

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN

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

**Département des Sciences Agronomiques**

*Laboratoire d'Agronomie*

Mémoire présenté en vue de l'option du diplôme de

**Master en Agronomies**

**Option**

**Technologie des industries agroalimentaires**

**Thème**

Etude microbiologique des bactéries formant des spores dans  
lait pasteurisé de la laiterie GIPLAIT, Tlemcen.

Par **BELAID Hassenia**

Soutenu le 27/06/2016

Devant le jury composé de :

<b>Président</b>	<b>Mr TEFIANI choukri</b>	<b>M.C.B</b>
<b>Encadreur</b>	<b>Melle GHANEMI Fatima Zohra</b>	<b>M.A.A</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mr BELYAGOUBI Larbi</b>	<b>M.C.B</b>

*Année universitaire 2015-2016*

## **REMERCIEMENTS**

*J'adresse en premier lieu ma reconnaissance à notre DIEU tout puissant, de m'avoir permis d'en arriver là, car sans lui rien n'est possible.*

*Au terme de ce travail, il est agréable de présenter mes remerciements les plus sincères à M<sup>lle</sup> **Ghanemi Fatima zohra**, maître assistant A pour m'avoir proposé ce sujet si intéressant et avoir accepté de m'encadrer et de m'orienter tout au long de mon travail avec son judicieux conseils et sa constante disponibilité, c'est grâce à sa compétence et indulgence que ce travail a pu être réalisé Je remercie les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, je vous en Suis très reconnaissante et en espérant être à l' hauteur de votre confiance.*

*Mes sincères remerciements à **Mr. TAFIANI. C.**, Maître de conférence A pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de mon soutenance.*

*Je remercie également **Mr. Benyaagoubi** Maître de conférence A pour l'honneur qu'il m'a réservé d'avoir accepter d'examiner ce travail.*

*Je remercie aussi **Melle Benahmed Meriem** doctorante en microbiologie Pour votre aide et pour tous conseils.*

*Je remercie également tous les personnes de la laiterie GIPLAIT Tlemcen surtout :**Fawzia, Asma, Chakib,**  
**Mr Benbakhti Abderazak.***

*Je tiens aussi à remercier Mr. Chaabane Yousef chauffé de la production de la laiterie GIPLAIT celui qui ton toujours aidée lors Les prélèvements Les échantillons.*

*Sont oublié l'équipe de la laiterie de Maghnia « ennadjahe » surtout Mr Derazze « oncle Mohammed » pour tout aide lors de stage dans la laiterie.*

*Je tiens à remercier tous le personnel de l'Université de Abou Bakr Belkaïd de m'avoir aidé à réaliser ce projet surtout Mr Habi Salim ingénieur de laboratoire, Mr sbaa responsable de laboratoire d'agronomies, Mr Yzît , Mr Bensabre et tout l'équipe de laboratoire, Merci infiniment pour les efforts fournis.*

*Je remercier également mes camarades de la promotion: 2015-2016 spécialité technologie des industries agro-alimentaire.*

*Je ne pourrai qu'exprimer un infini remerciement plein Le gratitude, à ma famille, mes proches qui n'ont jamais arrêtés Le m'encourager et Le m'aider à aller Le l'avant. Sans oublier tous mes amies. Grand. Merci à tous.*

## *Dédicaces*

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie ce modeste travail.*

*A la mémoire Le mon Père Youcef « Allah yerahmou »  
Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*Ma chère mère : Bakhta*

*Affable, honorable, aimable que je ne cesse Le remercier pour tout ce qu'elle m'a donné... Que Dieu la récompense pour tous ces bienfaits.*

*Mes deuxième parentes Kouider et Ferouz. Je veux remercier pour tous efforts.*

*Mes chères frères et sœurs  
qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*Abd elrzake, Mohammed, Abd elkader et sa femme Lila sans oublier ma petit frère Mohammed Amin Nedjoume.*

*Lamia, Merieum et son mari Ahmed.*

*Mes chères neveux : Fares, fathallah, Lokman, Rihab et Issame.*

*A mon ami : Nesseddin.*

*Rien au monde, n'a pu ébranler notre amitié*

*A mes amies : Batoul, Nassera et Mounia.*

*Pour notre amitié et tous les bons moments passés et à venir,  
Pour votre présence, vos bons conseils et nos fous rires partagés  
Un très grand merci à tous et à toutes*

*A tous ceux qui m'ont aidé lors de la réalisation de ce travail, merci à tous.*

*Hassenia*

## Résumé

Les industries agro-alimentaires ont souvent recours à la pasteurisation afin d'en produire un lait sain, toutefois ce traitement thermique est souvent la source de germination et de multiplication de bactéries sporulées.

Le présent travail visait à analyser une série de trois échantillons de lait prélevés du pasteurisateur de la laiterie de GIPLAIT « Mansourah » située dans la région de Tlemcen.

Dans cette étude, nous avons réalisé l'isolement de 20 souches sur milieu gélose PCA à 30 °C, après un traitement thermique des échantillons au laboratoire (à 80°C pendant 10 min). L'identification des souches prélevées était réalisée par quelques tests biochimiques. 95% des souches identifiées appartiennent aux bactéries à des bacilles Gram positifs, aérobies et aéro-anaérobies facultatives. Les souches ont été par la suite caractérisées par des tests biochimique, ce qui a permis de classer ces souches dans cinq biotypes différents qui sont : *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*.

Les résultats de cette étude montrent que la pasteurisation n'est pas assez efficace pour détruire les bactéries sporulées aérobies du genre *Bacillus*, un nettoyage rigoureux, de bonnes pratiques d'hygiène ainsi qu'un temps de pasteurisation plus important sont vivement recommandés.

**Mots clés :** Lait, pasteurisation, bacilles, sporulation, thermorésistance, altération.

## الملخص

المصانع الغذائية في اغلب الأحيان يكون عموما مصدر لإحياء البكتيري . من حليب مبستر مأخوذ من خزن مبستر لملبنة تحليل ثلاثة عينات حليب خالي من الجراثيم هذا يهدف هذا العمل تحليل ثلاثة عينات " جبيلي " قمنا في هذه الدراسة بعزل وتنقية 20 حرارية للعينات ( 80 مئوية 10 ) . وقد تم تحديد خصائص السلالات المعزولة ببعض التحاليل البيوكيميائية . 95 %

بكتيريا العصيات الغرام ايجابي هوائية واللاهوائية اختياري. تم تحليل السلالات المعزولة عن طريق تحليل بيوكيميائي أخرى ومنه صنفت السلالات إلي مختلفة ولا سيما *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*.

عملية البسترة غير فعالة للقضاء علي البكتيريا ولهذا ب القيام بتنظيف الدقيق و تطبيق قواعد النظافة الصحية .

الكلمات المفتاحية : الحليب عصيات

## **Abstract**

The food industry often resort to pasteurization in order to produce healthy milk, however, this heat treatment is generally the source of germination and multiplication of spore-forming bacteria.

The present work was to analyze a series of three milk samples taken from milk pasteurizer Giplait "Mansurah" located in the Tlemcen region.

In this study, we performed the isolation of 20 strains on PCA agar at 30 ° C, after heat treatment of the samples on the laboratory (at 80 ° C for 10 min). The identification of strains taken was carried out by some biochemical tests. 95% of identified strains belong to bacteria to Gram-positive bacilli, facultative aero-anaerobic. The strains have subsequently been characterized by biochemical tests , which allowed to classify these strains in five different biotypes that are: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*.

The results of this study show that pasteurization is not effective enough to destroy aerobic spore-forming bacteria of the genus *Bacillus*, a rigorous cleaning, hygienic practices and that more time pasteurization are strongly recommended.

**Key words:** Milk, pasteurization, sporulation, heat resistance, impaired.

## Liste des abréviations

<b>GIPLAIT</b>	Groupe Industriel Populaire du Lait
<b>FAO</b>	Organisation internationale de l'alimentation
<b>°D (D90°C)</b>	
<b>HTSTI</b>	High temperatur short time
<b>U.V</b>	Ultra violet
<b>CIP</b>	Cleaning In Place ou nettoyage en palace
<b>FMT</b>	Flore mésophile totale
<b>FTMT</b>	Flore thermorésistante mésophile totale
<b>UHT</b>	Ultra haut température

## Liste des tableaux

<b>Numéro de tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Résumé des différents termes utilisés pour définir la composition du lait	<b>3</b>
<b>2</b>	Composition minérale du lait	<b>5</b>
<b>3</b>	Composition moyenne du lait de différentes espèces animales	<b>6</b>
<b>4</b>	Thermorésistance de diverses espèces	<b>20</b>
<b>5</b>	Les différents barèmes de la pasteurisation	<b>24</b>
<b>6</b>	Les résultats des tests biochimiques de la galerie classique	<b>43</b>
<b>7</b>	Les résultats de la galerie API	<b>45</b>
<b>8</b>	Dénombrement des colonies sur milieu gélose PCA	<b>71</b>

## Liste des figures

Numéro de figure	Titre	Page
<b>1</b>	Flux microbiens dans Les étables de production laitière	<b>13</b>
<b>2</b>	Structure de spore bactérienne.	<b>17</b>
<b>3</b>	Processus de sporulation de <i>Bacillus cereus</i>	<b>18</b>
<b>4</b>	Diagramme de fabrication du lait pasteurisé.	<b>28</b>
<b>5</b>	Schéma montre le protocole de dénombrement de FMT	<b>31</b>
<b>6</b>	Schéma montre le protocole de dénombrement de FTMT	<b>32</b>
<b>7</b>	Dénombrement des colonies sur milieu gélose PCA	<b>36</b>
<b>8</b>	Graphe de résultats de dénombrement de flore FTMT des trois échantillons	<b>36</b>
<b>9</b>	Exemples d'aspect macroscopiques des isolats cultivés sur gélose PCA	<b>37</b>
<b>10</b>	Ensemencement sur gélose nutritif (ensemencement par séries de stries).	<b>37</b>
<b>11</b>	Observation microscopique de la coloration de Gram <sup>+</sup> (x 100)	<b>38</b>
<b>12</b>	Observation d'effervescence (catalase positive).	<b>38</b>
<b>13</b>	Activité enzymatique (A. Hydrolyse de caséine, B. Hydrolyse l'amidon, C. Hydrolyse de lécithine).	<b>39</b>
<b>14</b>	Exemples de mise en évidence de l'utilisation de citrate.	<b>40</b>
<b>15</b>	Exemple de la mise en évidence de l'utilisation de mannitol (A), TSA (B).	<b>41</b>
<b>16</b>	Résultats des plaques API de quelques souches.	<b>43</b>

## **Tableau des matières**

Remerciements.....	<b><i>I</i></b>
Dédicace .....	<b><i>III</i></b>
Résumé .....	<b><i>IV</i></b>
.....	<b><i>V</i></b>
Abstract.....	<b><i>VI</i></b>
Liste des abréviations.....	<b><i>VII</i></b>
Liste des tableaux.....	<b><i>VIII</i></b>
Liste des figures.....	<b><i>IX</i></b>

## *Synthèse bibliographique*

Introduction.....1

### ***Chapitre 1 : Généralités sur le lait***

1) Définitions du lait .....3

2) Composition du lait .....3

3) Facteurs de variation dans la composition de lait.....5

4) Caractéristiques du lait .....8

5) Caractéristiques biologiques.....9

6) La Microflore du lait .....10

7) Hygiène de la traite .....12

8) Le lait de consommation .....14

### ***Chapitre 2 : La thermo- résistance des spores bactériennes du lait pasteurisé***

1) Les spores bactériennes .....16

2) Phénomènes de sporulation et de germination .....17

3) L'acquisition de la résistance des spores.....18

4) Définition de la thermorésistance .....19

5) L'origine de la résistance thermique.....19

6) Influence de certains.....20

7) Composition du milieu de sporulation.....20

8) Les bactéries sporulées.....22

9) La pasteurisation du lait .....23

10) Problématique du lait pasteurisé.....	25
---	----

### ***Chapitre 3 : Présentation de la laiterie de Giplait Tlemcen « Laitier Mansourah »***

1) Description de la laiterie .....	26
2) la mission de la laiterie .....	26
3) Le diagramme de fabrication du lait pasteurisé.....	28
4) Station CIP (cleaning in place).....	29
1) Méthodologie de prélèvement.....	30
2) Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale.....	31
3) Dénombrement, Isolement et purification des micro-organismes thermorésistants.....	32
4) Identification phénotypiques des souches thermorésistante .....	33

#### ***Matériel et Méthodes***

1) Méthodologie de prélèvement .....	30
2) Dénombrement de FMT.....	30
3) Dénombrement, Isolement et purification des micro-organismes thermorésistants .....	31
4) Identification phénotypiques des souches thermorésistante .....	32
4.1) Caractérisation morphologique des isolats.....	32
4.2) Caractérisation biochimique des isolats .....	33

#### ***Résultats et discussion***

1) Dénombrement de FMT et FTMT.....	37
2) Contribution de la collection des souches.....	37
3) Isolements et purifications souches .....	38
4) Caractérisations phénotypiques des isolats.....	38
Discussion.....	46
Conclusion.....	49
Références.....	50
Annexe.....	69

# ***INTRODUCTION***

L'Algérie est un pays de tradition laitière. Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens ils apportent la plus grosse part de protéines d'origine animale. En regard de son contenu en énergie métabolisable, le lait présente une forte concentration en nutriments.

La consommation nationale s'élève à environ 3 milliards de litres de lait par an, la production nationale étant limitée à 2,2 milliards de litres, dont 1,6 milliard de litres de lait cru (*Transaction d'Algérie, 2010*).

La durée de vie du lait pasteurisé en Algérie est de concerne, si l'on parle d'une durée de vie moyenne pour le lait pasteurisé dans les pays développés d'environ 10 à 16 jours à 5°C (*kelly et o'shea, 2011*), le lait algérien ne peut survivre cette période et les consommateurs procèdent en général à la congélation pour le conserver.

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la durée de vie du lait pasteurisé comme la qualité microbiologique du lait cru, les conditions de traitement et de conditionnement, la passibilité de contamination post-pasteurisation ainsi que la température de réfrigération (*Medjahdi, 2013*).

En industries laitières, la contamination disséminée à partir des surfaces industrielles est largement reconnue. La nature des espèces qui composent ces écosystèmes microbiens est largement influencée par les conditions des processus technologiques. La flore thermorésistante telle que les bacilles sporulés est sélectionnée par les traitements thermiques, très utilisés comme une technologie de conservation du lait. La pasteurisation permet entre autres d'éliminer les micro-organismes pathogènes mais pas les spores (*Malek, 2013*).

Les bactéries sporulées aérobies sont des contaminants importants dans le milieu laitier et sont impliqués dans les problèmes d'altération du lait pasteurisé ainsi que de la limitation de sa durée de vie. Certains membres des bacilles sont pathogènes pour l'homme par la production de plusieurs toxines qui sont responsables de toxi-infections alimentaires (*Malek, 2013*).

Le but de cette étude est de rechercher les bactéries sporulées aérobies (les bacilles) dans le lait pasteurisé et déterminer le rôle qu'ils peuvent jouer dans la dégradation de sa qualité et la diminution de sa durée de vie dans la laiterie de GIPLAIT Tlemcen.

Le plan expérimental s'articule comme suit :

- ✓ Dénombrement de la flore mésophile totale et de la flore thermorésistants du lait de vache pasteurisé.
- ✓ Isolement et l'identification des bactéries isolées.

***Synthèse***  
***bibliographique***

## 1) Définitions du lait

### 1.1) Définition générale

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères, comme la vache, la chèvre et brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant (**Amiot *et al.*, 2002**).

Le lait ou « leben » en arabe classique ou « halib » en arabe dialectal universellement est le lait de vache (**Khiati, 2007**).

### 1.2) Définition légale

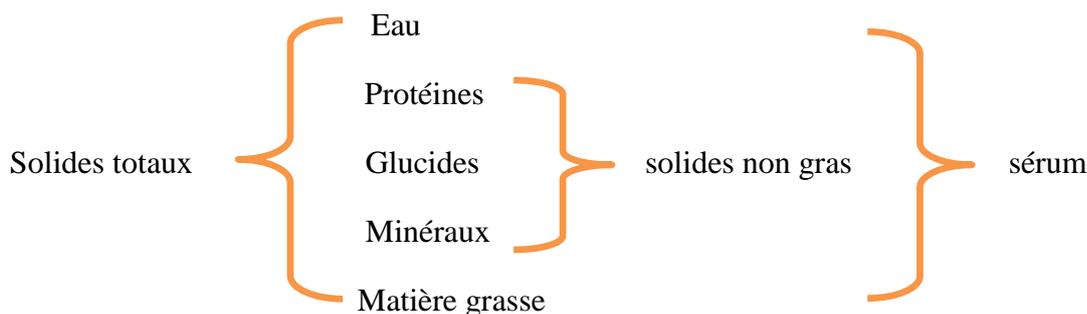
Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes : « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie qui ne contienne pas de colostrum » (**Bourgeois *et al.*, 1996**).

Le lait cru est un lait non chauffé au-delà de 40°C ni soumis à un traitement non thermique d'effet équivalent notamment du point de vue de la réduction de la concentration en microorganismes (**Deforges *et al.*, 1999**).

## 2) Composition du lait

Le lait est un substrat très riche, fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment ; presque complet. Protides, glucides, lipides, sels minéraux et vitamines sont présents à des concentrations tout à fait satisfaisantes pour la croissance cellulaire (**Bourgeois *et al.*, 1999**). Il contient une forte proportion d'eau environ 87 % le reste est représenté par l'extrait sec (environ 130 g/L), les principaux composants du lait sont : les lipides (triglycérides), les protéines (caséines, albumines, globulines), les glucides essentiellement le lactose, les sels (sels d'acide phosphorique, sels d'acide chlorhydrique, etc.) (**Larpent, 1997**).

**Tableau 1** : Résumé des différents termes utilisés pour définir la composition du lait (**Amiot *et al.*, 2002**)



### 2.1) Eau

L'eau est l'élément quantitativement le plus important : 900 à 910 g/L, tous les autres constituants du lait sont dispersés dans cet élément ainsi que tous ceux de la matière sèche (**Mathieu, 1998**).

### 2.2) Glucides

Ce sont les constituants les plus importants quantitativement après l'eau. Ils représentent environ 38% de matière sèche (**Perreau, 2014**). Le sucre principal du lait est le lactose, c'est un disaccharide constitué par de l' ou -glucose uni à du -galactose ; le lactose est fermentescible par de nombreux microorganismes, celui-ci est à l'origine de plusieurs type de fermentation pouvant intervenir dans la fabrication de produits laitiers (**Morrissey, 1995**).

### 2.3) Matières grasses

La teneur en matières grasses des laits de vache varie entre 3,3 et 4,7%, la matière grasse du lait est majoritairement présente sous forme de globules gras de diamètre 0,2 à 15 µm (**jeantet et al., 2008**).

Les matières grasses du lait se composent principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de -carotène (**Amiot et al., 2002**).

### 2.4) Matières azotées

Elles représentent environ 27% de la matière sèche du lait, soit une teneur de 32 à 36 g/L. On distingue, à l'intérieur de cette catégorie, la fraction protéique et la fraction non protéique (**Perreau, 2014**). Les protéines, parmi lesquelles la caséine 80%, les protéines solubles (albumines et globulines), 19% des protéines diverses (enzymes), en sont les constituants essentiels (**Skine ,2013**). L'Azote non protéique du lait se présente sous forme de créatine (créatinine), ammoniacque, acides aminés libres, vitamines, nucléotides, urée (**Pacclin et Galantier, 1986**).

### 2.5) Minéraux

Le lait en ces éléments est de 5%, ce qui est loin d'être négligeable (**Perreau, 2014**). Bien que mineure dans la composition des laits comme la montre le tableau 02, la fraction minérale est très importante tant d'un point de vue structural que nutritionnel et technologique (**Jeantet et al., 2008**).

**Tableau 02** : Composition minérale du lait (Amiot *et al.*, 2002).

Constituants	Teneur moyenne mg/kg
<b>Potassium</b>	1500
<b>Calcium</b>	1180
<b>Sodium</b>	445
<b>Magnésium</b>	105
<b>Chlore</b>	958
<b>Phosphore</b>	896
<b>Fer</b>	0.50

## 2.6) Vitamines

Les vitamines sont des substances indispensables à la vie de l'organisme humain (co-facteurs dans les réactions enzymatiques et les échanges cellulaires). L'organisme humain n'est pas capable de les synthétiser (se trouvent dans les aliments) (Amiot *et al.*, 2002).

Le lait a d'assez fortes teneurs en vitamines, il contient non seulement des vitamines liposolubles A, D, E, K, mais aussi les vitamines du groupe B, il a revanche une très faible teneur en vitamine C (Perreau, 2014).

## 3) Facteurs de variation dans la composition du lait

Ces principaux facteurs de variations sont bien connus. Ils sont soit intrinsèques liées à l'animal, soit extrinsèques liées au milieu et à la conduite d'élevage (Wolter, 1988). Le lait est complexe en raison de son organisation, des interactions existant entre ses divers constituants et de la variabilité de sa composition qui dépend de l'espèce, de la race, du régime alimentaire et période de lactation (jeantet *et al.*, 2008).

### 3.1) Facteurs intrinsèques

#### 3.1.1) Effet des espèces et des races

La composition moyenne du lait de différentes espèces est présentée dans le tableau 03.

**Tableau 03** : Composition moyenne du lait de différentes espèces animales (**Amiot *et al.*, 2002**).

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

Il existe de grands écarts dans la composition du lait d'une race à une autre, et surtout dans le taux de matières grasses. Les races jersey et Guernesey se distinguent par des laits très riches en matière grasse, tandis que les laits produits par les races Holstein et ayrshire sont relativement plus dilués (**FAO, 1995**).

### 3.1.2) Effet du stade de lactation (état physiologique)

L'influence du stade de lactation sur la composition du lait a souvent été décrite. Les teneurs en protéines et matières grasses évoluent de façon inverse à la qualité du lait produit (**Jeantet *et al.*, 2008**).

Les taux de matières grasses et matières azotées, élevés au vêlage, diminuent au cours du premier mois et maintiennent à un niveau minimal pendant le 2<sup>ème</sup> mois. Ils amorcent ensuite une remontée jusqu'au tarissement. L'amplitude de variation est généralement plus importante pour le taux butyreux que pour le taux protéique. Les laits de fin de lactation présentent les mêmes caractéristiques des laits sécrétés par les animaux âgés. En outre, les deux taux, protéique et butyreux, ont tendance à diminuer au cours des lactations successives (**Meyer *et Denis*, 1999**).

### 3.1.3) Effet Age

Le niveau de production augmente avec l'âge jusqu'à la 4<sup>ème</sup> lactation ; cette progression est surtout notable pour le début de lactation en revanche la persistance devient moins bonne quand les vaches vieillissent (**Perreau ,2014**).

Le vieillissement des vaches provoque un appauvrissement de leur lait, ainsi la richesse du lait en matières sèches tend à diminuer. Ces variations dans la composition sont attribuées à dégradation de l'état sanitaire des mamelles. En fonction de l'âge, le nombre de mammites croît et la proportion de protéines solubles augmente en particulier celles provenant du sang (**Mathieu, 1985**).

### 3.1.4) Effet de l'état sanitaire

Une augmentation du comptage cellulaire induisant des modifications considérables dans la composition du lait due a un appel leucocytaire important c'est-à-dire une infection (**Badinand, 1994**). Les mammites sont les infections les plus fréquents dans les élevages laitiers. Elles sont à l'origine d'une modification des composants du lait (**Toureau et al., 2004**).

## 3.2) Les facteurs extrinsèques

### 3.2.1) Effet de l'alimentation et de la saison

Les facteurs alimentaires sont multiples ; ils concernent les teneurs en glucides, lipides et protéines de la ration alimentaire mais aussi la nature de chacun de ces constituants (**Jeantet et al., 2008**). L'alimentation est très importante, elle permet d'agir à court terme et de manière différente sur les taux des composants du lait. Le taux de protéines varie dans le même sens que les apports énergétiques, quant au taux butyreux, il dépend à la fois de la part d'aliment concentré dans la ration, de son mode de présentation et de distribution (nombre de repas, mélange des aliments....) (**Coulon et Hoden, 1991**).

L'influence de la saison est étroitement associée aux effets de l'alimentation qui évoluent simultanément. Les taux protéiques et butyreux les plus bas du lait de vache s'enregistrent entre Juin et Juillet et les taux élevés en Février et Octobre (**Jeantet et al., 2008**).

## 4) Caractéristiques du lait

### 4.1) Organoleptiques

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en  $\beta$ -carotène. Il a une odeur peu marquée, mais caractéristique. Son goût, variable selon les espèces animales, est agréable et douceâtre (Goursaud, 1985). Il est deux fois plus visqueux que l'eau et de saveur légèrement sucrée (Veisseyre, 1975).

### 4.2) Physico-chimiques

Le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne par sa composition physico-chimique (Veisseyre, 1975). Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la masse volumique et la densité, le point de congélation, le point d'ébullition, l'acidité et  $A_w$  (Amiot *et al.*, 2002).

#### 4.2.1) Densité du lait

La densité du lait est exprimée par le rapport du poids d'un volume de lait à une température donnée sur le poids d'un volume identique d'eau à la même température. Pour le lait de vache elle est comprise entre 1,028 et 1,033 (Allais, 1984).

#### 4.2.2) Point de congélation

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes. Sa valeur moyenne, si l'on considère des productions individuelles de vache, se situe entre  $-0,54^\circ\text{C}$  et  $-0,55^\circ\text{C}$  (Mathieu, 1998).

#### 4.2.3) Le pH du lait

Le pH du lait frais à  $20^\circ\text{C}$  varie entre 6.6 et 6.8. Plutôt proche de 6.6 immédiatement après la traite (Groguennec *et al.*, 2008).

#### 4.2.4) L'acidité de titration ou degré Dornic

L'acidité de titration globale mesure à la fois le pH initial du lait normal et l'acidité développée après la traite par fermentation lactique qui diminue le pH jusqu'à 4 ou 5 l'acidité de titration, ce indique donc le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. Un lait normal a une acidité de titration de 16 à  $18^\circ\text{D}$ =1 millilitre d'acide lactique dans 10 millilitres de lait soit 0.1 g d'acide lactique/litre. (Dillon, 2008 ; Hebbel *et al.*, 2005).

#### 4.2.5) l'activité de l'eau ( $A_w$ )

L'eau joue un rôle très important dans le lait. Elle conditionne l'état physique des autres constituants. Elle favorise le développement microbien, l'eau disponible dans les aliments est l'eau libre. Cette disponibilité est exprimée par l'activité de l'eau ( $a_w$ ). La plupart des bactéries se développent bien pour des  $a_w$  comprises entre 0,980 et 0,995 (**Dieng, 2001**).

#### 4.2.6) Point d'ébullition

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée. Pour le lait le point d'ébullition est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100.5°C (**Amiot et al., 2002**).

### 5) Caractéristiques Biologiques

Le lait est une matière biologique vivante par certains constituants qui sont les enzymes, vitamines et cellules.

#### 5.1) Enzymes du lait

Les enzymes sont des protéines globulaires spécifiques produits par les cellules vivantes, ils sont des biocatalyseurs, car ils accélèrent les réaction biochimiques (**Amiot et al., 2002**). Les enzymes sont des substances élaborées par les micro-organismes pour digérer les éléments du lait, mais qui peuvent être parfois fabriquées par la femelle laitière elle-même (**Duquesnel , 1993**).

Le lait contient principalement trois groupes d'enzymes : les hydrolases, les déshydrogénases ou oxydases et les oxygénases. Deux principaux facteurs qui influent sur l'activité enzymatiques sont le pH et la températures (**Amiot et al., 2002**).

#### 5.2) Vitamines du lait

Les vitamines sont des substances qui existe à l'état de traces, pour la croissance, l'entretien et le fonctionnement de l'organisme humain. Le lait contient la plus grande variété des vitamines liposolubles (A, D, E et K) et les vitamines hydrosolubles (B et C) (**Dieng, 2001**).

Les vitamines par leur nature, influencent les possibilités de développement de flore et donc l'aptitude fromagère du lait (**Duquesnel, 1993**).

### 5.3) Gaz dissous

Le lait cru contient des gaz dissous (oxygène, dioxyde de carbone), surtout s'il a subi une agitation poussée, ce qui conduit à la formation de mousse (**Duquesnel, 1993**).

### 5.4) Les cellules du lait

Comme tout liquide biologique, le lait même normal, contient des cellules somatiques provenant de la mamelle ou sang. Parmi ces cellules nous pouvons distinguer :

- ✓ Des lymphocytes de type B ou C
- ✓ Des macrophages avec les cellules épithéliales représentent plus des deux tiers des cellules ;
- ✓ Des leucocytes polynucléaires neutrophiles (0 à 11%).

Le nombre de ces cellules est modifié en cas d'inflammations (**Larpen, 1997**).

Le lait contient un nombre variable de cellules ; celles-ci correspondent à la fois à des constituants normaux, mais également à des éléments d'origine exogène qui sont les micro-organismes (**Gripon et al., 1975**).

## 6) La Microflore du lait

Le lait est, de par sa composition un aliment de choix : il contient des graisses, du lactose, des protéines, des sels minéraux, des vitamines et 87% d'eau. Son pH est de 6,7. Il va être un substrat très favorable au développement des micro-organismes. Le lait est utilisé sous de nombreuses formes et il est la matière première de nombreux produits alimentaires (**Guiraud, 2012**).

Les micro-organismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais, on peut aussi trouver des levures et des moisissures, virus (**Institut de l'élevage, 2009 in Benhedane N, 2012**).

On répartir les micro-organismes du lait, selon leur importance, en deux grandes classes : la flore indigène ou originale et la flore de contamination. Cette dernière est subdivisée en deux sous-classes : la flore d'altération et la flore pathogène (**Amiot et al., 2002**).

### 6.1) Flore d'origine

La flore d'origine des produits laitiers se définit comme l'ensemble des micro-organismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis (**Amiot et al., 2002**).

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de  $10^3$  germes/ml). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques mais aussi streptocoques, lactiques (*Lactococcus*) et lactobacilles. Le lait est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées « lacténines » mais leur action est de très courte durée (1 heure environ) (Guiraud, 2014).

### 6.2) Flore de contamination

La flore de contamination est l'ensemble des micro-organismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération qui touche la qualité organoleptique (goût, odeur, texture, couleur) ou peut réduire la durée de conservation, et d'une flore pathogène capable de provoquer des maladies chez le consommateur (Amiot *et al.*, 2002).

Le lait se contamine par des apports microbiens d'origine diverses : fèces et téguments de l'animal, sol, air et eau, équipement, manipulateurs (Guiraud, 2014).

#### 6.2.1) Flore pathogène

L'animal, l'homme et l'environnement peuvent être à l'origine de cette contamination. Différentes espèces bactériennes sont capables de pénétrer dans la mamelle par le canal du trayon et sont excrétées dans le lait (Kagembega, 1984).

Les principaux micro-organismes pathogènes associés au lait sont : *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* et certaines moisissures (Amiot *et al.*, 2002).

#### 6.2.2) Flore d'altération

Ce sont des bactéries et champignons indésirables apportés par la contamination. Cette flore regroupe les bactéries thermorésistantes, les coliformes, les psychrotrophes, les levures et moisissures (Larpent, 1998).

##### 6.2.2.1) Flore thermorésistante

Un certain nombre de bactéries est capable de résister au traitement thermique usuel utilisé dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes (**Bullard, 2011**).

Les composants de cette flore sont : *Micrococcus*, *Microbacterium* et *Bacillus* dont l'espèce *B. cereus* produit une entérotoxine stable après pasteurisation. Le genre *Bacillus* réalise en outre, des activités enzymatiques pouvant être responsables de l'acidification, la coagulation ou la protéolyse des laits de longue conservation (**Larpen, 1997**).

### 6.2.2.2) Les psychrotrophes

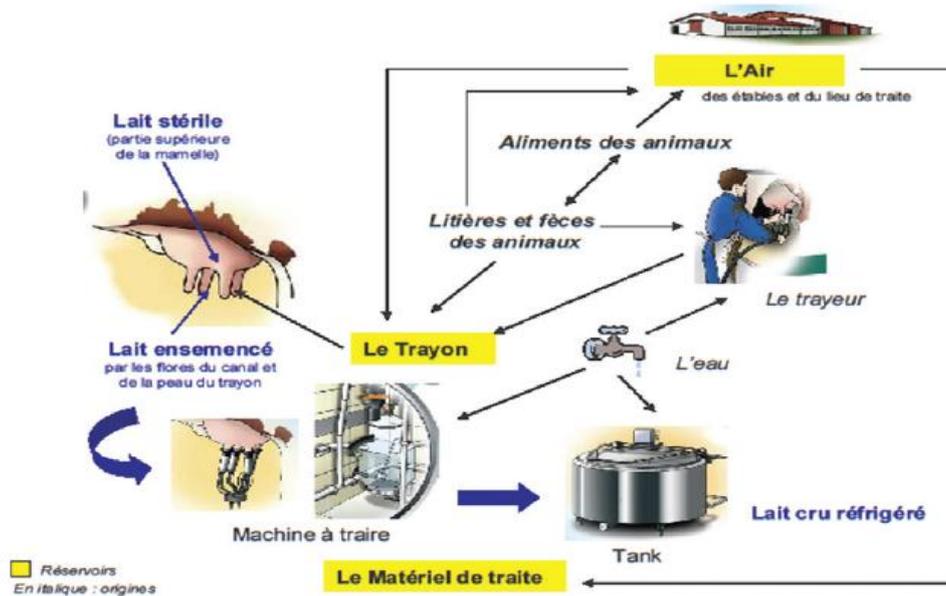
Le terme « psychrotrophe » désigne des microorganismes qui ont la faculté de se développer à une température inférieure à +7°C, indépendamment de leur température de croissance élevée . parmi ces bactéries : Gram (-) comme *Pseudomonas*, Gram (+) comme *Corynebacterium* (**Leyral et Vierling, 2001**).

### 6.2.2.3) Les coliformes

D'un point de vue technologique, certains coliformes sont lactiques et fermentent le lactose sur un mode hétéro-fermentaire. Ils peuvent se retrouver dans tous les types de lait. Ce sont des germes qui vivent dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Leur présence est un signe de contamination lors de la traite et pendant les manipulations et transvasements multiples que subissent les produits avant la commercialisation (**Badio, 2000**).

## 7) Hygiène de la traite

Le lait est une denrée fragile dont le devenir industriel (lait en nature, beurre, fromage) dépend de sa qualité. La production d'un lait de qualité n'exige ni des installations coûteuses dans la ferme, ni des transformations ruineuses dans le système commercial et industriel; il faut surtout un suivi rigoureux et permanent des bonnes pratiques d'hygiène tout le long du circuit de sa production notamment à la traite (**Crapelet et Thibier, 1973**).



**Figure 1 :** Flux microbiens dans Les étables de production laitière (D'après Y. Bouton, 2013)

### 7.1) Trayeur

Celui-ci doit remplir les conditions suivantes :

- ✓ Bon état de santé : pour éviter la pollution du lait et la contagion de certaines maladies (tuberculose) à la vache :
- ✓ Propreté : avant de commencer à traire, doit se laver soigneusement les mains et les essuyer avec un linge propre.
- ✓ Tenue : le trayeur doit être habillé proprement et simplement. La meilleure tenue est le bleu de mécanicien; le trayeur doit mettre un tablier blanc toujours propre et une calotte blanche cachant ses cheveux (**Crapelet et Thibier, 1973**).

### 7.2) Animal

Les conditions d'hygiène ci-dessous doivent être rigoureusement respectées

- ✓ Propreté générale : elle sera obtenue par une litière correcte, si nécessaire un pansage journalier évitant la présence de souillures voire de plaques d'excréments.

- ✓ Propreté de la mamelle : elle sera acquise par le passage sur le pis d'un linge propre trempé de solution légèrement anti-septique tiède; cette dernière devra être renouvelée aussi souvent que nécessaire pour rester propre et remplir son rôle.
- ✓ Pour la traite en étable, la queue devra être attachée, pour éviter qu'elle ne souille le lait.
- ✓ Santé: on détectera précocement et systématiquement les maladies particulièrement dangereuses : tuberculose, mammites (**Crapelet et Thibier, 1973**).

### **8) Les lait de consommation :**

L'évaluation des processus technologiques, des techniques de conservation et de distribution a permis l'élaboration d'une large gamme de « laits de consommation » qui se distinguent par leur composition, leur qualité nutritionnelle et organoleptique et leur durée de conservation (**Jeantet et al., 2007**).

#### **8.1) Le lait cru**

Le lait cru désigne un lait brut, qui n'a pas subi de pasteurisation, de stérilisation, de thermisation, de microfiltration. Un lait cru n'a jamais excédé la température de 40 degrés Celsius, c'est-à-dire proche de la température du corps de l'animal (**Skine, 2013**).

#### **8.2) Le lait traité thermiquement**

Selon l'intensité des traitements, on distingue :

- ✓ Les laits pasteurisés ;
- ✓ Les laits stérilisés de longue conservation (**Jeantet et al., 2007**).

##### **8.2.1) Le lait pasteurisé**

On chauffe le lait afin de réduire la flore banale et de détruire les germes pathogènes. Le traitement usuel est de 15 à 20 secondes à 72-75 °C; il permet de détruire le bacille de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*) et d'inactiver la phosphatase alcaline. Dans ces conditions, l'effet sur les constituants du lait est très faible, en dehors d'une faible perte de thiamine (vitamine B<sub>1</sub>) et de vitamine C (7 à 10%) (**Alais, 2003**).

### 8.2.2) le lait stérilisé

Le but de la stérilisation est la destruction des microorganismes qui pouvant se développer lors de l'entreposage. La destruction des microorganismes est fonction de deux paramètres : la durée du traitement thermique et la température (**Amiot *et al.*, 2002**).

Elle permet la destruction de tous les microorganismes présents dans le lait. Les techniques les plus anciennes utilisaient une température de 105 °C pendant 20 minutes, (**Joffin C *et Joffin J*, 2003**).

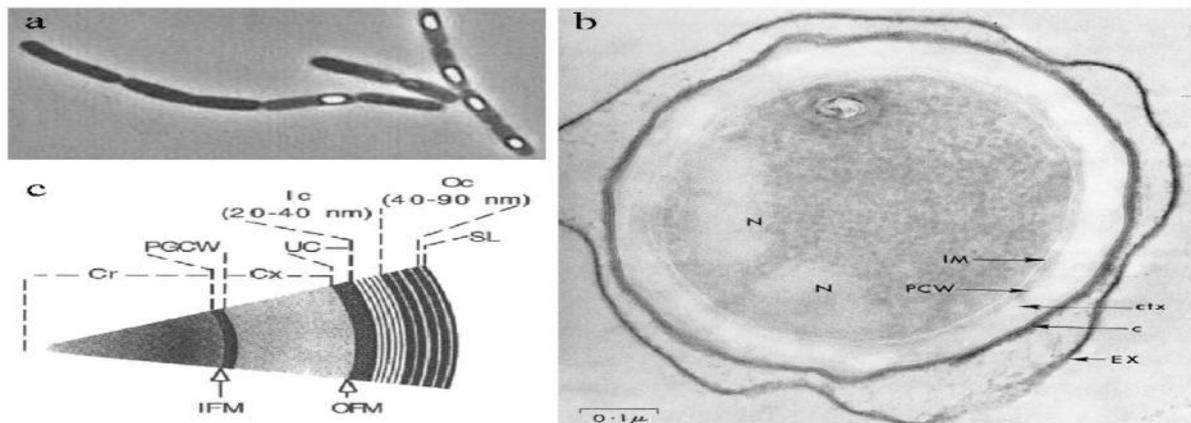
Les techniques moderne (procédés UHT : ultra-haute température) permettent de chauffer le lait à 140 °C pendant une seconde et ce chauffage est immédiatement suivi d'un refroidissement après détente sous vide (**Joffin C *et Joffin J J.*, 2003**).

### 1) Les spores bactériennes

Dans des conditions défavorables, il apparaît pour certaines espèces essentiellement des bacilles Gram+ en industrie alimentaire, une spore (ou endospore), forme de vie latente dont la persistance peut être très longue. La spore bactérienne présente un cytoplasme condensé autour du génophore et des enveloppes protectrices multiples : cortex, tunique protéique, exosporum (**Guiraud, 2012**).

La spore se présente dans la cellule sous forme d'un corpuscule réfringent non « colorable au Gram » sa forme est sphérique ou ovoïde, sa localisation centrale, terminale ou non déformante. Tous ces caractères sont typiques d'une espèce. Les enveloppes contiennent des constituants proches de ceux de la paroi; elles sont imperméables et participent à la thermorésistance de même que les ponts disulfures stabilisant les protéines (**Guiraud, 2012**).

Afin de résister à un environnement qui n'est plus favorable à leur développement, certaines bactéries sont capables de sporuler. Ainsi, lors d'une baisse des nutriments, d'une baisse de l'activité d'eau ( $a_w$ ) ou encore d'une variation importante de température, les bactéries du groupe *B. cereus* produisent des spores ultra résistantes par rapport à la forme végétative (**Gautier, 2013**).



**Figure 2 :** Structure de spore bactérienne.

(a) Photographie en microscopie de *Bacillus cereus* en phase stationnaire de croissance ; (b) Photographie en microscopie électronique d'une spore de *Bacillus cereus* (Gould *et* Hurst, 1969) ; (c) Schéma d'une coupe de spore de *Bacillus subtilis* (Henriques *et* Moran, 2000). (Cr) cœur ou corps sporal, « core » ; (IM, IFM) membrane interne, « Inner Forespore Membrane » ; (PCW, PGCW) paroi sporale, « Primordial Germ Cell Wall » ; (OFM) membrane externe, « Outer Forespore Membrane » ; (c) tunique, « coat » ; (UC) sous-tunique, « Under Coat » ; (Ic) tunique interne, « Inner coat » ; (Oc) tunique externe, « Outer coat » ; (EX, SL) exosporium, « Surface Layer ».

### 2) Phénomènes de sporulation et de germination

Le cycle sporal caractérise les transformations où alternent les phases végétatives de croissance, la sporulation, la dormance et la germination. Le processus de sporulation qui induit de profonds et radicaux changements morphologiques survient en fin de phase de croissance lorsque le milieu s'appauvrit en nutriments. Mais son initiation est beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît (O'Connor *et* Halvorson, 1961).

Lorsque la spore est achevée, celle-ci reste en phase de dormance dans l'attente de conditions plus propices à la croissance. La dormance est un état dans lequel la spore se trouve fortement déshydratée et totalement inactive, il n'y a pas d'activité métabolique, ce qui lui permet de survivre pendant de très longues périodes. Dans ces conditions, elle est particulièrement résistante à la chaleur, à la dessiccation, aux radiations ainsi qu'aux agents chimiques (O'Connor *et* Halvorson, 1961).

Enfin, lorsque l'environnement devient à nouveau favorable au niveau physico-chimique, la spore germe pour redevenir une cellule végétative. Le processus de germination est aussi

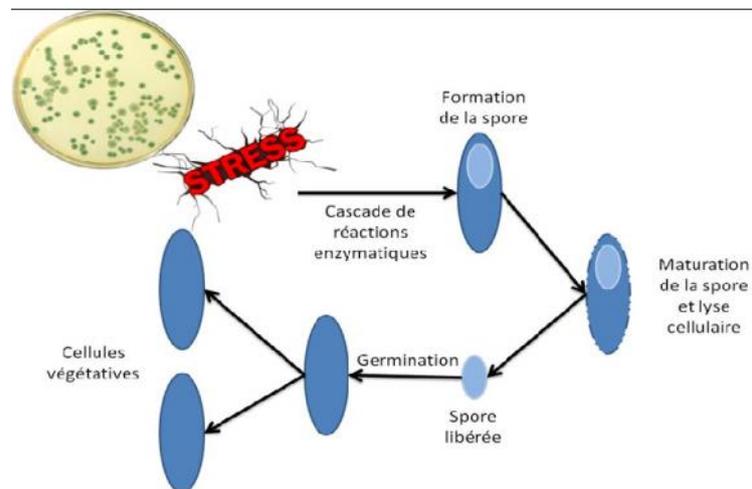
complexe que celui de la sporulation et serait induit par de petites molécules comme certains acides aminés par exemple (O'Connor *et* Halvorson, 1961).

La germination peut également être déclenchée par certains stress dont la chaleur ou les pH acides, on parle alors d'activation (Finley *et* Fields, 1962; Berg *et* Sandine, 1970) in (Guiraud, 2012).

### 2.1) La germination des spores comprend deux phases

1. La germination proprement dite, pendant laquelle la spore se réhydrate (elle perd alors sa thermorésistance) et remet en fonction la machinerie des synthèses des acides nucléiques et protéines.

2. L'émergence de la cellule hors de l'enveloppe de la spore, et la croissance de la cellule jusqu'au stade de la première division (Leclerc *et al.*, 1995, Meyer *et al.*, 1991).



**Figure 3:** Processus de sporulation de *Bacillus cereus* (GRIESS, 2013).

### 3) L'acquisition de la résistance des spores

La résistance des spores est acquise progressivement au cours de la sporulation et n'est pas spécifiquement liée à une étape particulière de la sporulation. Selon Knott *et al.*, (1995), l'acquisition de la résistance dépend du développement et de la maturité des différentes structures sporales. L'acquisition de la résistance des spores est indissociable de la formation des spores qui dépend de l'espèce bactérienne et des conditions environnementales de sporulation.

L'acquisition de la thermorésistance est réalisée via l'accumulation de plusieurs composés en quantités très importantes dans le cortex, les principaux étant l'acide dipicolinique et des cations divalents, essentiellement du calcium  $\text{Ca}^{2+}$ . En 1960, **Hashimoto et al.** Remarquent déjà que la résistance est fortement liée à la quantité d'acide dipicolinique présent, il en va de même pour la réfringence. La teneur en acide dipicolinique est telle, jusqu'à 15 % de la masse de la spore, qu'elle dépasse le seuil de solubilité, le composé se trouve alors sous forme cristalline (**Leuschner et Lillford, 2001**).

#### 4) Définition de la thermorésistance

La thermorésistance selon les espèces, les spores de *Bacillus stearothermophilus* par exemple ne sont détruites que par un traitement de 15min à 120°C (**Bugwicourt, 1995**). Selon **Janstova et al., (2001)**, elle est liée au taux des bactéries survivant après traitement thermique, à différentes températures et temps d'exposition.

Des indications effectives pour certains traitements thermiques sur les spores détruites et celles encore en vie sont données par la valeur D (D est le temps de réduction décimale c'est-à-dire le temps requis pour tuer 90% des micro-organismes ou des spores dans un échantillon à une température donnée) (**Dufrenne et al., 1995, Andersson et al., 1995**).

Selon **Guinebrière et al., (2008)** les *B. cereus stricto sensu* peuvent se développer à des températures allant de 7°C à 50°C selon les souches (psychro-tolérantes, mésophiles et thermo tolérantes modérées). De plus, il a été reporté qu'une forte température, comme lors de la pasteurisation à 80°C, permet l'activation des spores.

#### 5) L'origine de la résistance thermique

D'après **Cazemier et al. (2001)**, la résistance aux fortes températures serait due à trois facteurs principaux, la déshydratation du protoplaste, la minéralisation et l'adaptation thermique. Les deux derniers facteurs induisant une augmentation de la déshydratation, c'est celle-ci qui serait à l'origine de la thermorésistance des spores (**Sugiyama, 1951**). En effet, **Beaman et Gerhardt (1986)** ont observé que le fait d'élever la température de sporulation accentuait la déshydratation du protoplaste, ce qui avait pour conséquence une très nette augmentation de la thermorésistance.

Ce phénomène serait à l'origine de la différence de comportement qui existe entre les psychrophiles peu résistants, les mésophiles de résistance moyenne et les thermophiles très

résistants (**Gombas, 1983**), d'après **Warth (1978)**, la résistance des spores dépendrait donc de la température maximale de croissance de la forme végétative. Ainsi **Beaman et al. (1982)**, après avoir estimé que le protoplaste de *Bacillus cereus* (mésophile) contenait cinq fois plus d'eau que celui de *Bacillus stearothermophilus* (thermophile), constataient que la thermophile était quasiment 600 fois plus résistante. Il est bien évident que la plus grande stabilité des protéines et du matériel génétique des thermophiles participe également à cet écart.

Quelques valeurs de thermorésistance de spores de diverses espèces sont données dans Le tableau N° 4 :

**Tableau 4 : Thermorésistance de diverses espèces (Jérôme et al., 2008).**

Espèces	D à 120°C (en s)
<i>Clostridium tetani</i>	5
<i>Bacillus subtilis</i>	5 à 10
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	4 à 5
<i>Bacillus stéarothermophilus</i>	4 à 5
<i>Desulfotomaculumnigrificans</i>	2 à 3
<i>Bacillus coagulans</i>	0.1
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.1 à 0.5
<i>Clostridium botulinum A ou B</i>	0.1 à 0.2
<i>Bacillus anthracis</i>	1 à 6

### 6) Influence de certains paramètres sur la thermo résistance de spores

Les conditions environnementales affectent la concentration des spores produites, le temps de sporulation, ainsi que la formation des structures membranaires de la spore. Etant donné que ces structures jouent un rôle primordial dans la résistance des spores, la variation des conditions environnementales de sporulation influence alors indirectement la résistance des spores formées (**Gaillard et al., 2000**).

### 7) Composition du milieu de sporulation

Les milieux de sporulation sont couramment enrichis en sels de sporulation, ions mono- ou divalents tels que le calcium, le magnésium, le fer, le potassium et le manganèse. En effet, les spores possèdent 4,5 fois plus de calcium et 3 fois plus de manganèse que les cellules végétatives (**Lechowich et Ordal, 1962**).

Il semble donc important d'enrichir le milieu de sporulation en ces ions. Des travaux portant sur les sels de sporulation indiquent, pour deux souches de *Bacillus subtilis*, deux souches de *Bacillus licheniformis* et pour une souche de *B. coagulans*, que les spores produites avec un mélange de sels de sporulation semblent plus résistantes que les spores produites en milieu uniquement enrichi en sulfate de manganèse (MnSO<sub>4</sub>) (Cazemier *et al.*, 2001).

La thermorésistance semble dépendre de la forme liquide ou solide du milieu de sporulation. Le temps nécessaire pour détruire 90% des spores de *Bacillus subtilis* à 90°C est de 52,5 min pour un milieu liquide contre 154,9 min pour des spores produites en gélose (Rose *et al.*, 2007). Il convient donc, pour vérifier l'efficacité d'un traitement thermique, d'utiliser des spores produites en gélose plutôt qu'en milieu de sporulation liquide.

### 7.1) Température de sporulation

L'influence de la température de l'environnement de sporulation est connue depuis 1929 (Williams, 1929). Certains auteurs ont mis en évidence une relation entre les capacités de croissance et la résistance des spores : plus la température optimale de croissance est élevée, plus la thermorésistance des spores est forte (Warth, 1978). Selon Afchain *et al.*, (2008), les spores de *Bacillus sp* mésophiles sont plus résistantes que les spores de *Bacillus sp*. Psychrotrophes.

La thermorésistance ( $D_{90^{\circ}C}$ ) des spores de *Bacillus cereus* mésophiles est comprise entre 104,7 min et 1,58 min, alors que la thermorésistance des spores de *Bacillus cereus* psychrotrophes est comprise entre 19,5 min et 0,89 min (Membré *et al.*, 2008). La température de sporulation est considérée comme un des principaux facteurs environnementaux affectant la résistance des spores (Palop *et al.*, 1999).

### 7.2) pH du milieu de sporulation

L'effet du pH de sporulation sur la thermorésistance des spores est moins étudié que celui de la température. En milieu de sporulation non tamponné, la thermorésistance des spores de *Bacillus cereus* ATCC4342 et de *Bacillus cereus* ATCC9818 diminue significativement avec une diminution du pH initial de sporulation. Cependant, la thermorésistance des spores de *B.cereus* ATCC7004 n'est, quant à elle, pas significativement influencée par le pH initial du milieu de sporulation (Mazas *et al.*, 1997).

Enfin, les spores de *Bacillus Anthracis* produites en milieu non tamponné, à pH 5,0, sont mais significativement plus thermorésistantes que les spores produites à pH 7,0 et à pH 9,0 (**Baweja et al., 2008**).

Dans ces conditions, la thermo-résistance des spores produites en milieu non tamponné est aléatoirement influencée par le pH initial de sporulation. L'étude de **Mazas et al. (1997)** révèle que quel que soit le pH initial de sporulation, en milieu non tamponné, le pH en fin de sporulation est compris entre 8,01 et 8,28.

### **7.3) A<sub>w</sub> du milieu de sporulation**

Peu de données existent concernant l'influence de l'*a<sub>w</sub>* du milieu de sporulation, sur la thermorésistance des spores. Une étude indique que la variation de l'*a<sub>w</sub>* de sporulation n'influence pas la thermorésistance des spores et ce, quel que soit le dépresseur d'*a<sub>w</sub>* utilisé (glycérol, sorbitol ou NaCl) (**Jakobsen et Murrell, 1977**).

## **8) Les bactéries sporulées**

Sont deux types :

### **8.1) Bactéries sporulées anaérobies**

Ces bactéries appartiennent au genre *Clostridium* (famille des *Bacilliaceae*). Il s'agit de bactéries « *telluriques* » communément rencontrées dans le sol, les eaux d'égout et l'intestin. Elles peuvent contaminer et dégrader les produits alimentaires dans des conditions anaérobies (conserve). Il s'agit d'un genre hétérogène. Certaines espèces sont pathogènes (**Guiraud , 2003**).

### **8.2) Bactéries sporulées aérobies**

Ces bactéries appartiennent au genre *Bacillus* (familles des *Bacilliaceae*). Elles font généralement partie de la flore banale Gram+ et contaminent de nombreux produits alimentaires. Les *Bacillus* sont des Bacilles Gram+, généralement mobiles, aptes à la sporulation. Une spore, structure de résistance, se forme dans la cellule lorsque les conditions deviennent défavorables. La spore ne prend pas la coloration de Gram, elle est sphérique ou ovale, déformante ou non selon l'espèce (**Guiraud, 2003**).

### 9) La Pasteurisation du lait

#### 9.1) Définition et objectifs

Plusieurs définitions ont été données à cet effet par divers auteurs qui s'accordent tous à mettre l'accent sur l'assainissement correct du lait par la chaleur tout en se souciant de préserver la haute valeur nutritive du lait. Pasteuriser le lait, c'est détruire en lui, par l'emploi convenable de la chaleur, la presque totalité de la flore banale, la totalité de la flore pathogène, tout en s'efforçant de ne toucher qu'au minimum à sa structure physique, à ses équilibres chimiques et à ses éléments biochimiques. (Ould Mustapha *et al.*, 2012).

En autres termes d'assurer sa salubrité et de prolonger sa durée de vie. (Meunier-Goddik Et Sandra , 2002).

#### 9.2) Les procédés de la pasteurisation

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

- ✓ Soit à une température de 63° C pendant une durée de 30 minutes à basse température cette pasteurisation est presque abandonnée
- ✓ Soit à une température de 85° C pendant une durée de 15-20 secondes (HTST/température moyenne)
- ✓ Soit encore instantanément à une température de 95° C HTSTI haute température. (Arrêté, 1993).

Ce type de pasteurisation haute température courte durée, est très répandu ces dernières années, où les deux préoccupations de sécurité alimentaire et le désir de prolonger la durée de conservation du lait liquide ont incité de nombreux transformateurs de produits laitier à augmenter la pasteurisation à des températures au-dessus des conditions minimales spécifiées par le décret A du lait pasteurisé (72 °C pour 15s) (Ranieri *et al.*, 2009).

C'est le principe des procédés HTST. Les barèmes de température de pasteurisation sont liés proportionnellement aux temps. Le couple température/ temps joue un rôle essentiel dans la pasteurisation chaque fois que la température de pasteurisation augmente le temps est réduit.

**Tableau 5** : montre les différents barèmes de pasteurisation. (Meunier-Goddik et Sandra.,2002).

Température (°C)	Temps
63	30 minutes
72	15 secondes
89	1.0 s
90	0.5 s
94	0.1 s
96	0.05 s
100	0.01 s

### 9.4) Paramètre de pasteurisation

La conception des lignes de traitement du lait pasteurisé du commerce varie beaucoup d'un pays à l'autre, et même d'une laiterie à l'autre, en fonction de:

- ✓ La législation et la réglementation locale.
- ✓ La standardisation éventuelle de la matière grasse qui peut se faire avant, après ou pendant la pasteurisation.
- ✓ L'homogénéisation peut être totale ou partielle D'autre part, la rapidité de ce traitement (quelques secondes) permet de conserver intactes les qualités organoleptiques et nutritionnelles du lait. (Ould Mustapha et al., 2012).
- ✓ Les appareils les plus souvent utilisés pour la pasteurisation du lait sont les échangeurs de chaleur à plaques. Ceux-ci sont construits selon une structure modulaire, autrement dit toutes les sections nécessaires au processus de pasteurisation sont situées dans une même installation sous forme de modules. Les différentes sections sont ordonnées de telle façon qu'à la zone la plus chaude succède la zone la plus froide, ce qui a des avantages du point de vue énergétique. Avec cette technologie, la récupération de chaleur s'élève à environ 85 %.
- ✓ la ligne de production du lait pasteurisé.

### 10) Problématique du lait pasteurisé

Un problème récurrent en industrie laitière est la qualité microbiologique du lait pasteurisé.

La pasteurisation n'assure pas la destruction complète de la flore de contamination du lait et sélectionne les bactéries sporogènes (**Aires *et al.*, 2009 ; Hanson *et al.*, 2005**).

En effet, malgré les progrès réalisés dans la technologie laitière, la contamination du lait spécialement par les bactéries productrices de spores demeure une barrière biologique spécifique qui limite la durée de vie et la qualité des laits traités thermiquement (**Novak *et al.*, 2005 ; Huck *et al.*, 2007 ; Zhou *et al.*, 2008 ; Ranieri *et al.*, 2009**).

### 1) Description de la laiterie

Est une unité nationale sous le nom « ONALAIT » (Office National du Lait), l'entreprise a été entrée en production en Janvier 1976, dans le but d'assurer les besoins de la population de la wilaya de Tlemcen. En 1984, l'entreprise a connu une restructuration et devient « OROLAIT » (Office Régional du Lait), Actuellement, cette entreprise a été nouvellement structurée sous le nom GIPLAIT (Groupe Industriel du Lait) destinée pour la fabrication des produits laitiers notamment :

- ✓ Lait de vaches pasteurisé,
- ✓ Lait recombinaé pasteurisé,
- ✓ L'ben ou lait fermenté,
- ✓ Crème fraîche, et beurre.

La laiterie GIPLAIT est implantée sur la zone semi-industrielle route Abou-Tachfine Tlemcen, elle s'étend sur une superficie de 29.700 m<sup>2</sup>.

Avec un régime de travail de :

- ✓ 2× 8 heures pour le service de production.
- ✓ 3×8 heures pour le service de sécurité.
- ✓ 1× 8 heures pour l'administration.

### 2) la mission de la laiterie

L'unité GIPLAIT Tlemcen fabrique les produits laitiers en particulier lait de vache et lait recombinaé pasteurisé conditionné, lait fermenté conditionné « L'ben », crème fraîche et beurre. Elle a la capacité de produire 150000 litres par jours théoriquement, dont 20 % de lait de vache (localement collecté) et 80% de lait recombinaé. Elle aura en principe les fonctions suivantes :

- ✓ La réception de laits crus localement collectés.
- ✓ Le traitement thermique des divers produits laitiers.
- ✓ Analyses microbiologiques et physicochimiques des produits fabriqués.
- ✓ Le stockage des matières premières.
- ✓ L'emballage et conditionnement des produits finis.
- ✓ L'équipement pour la production d'eau traitée, d'eau glacée, de vapeur et l'air comprimé constitue aussi une partie intégrée dans l'usine.

3) Le diagramme de fabrication du lait pasteurisé

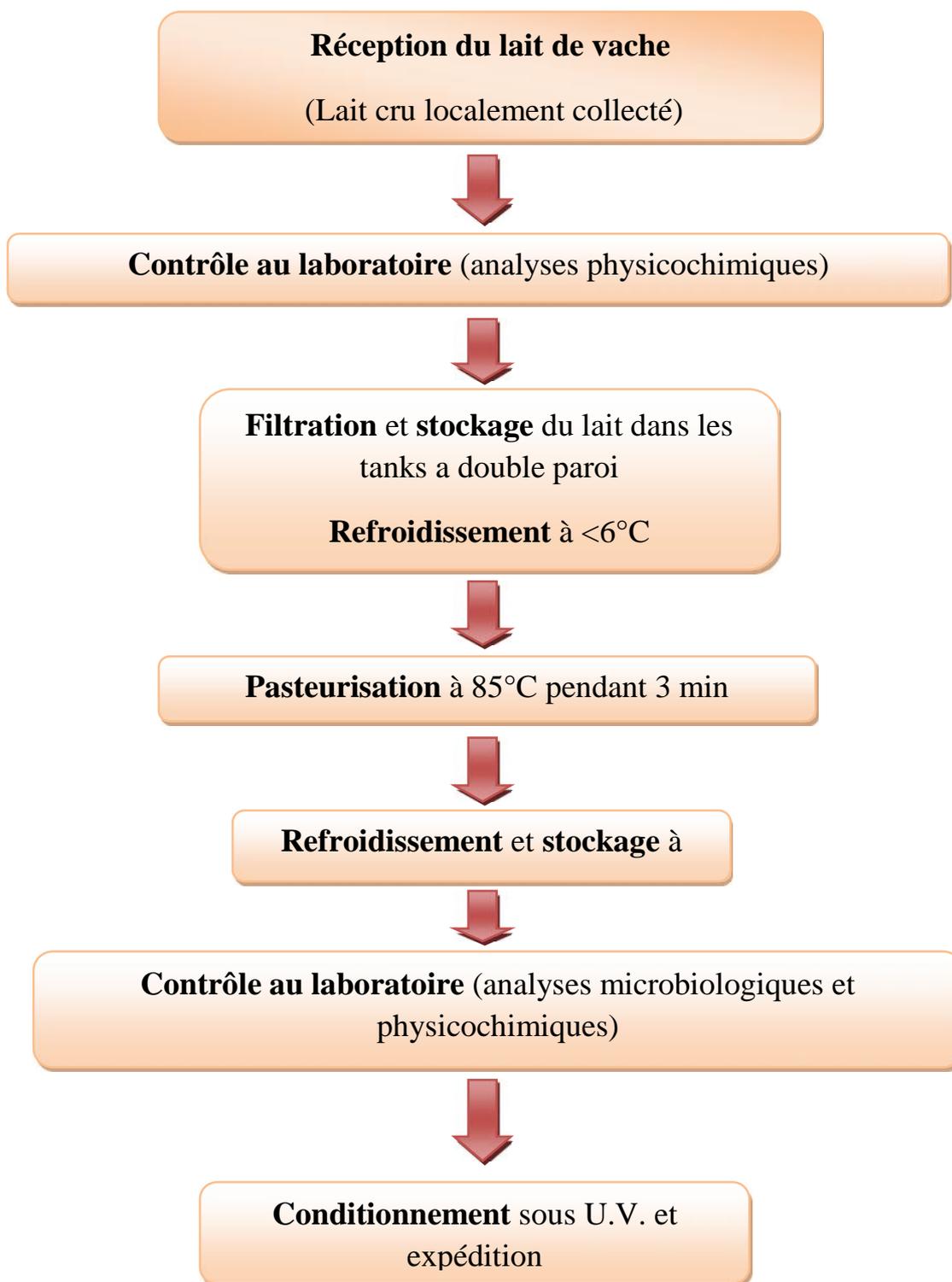


Figure 4 : Diagramme de fabrication du lait pasteurisé.

### 4) Station de CIP (cleaning in place):

La station CIP (cleaning in place) sert au nettoyage automatique des différents circuits de fabrication et de conditionnement, Le nettoyage se fait dans un cycle fermé.

Cette station CIP fonctionne à l'aide des programmes :

- 1- Pré-rinçage par l'eau.
- 2- Nettoyage par la soude.
- 3- Rinçage par l'eau.
- 4- Nettoyage par l'acide (**Contacte directe au niveau de la laiterie GIPLAIT**)

# ***Matériel et Méthodes***

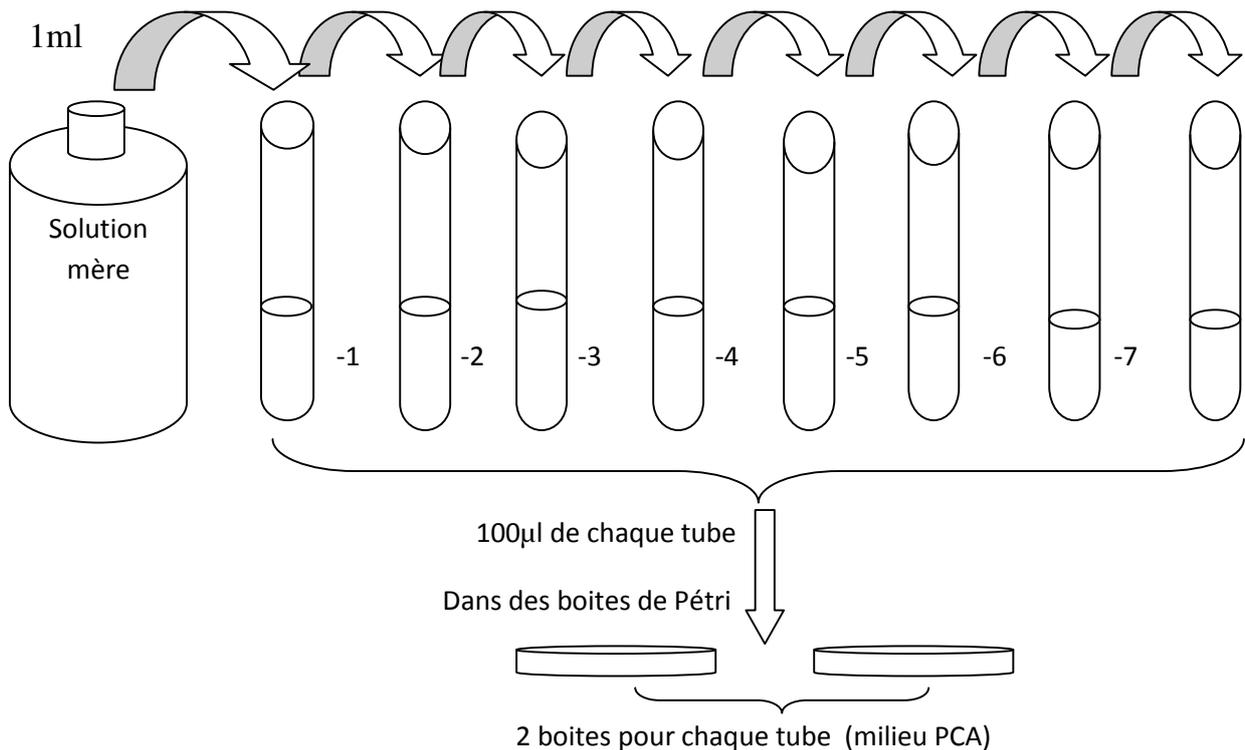
Notre travail a été effectué au niveau des laboratoires d'agronomie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Abou Bakr Belkaid- Tlemcen), dans lesquels nous avons réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques sur les différentes souches de bactéries isolées à partir de lait de vache pasteurisé. Pour but d'étudier la microbiologie de lait précisément les bactéries sporulées.

### **1) Méthodologie de prélèvement**

Trois échantillons le 15,23 et 31/05/2016 de lait de vaches pasteurisé ont été prélevés à partir de laiterie de GIPLAIT « Mansourah » dans la région de Tlemcen (l'Ouest d'Algérie), la laiterie située au niveau de la zone semi-industrielle, route Abou-Tachfine, Tlemcen. Le prélèvement pour des analyses microbiologiques s'effectue à partir du robinet disposé au pasteurisateur dans un flacon en verre de 250ml stérile et bouché avec un bouchon à vis. Le robinet est flambé au préalable, nous éliminons les premiers jets et nous remplissons le flacon. Les échantillons de lait sont placés dans une glacière et transportés au laboratoire d'agronomies au niveau de l'université de Tlemcen (faculté SNV/SUT).

### **2) Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale**

Cette flore appelée aussi « flore aérobie mésophile revivifiable » (FAMT) est un bon indicateur de la qualité générale et de la stabilité des produits ainsi que la qualité (propreté) des installations (Guiraud, 1998). A partir de dilutions  $10^{-1}$  (1ml de solution mère dans 9ml de l'eau de Ringer), jusqu'au  $10^{-8}$ , porter aseptiquement 100 $\mu$ l de chaque dilution dans une boîte de Pétri remplie de PCA ensuite bien homogénéiser le milieu gélosé. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 72h. Seules les boites contenant entre 30 et 300 colonies sont prises en compte.



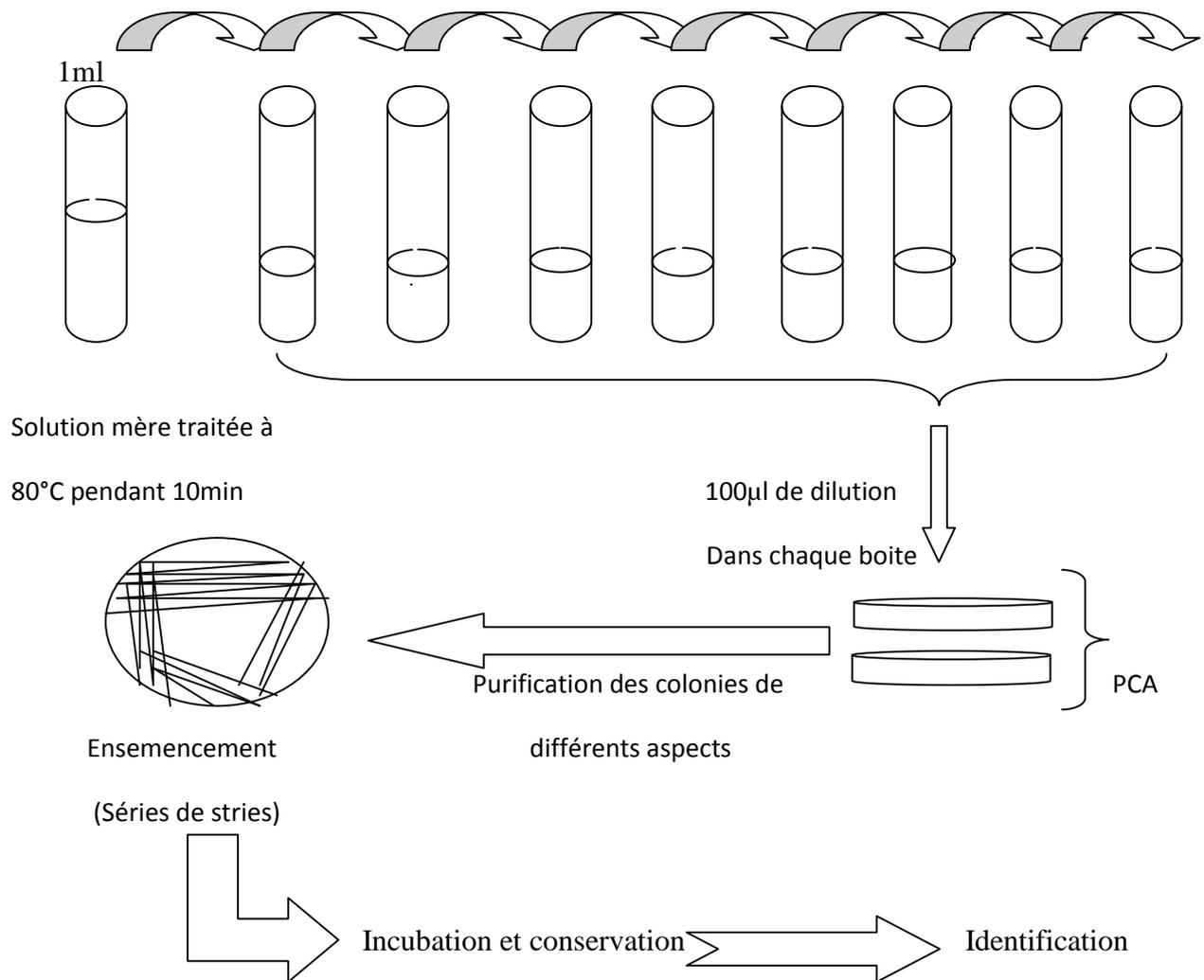
**Figure 5** : Schéma montre le protocole de dénombrement de FMT

### 3) Dénombrement, Isolement et purification des micro-organismes thermorésistants

**Mourgues et Auclair (1973)** ont montré qu'en l'absence de toute recontamination post-pasteurisation, la qualité de conservation du lait pasteurisé était limitée par des bactéries provenant du lait cru, donc thermorésistantes. Pour leur dénombrement, on emploie le milieu Conseillé pour le dénombrement des germes aérobies du lait (PCA). L'incubation est réalisée à 30 °C pendant 3 jours (**Larpen, 1997**).

A partir de solution mère traitée à 80°C pendant 10min, (1 ml dans 9 ml de l'eau de Ringer) une série de dilutions allant à  $10^{-8}$  est effectuée, 100µL de chaque dilutions estensemencée en surface sur des boîtes de Pétri contenant du milieu PCA. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 48h.

Après incubation de chaque boîteensemencée, on choisit au maximum 5 à 7 colonies d'aspect différent pour l'isolement. Chaque colonie choisie estensemencée sur milieu gélose nutritif. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 24h. Cette opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de colonies pures.



**Figure 6 :** Schéma montre le protocole de dénombrement de FTMT

#### 4) Identification phénotypiques des souches thermorésistante

##### 4.1) Caractérisation morphologique des isolats

##### 4.1.1) Aspect macroscopique des colonies

L'aspect macroscopique des colonies (Aspect, couleur) est déterminé après incubation à 30°C sur GN pendant 24h à 48h.

- ✓ **La taille :** Elle est mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible : en

comparant la taille de la colonie et le diamètre du champ, on aura une idée plus précise de la taille des petites colonies ;

- ✓ **La forme :** (bombée, rond, plate, ombiliquée, à centre surélevé, à bords dentelés, en étoile.) ;
- ✓ **L'aspect de la surface :** il est bien observé par transillumination oblique. Il peut être lisse, rugueux, ...etc ;
- ✓ **L'opacité :** les colonies sont décrites comme : opaques (ne laissent pas passer la lumière), translucides, transparentes ;
- ✓ **La consistance :** Il s'agit d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses, sèches ou encore muqueuses ;
- ✓ **La couleur (pigmentation) :** les colonies sont habituellement de couleur crème. Une couleur différente est due à des pigments.

#### 4.1.2) Aspect microscopique

##### ✓ Coloration de Gram

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

#### 4.2) Caractérisation biochimique des isolats :

##### 4.2.1) Mise en évidence des enzymes respiratoires

##### ✓ Catalase :

La présence de la catalase est mise en évidence en dissociant à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur une quantité suffisante de la culture sur une lame de verre contenant une goutte

d'eau oxygénée a 10 volumes. La présence d'une catalase se traduit en quelques secondes par la formation de bulles d'oxygène (Gerhardt *et al.*, 1994).

#### **4.2.2) Croissance sur le milieu mannitol-mobilité**

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et incubé à  $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 18 à 24h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (Marchal *et al.*, 1991).

#### **4.2.3) Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons**

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone: le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubé à  $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 5 jours.

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

#### **4.2.4) TSI (Gélose Glucose-Lactose-Saccharose-H<sub>2</sub>S)**

A l'aide d'une anse contenant des colonies prélevées, on ensemence la pente puis le culot d'un tube par piqûre centrale. L'incubation se fait à  $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 48 à 72h.

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

Ce test permet également d'observer la production de H<sub>2</sub>S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de gaz CO<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub> (bulles dans la gélose) (Marchal *et al.*, 1991).

#### **4.2.5) Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires :**

- **Détermination de l'activité amylolytique**

La mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon est réalisée par l'ensemencement des souches en une seule strie sur gélose à amidon .après incubation à 30°. Des observations régulières sont effectuées chaque 24h pendant 72heures. En recouvrant la gélose par une solution de *Lugol*. L'absence de la coloration autour de la culture indique la dégradation de l'amidon alors que les zones contenant l'amidon se colorent en brun (**De vos et al., 2009**).

- **Détermination de l'activité protéolytique**

- ✓ **Hydrolyse de la caséine**

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur gélose au lait. Les souches sont ensemencées en une seule strie puis incubées à 30C. Les résultats sont appréciés quotidiennement durant 72 heures. L'apparition d'une auréole claire autour de la culture indique la dégradation de la caséine (**Devos et al.. 2009**).

- ✓ **Lécithinases**

Selon la méthode de **Genta et Heluane (2001)**, 10mL d'une émulsion de jaune d'œuf ont été additionnés à 90mL de milieu de base (Gélose nutritive). Maintenu en surfusion (~45°C), ce mélange était coulé sur des boites de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les souches étaient ensemencées par stries. L'apparition de toute zone claire autour de la culture après 24 à 72 heures d'incubations à 30°C, témoigne que la souche possède des lécithinases (**De vos et al., 2009**).

#### **4.2.6) Caractérisation des souches par la galerie API**

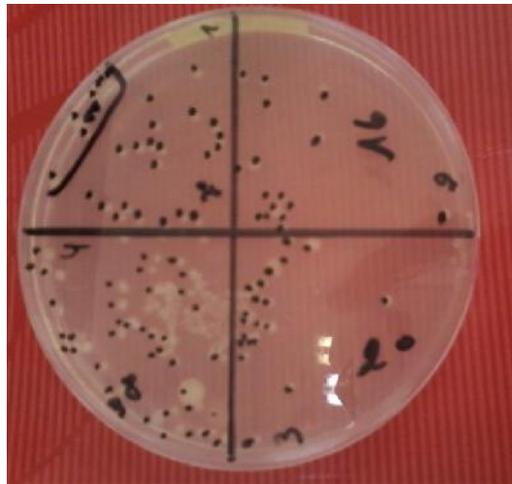
C'est un système simplifié et standardisé, qui comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés permettant d'effectuer 22 tests biochimiques, des suspensions bactériennes effectuées, à partir des cultures de 18h, de chaque souche dans de l'eau physiologique (0,85g/L) sont inoculées dans les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

# ***Résultats et Discussion***

## 1. Résultats

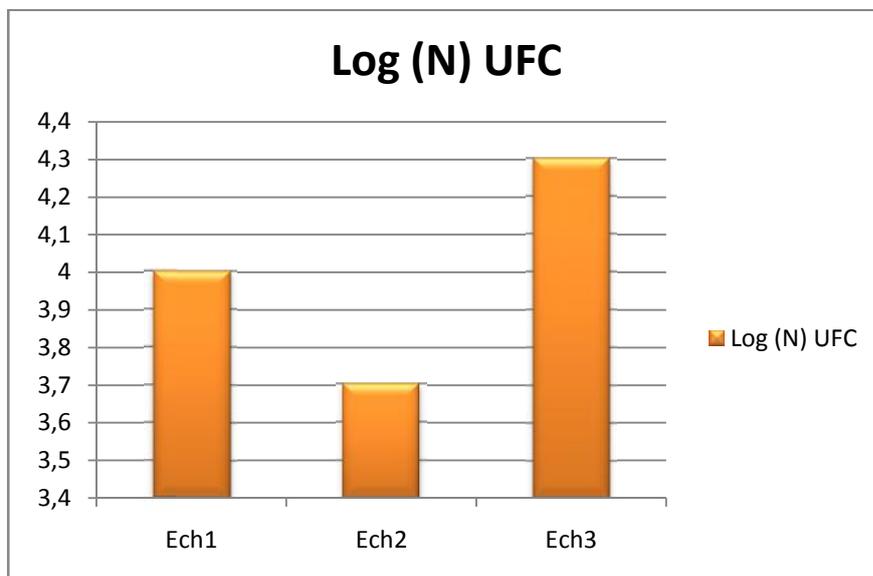
Après manipulation du protocole on à des résultats suivant :

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



**Figure 7 :** Dénombrement des colonies sur milieu gélose PCA.

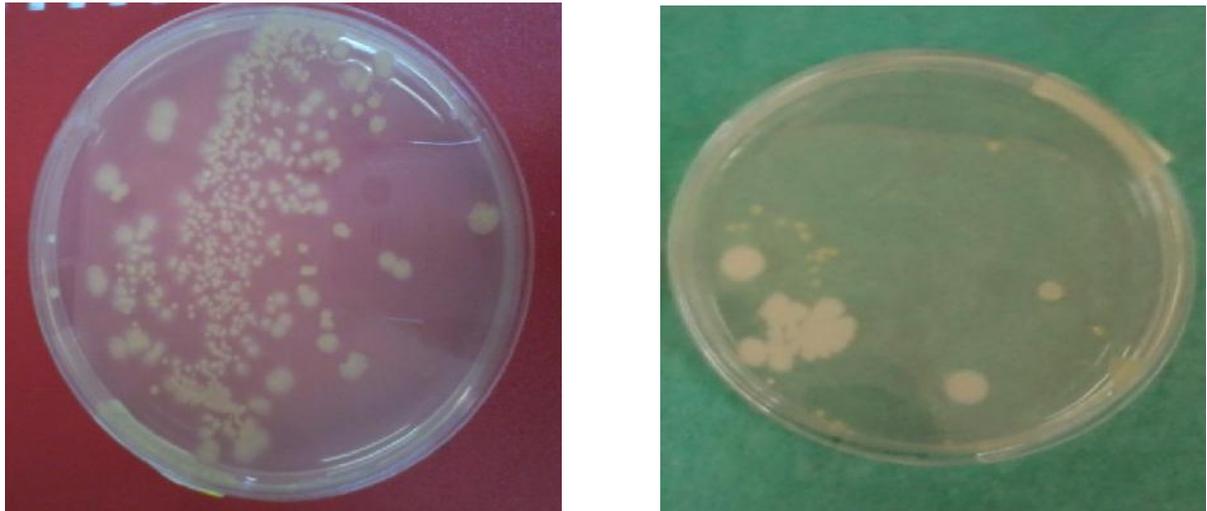
Les résultats de dénombrements de FTMT sont montrés dans la figure suivante :



**Figure 8 :** Graphe de résultats de dénombrement de flore FTMT des trois échantillons

### 1- 2. Contribution de la collection des souches :

Des colonies à différents aspect macroscopique sont apparues après incubation 48h sur gélose PCA.



**Figure 9:** Exemples d'aspect macroscopiques des isolats cultivés sur gélose PCA.

### 1.3-Isollements et purifications souches

Après purification des colonies par ensemencement series de stries, 20 souches sont sélectionnées à partir de milieu gélose nutritif, la sélection selon des critères fixés.

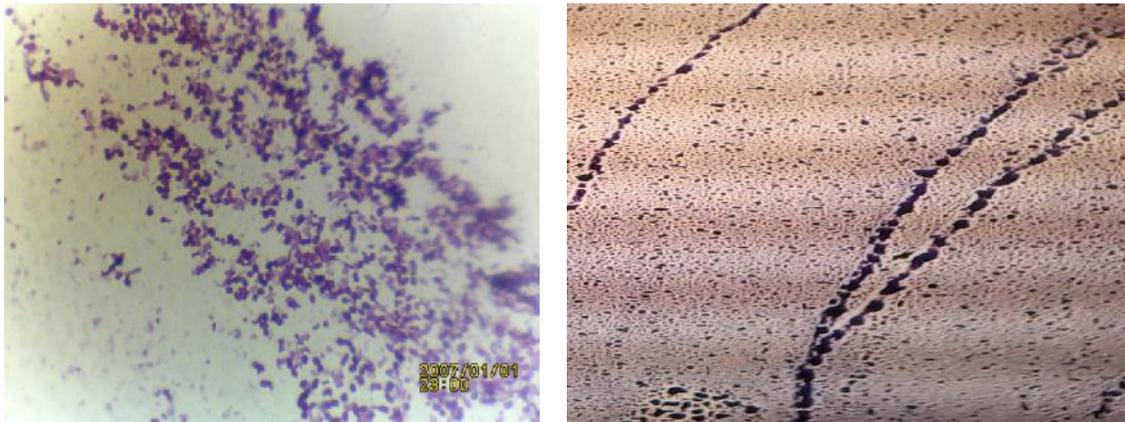


**Figure 10:** Ensemencement sur gélose nutritif (ensemencement par séries de stries).

### 1.4- Caractérisations phénotypiques des isolats

#### 1.4.1- Aspect microscopique

Après la coloration de Gram, nous avons passé à l'observation microscopique aux grossissements (G : x 100) avec l'huile à immersion, où nous avons pu observer que les bactéries étaient Gram positif apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations. L'observation microscopique a montré que 95 % des souches étudiées sont des bacilles en paire, en chainettes et en amas (**figure11**).



**Figure 11** : Observation microscopique de la coloration de Gram<sup>+</sup> (x 100).

### 1.5-Caractéristiques biochimiques des isolats

#### 1.5.1-Mise en évidence des enzymes respiratoires

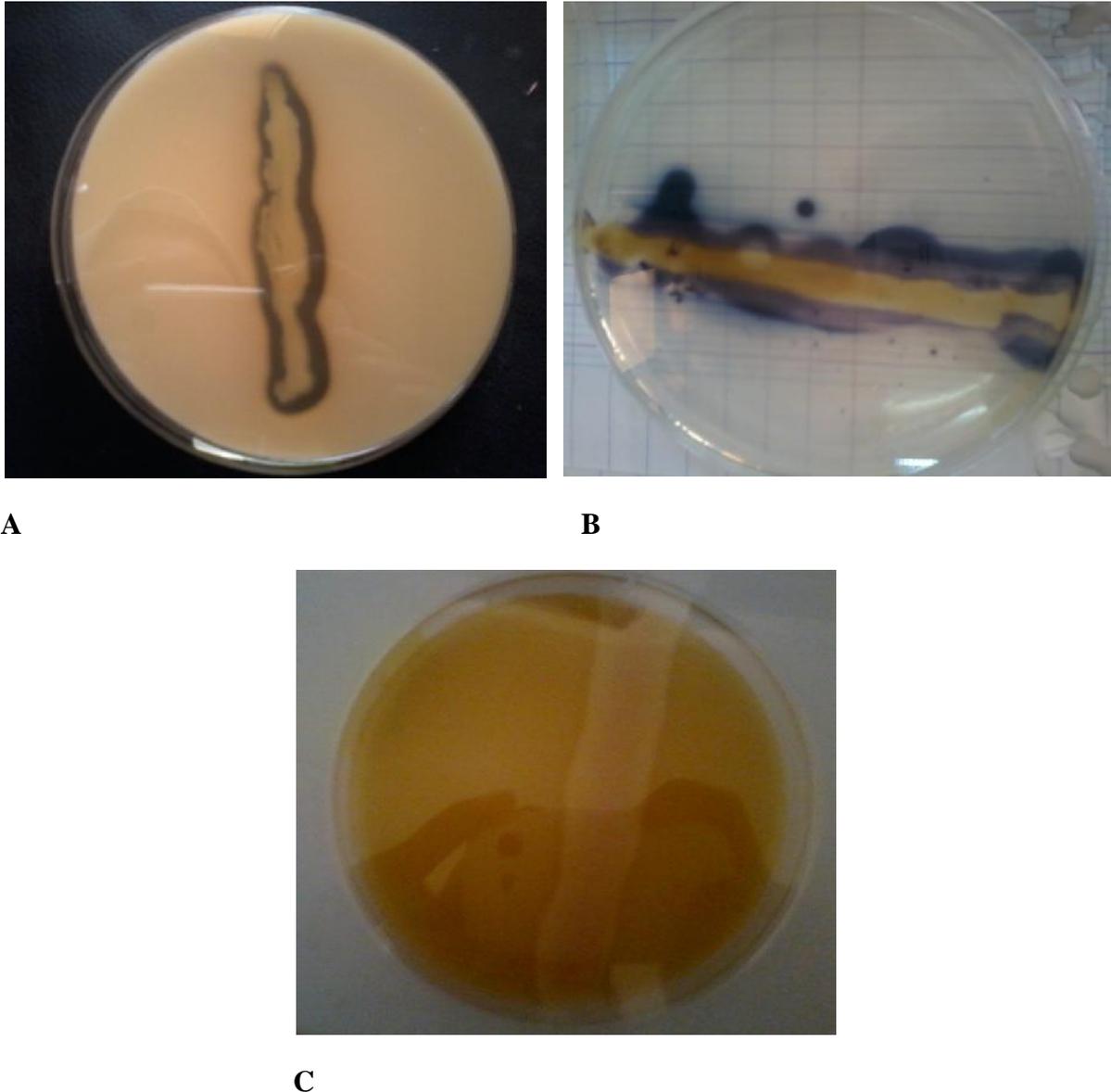
L'observation de test catalase est montrée que toutes les souches étudiées sont catalase<sup>+</sup>, Elles sont donc aérobies ou anaérobies facultative



**Figure 12** : Observation d'effervescence (catalase positive).

### 1.5.2-Résultats de la mise en évidence les activités enzymatiques :

Les activités protéolytique, amylolytique, et lipolytique ont été réalisées en utilisant les milieux suivants : gélose a amidon, gélose au lait et gélose a émulsion d'œuf (la lécithine), les résultats sont illustrés dans les figure et mentionnées dans le tableau 6.



**Figure 13 :** Activité enzymatique (A. Hydrolyse de caséine, B. Hydrolyse l'amidon, C. Hydrolyse de lécithine).

### 1.5.3-Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de simmons

La capacité des souches à assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est observée 10% souches dégradent le citrate la figure montre citrate positive (bleu) et négative (vert). Les résultats sont résumés dans le tableau 6.



**Figure14 :** Exemples de mise en évidence de l'utilisation de citrate (source de citrate de Carbone, la colore vert négatif et le bleu positif).

### 1.5.4-Utilisation de milieu au mannitol mobilité et TSI :

Pour le test de mannitol 55% des souches sont positives, et le TSI 80% sont positives .Les résultats des deux tests sont résumés dans le tableau 6.



**A**



**B**

**Figure 15** : exemple de la mise en évidence de l'utilisation de mannitol (A : la colore jaune positif et le rose négatif et pour la mobilité l'observation de trouble), TSA (B : la colore jaune positif).

**Tableau 6** : Les résultats des tests biochimiques de la galerie classique.

Souche	Citrate	mannitol	Mobilité	TSI	Catalase	Lécithinase	Amidon	Caséine	Morphologie
1	-	-	+	-	+	-	+	-	Jaune, sec, étoilé
2	-	+	+	+	+	-	-	-	Blanc, crémeuse
3	+	+	+	+	+	-	-	-	Blanc crémeuse
4	-	-	+	+	+	-	-	-	Rose, crémeuse.
5	-	+	+	+	+	-	-	-	Blanc crémeuse
6	-	+	-	+	+	+	+	+	Crémeux, rond, non plat, grand , opaque ,blanc.
7	-	+	-	+	+	+	+	+	Crémeux, rond, non plat, grand , opaque ,blanc.
8	-	-	-	+	+	-	-	+	Banc, a bord transparent, muqueuse,
9	-	-	-	+	+	-	-	+	Banc, a bord transparent, muqueuse
10	-	+	+	+	+	-	+	+	Jaune sec
11	-	+	+	+	+	-	-	-	Crémeuse, jaune, petit, rond.
12	-	+	+	+	+	-	+	-	Crémeux, blanc, ronde, plat, opaque .petit
13	+	-	+	-	+	-	-	-	Crémeuse, plats blanc, rond, petit
14	-	+	+	+	+	-	-	-	Jaune petit,
15	-	+	+	+	+	-	-	-	Jaune petit.
16	-	-	-	+	+	-	-	-	Blanc crémeuses
17	-	-	+	+	+	-	-	-	Crémeuse, blanc, petite, étoilé.
18	-	-	+	+	+	-	-	-	Crémeuse, plats blanc, étoilé, petit
19	-	-	-	+	+	-	+	+	Crémeuse, rond, non plat, grande , opaque ,blanc.
20	-	+	+	+	+	-	-	-	Crémeuse, plats blanc, rond, petit

## 1.6-Résultats des plaques API20E :

Le reste des tests biochimiques ont été réalisés sur plaques API, 09 souches ont été sélectionnées et identifiées, les résultats obtenus par des calculs pour l'identification microbienne (*Jean et al ., 2007*)



A



B



C

**Figure 16 :** Résultats des plaques API de quelques souches (A. avant incubation B,C après incubation ).

Tableau 7: Résultats de la lecture de la plaque API

Souche	ONPG	ADH	LD C	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	INP	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NIT
4	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
5	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
10	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
11	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-

Les espèces identifiées par la plaque API sont :

**Souche 11 et 5 :** *Bacillus licheniformis*.

**Souche 9 et 3 :** *Bacillus amyloliquefaciens*.

**Souche 1, 10 , 16 :** *Bacillus megaterium*.

**Souche 4 :** *Geobacillus stearothermophilus*.

**Souche 6 :** *Bacillus cereus*.

### Discussion

Cette étude a permis l'isolement de 20 souches à partir du lait pasteurisé, en se basant sur leurs approches morphologique, microscopique et biochimique. Les résultats obtenus par l'identification (coloration de Gram et les tests biochimiques) ont montré que la plupart des isolats sont des bacilles à Gram positif avec des extrémités arrondies, aérobies, capables de former des spores à catalase positive, ces caractéristiques représentent les traits typiques des espèces appartenant au genre *Bacillus* (**Bergey's manual of systematic biology**).

Pour une identification plus efficace ont utilisé d'autres tests biochimiques étaient réalisés en utilisant la galerie API, les résultats de cette test montre que les isolats appartiennent au genre bacillus de différentes espèces : *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*.

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

Malgré que Les bacilles thermophiles ne sont pas pathogènes, mais elles peuvent être la cause d'altération du lait donc ce sont des indicateurs de l'hygiène du processus et des bonnes pratiques de fabrications (**Burgess et al., 2010**), en plus la potentiel enzymatique des bacilles thermophiles telles que les protéase et lipases peuvent jouer un rôle important dans la réduction de la durée de vie du lait (**Chen et al., 2003**).

Les spores de *Bacillus cereus* sont capables de résister à de fortes températures et donc aux principales méthodes de stérilisation de l'industrie agroalimentaire. Il a été montré que dans le lait UHT (ultra haute température), les spores présentes sont alors activées par ce choc thermique. Les bactéries, qui ont ainsi germé, peuvent alors produire des enzymes extracellulaires. Ces enzymes sont produites lors de la fin de la croissance exponentielle ainsi que pendant le début de la phase stationnaire (**Chen et al., 2003**).

La production de ces enzymes extracellulaires est associée à la sporulation de *Bacillus cereus* (**Chen et al 2004**). Ces dernières donnent au lait une saveur anormale et des défauts de structure (**De Jonghe et al., 2010**). Les mécanismes altérant les propriétés physiques (microstructure, viscosité) et la saveur du lait sont complexes. Ils résultent d'une combinaison de réactions physiques, chimiques et biochimiques (**Chen et al., 2003**).

Cette altération ne touche pas seulement la qualité du lait pasteurisé mais d'autres aliments fabriqués à partir de ce lait comme les fromages, les crèmes glacées et le yaourt car sont des produits transformés basant sur la qualité microbiologique de la matière première. **Cheng et al., (2003)** ont montré que même si les bactéries qui contaminent le lait ne survivent pas à sa transformation, les enzymes, elles sont encore plus résistantes à la température. Dans le cas de thermophiles facultatifs, certaines souches de *Bacillus licheniformis* sont également capables de produire une substance extracellulaire visqueuse qui peut affecter la qualité du lait pasteurisé et de crème (**Gilmour et Rowe, 1990**).

Les bacilles aérobies sporulés sont des bactéries d'altération mais elles peuvent causer des toxi-infections alimentaires par leur capacité de produire des toxines. **Samapundo et al., (2011)** montre que *Bacillus cereus* capables d'induire des syndromes diarrhéiques par la production des toxines : la Nhe (entérotoxine non hémolytique), Hbl (Hémolysine BL) et Cyt K (cytotoxine K). Ces entérotoxines impliquées dans des TIAC sont produites lors de la phase de croissance végétative des *B. cereus* dans le petit intestin de la personne contaminée (**Granum et Lund ; 1997**).

La contamination du lait pasteurisé à plusieurs facteurs, l'environnement, l'équipement, la saison, la charge microbienne du lait cru. Le taux de contamination varie en fonction de la saison (**Fernandes, 2009**).

La concentration du lait en spores aérobies au cours du printemps et en été plus élevée due à la contamination des trayons par le sol pendant le pâturage (**Vissers et al., 2007**). Pendant la période d'hébergement, le lait cru peut être contaminé par des matières fécales, fourrage et laitières: foin et la poussière ont été sources importantes de contamination considérées en hiver (**Magnusson et al., 2007; Christiansson et al., 1999**).

Les systèmes de traite fermés, mieux conception sanitaire de l'équipement, un nettoyage plus efficace des vaches et des systèmes efficaces «clean in place» permettent de produire du lait cru avec une très faible contamination microbienne (**Barbano et al., 2006**).

Le genre *Bacillus* était présent avant et après pasteurisation ce qui est logique cette bactérie pathogène peut se développer dans le lait cru refroidi à 8°C, et ses spores sont thermorésistantes pouvant échapper à la pasteurisation. Ces bactéries sont des déterminants significatifs de la durée de vie du lait pasteurisé (**Stepaniak, 2009**).

Dans le cas des bacilles thermophiles les spores de *Geobacillus* spp. Ont le potentiel pour survivre à des traitements UHT (**Schwarzenbach et Hill, 1999**).

Les *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilus* peuvent survivre à 135 °C pendant 10 s. De plus, une étude antérieure a montré que, sur un certain nombre de souches de *Bacillus* (incluant *Bacillus licheniformis*) obtenus à partir de produits laitiers, seuls *Bacillus sporothermodurans* a survécu à des traitements thermiques élevés de 120 °C pendant 5 s (**Mostert et al., 1979**).

**Novak et al., 2005** ont mené une étude sur la résistance thermique de *B. cereus* dans le lait écrémé. Les valeurs de D rapportées pour la souche étaient 1,189 min à 72 °C, 5,13 min à 90 °C, 7 min à 100 °C, et de 1,1 min à 130 °C. Les valeurs D à 90 °C.

**En 2001 Janstova et Lukasova** ont mené une étude sur la thermorésistance de quelques souches du genre *Bacillus* dans le lait de vache à 95°C qui a donné des valeurs de D de 4,40 pour *Bacillus Sphaericus* de 2,02 pour *Bacillus amylolytique* et de 3,96 pour *Bacillus coagulans* ce qui montre que dans les mêmes conditions cette valeur est caractéristique de chaque souche.

# ***Conclusion***

Pour produire du lait sécurisé sans germes pathogènes avec une durée de vie prolongée, les industries laitières appliquent des traitements thermiques sur le lait cru qui possède une charge microbienne très élevée, ce traitement thermique qu'est la pasteurisation leur but est d'éliminer les bactéries pathogènes et d'altération. Mais le problème qui pose c'est que la pasteurisation permet l'activation et la germination des spores thermorésistants donc l'altération de produit final.

Le but fondamental de ce travail c'est l'isolement et l'identification des bactéries thermorésistants capable de former des spores à partir de trois échantillons de lait pasteurisé au niveau de la laitière de GIPLAIT « Mansourah » dans la région de Tlemcen.

Vingt souches ont été isolées et identifiées. L'identification phénotypique a montré que la majorité des isolats 95 % sont des Bacilles à Gram positif capable de former des spores, Les résultats de la caractérisation biochimiques montre que tous les isolats sont catalase positives. Elles sont donc aérobies ou anaérobies facultatives et que la moitié des souches ont une oxydase négative, elles sont capables aussi d'hydrolyser la caséine, l'amidon, la lécithine.

Au cours de notre étude nous avons pu identifier 20 isolats dont : *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*.

Enfin pour prévenir contre la post-contamination du lait pasteurisé et le problème d'altération il faut :

- ✚ L'application des règles d'hygiène et de fabrication en contrôlant la qualité microbiologique du lait cru qui la matière première.
- ✚ L'amélioration du système de nettoyage en place (CIP) des équipements laitiers et l'application des actions physiques au cours du nettoyage.
- ✚ Changement du traitement thermique ou bien la mise en jeu sur les paramètres de pasteurisation.

***Références  
bibliographiques***

### *A*

**Ababsa A. 2012.** *Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait.* Mag Génie microbiologique. Univ Ferhat Abbas- Setif Faculté Des Sciences De La Nature Et de la vie.

**Adjaine Oet Amiri. 2013.** *Etude de la qualite microbiologique du lait camelin collecte Localement en fin de lactation.* Master Spécialité : Microbiologie appliquée.

**Afchain et al (2008)** In Khrbouche.

**Aires et al., 2009** In Malek F.

**Akli Bordjah. 2011.** Analyse physico-chimique et microbiologie de lait UHT demi-écrémé centre de formation professionnelle El Hidhab Sétif Algérie - BTS en contrôle de qualité dans les industries agroalimentaires.

**Alais . (2003).** Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Edition Sepaic, Paris.

**Alais C.-** Sciences du lait: Principes et techniques laitiers. IVE édition, Ed. SEPAiC, Paris, 1984,814 p.

**Alais C., Linden G. et Miclo L. (2008).** Biochimie alimentaire, Dunod 6emeédition. Paris. pp :86-88.

**Amiot, Laurent, Boutonnier , (2002).** Science et technologie du lait. Edition presses internationales polytechnique. P 1-91 : 221-225.

**Andersson et al., 1995** In Kharbouche.

**Arrêté Interministériel (1993).** D'après le journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire.n°69 correspondant aux spécifications et a la présentation de certains laits de consommation. P 2-5.

**Aslanza deh, 2006.** Biochemical profile-Based Microbial identification Systeme. In Tang, Y.W. et Stratton, C.W.Advanced Technique in Diagnostic Microbiology. USA: Springer Science+Busines Media, LLC.p.84-115.

### *B*

**Ba Diao M., (2000) :** La qualité du lait et produits laitiers. Communication à l'atelier de restitution de l'étude sur la filière lait au Sénégal. GRET / ENDA-GRAF Dakar.

**Badinand F. (1994).** Maîtrise du taux cellulaire du lait. Rec. Méd. Vét., n°170.

**Baweja *Et Al.*, 2008**in Kharbouche

**Beaman, T., Gerhardt, P., 1986.** Heat Resistance Of Bacterial Spores Correlated With Protoplast Dehydratation, Mineralisation And Thermal Adaptation. Applied And Environmental Microbiology 52 (6), 1242\_1246.

**Beaman, T., Greenamyre, J., Corner, T., Pankratz, H., Gerhardt, P., 1982.** Bacterial Spore Heat Resistance Correlated With Water Content, Wet Density, And Protoplast/ Sporoplast Volume Ratio. Journal Of Bacteriology 150 (2), 870\_877.

**Behaze I et Zahzouh A ,2014** ,Impact du système de nettoyage CIP, par la qualité physique-chimique et microbiologique de lait pasteurisé et de l'ben conditionnés. Mastre en agronomies Univ tlemcen.

**Beneddine Hadjer et Djebrit Cheuaiba. 2015.** Etude de l'activité antimicrobienne des quelques souches lactobacilles isolées à partir du lait de chamelle vis-à-vis des quelques souches pathogènes ciblées. Sciences de la nature et de la vie microbiologie fondamentale et appliquée. univ kasdi merbah ouargla.

**Benhedane N. 2012.** Qualité microbiologique du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est algérien. Magis Biotechnologie Alimentaire . Univ Mentouri – Constantine – Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires.

**Bensaid M,2008,** Effet du lait et de ces composants sur l'adhésion des spores de bacillus cereus à l'acier inoxydable. Ing, CQA,depar biologie cellulaire et moléculaire. univ tlemcen.

**Berg, R., Sandine, W., 1970.** Activation Of Bacterial Spores : A Review. Journal Of Milk Food Technology 10, 435\_441.

**Bonfoh B. 2002.** Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus en saison chaude dans le district de bamako au mali.

**Bornert G. 2000.** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Méd. Vét.*, , 151, 11, 1003-1010.

**Bouadjaib s. 2013.** Etude physico-chimique du produit laitier traditionnel du Sud algérien «Jben» Recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. Master Microbiologie. Faculte Des Sciences De La Nature Et De La Vie Et Sciences De La Terre Et De l'univers.

**Boudjani W, 2009**, Action de la flore lactique du lait cru sur des bactéries de contamination ,ing, CQA, depar biologie. uni tlemcen.

**Bourgeois C, Mescle J, Zucca J., (1996)**. Microbiologie alimentaire « Aspect Microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments (tome) ». Edition Technologie et Documentation. P 270-277.

**Bourgeois c.m. et Leveau j.y. ,1991**. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Le contrôle microbiologique. Edition TEC et DOC Lavoisier, Paris, volume 3,499P .

**Bourgeois C.M., Mescle J.F.et Zucca J. (1999)**. Microbiologie Alimentaire Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments Tome 1. Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris.

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

**Bouton, Y., 2011** « Microflore Du Lait Cru : Vers Une Meilleure Connaissance Des Ecosystemes Microbiens Du Lait Et De Leurs Facteurs De Variation », P79.

**Bugwicourt, 1995** in Kharbouche.

**Bullard, 2011**. Interactions De Bactéries Lactiques Productrices D'exopolysaccharides Et Effets Sur Les Propriétés Rhéologiques Du Yogourt.

Maîtrise en Sciences et technologie des aliments Département Des sciences des Aliments et de nutrition faculté des sciences de l'agriculture et de L'alimentation Univ Laval Québec.

### C

**Cazemier, A., Wagenaars, S., Ter Steeg, P., 2001.** Effect Of Sporulation And Recovery Medium On The Heat Resistance And Amount Of Injury Of Spores From Spoilage Bacilli. *Journal Of Applied Microbiology* 90, 761\_770.

**Cazemier, A., Wagenaars, S., Ter Steeg, P., 2001.** Effect Of Sporulation And Recovery Medium On The Heat Resistance And Amount Of Injury Of Spores From Spoilage Bacilli. *Journal Of Applied Microbiology* 90, 761\_770.

**Chen, L., Coolbear, T. & Daniel, R. .** Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal* 14, 495–504 (2004).

**Chen, L., Daniel, R. M. & Coolbear, T.** Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal* 13, 255–275 (2003).

**Chethouna f. 2011.** Etude des caractéristiques physico-chimiques, biochimiques et la qualité microbiologiques du lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru. Magister option : Microbiologie appliquée. Univ kasdi merbah ouargla faculte des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers departement des sciences de la nature et de la vie.

**Chouiti Fadia. 2013.** Recherche Et Caractérisation Des Bacilles Thermophiles Dans Le Lait Pasteurisé De Vache Et Le Lait Recombiné. Biologie Moléculaire Et Cellulaire Option : Microbiologie Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.

**Collado, J., Fernández, A., Rodrigo, M., Camats, J. & Lopez, A. M.** Kinetics of deactivation of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology* 20, 545–548 (2003).

**Coulon J-B. et Hoden A. (1991).** Maîtrise de la composition du lait : influence des facteurs nutritionnels sur la quantité et les taux de matières grasses et protéiques. *INRA Prod. Anim.*, 4 (5).pp: 361-367.

### *D*

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

**Deforges J., Derens E., Rosset R. et Serrand M. (1999).** Maîtrise de la chaîne du froid des produits laitiers réfrigérés. Edition Cemagref Tec et Doc, Paris.

**Dergal A, 2013** Caractérisation de la flore thermorésistante de la poudre de lait commercialisée en algérie. microbiologie, depart biologie moléculaire et cellulaire .uni tlemcen.

**Dieng M, 2001.** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur les marchés dakarois. Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 10 .

**Djoughri k et Madani S. 2015.** Etude Microbiologique d'un Produit Laitier Fermenté Traditionnel (j'ben) : Isolement Et Identification Des Bactéries Lactiques. MAST Microbiologie Appliquée. UNIV KASDI MERBAH OUARGLA Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie Département Des Sciences Biologique.

**Dufrennej . ,Bijaward M .,Te Giffel M ., Et Nnothermans R (1995).**Characterstics Os Some psychrotrophic b .Cereus In Int.J.Of microbiology. Vol.27,Pp175-183.

**Dunod. P. Guiraud, J.P. (1998).** Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire. Ed ©Dunod, Paris.

**Duquesnel, R.1993.** Etude de la qualité bactériologique du lait et des fromages de chèvres en région Centre chez des transformateurs fermiers ou industriels en 1989-1990. Th. : Med. Vet. : Toulouse:, 131.

### *E*

**Elwatan., (2011)** Industrie du lait en Algérie.

### *F*

**F.A.O, 1998.** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Rome(Italie).Collection.

**FAO. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO Alimentation et nutrition n°28.

**Finley, N., Fields, M., 1962.** Heat Activation And Heat-Induced Dormancy Of Bacillus Stearothermophilus Spores. Applied Microbiology 10, 231\_236.

### G

**Gaillard S. 2003.** Modélisation De La Thermorésistance, De La Viabilité Et Du Comportement A La Recroissance De Bacillus Cereus, En Fonction De La Température, Du Ph Et De L'activité Aqueuse. doc.microbiologie. école doctorale des sciences de la matière de l'information et du vivant. univ de bretagne occidentale.

**Gaillard, 2000.** Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of Bacillus cereus spores. Journal of Food Science 63 (5), 887\_889.

**Gaillard, S., Leguérinel, I., Mafart, P., 1998.** Modelling combined Effect Of The Temperature And Ph On The Heatresistance Of Spores Of Bacillus Cereus. Food Microbiology 15, 625\_630.

**Gaillard, S., Leguérinel, I., Mafart, P., 2000.** Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of Bacillus cereus spores. Journal of Food Science 63 (5), 887\_889.

**Genta et Heluane (2001).** Mesophilic Aerobic Microorganisms in spencer, J. and ragout de spencer, A.L (editors). Food microbiology protocols. Totowa, new jersey : humana press inc. p11-24.

**Ghaoues S. 2011.** Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien. Magister en Sciences Alimentaires Option: Technologie Alimentaire. Institut de La Nutrition, de L'alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires. Univ MENTOURI – Constantine.

**Gombas, D., 1983.** Bacterial Spore Resistance To Heat. Food Technology Nov, 105\_110.

**Gould, G., Hurst, A., 1969.** The Bacterial Spore. Academic Press, London And New York.

**Goursaud J., (1985).** Composition et propriétés physico-chimiques. Dans Laits et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laitière. Luquet F.M.. Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris.

**Griess. 2013** Les problèmes posés par *Bacillus cereus* dans l'industrie agroalimentaire. Master 2 biologie gestion, univ de rennes 1, ufr sciences de la vie et de l'environnement, Département agroalimentaire.

**Gripon JC., Desmazeaud MJ., Le Bars D. et Bergère JL. (1975).** Étude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. Influence de la présure commerciale. Le Lait 55.pp: 502-516.

**Groguennec et al., 2008** in Bessas Faiza et al Contrôle de qualité bactériologique et physico-chimique du lait cru et du lait pasteurisé.

**Guinebertière, Carlin, F., M., Choma, C., Pasqualini, R., Braconnier, A., Nguyen C., 2000.** Spore-Forming Bacteria In Commercial Cooked, Pasteurised And Chilled Vegetable Purees. *Food Microbiology* 17 (2), 153\_165.

**Guiraud J. (2014).** Microbiologie alimentaire .Edition Dunod. Paris. p 6 :96-138.

**Guiraud J.P. (1998) :** Microbiologie des principaux produits alimentaires ; in : «Microbiologie Alimentaire, Techniques de Laboratoire » Dunod, Paris.

**Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. pp : 136-139.

### *H*

**Halima Zadi Karam\* & N-E. Karam. 2006.** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel., , 24, 3, 153-156.

**Hanson ML, Wendorf DA, Houck KB. 2005.** Effect of heat treatment of milk on activation of bacillus spores.*J. Food protect.*68(7): 1484-1486.

**Hashimoto, T., Black, S., Gerhardt, P., 1960.** Development Of  $\alpha$ -Ne Structure, Thermostability And Dipicolinate During Sporogenesis In *Bacillus*. *Canadian Journal Of Microbiology* 6, 203\_212.

**Hassan A.N. et Frank J.F., 2001.** Starter Cultures and their use. *In: Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. et Steele J.L.) *2e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.

**Henriques, A. O., Moran, C., 2000.** Structure And Assembly Of The Bacterial Endospore Coat. *Methods* 20, 95\_110.

**Huck JR, BH Hammond, Murphy SC, Woodcock NH, Boor KJ. 2007.** Tracking spore-forming bacterial contamination in fluid milk-processing systems. *J Dairy Sci* 90: 4872-4883.

*J*

**Institut de l'élevage. (2009).** Traite des vaches laitière. Matériel. Installation. Entretien. 1ere Edition France Agricole. Produire mieux. pp :55-506.

*J*

**Jakobsen Et Murrell, 1977** In Kharbouche.

**Janstova .B,J .Lukasova (2001).**Heatresistance Of Bacillus spp ,Spores Isolated from cow's milk And From Environnement (70).Pp.179-184

**Jeanet ,. (2007)** sciences des aliments « biochimie, microbiologie, procédés, production » sciences et technologie agroalimentaire.

**Jeanet et al., 2008** in in Bessas Faiza et al Contrôle de qualité bactériologique et physico-chimique du lait cru et du lait pasteurisé.

**Jérôme Et al., 2008** In Kharbouche.

**Joffin C et Joffin J. (2003).** Microbiologie alimentaire.5<sup>eme</sup> et 6<sup>eme</sup> Edition centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine. P90-93 :137-139.

*K*

**Kagembega J. M. (1984):** Contribution à l'étude de la salubrité des laits caillés et yaourt à Dakar. Th. Pharm., Dakar, n° 24.

**Kelly Et O'shea, (2011).** Pasteuriziers, Design And Operation. In Fuquay, W.J., Fox, P.F., Meswenney, P.L.H. Encyclopedia Of Dairy Sciences. Second Edition. Oxford: Elsevier Ltd, P . 193-199.

**Kherbouche El-Houaria. 2014.** Influence D'un Traitement A Ultrason Sur La Thermorésistance De Spores De Bacilles Sp. Isolées De Poudre De Lait. Biologie Moléculaire Et Cellulaire .Microbiologie Univ Aboubekr Belkaid Tlemcen.

**Khiati, 2007** in Bessas Faiza et al .Contrôle de qualité bactériologique et physico-chimique du lait cru et du lait pasteurisé.

**Knott *Et Al.*, 1995** In Kharbouche.

**Kohler et chamidt, D.J., Musser, K.A. Et Dumas, N.B.(2009).** Identification Of Aerbic Gram-Negative Bacteria. In Goldman, E. et Green, L.H. (editurs). Practical Handbook Of Microbiology. CRC press Taylo Et Francis Group NY, USA p67.

*L*

**Labioui, 2009.** Étude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Labo de Biotechnologie, Environnement et Qualité, Faculté des Sciences Université Ibn Tofaïl, , Maroc.*

**Larpent J.1991.** Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoire. Edition : LAVOISIER, Paris.

**Larpent J.P. (1990).** Lait et produits laitiers non fermentés. Dans Microbiologie alimentaire. Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Edition Tec et Doc. Lavoisier. pp : 201-215.

**Larpent J.P., 1997.**Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 704-711 P.

**Larpent J.P., Copin M.P., Germonville A., Jacquet M. Et Thetas J.L. (1997).**Microbiologie du lait et des produits laitiers ; in : « Microbiologie alimentaire ». ed.

**Larpent, J.P, (1997).** Mémento technique de microbiologie .3eme Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 910 pages. Larpent,Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris.

**Lechowich et Ordal, 1962** In Kharbouche.

**Leclerc, H., Gaillard, J.-L., Simonet, M., 1995.** Microbiologie Générale. La Bactérie Et Le Monde Bactérien. Doin Editeurs.

**Leclerc, Gaillard J.L Et Simonet M. ,(1995)** .Microbiologie Générale :La Bactérie Et Le Monde Bactérien .ED Doin 1995.P335.Paris.

**Leksir C et M Chemmam.** Contribution à la caractérisation du *klila*, un fromage traditionnel de l'est de l'Algérie. Université 8 Mai Guelma.

**Leuschner, R., Lillford, P., 2001.** Investigation Of Bacterial Spore Structure By High Resolution Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy And Transmission Electron Microscopy. International Journal Of Food Microbiology 63, 35\_50.

### *M*

**Mahieu H. (1985).** Modification du lait après récolte. Dans : Lait et produits laitiers. Vaches, brebis, chèvres. Luquet F.M tome 1. Tech. & Doc., Coll. STAA, Lavoisier, Paris.

**Malek F, (2013).** Identification And Généticdiversity Of Bacillus cereus strains isolated A Pasteurized milk processing In Algéria. Revue. Official Journal Of The Institute National. 93 :73-82.

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

**Mathieu J. (1985).** Initiation à la physicochimie du lait. Guides Technologiques des IAA. Edition Lavoisier Tec et Doc, Paris.

**Mathieu J. (1998).** Initiation a la physicochimie du lait. Edition technologie et documentation. Paris. P 110 - 257.

**Mazas Met Al., (1995).** Effect Of Spoulation Media And Strain On Thermal Of Bacillus Cereus Spores. Int.J.Food Sci.Techn.30:71-78.

**Mechai A. Et Kirane D., (2008).** Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk Raïb . *African Journal of Biotechnology*, 7 (16): 2908-2914.

**Medjahdi K, 2013,** Optimisation des méthodes de nettoyage et de désinfection pour l'élimination formés sur des surfaces en plastique. Magister en maitrise de laq qualité microbiologique et du devloppoement microbien.univ tlemcen.

**Membré Et Al., 2008** In Khrbouche.

**Meunier-Goddik L, Sandra S. (2002).** liquid milk products pasteurized milk.

**Meyer C. et Denis J.P (1999).** Elevage de la vache laitière en zone tropicale. Edition Quae, CTA, presses agronomiques de Gembloux. Microbiology 15, 625\_630.

**Morrissay PA. (1995).** Lactose : chemical and physicochemical properties. dans : Developments in dairy chemistry 3. (FOX PF). Elsevier, London.

*N*

**Najia Ouazzani Taybi et al., 2014.** Evaluation de la qualité microbiologique du lait cru dans la région du Gharb, Maroc [ Evaluation of microbiological quality of raw milk in the region of Gharb, Morocco ]. International Journal of Innovation and Scientific Research p. 487-493.

**Novak J.S., J. Call, P.Tomasula, J.B. Luchansky.2005.**An assessment of pasteurization treatment of water, media, and milk with respect to bacillus spores. J.Food protect., 68(4): 751-7.

*O*

**O'Connor, R., Halvorson, H., 1961.** L-Alanine Dehydrogenase : A Mechanism Controlling The Specificity Of Amino Acid-Induced Germination Of Bacillus Cereus Spores. Journal Of Bacteriology 82, 706\_713.

**OuId Mustapha,A., N'diyae D., OuId Kory B., (2012).** Etude de la qualité du lait pasteurisé des industries laitières situées a nouakcote (mauritanie) sciences du vivant biologie. editions mersenne: volume 4 N 0120804 ISSN 2111 - 4706.

*P*

**Paccalin et Galantier (1986),** in Bessas Faiza et al Contrôle de qualité bactériologique et physico-chimique du lait cru et du lait pasteurisé.

**Palop, A., Manas, P., Condon, S., (1999).** Sporulation Temperature And Heat resistance Of Bacillus Spores : Areview. Journal Of Food Safety 19, 57\_72.

**Perreau M. (2014).** Conduire son troupeau des vaches laitières. Edition France agricole. P 30-69. Processinghandbook. Weinheim: Wiley-Vchverlaggmbh& Co. Kгаа.

### *R*

**Ranieri ML, Huck JR, Sonnen M, Barbano DM, Boor KJ., (2009).** High temperature, short time pasteurization temperature iversly affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized milk. J.Dairy Sci., 92(10): 4823-32.

**Rose *et al.*, 2007** In Kharbouche.

### *S*

**Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R. & Devlieghere, F.** Incidence, diversity and toxin gene characteristics of Bacillus cereus group strains isolated from food products marketed in Belgium. International Journal of Food Microbiology 150, 34–41 (2011).

**Sanaa, M., Bemrah, N., S.Meyer, Cerf, O., Mohammed, H., 2000.** Quantitative Risk Assessment Related To Microbial Food Contamination. Revue D'épidémiologie Et De La Santé Publique 48 Suppl. 2, 11\_23.

**Sikine M. 2013.** Suivi la viscosité et la texture des produits laitiers. Master Sciences et Techniques. Master Sciences et Techniques. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et Techniques maroc.

**Singleton, P. (1999).**Bactériologie.4eme Edition. Dunod, Paris. 317 pages.

**Stanislas Griess, 2013** Master 2 Biologie Gestion Marketing .

**Sugiyama, H., 1951.** Studies On Factor A\_ecting The Heat Resistance Of Spores Of Clostridium Botulinum. Journal Of Bacteriology 62, 81\_96.

*T*

**Toureau V., Bagieu V. et Le Bastard A-M. (2004).** Une priorité pour la recherche :la qualité de nos aliments. Les recherches sur la qualité du fromage. INRA mission communication.

**Transaction D'algie., (2010)** Selon un rapport d'UBI France l'Algérie premier importateur africain de denrées alimentaires.

*V*

**Veisseyre R. 1975** Technologie du lait: constitution, récolte, traitement et transformation. Ille Ed., Paris, La Maison Rustique, , 714 p.

*W*

**Warth, A., 1978.** Relationship Between The Heat Resistance Of Spores And The Optimum And Maximum Growth Temperature Of Bacillus Species. Journal Of Bacteriology 134 (3), 699\_705.

**Williams, &A Leadley, C. E.,. (2006).**Pulsed electric field processing, Power Ultrasound And Otheremerging Technologies. In James G. Brennan (Ed.), Food

**Wolter R. (1988).** Alimentation de la vache laitière. 3éme édition. Editions France Agricole. Paris.

### Z

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

# ***Annexe***

## Annexe 1 :

**Préparation des milieux de cultures utilisés****Gélosés nutritive**

Composant	Quantité
Peptone	15g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	0.2g
Chlorure de sodium	0.5g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
ph	7

**Gélose nutritive standard Plate Count Agar (P.C.A)**

Composant	Quantité
Hydrolysate tryptique de caséine	2.5g
Extrait de viande	5g
Glucose	1g
Extrait de la levure	2.5g
Agar	15g
Eau distillé	1000ml
Ph	7

**Gélose à l'amidon**

Composant	Quantité
Amidon	.5g
L'eau distillée	50ml
Gélose nutritive	500ml

**Milk agar (gélose au lait)**

Composant	Quantité
Poudre de lait écrémé	5g
Eau distillée (a)	50ml
Agar	2g
Eau distillée	50 ml

**Mannitol-mobilité**

Composant	Quantité
Peptone tryptique de viande	20 g
Agar	4 g
Mannitol	2 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
Rouge de phénol à 1 %	4g
Eau distillée	1000 ml
ph	7.6-7.8

**Gélose- Glucose – Lactose – Saccharose – H<sub>2</sub>S (Ou milieu TSI )**

Composant	Quantité
Extrait de viande de boeuf	<b>3g</b>
Extrait de levure	3g
Peptone	20g
Chlorure de sodium	5g
Citrate ferrique	0.3g
Thiosulfate de sodium	0.3g
Lactose	10g
Glucose	1g
Saccharose	10g
Rouge de phénol	0.05g
Agar	12g
Eau distillée	1000ml
Ph	7,4

**Gélose Citrate de Simmons**

Composant	Quantité
Ammonium dihydrogenophosphate	1g
Phosphate dipotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Citrate de Sodium	2 g
Sulfate de magnésium	0.2g
Bleu de Bromothymol	0.08g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
ph	6,6

**Eau physiologie** : 9g de NaCL pour 1000ml

d'eau distillée.

**Emulsion de jaune d'œuf :**

Dans un flacon stérile, récupérez le jaune d'œuf après avoir flambée la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes ensuite ajouté le même volume en eau physiologie stérile. Mélangé rigoureusement puis mettre le mélange au réfrigérateur pendant 24h en suit mélangé avec gélose TSA devant bec bensen.

**Annexe 2 :**

**Tableau 6:** Résultats des analyses microbiologies du lait pasteurisé.

Echantillon	Flore mésophile totale	Flore thermorésistante
1	$2 \cdot 10^3$	$32 \cdot 10^4$
2	$5 \cdot 10^3$	$22 \cdot 10^2$
3	$36 \cdot 10^3$	$27 \cdot 10^3$

## Résumé

Les industries agro-alimentaires ont souvent recours à la pasteurisation afin d'en produire un lait sain, toutefois ce traitement thermique est souvent la source de germination et de multiplication de bactéries sporulées.

Le présent travail visait à analyser une série de trois échantillons de lait prélevés du pasteurisateur de la laiterie de GIPLAIT « Mansourah » située dans la région de Tlemcen.

Dans cette étude, nous avons réalisé l'isolement de 20 souches sur milieu gélose PCA à 30 °C, après un traitement thermique des échantillons au laboratoire (à 80°C pendant 10 min). L'identification des souches prélevées était réalisée par quelques tests biochimiques. 95% des souches identifiées appartiennent aux bactéries à des bacilles Gram positifs, aérobies et aéro-anaérobies facultatives. Les souches ont été par la suite caractérisées par des tests biochimique, ce qui a permis de classer ces souches dans cinq biotypes différents qui sont : *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*.

Les résultats de cette étude montrent que la pasteurisation n'est pas assez efficace pour détruire les bactéries sporulées aérobies du genre *Bacillus*, un nettoyage rigoureux, de bonnes pratiques d'hygiène ainsi qu'un temps de pasteurisation plus important sont vivement recommandés.

**Mots clés :** Lait, pasteurisation, bacilles, sporulation, thermorésistance, altération.

## المخلص

تلجأ المصانع الغذائية في اغلب الأحيان إلى البسترة و ذلك إنتاج حليب صحي خالي من الجراثيم، ولكن هذا العلاج الحراري قد يكون عموماً مصدر لإحياء و تكاثر البكتيريا ذات الابواغ يهدف هذا العمل إلى تحليل ثلاثة عينات من حليب مبستر مأخوذ " جيبلي " .

قمنا في هذه الدراسة بعزل وتنقية 20 سلالة من وسط زرع بعد معالجة حرارية للعينات في المخبر ( 80 درجة مئوية مدة 10 ) وقد تم تحديد خصائص السلالات المعزولة ببعض التحاليل البيوكيميائية . 95 % من السلالات تنتمي إلى بكتيريا العصيات الغرام ايجابي هوائية واللاهوائية اختياري. تم تحليل السلالات المعزولة عن طريق تحليل بيوكيميائي أخرى ومنه صنفت السلالات إلى خمس أقسام مختلفة ولا سيما *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*.

و لقد أظهرت هذه النتائج أن عملية البسترة غير فعالة للقضاء على البكتيريا ذات الابواغ هوائية من صنف العصيات. ولهذا يجب القيام بتنظيف الدقيق و تطبيق قواعد النظافة الصحية إضافة إلى الزيادة في وقت البسترة.

عصيات

الكلمات المفتاحية : الحليب

## Abstract

The food industry often resort to pasteurization in order to produce healthy milk, however, this heat treatment is generally the source of germination and multiplication of spore-forming bacteria.

The present work was to analyze a series of three milk samples taken from milk pasteurizer Giplait "Mansurah" located in the Tlemcen region.

In this study, we performed the isolation of 20 strains on PCA agar at 30 ° C, after heat treatment of the samples on the laboratory (at 80 ° C for 10 min). The identification of strains taken was carried out by some biochemical tests. 95% of identified strains belong to bacteria to Gram-positive bacilli, facultative aero-anaerobic. The strains have subsequently been characterized by biochemical tests , which allowed to classify these strains in five different biotypes that are: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*.

The results of this study show that pasteurization is not effective enough to destroy aerobic spore-forming bacteria of the genus *Bacillus*, a rigorous cleaning, hygienic practices and that more time pasteurization are strongly recommended.

**Key words:** Milk, pasteurization, sporulation, heat resistance, impaired.