance de contaminations, de la diminution de l'efficacité des procédures de nettoyage/désinfection et de la dégradation du statut hygiénique des entreprises (Malek, 2019). La figure 4 illustre un exemple de surfaces mal nettoyées en industrie laitière.

En effet, la contamination des produits finis, après pasteurisation ou contamination croisée qui désigne le transfert des bactéries détachées du biofilm à l'aliment transformé est principalement attribuable aux biofilms (Malek, 2019). Ainsi les surfaces de l'équipement peuvent agir comme des réservoirs pour la recontamination du lait, réduisant ainsi l'efficacité des traitements de pasteurisation et d'assainissement (Malek *et al.*, 2012 ; Pal *et al.*, 2013).

En raison de leur résistance aux traitements thermiques et aux agents antimicrobiens, les biofilms laitiers sont difficiles à éliminer, même avec des procédures de nettoyage et de désinfection acceptables. Leur élimination exige un traitement sévère avec des

oxydants puissants et le développement de nouvelles stratégies d'assainissement (Malek, 2019).



**Figure 4:** Exemples de surfaces mal nettoyées en industrie laitière : biofilms matures formés *in-situ* sur des lames en inox placées à l'intérieur de conduites de lait pendant 7 jours et observées au microscope électronique à balayage environnemental (ESEM), après application du système de nettoyage (CIP). A gauche : segment de pré-pasteurisation, à droite : segment de post-pasteurisation (adapté de Malek 2016 in Malek, 2019).

### 5.1.3. Le personnel

Une mauvaise hygiène des employés est souvent une source de contamination dans la transformation des produits laitiers, et les critiques affirment que la plupart des épidémies de maladies d'origine alimentaire, y compris les épidémies de produits laitiers, sont probablement causées par le contact des travailleurs du secteur alimentaire avec les aliments, en particulier ceux qui sont malades. En tant que porteurs d'agents pathogènes d'origine alimentaire, les travailleurs infectés peuvent être à la fois des hôtes et des vecteurs de contamination du lait et des produits laitiers (Ntuli et al.,2022) .

Les micro-organismes peuvent habiter les surfaces externes du corps, telles que la peau et les cheveux, et les surfaces des muqueuses, telles que le nez et la bouche, ou être excrétés du tube digestif dans les matières fécales. Les micro-organismes les plus associés à l'augmentation du risque de contamination entre les humains et les

environnements de transformation des aliments ou de l'industrie alimentaire sont ceux qui se trouvent sur la peau. Les personnes travaillant à proximité d'aliments ouverts peuvent continuer à contaminer les aliments ou les surfaces avec lesquelles les aliments peuvent entrer en contact. Habituellement, les personnes qui démontent et remontent fréquemment les machines pour les procédures de nettoyage et celles qui maintiennent les machines en marche pendant la production sont souvent des sources de contamination (Ntuli et al., 2022) .

#### 5.1.4. L'air ambiant

La qualité de l'air dans les zones de transformation laitière peut affecter la qualité microbiologique du lait et des produits laitiers. Les produits laitiers sont très sensibles à la contamination par des micro-organismes en suspension dans l'air. La qualité microbiologique de l'air dans les zones de transformation et d'emballage est un point de contrôle critique dans la transformation des produits laitiers, car les contaminants en suspension dans l'air peuvent réduire la durée de conservation et agir comme vecteurs de transmission d'agents pathogènes et de maladies. Par conséquent, toutes les précautions doivent être prises pour éviter la contamination aérienne du produit pendant et après le traitement. Les micro-organismes aéroportés dans les usines laitières comprennent les bactéries, les moisissures, les levures, les virus et même les bactéries et les champignons sporulés qui peuvent survivre dans les bioaérosols et résister plus longtemps dans l'air (Radha et Nath , 2014).

Les principales sources d'organismes en suspension dans l'air dans la zone de transformation laitière comprennent le personnel, les équipements laitiers, les matériaux d'emballage et l'eau lorsqu'ils sont appliqués sous pression dans les procédures de nettoyage et de désinfection, ainsi qu'un système de ventilation inadéquat, lorsque les filtres installés dans ces conduits ne sont pas efficaces. La principale cause qui entraîne la croissance de champignons filamenteux est l'humidité élevée (Konieczny et al ., 2016 ; Radha et Nath , 2014).

Les micro-organismes conservent leur virulence dans l'air, il est donc nécessaire de contrôler la contamination de l'air dans les zones de production alimentaire afin de faciliter la détection et l'élimination des dangers potentiels pour la santé résultant de leur présence (Vinayananda *et al.*, 2018).

### 5.1.5. Le matériel d'emballage

Les matériaux d'emballage pour l'industrie laitière sont essentiels car ils affectent la qualité, la sécurité, le coût et la qualité marchande des produits pour les consommateurs. Ils peuvent affecter la qualité des aliments en raison d'interactions possibles entre eux, notamment la perméabilité des gaz et de la vapeur d'eau à l'intérieur ou à l'extérieur de l'emballage, et la migration des composants de l'emballage dans les aliments. Cette interaction affecte directement la qualité et la durée de conservation du produit. Les matériaux d'emballage jouent un rôle essentiel dans la qualité microbiologique du lait et des produits laitiers. Cela peut se produire en influençant directement la charge microbienne en raison de la présence de microbes sur leurs surfaces ou indirectement en raison du caractère perméable du matériau d'emballage, permettant ainsi la croissance de microbes qui peuvent être présents (Ntuli *et al.*, 2022).

Par conséquent, le choix approprié des matériaux d'emballage dans l'industrie laitière est nécessaire pour créer un obstacle qui maintient la qualité du produit et permet également une durée de conservation raisonnable, entre autres facteurs.

## 5.2. Flore de contamination

De par leur richesse en nutriments, le lait et les produits laitiers sont favorables au développement des micro-organismes. De ce fait, la flore de contamination peut être très diversifiée mais aussi influencée par les conditions d'hygiène dans les entreprises de production laitière. Bien que les critères microbiologiques officiels soient limités à quelques groupes bactériens (JORA, 2017), il est possible de rencontrer dans les produits laitiers de nombreux contaminants bactériens et fongiques.

### 5.2.1. La flore totale aérobie mésophile

Le nombre total de bactéries aérobie mésophile ou germes totaux est l'indicateur le plus utile de l'état microbiologique des produits laitiers. Les concentrations élevées font référence à la contamination des matières premières, à un mauvais assainissement ou à des facteurs de temps et de température inappropriés pendant l'entreposage et la production (**Roberts et Skinner, 1983**).

Les germes totaux ce sont des micro-organismes capables de se multiplier en aérobie à une température de 30°C sur un milieu ordinaire. Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile reste le meilleur moyen d'estimer l'indice de sécurité alimentaire dans le contrôle industriel (**Verne-bourdais et al., 2002**).

### 5.2.2. Les coliformes et autres Entérobactéries

Les coliformes sont des contaminants courants dans le lait et autres produits laitiers comme le yaourt (**Wolfe et al., 2014**). Ils appartiennent à la famille des entérobactéries. Les coliformes sont des bacilles à Gram-, non sporulés, oxydase- et aérobie ou anaérobie facultatif, capables de fermenter le lactose avec la production d'acide et de gaz à 32-35°C (**Billon et Sauve, 2009 ; Wehr et Frank, 2004**). Le groupe des coliformes comprend de nombreuses espèces des genres tels que *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* ainsi qu'*Escherichia coli*. La présence de *E. coli* considérée comme un signe de contamination fécale, qui peut représenter un risque de toxi-infection alimentaires.

La famille des entérobactéries comprend également plusieurs genres et espèces de bactéries pathogènes intestinales comme *Salmonella* et *Shigella* (**Ghafir et Daube, 2007**). Dans les denrées alimentaires d'origine animale, les entérobactéries sont d'origine intestinale ou environnementale et indiquent un manque d'hygiène lors des processus de fabrication (**Salifou et al., 2013**).

### 5.2.3. *Salmonella*

Les Salmonelles appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae et leur transmission asymptomatique est fréquente et constitue la principale voie de transmission de ces bactéries dans l'environnement et dans les aliments. Elles poussent dans une plage de température de 4°C à 47°C et survivent à des températures froides, résistant ainsi au refroidissement. Cependant, elles sont détruites par la pasteurisation (72°C, 15 secondes). Ils sont également capables de se reproduire à des valeurs de pH comprises entre 5 et 9, mais sont sensibles à la fermentation lactique lorsque les concentrations en acide lactique sont supérieures à 1 %. (Jay, 2000 ; Guy, 2006).

### 5.2.4. *Staphylococcus aureus*

Le staphylocoque doré ou *staphylocoque aureus* dans les aliments est un indicateur de contamination par le personnel qui participe à la production et à la manipulation (Abdel hameed et Elmalt , 2009).

Le lait et les produits laitiers peuvent aussi être contaminés par ces bactéries. Le lait devrait donc être suffisamment pasteurisé et prendre des précautions pour prévenir la contamination et la croissance subséquente du staphylocoque pendant le processus de fabrication et dans le produit final. Le staphylocoque doré peut causer une intoxication alimentaire dans le lait et les produits laitiers ( Asperger , 1994).

### 5.2.5. Les bactéries sporulées aérobies

Les bactéries sporulées aérobies mésophiles et thermophiles appartenant à *Bacillus* et aux genres proches, sont également présentes dans le lait. Ces organismes sont généralement associés avec le sol et le compost et sont soupçonnés d'être introduits dans le lait cru pendant la traite en faible nombre (<10 ufc / ml). Toute fois leur nombre peut être relativement important dans le lait en poudre (Malek, 2019).

Ces bacilles sont responsables de l'altération des produits laitiers, qui est due principalement aux activités enzymatiques des souches contaminant ces produits. Ces bactéries sporulées présentent une très forte résistance aux traitements thermiques, comme la pasteurisation, qui permet de les sélectionner. Les spores thermorésistantes sont également caractérisées par un fort pouvoir d'adhésion et de formation de biofilm. Elles peuvent être extrêmement difficiles à éliminer d'une usine de fabrication de produits laitiers (Flint et al., 1997 ; Christeans et Zagorec., 2013).

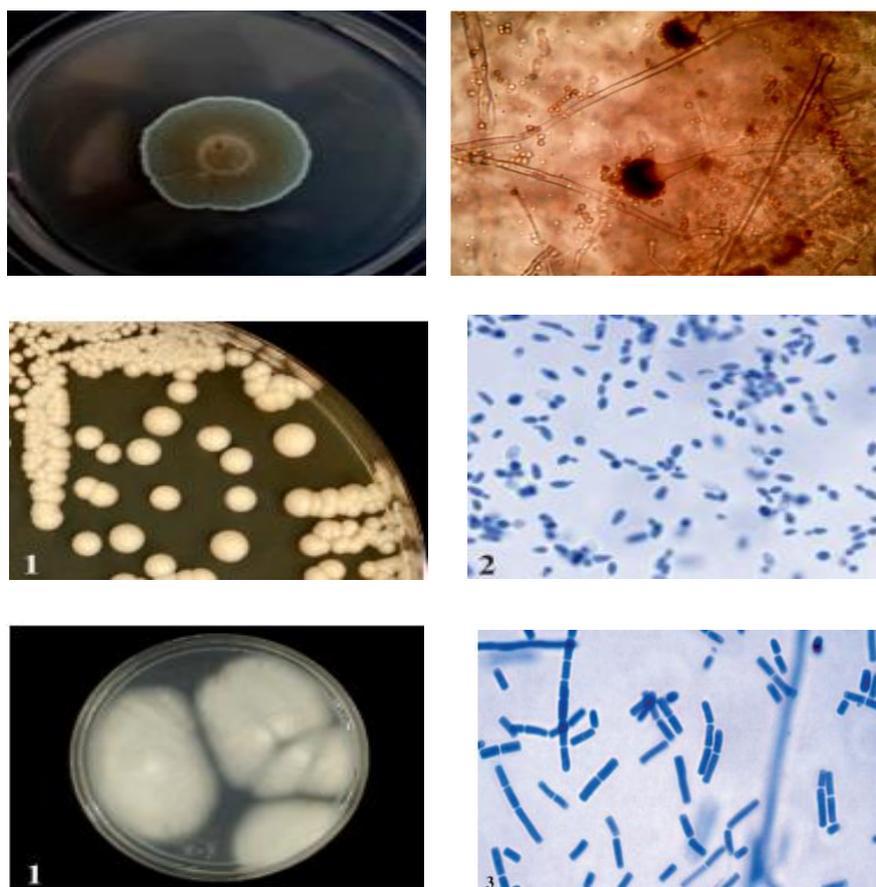
#### 5.2.6. Les levures et moisissures

Les principaux contaminants et agents de détérioration du lait fermenté sont les levures et les moisissures. En plus d'être un risque important pour la santé, la contamination du lait fermenté par des champignons tel que *Aspergillus* (Figure 5) et des levures tels que *Candida* et *Geotrichum candidum* (Figure 5) réduit ses caractéristiques chimiques et organoleptiques (Odeyemi et al., 2020; Pei et al., 2021 ; Shi et Maktabdar , 2022). Les mycètes sont responsables de perte de qualité de la texture et de goût due à la production de gaz, et gonflement et rétrécissement de l'emballage (Moureira et al., 2001).

Un nombre élevé de moisissures toxigènes indique souvent la présence de mycotoxines, dont la présence potentielle dans les produits laitiers les rend particulièrement dangereux pour l'homme en raison de leurs effets négatifs pour les adultes et surtout les enfants (Moubasher et al., 2018).

Les sources de contamination des produits laitiers par les levures et les moisissures semblent généralement être l'air et d'autres sources environnementales, ce qui fait de l'étape de conditionnement un point critique où de mauvaises pratiques d'hygiène existent (Pei et al., 2021).

Les principaux des levures et des moisissures fréquentes isolées du lait et produits laitiers figurent dans le tableau 3.



**Figure 5:** Observation macroscopique (à gauche) et microscopique (à droite) des genres *Aspergillus*, *candida* et *Geotrichum candidum* (de haut en bas) (Meghazi ,2011 ; Bouchara et al. 2010).

**Tableau 3:** Diversité des levures et moisissures isolées à partir de lait et produits laitiers contaminés (Lavoie et al., 2012; Shi et Maktabdar , 2022 ).

Les levures	Les moisissures
<i>Candida</i>	<i>Penicillium commune</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>Penicillium crustosum</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Mucor racemosus</i>
<i>Trichosporon</i>	<i>Mucor genevensis</i>
<i>Yarrowia</i>	<i>Aspergillus</i>

### 5.3. Stratégies de lutte contre les contaminations microbiennes dans l'environnement laitier

Afin d'éviter ou de retarder la dégradation microbienne et fongique et de prolonger ainsi la durée de conservation et la sécurité des produits, les fabricants laitiers appliquent des méthodes de prévention. Celle-ci comprennent l'application de bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène et la mise en œuvre du système d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques (HACCP) (Garnie *et al.*, 2017).

En outre, plusieurs nouvelles façons d'éliminer la contamination dans le secteur laitier ont été élaborées, notamment :

#### 5.3.1. Conservateurs chimiques

Les agents de conservation chimiques peuvent être décrits comme les additifs chimiques qui sont ajoutés aux aliments spécifiquement pour prévenir la détérioration ou la décomposition d'un aliment et qui sont sans danger pour l'homme (Jayanthi et chatterjee, 2017).

Cependant les agents de conservation du sorbate sont des inhibiteurs très efficaces de la plupart des micro-organismes courants qui peuvent attaquer les aliments, et ils n'ont aucune incidence sur le goût, la couleur ou la saveur des aliments (Ashmawy et Ibrahim, 2009). En effet l'ajout de sorbate de potassium a toutefois inhibé les niveaux de levure et de moisissure. Il est l'un des conservateurs alimentaires les plus sûrs, les plus efficaces et les plus polyvalents utilisés aujourd'hui et a été autorisé à être utilisé et approuvé comme conservateur alimentaire.

#### 5.3.2. Bioprotecteurs

Au cours des dernières années, les consommateurs se sont montrés de plus en plus intéressés par les produits alimentaires propres, qui sont naturels, moins transformés et exempts d'agents de conservation chimiques ajoutés. Cela a suscité un intérêt pour

l'utilisation des bactéries lactiques (LAB: lactic acid bacteria) ou de leurs métabolites comme biopreservatifs afin de limiter la croissance des organismes de détérioration dans les produits laitiers (**Shi et Maktabdar , 2022**). Les bactéries lactiques ainsi que leurs métabolites sont traditionnellement utilisées comme agents de conservation naturels dans les aliments. Elles produisent divers composés antimicrobiens, comme les acides lactiques et acétiques (**Afzali et al., 2022**).

L'effet néfaste de ces acides sur les microbes les rend appropriés pour l'utilisation en conservation. Les pathogènes responsables de maladies d'origine alimentaire sont tués par un choc acide pendant la transformation des aliments (**Jayanthi et Chatterjee , 2017**). Une gamme de composés produits par LAB a une activité antifongique potentielle (**Shi et Maktabdar ,2022**), ainsi que ces cultures alimentaires aux effets bioprotecteurs sont de plus en plus utilisées même contre les levures (**Nielsen et al ,2021**).

Les bactéries d'acide lactique peuvent également synthétiser les bactériocines qui sont des antimicrobiens dans la nature, une propriété qui peut être exploitée dans la biopréservation alimentaire. Ils sont efficaces contre les pathogènes d'origine alimentaire ainsi que les organismes de détérioration des alimentaires et surtout sur la viabilité des spores, la germination des spores et la croissance mycélienne des contaminants fongiques. Le producteur de bactériocine peut être inoculé dans l'aliment ou la molécule antimicrobienne peut être purifiée et utilisée comme additif alimentaire (**Garcha, 2018**).

### **5.3.3. Décontamination de l'air**

#### **➤ Systèmes de filtration**

Spécifique au risque de contamination fongique, les sources potentielles de contamination comprennent l'air ambiant. Par conséquent, un système de filtration de l'air efficace doit être utilisé pour réduire le nombre de spores dans l'air où le produit est vulnérable. Une attention particulière doit également être accordée à la direction

du flux d'air et à l'emplacement des sorties dans les zones sensibles. De plus, un contrôle de suralimentation d'air peut être appliqué pour empêcher le flux d'air des zones les plus sales vers les zones les plus propres (**Garnir et al., 2017**).

#### ➤ Désinfectants

Divers désinfectants tels que l'alcool, l'acide peracétique, les iodophores, les aldéhydes, les composés d'ammonium quaternaire, les agents à base de chlore ou le peroxyde d'hydrogène ont été utilisés dans l'industrie laitière pour lutter contre la contamination fongique (**Garnir et al., 2017**).

#### 5.3.4. Matériaux nanostructurés

Les stratégies de lutte contre les biofilms sont essentiellement basées sur l'action des agents antimicrobiens, antibiotiques ou biocides, et se heurtent toujours au problème crucial de la résistance sessile (**Malek, 2019**), ainsi que l'utilisation des détergents et des désinfectants qui ne sont pas très acceptables en raison de leur toxicité et cancérigène (**Vishwakarma, 2019**).

Pour réduire l'attachement microbien dans l'équipement industriel, l'utilisation de matériaux nanostructurés est la meilleure alternative. Les nanomatériaux permettent de détecter la présence de bactéries et d'agents pathogènes dans les échantillons par des nanocapteurs. Les nanoparticules métalliques comme le titane ont des propriétés physiques et chimiques uniques et sont toxiques pour le micro-organisme (**Vishwakarma, 2019**).

## **Matériel et méthodes**

La recherche a été menée dans les laboratoires de pédagogie du département de Biologie, Faculté SNV-STU de l'Université de Tlemcen, Algérie. Ce travail porte l'évaluation de la qualité microbiologique d'un yaourt produit dans une laiterie de la région de Tlemcen d'une part, à la production et dans les conditions d'un stockage simulé, d'autre part. Le plan expérimental de ce travail est le suivant :

- Analyse de quelques paramètres physico-chimiques : le pH et l'acidité titrable.
- Dénombrement et isolement de la flore bactérienne et fongique de contamination du yaourt.
- Identification phénotypique des souches isolées par l'étude des caractères culturels, morphologiques et biochimiques.
- Caractérisation du potentiel de formation de biofilm par les isolats bactériens.

### 1. Échantillonnage

Les 8 échantillons, soumis à notre étude ont été prélevés durant le mois de Février et le mois de Mars 2023 dans une laiterie de la région de Tlemcen, comprennent :

- **Prélèvement du produit fini** : représenté par 5 pots de yaourt prêts pour la commercialisation, prélevés le même jour et analysés après stockage à différentes températures et temps (**Tableau 3**).
- **Prélèvement au niveau des conditionneuses E6** : représenté par 1 pot de yaourt après conditionnement (avant incubation dans la chambre chaude).
- **Prélèvement au niveau du process (tank de stockage) E7** : représenté par le lait utilisé dans la fabrication du yaourt après sa pasteurisation.
- **Prélèvement pour le contrôle de l'environnement E8** : représenté par l'air ambiant de l'atelier de fabrication de yaourt dans des endroits différentes (sous la cuve de fermentation du yaourt, centre d'atelier à l'air libre, atelier de préparation de mélange initial « lait + poudre de lait + sucre », conditionneuse du yaourt).

Les échantillons ont été immédiatement amenés au laboratoire et conservés dans des différentes conditions, à différentes températures selon les délais mentionnés dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Description des échantillons de yaourt analysés .

Echantillon	Température de stockage	Durée de stockage	Code
1 <sup>ère</sup> pot	Température ambiante	48 h	E1
2 <sup>ème</sup> pot	25°C	6 jours	E2
3 <sup>ème</sup> pot	4°C	48 h	E3
4 <sup>ème</sup> pot	37°C	48 h	E4
5 <sup>ème</sup> pot	30°C	48 h	E5

## 2. Analyses physico-chimiques

### 2.1. Mesure de pH

Après étalonnage dans des solutions tampons (pH 10 et pH 4), la détermination du pH se fait directement en plongeant l'électrode dans le yaourt contenu dans un bécher. La valeur du pH est obtenue par simple lecture sur l'écran du pH mètre.

### 2.2. Détermination de l'acidité titrable (dornic)

#### ➤ Principe

Le principe est basé sur l'étalonnage de l'acidité par l'hydroxyde de sodium (NaOH 0.9N) avec la présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré. Le but de cette analyse est de mesurer la quantité de l'acide lactique présente dans ce produit laitier.

#### ➤ Mode opératoire

A l'aide d'une seringue stérile, on a prélevé 10 ml du yaourt et dilué au ½ dans l'eau distillée, sont ajoutées quelques gouttes de phénolphtaléine est dosé le yaourt par la

soude NaOH 0.9N avec agitation de la solution jusqu'à l'obtention d'une couleur rose pâle persistant le volume de NaOH est notée. L'acidité a été exprimée en degré Dornic (1°Dornic correspond à 0,1 g d'acide lactique).

### 3. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques sont réalisées selon le protocole suivant :

#### 3.1. Préparation de dilutions

A l'aide d'un outil de prélèvement stérile on prend 10 ml d'échantillon dans un bécher contenant 10 ml de TSE (tryptone-sel-eau) puis transféré à un tube à essai. Cette suspension constitue alors la suspension mère (SM) de titre 1/2. Le tube de cette dernière a été agité par un Vortex, et avec un embout stérile de la micropipette on a prélevé 1ml de cette solution et on l'introduit dans un nouveau tube de diluant de 9ml de TSE, on obtient une dilution  $10^{-1}$  et ainsi de suite jusqu'au niveau de dilution  $10^{-5}$

#### 3.2. Ensemencement

L'ensemencement s'effectue en surface sur les milieux coulés dans les boîtes de Pétri. A l'aide de micropipette de 100  $\mu$ l on dépose 0.1 ml de la solution dans les boîtes de pétri préparées qui contiennent le milieu gélosé. On étale uniformément cet inoculum sur la gélose par des pipettes pasteur en forme d'un râteau.

#### 3.3. Recherche des germes de contamination

Les analyses effectuées dans cette étude ont portées sur les germes suivants :

##### 3.3.1. Recherche et dénombrement de la Flore Mésophile Totale ou germes totaux

Le milieu TSA (Trypticase soja agar) préalablement fondue et refroidie à 45°C a été coulée dans les boîtes de pétri. Après homogénéisation et solidification de la gélose, les boîtes sont ensemencées et incubées à 30°C pendant 48h à 72h.

### 3.3.2. Recherche et dénombrement des entérobactéries

Le dénombrement des entérobactéries a été fait sur le milieu Mac Conkey . Après l'ensemencement dans les mêmes conditions citées précédemment, les boites sont incubées à 37°C pendant 24h à 48h.

### 3.3.3. Recherche et dénombrement des staphylocoques

La gélose de Chapman ou gélose de MSA (Mannitol salt agar) est ensemencée comme citée précédemment, les boites sont incubées à 37°C pendant 24h à 48h.

### 3.3.4. Recherche et dénombrement des levures et moisissures

La gélose PDA (Potato dextrose agar) est ensemencée dans les mêmes conditions citées ci-dessus et incubée à 25°C pendant 5 jours.

## 3.4. Contrôle de l'air ambiant

Le contrôle microbiologique de l'air ambiant s'effectue par exposition de boites de pétri coulées avec le milieu de culture. Les boites sont exposées à différents endroits surtout ceux exposées aux courants d'air (**Adjidé, 2014**). Après exposition les boites sont refermées et mises à incuber à la température optimale du germe.

Les milieux de cultures utilisées pour ce contrôle sont TSA pour la flore totale et PDA pour les levures et moisissures.

## **4. Identification des bactéries isolées**

### **4.1. Les bactéries**

#### **4.1.1. Identification morphologiques**

##### **4.1.1.1. Caractères cultureux**

Cette étape de l'identification consiste en l'observation directe à l'œil nu, de l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieux de cultures après l'incubation. On peut ainsi déterminer l'aspect macroscopique des colonies (la forme, la taille, la consistance, la couleur, la régularité des contours).

##### **4.1.1.2. Morphologie cellulaire**

La détermination de l'arrangement des cellules, la morphologie et le type pariétale des isolats est réalisé par la technique de coloration de Gram sur des cultures jeunes à l'aide d'un microscope optique.

##### **➤ Coloration de Gram**

Le frottis fixé à l'aide de la chaleur (pendant une minute) est coloré au violet de Gentiane, laissé traiter une minute après lui recouvert par une solution de lugol et rapidement rincé.

La lame du frottis est ensuite passe par une étape de décoloration par l'alcool, on coule le solvant dessus pendant 30 secondes. La lame est inclinée jusqu'à ce que le colorant arrête de s'échapper du frottis après un lavage à l'eau distillé.

À cette phase, les cellules Gram (+) sont violettes et les cellules Gram (-) seront incolores.

On fait subir ensuite au frottis à une recoloration à la fushine pendant 1min afin d'obtenir une couleur rose des cellules à Gram (-), puis lavé à l'eau, séché à l'air et on

l'examine à l'objectif (objectif x 100) avec l'ajout de quelques gouttes d'huile à immersion (Singleton, 1999).

### 4.1.1.3. Conservation des souches

Les souches isolées ont été conservées à 4°C dans des tubes à essai contenant le milieu TSA incliné et sontensemencées sur la pente des tubes par des stries, puis incubées à 37°C pendant 24 h.

### 4.1.2. Identification biochimiques

#### 4.1.2.1. Test de catalase

Pour mettre en évidence la présence de la catalase une quantité appropriée de la culture bactérienne est déposée sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. Après quelques secondes, 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 (Gerhardt, 1994).

#### 4.1.2.2. Test d'oxydase

Le test d'oxydase repose sur la fabrication d'enzyme bleu d'indophénol par les organismes contenant du cytochrome oxydase. Pour former un composé bleu violacé cette enzyme oxyde un colorant redox (N.N-diméthyl-p-phénylènediamine) en présence de l'oxygène atmosphérique (Kohler et al., 2009).

Une pipette Pasteur est utilisée pour prélever une colonie à partir d'une culture jeuneensemencée sur le milieu de culture (Aslanzadeh, 2006). La colonie a ensuite été placée sur un disque d'oxydase, l'implication de l'enzyme oxydase chez la bactérie est indiquée par un changement de couleur vers le bleu violet foncé.

#### 4.1.2.3. Identification par galerie API 20 E

➤ **Préparation de la galerie**

- ✧ Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- ✧ Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ **Préparation de l'inoculum**

Prélever une colonie d'une souche pure et l'introduire dans 5ml d'eau physiologique stérile, en réalisant une suspension d'une D.O de 0,6 à 0,8 à 580 nm.

➤ **Inoculation de la galerie**

Avec la micro pipette introduire la suspension bactérienne dans les microtubes de la galerie. Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule, pour les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE créer une anaérobiose, en remplissant leur cupule d'huile de paraffine stérile et pour les autres tests remplir uniquement les tubes.

➤ **Incubation**

Incuber la boîte 24 heures à 37°C.

#### 4.1.2.4. Identification par galerie API Staph

La galerie API Staph est un système standardisé pour l'identification du genre *Staphylococcus*. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

- La préparation de la galerie et de l'inoculum est faite de la même manière que mentionner précédemment.

### ➤ **Inoculation de la galerie**

À l'aide d'une micropipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Medium ensemencé, conformément aux instructions contenues dans le guide de la galerie.

### ➤ **Incubation**

Incuber à 37°C pendant 24 heures.

La lecture de ces réactions obtenues dans les plaques API se fait à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

## **4.2. Les levures et moisissures**

### **4.2.1. Identification morphologique**

L'identification des levures et moisissures est essentiellement basée sur des traits cultureux (identification macroscopique) et morphologiques (identification microscopique).

#### **4.2.1.1. Caractères cultureux**

Après l'ensemencement de la souche pure sur un milieu spécifique, sa morphologie et ses caractéristiques de culture ont été déterminées. L'identification se fait à l'œil nu et repose principalement sur les caractéristiques suivantes :

- La texture des colonies.
- La couleur de la colonie (**Cahagnier et Richard-Molard, 1998**).

#### **4.2.1.2. Morphologie cellulaire**

Cette étude est basée sur l'examen microscopique qui permet de définir la forme, l'arrangement et le mode de reproduction végétative des cellules.

Afin de réaliser les observations microscopiques des levures et moisissures, il faut tout d'abord réaliser un montage entre lame et lamelle, pour ce faire on a utilisés les techniques de montage suivantes (**Techniques de montages ,2019**).

### ➤ **1ère technique**

- ✧ Déposer une goutte de liquide de montage : le bleu coton sur une lame propre.
- ✧ En travaillant près de bec bunsen pour éviter toute contamination, le matériel fongique est prélevé à l'aide d'une pince stérile et déposé dans la goutte de bleu de coton.
- ✧ Déposer la lamelle de verre au dessus du montage et appliquer une légère pression sur elle, afin de finaliser le montage et passer à l'observation microscopique.

### ➤ **2ème technique**

- ✧ Cette technique consiste à prélever dans les mêmes conditions que précédemment, un petit carré de gélose à l'aide d'une pince et déposer dans la goutte de bleu coton sur la lame.
- ✧ Une lamelle est disposée sur le matériel fongique, et au dessus de bec bunsen on recuit la gélose eu la faisant chauffer.
- ✧ Une légère pression est appliquée sur la lamelle pour finir le montage.

### ➤ **3 ème technique**

- ✧ À l'aide d'un ruban adhésif transparent et dans les mêmes conditions précédentes, un morceau de scotch est découpé et appliqué sur le matériel fongique avec une faible pression afin de le prélever.
- ✧ Le scotch est déposé ensuite la face adhésive vers le bas dans la goutte de bleu coton puis retourner.

- ✧ Une lamelle déposée au dessus du scotch avec une légère pression pour finaliser le montage et passer à l'examen microscopique.
- ✧ Cette technique s'est avérée la plus pratique et efficace, les préparations sont observées par un microscope optique à l'objectif (GX40).

### 5. Détermination du potentiel de formation du biofilm

Afin de déterminer le caractère persistant ou transitoire des contaminations bactériennes, la capacité des bactéries isolées, à former le biofilm a été évaluée *in-vitro*, sur des surfaces en verre et en polystyrène.

#### 5.1. Formation de biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits

La méthode au cristal violet décrit par O'Toole et *al.*, (2000) permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm, elle est basée sur le principe que le cristal violet se lie de manière proportionnelle à la biomasse du biofilm.

A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu TSB a une densité optique (D.O) comprise entre 0.6 -0.8, l'ensemencement à 1% se fait par l'ajout de 20µl dans 2ml le même bouillon de culture. Après une agitation des tubes en vortex, les puits d'une microplaque de 96 puits, en polystyrène sont inoculés avec 100 µl de suspension bactérienne dans chaque puits.

Les microplaques sont incubées par la suite pendant 24 heures à 37°C. Après incubation les puits sont lavés trois fois avec l'eau distillée. Les biofilms ainsi formés par l'adhésion des bactéries sessiles sont colorés avec du cristal violet.

#### 5.2. Formation de biofilm dans les tubes en verre

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par Christensen et *al* (1982).

A partir d'une culture de 18-24 heures, une colonie estensemencée dans de TSB puis incubé à 37°C pendant 24h. Les tubes sont lavés avec l'eau distillée puis séchés, chaque tube ensuite coloré par le cristal violet.

Lorsqu'un film visible recouvre la paroi et le fond du tube, la formation du biofilm est considérée comme positive.

### 5.3. Caractérisation microscopique de la formation de biofilms

#### 5.3.1. Adhésion et formation de biofilm sur des lames en verre

Des biofilms sont préparés selon la technique de **Maris (1992)** et colorés au cristal, selon le protocole établi par **Malek (2023)**.

Des lames de microscope en verre sont divisées en deux parties égales, chacune marquées en son centre par un carré de 2 cm, puis stérilisées et placées dans des boîtes de pétri stériles. Placer 100µl de l'inoculum préparé dans de l'eau physiologique stérile (cellules végétatives obtenues par centrifugation à 2000 g pendant 20 min) au centre d'un carré et 100µl de culture sur milieu TSB dans l'autre carré tracé sur la lame (**Figure 6**), et incubé les lames dans une étuve humidifiée pendant 2 h, pour laisser les cellules adhérer à la surface de la lame.

Après le temps d'incubation, les lames sont rincées 3 fois à l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules faiblement attachées, à l'aide de la micropipette, verser 100 µl du bouillon TSB dans chaque carré, et incubé à nouveau les lames à 37°C pendant 24 h en atmosphère saturée d'humidité.

#### 5.3.2. Coloration des biofilms et observation au microscope optique

Après incubation, les lames sont lavées par l'EDS puis séchées et colorées par la solution de cristal violet à 0,5% pendant 20 min, puis rincées et observées au microscope après l'ajout d'une goutte d'huile à immersion.



**Figure 6:** Adhésion et formation de biofilm sur les lames en verre.

## **Résultats et discussion**

## 1. Résultats des analyses physico-chimiques

Les résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur les échantillons du yaourt sont représentés dans le tableau 5.

**Tableau 5:** Mesure du pH et de l'acidité dornic des échantillons de yaourt.

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
<b>pH</b>	4,24	4.16	4.45	4.5	4.52	5.95	6.92
<b>Acidité (D°)</b>	90°D	92°D	93°D	103°D	95°D	25°D	18.3°D

D'après le tableau 5, les valeurs de pH du produit fini obtenues pour les échantillons E1, E2, E3, E4 et E5 sont similaires, et il est à noter que ces valeurs sont proches des normes (4.6 – 4.7) retenue par l'AFNOR (1986). Selon Luquet et Carrieu (2005), le pH du yaourt doit être inférieur à 4,6 dans certains pays, ce qui est cohérent avec nos résultats.

Pour l'échantillon E6 qui représente un produit semi fini (avant incubation), le pH de 5.95 est inférieur par rapport à celui du lait (E7). Cette diminution du pH est due à un début de fermentation lactique par les ferments ajoutés.

Concernant le lait de yaourt représenté par échantillon E7, le pH du mélange du lait et sucre est proche de la neutralité avec une valeur de 6.92.

A partir des résultats obtenus résumés dans le tableau 5 nous avons remarqué que les acidités titrables des échantillons E1, E2, E3 et E5 ont pratiquement les mêmes valeurs allant de 90°D jusqu'à 95°D, sauf E4 qui a une acidité un peu plus élevée (103°D) par rapport aux autres échantillons. Ceci est dû à leur incubation à 37°C pendant 48h, avant l'analyse, et qui aurait permis une certaine activité des ferments lactiques. Néanmoins, tous les échantillons sont conformes aux normes (75 -100) (AFNOR ,1983).

Selon l'AFNOR (1983), l'échantillon E7, qui avait une acidité titrable de 18,3°D, est conforme à la norme (16 – 18 °D).

Pour l'échantillon E6 l'acidité titrable (25°D) augmente par rapport à E7 après l'ajout de ferments lactiques, cette augmentation est due à la production progressive d'acide lactique par les bactéries fermentants (Luquet et corrieu, 2008).

## 2. Résultats des analyses microbiologiques

### 2.1. Résultats du dénombrement et isolement des souches

Les résultats des analyses microbiologiques des yaourts sont rapportés dans le tableau 6.

**Tableau 6:** Dénombrement de la flore de contamination du yaourt.

	<b>FMAT</b> N (ufc/ ml)	<b>Entérobactéries</b> N (ufc/ ml)	<b>Staphylocoques</b> N (ufc/ ml)	<b>Levures et moisissures</b> N (ufc/ ml)
<b>E1</b>	1,08 .10 <sup>6</sup>	Abs	Abs	8,2. 10 <sup>3</sup>
<b>E2</b>	6. 10 <sup>5</sup>	Abs	Abs	4,2. 10 <sup>5</sup>
<b>E3</b>	3.4. 10 <sup>5</sup>	Très faible	Très faible	2,06. 10 <sup>4</sup>
<b>E4</b>	1,42. 10 <sup>4</sup>	Abs	3,3. 10 <sup>4</sup>	1,32. 10 <sup>6</sup>
<b>E5</b>	4.7. 10 <sup>5</sup>	3.2. 10 <sup>5</sup>	8.7. 10 <sup>5</sup>	4.3. 10 <sup>5</sup>
<b>E6</b>	4,1. 10 <sup>5</sup>	8,2. 10 <sup>3</sup>	1,03. 10 <sup>4</sup>	4,5. 10 <sup>4</sup>
<b>E7</b>	7.7. 10 <sup>5</sup>	6. 10 <sup>3</sup>	6.7. 10 <sup>5</sup>	IND
<b>E8</b>	6.3. 10 <sup>5</sup>	/	/	1.59. 10 <sup>6</sup>

\*Abs : absence

\*E7 : Lait nonensemencé

\*IND : indénombrable

\*E8 : air ambiant

Le dénombrement des germes a été effectué sur les différents milieux afin de vérifier la charge microbienne des germes étudiés (FTAM, staphylocoques, entérobactéries, levures et moisissures) dans les échantillons. Après incubation, les boîtes contenant un nombre de colonies compris entre 15 et 300, 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.

Les résultats sont exprimés en ufc par (ml) de produit selon la formule suivante

**N** : nombre d'ufc/ml

$$N = n \cdot 1 / D \cdot V$$

**n** : nombre de colonies

**V** : volume de l'inoculum

**D** : facteur de dilution ou la dilution considérée

D'après le tableau 6, le nombre des germes totaux est important dans tous les échantillons. Pour E1, E2, E3, E4, E5 et E6 cette charge microbienne élevée notamment dans l'échantillon E1 ( $1,08 \cdot 10^6$  ufc/ml) peut s'expliquer par l'ajout des ferments qui sont des bactéries lactiques qui ont pu se développer sur le milieu TSA. Selon le **Ministère de l'économie et des Finances (2009)**, les bactéries lactiques dans le produit fini doivent être vivantes et présentes en abondance, ce qui correspond à nos résultats. Pour le lait non ensemencé (E7), la flore totale est également très élevée ( $7,7 \cdot 10^5$  ufc/ml), cette concentration fait référence à la contamination et à un mauvais assainissement ou à une pasteurisation inefficace (**Roberts et Skinner, 1983**). La grande charge microbienne dans l'air ambiant : E8 ( $6,3 \cdot 10^5$ ), peut s'expliquer, par une contamination aérienne dans l'atelier de production, ce qui peut affecter la qualité microbiologique du lait et des produits laitiers (**Radha et Nath, 2014**).

Les résultats obtenus pour les entérobactéries montrent l'absence totale de ces germes dans les échantillons E1, E2, E4 avec une très faible présence dans E3, ce qui est conforme à la norme recommandée par **J.O.R.A (2017)**. Par contre, la forte présence de ces bactéries dans E5, E6 et E7 indique un manque d'hygiène lors des

processus de fabrication (Salifou et al.,2013), ou le non-respect de la chaîne de froid durant le stockage et la distribution.

Concernant les *staphylocoques*, les résultats montrent une absence totale de ces germes dans E1 et E2, et une très faible présence dans E3, ce qui est conforme à la norme recommandée par J.O.R.A (2017). Alors que la présence de ces micro-organismes, dans le reste des échantillons E4, E5, E6, E7 est un indicateur de contamination par le personnel qui participant à la production et à la manipulation (Abdel hameed et Elmalt, 2009).

Cependant, la recherche et le dénombrement des levures et moisissures, montrent une très forte concentration dans tous les échantillons notamment dans l'air ambiant qui est représenté par E8 ( $1.59 \cdot 10^6$ ). Selon Moubasher et al (2018), l'air fait partie des principales sources de contamination des produits laitiers par les levures et les moisissures, ceci est cohérent avec nos résultats.

D'une manière générale, le stockage des échantillons du yaourts analysées aux différentes températures (25°C, 30°C, 37°C), a favorisé le développement des levures et moisissures, des staphylocoques et des entérobactéries respectivement, ce qui montre que toute élévation du température durant le stockage et la distribution du yaourt, favorise le développement de la flore de contamination appropriée.

L'analyse des différentes échantillons permis l'isolement de 19 souches bactériennes, qui ont fait l'objet d'une identification phénotypique et une caractérisation des propriétés d'adhésion et de formation des biofilms.

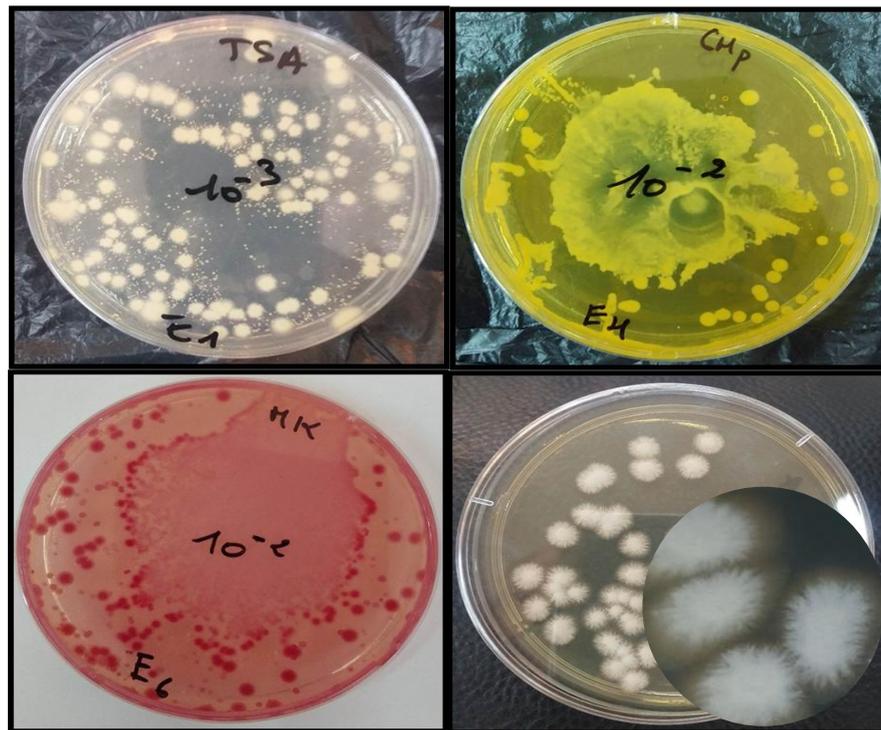
## 2.2. Résultats de l'identification phénotypique des bactéries isolées

### 2.2.1. Caractères cultureux

Les colonies obtenues ont été examinées tout d'abord macroscopiquement, leurs aspects ont été observés afin de déterminer leurs caractères cultureux (couleur, forme, taille, consistance et la régularité des contours) qui diffèrent d'un échantillon à l'autre.

Comme le montre la **Figure 7**, la contamination est homogène dans le même échantillon, un type morphologique dominant a été observé dans la même boîte de pétri, quels que soient le milieu de culture et les germes recherchés. Le milieu de culture, l'aspect des colonies peuvent orienter l'identification vers des taxons potentiels. On distingue:

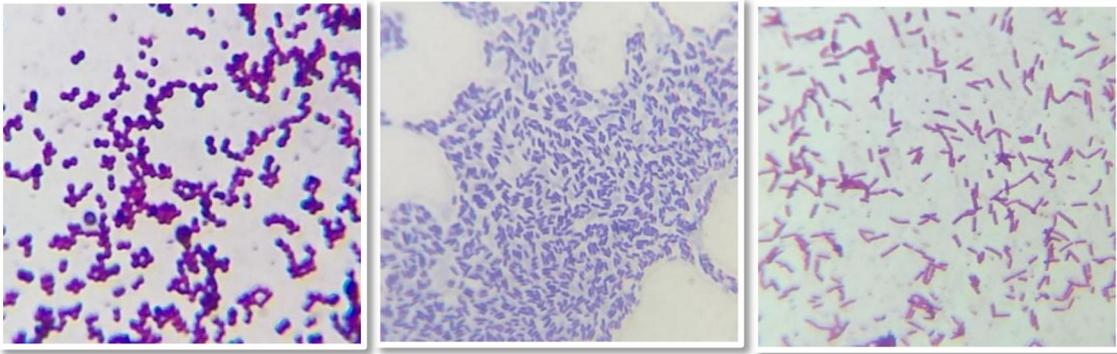
- Sur le milieu Mac conkey, on observe des colonies lisses, arrondies, limitées par un bord régulier, translucides, plates à centre ombiliquée, lactose positive ou négative, qui exprime les caractères généraux des *entérobactéries* et parfois de l'espèce *E. coli* (**Guiraud, 2003**).
- Sur le milieu Chapman, on observe des colonies lisses, ronde, bombée, mannitol positive ou négative, qui exprime les caractères généraux des *Staphylococcus* (**Abdel hameed et Elmalt, 2009**).
- Sur le milieu PDA, on observe des colonies filamenteuses aux contours de couleur beige-crème, d'aspect levuriforme, qui produit une grande quantité d'arthrospores qui exprime les caractères généraux de *Geotrichum candidum* (**Desmaures, 2014**).
- Sur le milieu TSA, on observe des petites colonies translucides, bombées, à bord régulier et des colonies opaques, bombées et à bord régulier qui exprime les caractères généraux des bactéries lactiques (**Ophélie et al., 2017; Bouhanna et Boussaa, 2017**).



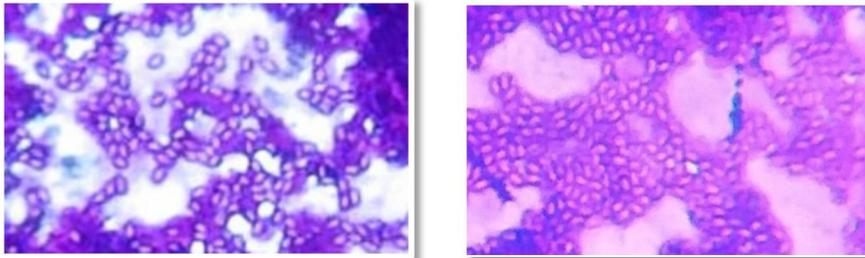
**Figure 7:** Aspect des colonies de la flore de contamination du yaourt sur les différents milieux de culture.

### 2.2.2. Caractères microscopiques

L'aspect microscopique des bactéries est observé après la coloration de Gram. Après la réalisation de la coloration de Gram, on est passé à l'observation microscopique (G X 100) avec l'addition de quelque goutte de l'huile à immersion. L'identification morphologique des isolats a permis d'obtenir 11 Cocci Gram + ,4 Bacille Gram -, 3 Bacille Gram + asporulés et une forme en bacille Gram + sporulés. Les figures suivantes montrent l'observation microscopique des cultures après coloration de Gram des souches (**Figure 8**) et des spores (**Figure 9**).



**Figure 8:** Observation microscopique des cultures après coloration de Gram (G  $\times$ 100).



**Figure 9:** Observation microscopique des spores après la coloration de Gram (G $\times$ 100).

L'observation microscopique a permis d'orienter les souches : S2, S3, S4, S5, S7, S9, S10 vers le genre *Staphylococcus* qui sont des cocci à Gram positif, catalase+, non sporulés, regroupés en amas sous la forme de grappe de raisin, (**Brisabois et al., 2016**).

La souche S11 est orienté vers le genre *Bacillus* constitué de bâtonnets à Gram positif, catalase positive et produisant des spores centrales ou terminales (**Granum et Lindbäck, 2013**).

Les souches S8, S15, S16, S18 et S19 sont orientées vers la famille des entérobactéries, qui sont des bacilles Gram négatif, oxydase négative (**Terkja, 2014**).

### 2.2.3. Caractères biochimiques

#### 2.2.3.1. Les enzymes respiratoires

Toutes les souches testées possèdent l'enzyme catalase, dont la présence se manifeste par un dégagement de bulles d'air, dès leur contact avec l'eau oxygénée (**Figure 10**). Ces résultats confirment l'orientation des souches S2, S3, S4, S5, S7, S9, S10 vers le genre *Staphylococcus* qui est caractérisé par la forme cocci à Gram + et catalase +.

Toutes les souches isolées sont oxydase négative, et ne possèdent pas l'enzyme cytochrome C oxydase (**Figure 10**). Ces résultats confirment ainsi l'orientation des souches S8, S15, S16, S18 et S19 vers la famille des *entérobactéries* (bacille Gram - et oxydase -).



**Figure 10:** Résultats des tests des enzymes respiratoires. A droite oxydase négative, à gauche catalase positive.

#### 2.2.3.2. Détermination des biotypes

##### ➤ Galerie API 20 E

L'identification bactérienne réalisée par galerie API 20E nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des quatre souches. S14, S15, S16, S19.

##### ✧ Biotype de la souche S14 : *Enterobacter aerogenes* (Tableau 7)

*E. aerogenes* est une bactérie à Gram négative, elle appartient au genre *Enterobacter*. Cette bactérie est l'une des coliformes qui sont responsables du

développement d'altérations répréhensibles dans le lait cru et les produits laitiers non pasteurisés, leur nombre élevé dans ces aliments indique une mauvaise hygiène. Ces bactéries causent occasionnellement des maladies d'origine alimentaire (Fathi et al., 2019).

Table 7: Détermination du biotype de la souche S14 par galerie API 20 E.

Test	O	A	L	O	C	H	U	T	I	V	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A
	N	D	D	D	I	2	R	D	N	P	E	L	A	N	O	H	A	E	M	R
	P	H	C	C	T	S	E	A	D		L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A
	G																			
Résultat	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobac aerogenes</i>																				

❖ **Biotype des souches S15 et S16 : *Serratia fonticola* (Tableau 8)**

*S. fonticola* est un membre de la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette bactérie peut survivre dans différents environnements, notamment dans l'eau potable, le sol, les eaux usées, le lait et les produits laitiers avec une température de croissance minimale de 2°C. Elle se trouve couramment chez les animaux et provoque rarement des maladies chez les humains (Hai et al., 2020).

Table 8: Détermination du biotype des souches S15 et S16 par galerie API 20 E.

Test	O	A	L	O	C	H	U	T	I	V	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A
	N	D	D	D	I	2	R	D	N	P	E	L	A	N	O	H	A	E	M	R
	P	H	C	C	T	S	E	A	D		L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A
	G																			
Résultat	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia fonticola</i>	 <p>The image shows an API 20 E test strip for <i>Serratia fonticola</i>. The strip contains 20 microtubes, each with a different color and reaction. The reactions are: ONPG (yellow), ADH (red), LDC (yellow), ODC (red), CIT (blue), H2S (yellow), URE (yellow), TDA (yellow), IND (yellow), VP (yellow), GEL (black), GLU (yellow), MAN (yellow), INO (yellow), SOR (yellow), RHA (yellow), SAC (yellow), MEL (yellow), AMY (yellow), and ARA (yellow).</p>																			

✧ **Biotype de la souche S18 : *Kluyvera spp* (Tableau 9)**

*Kluyvera spp* sont des bacilles à Gram négatif. Ce genre colonise principalement les voies respiratoires, gastro-intestinales, l'eau, les eaux usées, le sol, le lait et les produits laitiers, les vaches ayant été signalées comme sources environnementales. Ce qui indique que *Kluyvera spp* est largement distribué. Le profil biochimique de cette bactérie est semblable à celui d'autres entérobactéries (Yoshino et al., 2016)

Table 9: Détermination du biotype de la souche S18 par galerie API 20 E.

Test	O	A	L	O	C	H	U	T	I	V	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A
	N	D	D	D	I	2	R	D	N	P	E	L	A	N	O	H	A	E	M	R
	P	H	C	C	T	S	E	A	D		L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A
	G																			
Résultat	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Kluyvera</i> <i>spp</i>																				

➤ **Galerie API Staph**

L'identification bactérienne réalisée par galerie API Staph nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des trois souches. S8, S9, S13.

✧ **Biotype de la souche S8 : *Micrococcus* spp (Tableau 10)**

*Micrococcus* spp appartient à la famille des *Micrococcaceae* taxonomiquement. Ces bactéries sont Gram positives, catalase positives et se présentent sous forme sphériques régulière. Les microcoques pénètrent dans le lait et les produits laitiers à partir de sources telles que les pis des vaches, les ustensiles de laiterie, les trayeuses, l'air et la poussière. Plusieurs rapports indiquent que la principale source de microcoques dans le lait et les produits laitiers est le pis de l'animal. *Micrococcus* domine la communauté microbienne du lait cru provenant de mamelles obtenues de manière non aseptique. Bien que les microcoques soient abondants dans le lait cru et les produits laitiers à base de lait cru, ils ont également été signalés dans le lait pasteurisé et les produits laitiers à base de lait pasteurisé. En effet, certains

microcoques ont été signalés comme étant de nature thermotolérante et survivent à la pasteurisation (Tarun et Elmer ,1990).

Table 10 : Détermination du biotype de la souche S8 par galerie API Staph.

<b>Test</b>	0	G	F	M	M	L	T	M	X	M	N	P	V	R	X	S	M	N	A	U
		L	R	N	A	A	R	A	L	E	I	A	P	A	Y	A	D	A	D	R
		U	U	E	L	C	E	N	T	L	T	L		F	L	C	G	G	H	E
<b>Résultats</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>Micrococcus spp</b>																				

✧ **Biotype de la souche S9 : Staphylococcus xylosus (Tableau 11)**

*S. xylosus* est une espèce de bactéries appartenant au genre *Staphylococcus*. C'est une espèce commensale de la peau humaine et animale. *S. xylosus* occupe une place spéciale parce qu'elle est souvent isolée des viandes, des produits laitiers et des milieux agricoles. Sa capacité à former des biofilms sur des surfaces non vivantes peut expliquer sa persistance dans ces derniers (Sdibe et al.,2022).

✧ **Biotype de la souche S13 : Staphylococcus aureus (Tableau 12)**

*S.aureus* est un pathogène polyvalent chez l'homme et l'animal, qui peut être transmis à l'homme par le lait et le produits laitiers contaminés et non traités. Ce germe se présente sur la peau et les muqueuses des animaux et il est fréquemment associé à une mammite entraînant la contamination des produits laitiers. Cette bactérie est capable d'exprimer une variété de facteurs de virulence et est donc considérée

comme médicalement pertinente lorsqu'elle est rencontrée dans les produits laitiers. Les opérations de traite, y compris le stockage, la manutention et le transport, sont considérées comme des points critiques qui contaminent les produits laitiers par cette bactéries (Sasidharan *et al.*, 2011).

Table 11: Détermination du biotype de la souche S9 par galerie API Staph.

<b>Test</b>	0	G	F	M	M	L	T	M	X	M	N	P	V	R	X	S	M	N	A	U
		L	R	N	A	A	R	A	L	E	I	A	P	A	Y	A	D	A	D	R
		U	U	E	L	C	E	N	T	L	T	L		F	L	C	G	G	H	E
<b>Résultats</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	?	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus xylosus</i>																				

Table 12: Détermination du biotype de la souche S13 par galerie API 20 Staph.

<b>Test</b>	0	G	F	M	M	L	T	M	X	M	N	P	V	R	X	S	M	N	A	U
		L	R	N	A	A	R	A	L	E	I	A	P	A	Y	A	D	A	D	R
		U	U	E	L	C	E	N	T	L	T	L		F	L	C	G	G	H	E
<b>Résultats</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	?	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>																				

### 3. Résultats de l'identification morphologique des levures et moisissures

L'aspect macroscopique et microscopique (après coloration au bleu coton) des levures et moisissures observés sont présentés dans le tableau 13. Les levures et moisissures sont fréquemment décrits comme des contaminants du lait, des produits dérivés et de l'environnement laitier (**Moubasher et al, 2018**). La diversité morphologique trouvée dans la flore de contamination du yaourt et de l'air ambiant analysé, pouvait orienter l'identification vers les genres produisant des ascospores (*Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*), fréquemment identifiées dans le lait cru, ou des filaments donnant naissance à des arthrospores tel que *Trichoderma*. (**Callon et al., 2006**). La dominance de *Geotrichum* dans certains échantillons de yaourt est remarquable.

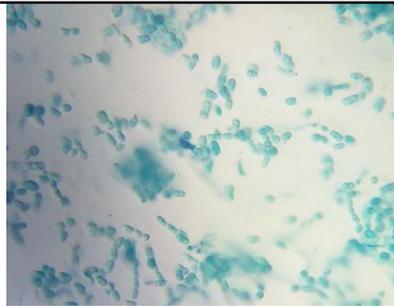
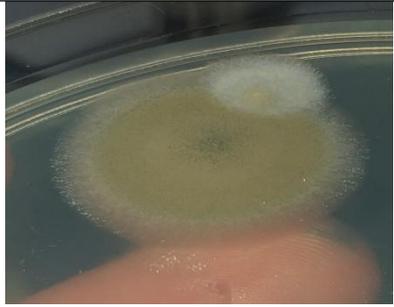
### 4. Résultats de la caractérisation des biofilms bactériens

Dans les entreprises agroalimentaires, la formation des biofilms sur les équipements est un indice de la persistance des contaminations suite à de mauvaises conditions d'hygiène.

#### 4.1. Caractérisation des biofilms dans les microplaques de titration en polystyrène

Après 24 heures d'incubation des microplaques à 37°C, nous avons observé un trouble même dans les puits contenant seulement le témoin qui est le milieu TSB comme tous les autres puits de la microplaque. La coloration des puits au cristal violet montre que toutes les souches indépendamment de leur origine, ne forment pas de biofilms, alors qu'elles ont été capables de former des biofilms sur les lames en verre comme observé au microscope.

**Table 13 :** Diversité morphologique des levures et moisissures isolées du yaourt et de l'environnement laitier.

Aspect macroscopique	Aspect microscopique (GX40)	Position taxonomique potentielle
		<i>Geotrichum candidum</i> (des colonies blanches et feutrées , d'aspect filamenteux, produisent des Arthrospores)
		<i>Geotrichum candidum</i> (des colonies blanches et feutrées , d'aspect filamenteux, produisent des Arthrospores)
		Champignons filamenteux (hyphe et ascospore : <i>Mucor</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> )
		<i>Trichoderma sp</i> (ou un genre voisin de <i>Géotrichum</i> , à cause des bords dentelés levuriforme)

Nous avons répété la technique des microplaques trois fois et chaque fois nous rencontrons le même problème de contamination, telle que montré par le témoin. Afin de découvrir la source de contamination, nous avons précédé à l'incubation du milieu TSB stérilisé, non ensemencé et des plaques contenant le bouillon stérilisé non ensemencé. La croissance observée dans les puits, après 24 h d'incubation, alors que le milieu est resté transparent dans le tube, indique clairement que la source de contamination est représentée par les microplaques de titration en polystyrène.

### 4.2. Caractérisation des biofilms dans les tubes en verre

Cette méthode présente une technique classique décrite par **Christensen et al (1982)**, pour détecter la formation de biofilm, en se basant sur l'observation visuelle de l'adhérence des cellules à une surface lisse, qui est évaluée par une simple indication de présence ou d'absence. Après une période d'incubation de 24h à 37°C et après coloration, nous avons observé que la plupart des souches présentaient une faible adhérence, se traduisant par la formation d'un film à peine visible à la surface interne des tubes à hémolyse. Comparativement aux autres souches, la souche S6 a démontré une forte adhérence sous forme d'anneau sur les parois du tube à l'interface, comme le montre la **Figure 11**.

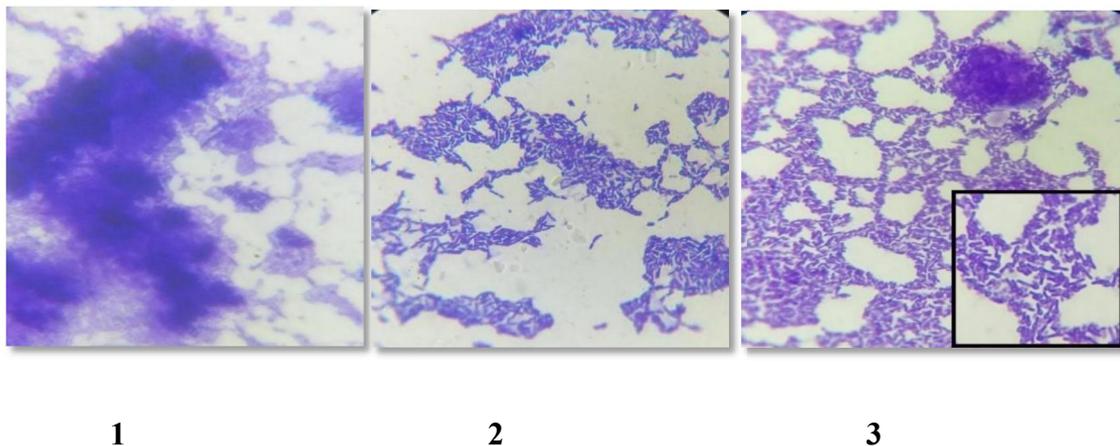


**Figure 11:** Biofilms formés dans les tubes en verre et colorés au cristal violet.

Après l'ajout de solution dissolvante et la mesure de la DO, on peut conclure que la souche 6 est considéré comme une bonne formatrice de biofilm, et la souche 5 considéré comme productrice moyen de biofilm. Les autres souches sont faiblement productrices de biofilm.

### 4.3. Caractérisation microscopique de la formation de biofilm

Les observations microscopiques des biofilms formés sur les lames en verre colorées au cristal violet et illustrées dans la **Figure 12**, montrent des différences dans la morphologie du biofilm et leurs stades de développement. Le biofilm important de la souche 6 (Image 1) était en phase de dispersion active, indiquant le grand potentiel et la rapidité du processus de formation du biofilm. Il est possible de visualiser une cavité formée au centre du biofilm, signe d'une dispersion selon le mode décrit pour les structures en forme de champignon (**Malek, 2016**). La souche 19 (image 2) formant un biofilm au début de leur développement, ce qui traduit un processus d'adhésion et de croissance du biofilm plus lent que celui de la souche S6. Nous avons également observé une dispersion dans l'image 3 où les spores apparaissent, dans les zones profondes après rupture du biofilm. Ces données traduisent un grand potentiel de formation du biofilm chez les souches testées. La dispersion active a une grande signification en hygiène alimentaire, puisqu'elle est responsable de la recontamination du produit fini ou contamination croisée (**Malek, 2019**).



**Figure 12** : Observation au microscope optique des biofilms formés sur des lames en verre après coloration au cristal violet.

## **Conclusion et perspectives**

L'évaluation de la qualité microbiologique du yaourt analysé a été réalisée à travers plusieurs étapes. L'analyse de quelques paramètres physico-chimiques (pH, et acidité), l'analyse microbiologique a porté sur l'isolement de différentes flores microbiennes, sur des milieux de culture appropriées (TSA, Chapman, Macconkey et PDA). L'identification a porté sur l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques des isolats bactériennes et des caractères morphologiques des isolats fongiques. La dernière étape de cette caractérisation consiste au détermination du potentiel d'adhésion et de formation de biofilm par les souches bactérienne isolées.

D'après les analyses physico-chimiques, tous les échantillons sont conformes aux normes. Cependant, les résultats des analyses microbiologiques du yaourt ont révélé la présence d'une flore microbienne variée, composée essentiellement par des bactéries à Gram+. L'aspect microscopique de dix-neuf souches a permis d'obtenir 11 Cocci Gram +, 4 bacille gram + et 4 bacille gram - capables de croître à 37°C. Les 4 bacilles Gram- et oxydase- sont identifiés par Galerie API 20E à *Enterobacter aerogenes*, *Serratia fonticola* et *Kluyvera* spp. La Galerie API Staph a permis d'identifier 3 cocci Gram+ et catalase+ à *Micrococcus* spp, *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus aureus*. D'autre part, l'étude des levures et moisissures a mis en évidence une diversité morphologique, sur le plan cultural et microscopique. La dominance de la levure *Geotrichum candidum* dans les échantillons de yaourt incubés à 25 et 30°C est remarquable. Les conséquences de le non-respect de la chaîne de froid durant le stockage favorisent la croissance des levures et des moisissures.

A l'exception de la souche 6, toutes les suches bactériennes isolées sont caractérisées par une faible capacité de formation de biofilms, se traduisant par la formation d'un film à peine visible à la surface interne des tubes à hémolyse. Ces résultats sont en faveur du caractère non persistant de ces bactéries, dont la source de contamination ne peut pas être uniquement des équipements mal nettoyés. La matière première est la première source de contamination. Les autres sources de contamination potentielle sont les équipements laitiers, l'air ambiant et le personnel de la laiterie

Pour prévenir la qualité microbiologique du yaourt, les fabricants doivent suivre des bonnes pratiques de fabrication BPH, et les bonnes pratiques d'hygiène BPH tels que le nettoyage et la désinfection régulière des équipements, la formation adéquate du personnel sur les mesures d'hygiène, le contrôle strict des conditions de stockage. Les autorités sanitaires et les organismes de réglementation jouent également un rôle important dans la surveillance de la sécurité alimentaire et l'application des normes de qualité.

Les perspectives de ce travail doivent porter sur les aspects suivants

- Une identification rigoureuse des champignons en particulier les levures du genre *Geotrichum*, dont la source de contamination précise reste à déterminer.
- Un meilleur contrôle de la contamination fongique en utilisant des agents actifs sur le développement des champignons (des conservateurs, des produits de nettoyage, désinfectants).
- La mise en place d'une démarche assurance de qualité telle que le système HACCP, et la formation du personnel aux BPF et BPH.

## **Références bibliographiques**

1. **Abdel hameed, K. G. et Elmalt, M. L. (2009)** Public health hazard of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and ice cream in Qena governorate. *Assiut Vet. Med. J.* 55 (121), 191-200.
2. **Adeline picot. (2019, 26 février)**. Techniques de montages pour observation microscopiques des moisissures [vidéo en ligne]. Repéré à <https://youtu.be/OWkAZq3I4MQ>
3. **Adjidé, C.C. (2014)**. Maîtrise du risque infectieux associé aux soins Prélèvements d'air & des surfaces: quand, comment, interprétation et actions correctives. *ASPEC CHU Amiens*.p:58
4. **AFNOR. (1986)**. Recueil des normes françaises. Lait et produits laitiers. Méthodes d'analyses
5. **Afzali, S., Edalatian Dovom, M. R., Habibi Najafi, M. B., & Mazaheri Tehrani, M. (2020)**. Determination of the anti-yeast activity of *Lactobacillus* spp. isolated from traditional Iranian cheeses in vitro and in yogurt drink (Doogh). *Scientific reports*, 10(1), 6291. doi.org/10.1038/s41598-020-63142-0.
6. **Al-ashmawy, M. A., et Ibrahim, J. I. (2009)**. Influence of potassium sorbate on the growth of yeasts and moulds in yogurt. *International journal of dairy technology*, 62(2), 224-227.
7. **Amellal-Chibane, H. (2008)**. Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes : formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé (Thèse de doctorat). Université BOUMERDES.
8. **Asperger, H., 1994**. *Staphylococcus aureus*. Dans : *The Significance of Pathogenic Microorganisms in Raw Milk*, International Dairy Federation. IDF : 24-42. Brussels, Belgium.
9. **Aswal, P.A., Shukla,S., Priyadarshi. (2012)**. Yoghurt: preparation, characteristics and recent advancement. *Cibtech journal of Bio-Protocols* ISSN, 1(2), 34-44.
10. **Ayar, A., Gurlin, E. (2014)**. Production and sensory, textural, physicochemical properties of flavored spreadable yogurt. *Life Science Journal*, 11(4), 58-65.
11. **Béal, C ., Helinck,S. (2019)**. Fabrication des yaourts et des laits fermentés.

- Techniques de l'Ingénieur. F6315 .ffhal-03519802ff..
12. **Benmammar , M ., Kouar , N., Kahil ,W.(2016).** Évaluation de la qualité physico-chimique et microbiologique du yaourt en fonction des conditions de conservation (Mémoire de master) . Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.
  13. **Billon P. et Sauve O. (2009).** Traite des vaches laitières.( 3e éd, p. 555 ) France: Editions France Agricole.
  14. **Bouchara, J. et al. (2010).** Les levures et levuroses - Cahier de formation - Biologie médicale.
  15. **Bouhanna, I.,Boussaa ,A. (2017).** Les bactéries lactiques, isolement et application dans la technologie laitière P4-9-21-22.
  16. **Bourlioux, P., Braesco, V. et Denis Mater, D.G. (2011).** Yaourts et autres laits fermentés. Cahiers de nutrition et de diététique, 46(6), 305-314.
  17. **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.
  18. **Cahagnier B., Richard-Molard D. (1998).** Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, P : 140-158.
  19. **Callon,C., Delbès,C., duthiot,F. and Monthel,M.C.(2006).**Application of SSCP – PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk salers cheeses.systematic and applied Microbiology , 29 ,172-180.
  20. **Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., et Beachey, E.D. (1982).** Adherence of coagulase –negative Staphylococci to plastic tissue culture plates, a quantitative model for adherence of Staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology, 22(6): 996-1006.
  21. **Christieans ,S. et Zagorec, M. (2013).** Flores protectrices pour la conservation des aliments.(1e éd .,p. 52). Editions Quae.
  22. **Das, K., Choudhary, R., & Thompson-Witrick, K. A. (2019).** Effects of new technology on the current manufacturing process of yogurt-to increase the overall

- marketability of yogurt. *Lwt.* 108, 69-80..doi : 10.1016/j.lwt.2019.03.058.
23. **Delacharlerie, S., de Biourge, S., Chèné, C., Sindic, M et Deroanne, C. (2009).** HACCP organoleptique, Guide pratique. Edition : Presses Agronomiques de Gembloux, p 172.
  24. **Delorme, C. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International journal of food microbiology* ,126(3), 274-277.
  25. **Desmaures, N. (2014).** CHEESE Mold-ripened varieties p409-415. In Tortorello ML (ed), *Encyclopedia of Food Microbiology* 2nd ed doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00060-4. Academic Press, Oxford.
  26. **Dias ,P.G., et Rathnayaka ,R.M.(2019).** Alteration of Quality Attributes in Yogurts as a Function of Natural Fibers Incorporation. *Elixir Food Science* 131, 53231-5323. doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.001.
  27. **Fathi .SS, Mohamed. A, Magdy .SH., El- Sayed.,El.(2019).** Coliforms Contamination in Raw Milk and Some Dairy Products with Special Reference to Comparative Identification of *Enterobacter* spp. *Zag Vet J.* 2019; 47(4): 388-397.
  28. **Flint S.H., Bremer P.J., Brooks J.D. (1997).** Biofilms in dairy manufacturing plant- description, current concerns and methods of control. *Biofouling. The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research.* 11(1) , 81-97.
  29. **Gahruie, ., Eskandari, MH. Mesbhai, G. Hanifpour, MA. (2015)** Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. *Food Science and Human Wellness* 4 .p1-8.
  30. **Garcha ,S. (2018).** Control of Food Spoilage Molds Using *Lactobacillus Bacteriocins*. *J Pure Appl Microbiol* ,12(3) , 1365-1373. doi: 10.22207/JPAM.12.3.39.
  31. **Garnier L, Valence F, Pawtowski A, Auhustsinava-Galerie L, Frotté N, Baroncelli R, Deniel F, Coton E, Mounier J.(2017).** Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int J Food Microbiol.* doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026. Epub 2016 Oct 21. PMID: 27794247.
  32. **Gerhard, R. (1994).** *Microbiologie de lait science et technologie de lait.* Ecole polytechnique de Montréal.

33. **Ghafir Y. et Daube G. (2007)**. Le point sur les méthodes de surveillance de la contamination microbienne des denrées alimentaires d'origine animale. *Ann. Méd. Vét*, 151 ,79-100.
34. **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.
35. **Guergour, K., Maache,B.(2021)**. Recherches des flores contaminantes dans le yaourt entrepose dans les commerces de la ville de Guelma (Mémoire de master). Université 8 mai 1945 Guelma.
36. **Guiraud,J.P. (2003)**. Microbiologie alimentaire : Analyse bactériologique des aliments et toxi-infections alimentaires.2ème édition.Paris: Dunod, 651p. ISBN:2100072595.
37. **Guy, FI. (2006)**. Elaboration d'un guide méthodologique d'intervention lors de contaminations par les salmonelles de produits laitiers au lait cru en zone de productions fromagères AOC du massif central. (Thèse de doctorat , université Paul-Sabatier de Toulouse, France , p17).
38. **Hai,P.D., Hoa, L.T.V., Tot,N.H.,L Phuong ,L.,Thuyet ,B.T., Son,P.N., et Quang, V.V.(2020)**. First report of biliary tract infection caused by multidrug-resistant *Serratia fonticola*.*New Microbes and New Infections*,36,100692.
39. **Hamiroune M., Berber A., Boubekour S. (2014)**. Qualité bactériologique du lait cru impact sur la santé publique. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 158: 137-144.
40. **J.O.R.A. n°39 du 02 juillet, ( 2017)**).Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.
41. **Jay, J.M. (2000)** . *Modern Food Microbiology*. (6e éd., p.635). Edition, Aspen Publishers, Gaithersburg.
42. **Jayanthi,A., et Chatterjee,A . (2017)**. Microbial Contamination, Prevention, and Early Detection in Food Industry. doi. 10.1016/B978-0-12-811515-2.00002-0.
43. **Kaur, R., Kaur, G., Mishra, S. K., Panwar, H., Mishra, K. K., & Brar, G. S.**

- (2017). Yogurt: A nature's wonder for mankind. *International Journal of Fermented Foods*, 6(1), 57-69.
44. **Kohler, C.Musser, D.J. et Dumas, N.B. (2009)**. Identification of aerobic Gram negatif bacteria. In Goldman E. et Green L.H. (editurs). *Practical Hand Book of Microbiology*. CRC press Taylo et Francis Group NY, USA. p 67.
45. **Aslanzadeh, (2006)**. Biochimical profile-based microbial identification system. Assessment related to microbial food contamination. *Revue d'Epidemiologie*.
46. **Konieczny, P ., Cegielska-Radziejewska, R ., Mroczek-Krzyżelewska, E et Dziejic, J. (2016)**. Analysis of air quality in selected areas of a poultry processing plant with the use of a microbiological air sampler. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* , 18, 401-406.doi: 10.1590/1806-9061-2015-0156.
47. **Lamontagne, M. (2002)**. Produits laitiers fermentés : In *Science et technologie du lait* (2e éd).Paris, France : Lavoisier.
48. **Lannabi, I., Sal, A. (2015)**. Analyse microbiologique d'un produit laitier (Yaourt) ; enquête alimentaire (Mémoire de master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri ,Constantine .
49. **Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., et Labrie, S. (2012)**. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy science & technology*, 92(5), 455–468. doi.org/10.1007/s13594-011-0051-4.
50. **Luquet F.M., Carrieu, G. (2008)**. Bactéries lactiques et génétique au ferment. . Ed. Lavoisier, Tec et Doc. Paris. 307 -763p.
51. **Luquet, F.M. et Carrien, G. (2005)**. Bactéries lactiques et probiotiques .Collection sciences et techniques agroalimentaires. Techniques et docine, itatio, Lavoisier Ed. Paris. 307.
52. **Maha, A.I., J. Guilal, A. Hamama, B. Saidi, M. Zahar. (2016)**. Identification des bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The International Journal of Multi-disciplinary Sciences*. 1: 81-94.
53. **Mahi, M. (2010)**. Etude technologique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de Berbis.Microbiologie Alimentaire (Thèsee de doctorat). Université d'Oran.

54. **Makhloufi, K. M. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza (Thèse de doctorat). Université de pierre et marie curie.
55. **Malek F. (2016).** Evaluation of a non-submerged cultivation assay combined to ESEM imaging for analysis of biofilms formed by dairy-associated sporeforming bacteria. *African journal of Microbiology research*. 10 : 1263-1273.
56. **Malek, F. (2019).** Bactéries sporulées et biofilms : Un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombinaison pasteurisé. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(6):405-420. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0435>.
57. **Malek, F. (2023).** Microorganism carrier-surface method as an efficient model for microscopic characterization of biofilm structure and dispersion in dairy-associated spore-forming bacteria. *Journal of food engineering and technology*,12(1), 21-28.
58. **Malek, F., Moussa-Boudjema, B., Khaouani-Yousfi, F., Kalai, A. et Kihal, M. (2012).** Microflora of biofilm on algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. *African Journal of Microbiology Research* 6 (17):3836-3844.
59. **Maris , M. (1992).** Biofilm and disinfection of microorganism carrier-surface method. *Science des aliments*,12, 721-728.
60. **Marty-Teyesset, C.,De la Torre, F. et Garel, J.R. (2000).**Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* sPP bugaricus upon aeration: involvement. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 262-267.
61. **Meghazi , N. (2011).**Activité antifongique de quelques huiles essentielles sur les moisissures du blé stocké (Mémoire de magistère). Ecole Nationale Supérieure Agronomique.Alger.
62. **Ministère de l'Economie et des Finances, (2009).** Spécifications techniques de l'achat public lait et produits laitiers. Paris France : OEAP.
63. **Mohammed A. S. and Abdullahi, M. (2015).** Comparative study of microbial quality of hawked nono and packaged yogurt sold in Bida. *Specialty Journal of Psychology and Management* 1(1),1-4

64. **Moreira, S.R., Schwan,R.F.,Pinheiro de Carvalho, E., et Wheals,A.E.(2001)** . Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* , 32 ,117-122 .
65. **Moubasher , AA., Abdel-Sater , .M.A. et Soliman, Z.S.M. (2018).**Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt.*Journal De Mycologie Médicale* .doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.003.
66. **Nielsen, L., Rolighed, M., Buehler, A., Knöchel, S., Wiedmann, M., & Marvig, C. (2021).** Development of predictive models evaluating the spoilage-delaying effect of a bioprotective culture on different yeast species in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 104(9), 9570-9582.
67. **Ntuli, V., Elegbeleye, J., Buys, E., Mugadza, D., Seifu,E., Sibanda, T. (2022).** Dairy production: microbia l safety of raw milk and processed milk products. *Present Knowledge in Food Safety,Academic Press,2023,P:* 439-454. doi.org/10.1016/B978-0-12-819470-6.00076-7.
68. **O’Toole, G. A., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000).**Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology*, 54, 49- 79.
69. **Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020).** Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(2), 311–331.doi.org/10.1111/1541-4337.12526.
70. **Ophélie, U., Sylvain,D., Maira, J., Yvonne, R. , Annie, D.M.et Stéphanie ,B.D.(2017).**Streptococcus thermophilus: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate?. *Journal of functional foods*,37,74-89.doi:10.1016/j.jff.2017.07.038.
71. **Pal, M., Seid, H., Karanfil, O. and Woldemariam, T. (2013).** Importance of microbial films in food processing plants. *Beverage and Food World* 40 , 49-50.
72. **Pal, M., Tefera, M., Tasew, A., Jergefa, T., Deressa, A. (2015).** Hygienic and Microbial Quality of Yoghurt. *Beverage and Food World*. 42, 25-27.
73. **Pei ,X., Tekliye ,M. et Dong ,M. (2021)** . Isolation and identification of fungi found in contaminated fermented milk and antifungal activity of vanillin .*Food*

- Science and Human Wellness 10 (2021) , 214-220 .  
doi :.org/10.1016/j.fshw.2021.02.011.
74. **Pissang, T. D. (1992).** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique Des laits et produits laitiers commercialisée au Tego.Thèse : Med. Vet. : Dakar(EISMV) ; 9.
75. **Radha, K. et Nath ,L. (2014).** Studies on the air quality in a dairy processing plant. Ind. J. Vet. & Anim. Sci. Res., 43 (5) , 346 - 353.
76. **Roberts, T.A. et Skinner, F.A. (1983)** . Food Microbiology: advances and prospects. London: Academic Press.
77. **Salifou ,C.F.A. , .Boko ,K.C. , Ahounou , G.S. , Tougan , P.U. , Kassa ,S.K. , Houaga , I. , Farougou , S. , Mensah , G.A. , Clinquart , A. et Youssao ,A.K.I. (2013).**Diversité de la microflore initiale de la viande et sécurité sanitaire des consommateurs.International. Journalof. Biological and. Chemical. Sciences. 7(3) ,1351-1369 . doi.org/10.4314/ijbcs.v7i3.41.
78. **Sasidharan, S., Prema, B., et Yoga, L. L. (2011).** Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 1(2), 130–132. doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60010-5.
79. **Savaiano, D. A., et Hutkins, R. W. (2021).**Yogurt, cultured fermented milk, and health: A systematic review. Nutrition reviews. 79(5), 599-614.doi: 10.1093/nutrit/nuaa013.
80. **Shi, C., et Maktabdar, M. (2022).** Lactic acid bacteria as biopreservation against spoilage molds in dairy products–A review. Frontiers in microbiology, 12, 4283.
81. **Shori, A. B. (2020).** Inclusion of phenolic compotmds from different medicinal plants to increase a-amylase inhibition activity and antioxidants in yogurt. Journal of Taibah University for Science, 14(1), 1000-1008.
82. **Sidibe, M. , Napo, A. , Dembele, A. , Kassogué, O. , Diallo, O. , Dembele, D. , Togo, M. , Koita, K. , Coulibaly, A. , Konaté, A. , Traore, J. , N'Diaye, F. , Thera, J. and Traore, L. (2022)** . *Staphylococcus xylosum* Isolation of Conjunctival Secretions in an 8-Year-Old Child at Sikasso Hospital (Mali):

- About a Case. *Open Journal of Medical Microbiology*, 12, 49-55.  
doi: 10.4236/ojmm.2022.122005.
- 83. Singh, V., Kaushal, S., Tyagi, A. et Sharma, P. (2011).** Screening of bacteria responsible for the spoilage of milk. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3(4) ,348-350.
- 84. Singleton, P. (1999).** Spore heat Resistance Correlated with water content, wet density, and protoplast/ sporoplast volume ratio. *Journal of bacteriology* 150 (2) ,870-877.
- 85. Sodini, I. et Beal, C. (2012).** Fabrication des yaourts et laits fermentés. *Techniques del'Ingénieur (F 6315)*. Paris- France, 16 p.
- 86. Soudaki, K. Attaf,Y.(2009).** Procédés de fabrication du yaourt alimentaire unité d'ARIB (Mémoire de fin étude). Université de Khemis Miliana.
- 87. Tailliez, P. (2001).** Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Mini-revue, Lait*. 81(1-3): 1-11.
- 88. Tarun ,B., Elmer H,M.,(1990) .** Rote of Micrococcus and Pediococcus Species in Cheese Ripening: A Review1. *Journal of Dairy Science* ,73 (4) , 859-866 .  
doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78740-1.
- 89. Terkja DN. (2014).** Étude de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées dans le service de neurochirurgie du C.H.U. de Tlemcen (Mémoire de master). Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen .
- 90. Tsarouhas, P. H., & Arvanitoyannis, I. S. (2014).** Yogurt production line: reliability analysis. *Production & Manufacturing Research*, 2(1), 11-23.
- 91. Vignola, G. (2002).** Science et technologie du lait, transformation du lait presse inter polytechnique (p.600).
- 92. Verne-bourdais E., Bonnefoy C., Guillet, F. et Leyral , G.(2002).** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires (p. 248).Collection Biosciences et Techniques, Série Sciences des Aliments.
- 93. Vinayananda, C O., S.J.Deepak, Rongsensusang, A.Elango, K.Porreen, V.Apparao, et B.Dhanalakshmi.(2018).** Analysis of Microbial Quality of the

- Air in Meat and Dairy Plants by Impaction Technique. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences ,7 [11] , 07-13.
- 94. Vishwakarma, V. (2019).** Impact of environmental biofilms: Industrial components and its remediation. *Journal of Basic Microbiology* , 60, 198–206 . doi. 10.1002/jobm.201900569.
- 95. Weerathilake, W. A. D. V., Rasika, D. M. D., Ruwanmali, J. K. U., et Munasinghe, M. A. D. D. (2014).** The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(4), 1-10.
- 96. Wehr H.M. et Frank J.F.(2004).** Standard Methods for the Examination of Dairy Products. (17e éd., p. 187–227) . American Public Health Association.
- 97. Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M. et Dutton, R.J. (2014).** Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell* 158 (2) , 422–433. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.041.
- 98. Yoshino, Y., Nakazawa, S., Otani, S., Sekizuka, E., et Ota, Y. (2016).** Nosocomial bacteremia due to *Kluyvera cryocrescens*: Case report and literature review. *idcases*, 4, 24-26.

# **Annexes**

➤ **Solution NaOH 0.9N**

NaOH 4g

Eau distillé 100ml

➤ **Tryptone-sel-eau (TSE)**

Eau distillée 1000 ml

Nacl 8.5g

Tryptone 1g

➤ **Milieux de cultures**

✧ **Tryptone soja agar (TSA)**

Poudre déshydraté 40g

Eau distillée 1000 ml

✧ **Potato dextrose agar (PDA)**

Poudre déshydraté 42g

Eau distillée 1000 ml

✧ **Chapman**

Poudre déshydraté 111g

Eau distillée 1000 ml

✧ **Mac conkey**

Poudre déshydraté 50g

Eau distillée 1000 ml

✧ **Boullion -Trypton soja (TSB)**

Poudre déshydraté 30g

Eau distillée 1000 ml

➤ **Eau physiologique**

Eau distillée 1 000ml

Nacl 1g

➤ **Cristal violet**

Cristal de violet 2 g

Eau distillé 100ml

➤ **Solution dissolvante**

Ethanol 200 ml

Acide acétique glacial 50 ml

Eau distillé 250ml

## Résumé

Le yaourt est considéré comme le produit laitier fermenté le plus consommé dans le monde , en raison de sa haute valeur nutritive et ses propriétés thérapeutiques. Bien que les produits laitiers fermentés soient généralement considérés comme sûrs, en raison de leur nature acide , des contaminations microbiennes peuvent se produire et diminuer la qualité microbiologique du yaourt, et sa durée de conservation.

Dans ce travail, la qualité microbiologique du yaourt produit dans une laiterie dans de la wilaya de Tlemcen, à été évaluée. Bien que le pH et l'acidité dornic du yaourt analysé soient conformes aux normes, l'analyse microbiologique des échantillons a permis de montrer des niveaux de contamination relativement élevés surtout par les levures et les moisissures, dont le nombre varie entre  $8.10^3$  et  $1.6.10^6$  ufc/ml. Les isolats fongiques sont caractérisés par une grande diversité morphologique et la dominance des levures de genre *Geotrichum*.

Sur la base des caractères morphologiques et biochimiques, les bactéries isolées sur milieu Chapman et Mac conkey sont de Gram positives ou négatives, et catalase positives ou oxydase négatives. La galerie API 20E a permis d'identifier 4 souches d'entérobactéries à *Enterobacter aerogenes* , *Serratia fonticola* et *Kluyvera* spp. La galerie API Staph a permis d'identifier 3 cocci à Gram positif à *Micrococcus* spp , *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus aureus* . Le potentiel de formation de biofilm est également testé par différents techniques, il varie selon les souches isolés. La formation de biofilm traduit un problème d'hygiène et de persistance des contaminations sur les surfaces industrielles. Ces résultats soulignent la nécessité d'appliquer des méthodes efficaces de prévention contre la contamination bactérienne et fongique dans les industries laitières.

Mots clés: Le yaourt , flore bactérienne , flore fongique , Biofilm ,Prévention

## Abstract

Yogurt is considered the most widely consumed fermented dairy product in the world because of its high nutritional value and therapeutic properties. Although fermented dairy products are generally considered safe, due to their acid nature, microbial contamination can occur and decrease the microbiological quality of the yogurt and its shelf life.

In this work, the microbiological quality of yogurt produced in a dairy in Tlemcen wilaya, was evaluated. Although the pH and dornic acidity of the yogurt tested are in accordance with the standards, microbiological analysis of the samples showed relatively high levels of contamination, especially by yeast and mould, whose number varies between  $8.10^3$  and  $1.6.10^6$  cfu/ml. Fungal isolates are characterized by a high morphological diversity and dominance of *Geotrichum* yeast.

Based on morphological and biochemical characteristics, bacteria isolated on Chapman and Mac conkey medium are Gram positive or negative, and catalase positive or oxidase negative. The API 20E gallery identified 4 strains of enterobacteria with *Enterobacter aerogenes* , *Serratia fonticola* and *Kluyvera* spp. The Staph API gallery identified 3 gram-positive cocci at *Micrococcus* spp , *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus* . The potential for biofilm formation is also tested by different techniques, it varies according to the isolated strains. Biofilm formation reflects a problem of hygiene and persistence of contamination on industrial surfaces. These results highlight the need for effective prevention methods against bacterial and fungal contamination in dairy industries.

Keywords:Yogurt, bacterial flora, fungal flora, biofilm, prevention

## المخلص

يعتبر الزبادي أكثر منتجات الألبان المخمرة استهلاكاً في العالم بسبب قيمته الغذائية العالية وخصائصه العلاجية .على الرغم من أن منتجات الألبان المخمرة تعتبر آمنة بشكل عام، نظراً لطبيعتها الحمضية، يمكن أن يحدث التلوث الميكروبي ويقلل من الجودة الميكروبيولوجية للزبادي وعمره الافتراضي.

في هذا العمل، تم تقييم الجودة الميكروبيولوجية للزبادي المنتج في منتجات الألبان في ولاية تلمسان .على الرغم من أن درجة الحموضة وحموضة الزبادي التي تم اختبارها تتوافق مع المعايير ، أظهر التحليل الميكروبيولوجي للعينات مستويات عالية نسبياً من التلوث، خاصة حسب الخميرة والعفن، والتي يتراوح عددها بين  $8.10^3$  و  $1.6.10^6$  cfu/ml. تتميز العزلات الفطرية بالتنوع المورفولوجي العالي وهيمنة خميرة *Geotrichum*.

بناءً على الخصائص المورفولوجية والكيميائية الحيوية، فإن البكتيريا المعزولة على وسط تشابلمان وماك كونكي إيجابية أو سلبية، وتحفز إيجابية أو سلبية أكسيداز. حدد معرض API 20E 4 سلالات من البكتيريا المعوية مع *Enterobacter aerogenes* و *Serratia fonticola* و *Kluyvera* spp. حدد معرض Staph API 3 كوكسي إيجابي جرام في *Micrococcus* spp و *Staphylococcus xylosus* و *Staphylococcus aureus* . يتم اختبار إمكانية تكوين الأغشية الحيوية أيضاً من خلال تقنيات مختلفة، وهي تختلف وفقاً للسلالات المعزولة. يعكس تكوين الأغشية الحيوية مشكلة النظافة واستمرار التلوث على الأسطح الصناعية. تسلط هذه النتائج الضوء على الحاجة إلى طرق وقائية فعالة ضد التلوث البكتيري والفطري في صناعات الألبان.

الكلمات الرئيسية: الزبادي، النباتات البكتيرية، النباتات الفطرية، الأغشية الحيوية، الوقاية