

MAST-579-32/01



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAI D TLEMCE N
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement
مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للاغذية للبيوطي والبيئة

Mémoire de master

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présentée par

Bensafi Meriem Amel

Intitulé du Thème:



Recherche et caractérisation des bacilles thermophiles dans le lait cru et la poudre du lait

Soutenu le : 07/07/2013



Devant le Jury composé de :

M^{elle}. Benariba N.

Présidente

Maitre assistante de classe A.

M^{me}. Bensalah F.

Examinatrice

Maitre assistante de classe A.

M^{me}. Ghembaza L.

Examinatrice

Maitre assistante de classe A.

M^{me}. Malek F.

Encadreur

Maitre assistante de classe A.

Année Universitaire : 2012-2013

Remerciements

Louange à DIEU le tout puissant d'avoir insufflé en moi l'amour de la science et d'avoir guidé mes pas jusqu'à la réalisation de ce modeste travail, prière et salut sur notre prophète « Mohamed » et sur sa famille et ses compagnons.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie appliqué à l'agroalimentaire au biomédical et à l'environnement L.A.A.M.A.B. de Tlemcen.

Je tiens d'abord à exprimer toute ma gratitude, mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance à ma promotrice DR. MALEK F. maitre assistante classe B au département de biologie, université Abou Baker Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté d'encadrer ce travail, pour sa patience, pour ces précieux conseils qu'elle n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail et ses qualités humaines et amicales.

Mes remerciements s'étendent également à M^{lle} BENARJBA, N. maitre assistante au département de biologie université de Tlemcen pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury et d'examiner mon travail. Je vous présente mes respects les plus profonds.

Mes vifs remerciements vont à Mme GHAMBAZA BOUBLENZAL. Maitre assistante et chargée de cours au département de Biologie, université de Tlemcen, pour l'attention qu'elle m'a portée à vouloir examiner ce travail et de faire part de mon jury.

Je souhaite également exprimer ma sincère gratitude à Mme BENSALAH F. Maitre assistante et chargée de cours au département de biologie, université Tlemcen pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par ses propositions.

Je tiens aussi à remercier l'équipe de GIPLAIS MONSOURAH, pour leur aide lors des prélèvements des échantillons particulièrement Mr CHAABEN YUCEF.

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



Je dédie cette thèse à ...

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A mon cher Père

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. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et Vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes frères et ma Sœur

Youcef, Abdelmounaim, Anes, Amine et Zineb qui ont cru en moi, qui m'ont encouragé et m'ont donnée la force d'aller jusqu'au bout. Qu'Allah les protège.

A mes adorables copines

Nassima, Fadia et Fatima présentent dans tous mes moments d'examens par leurs soutiens moraux et ses belles Surprises sucrées. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je vous 'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A tous ceux qui m'ont chères

ma tante Souade, mes cousines, mes petites cousines « zinouba, tasnime » que j'adore plus fort que moi-même, Qu'Allah les protège.

A tous ceux qui m'aiment et tous ceux que j'aime.

Résumé

Les bacilles thermophiles constituent un groupe de contamination très important en industrie laitière et largement impliqué dans les problèmes d'altération du lait pasteurisé.

Cette étude a permis de montrer la contamination dans la poudre de lait et le lait de vache local par des bacilles thermophiles isolés sur une gélose TSA à 55°C.

L'identification aux bacilles thermophiles était confirmée par la présence de la spore et celle de l'enzyme catalase.

La détermination du profil biochimique des souches isolées par galerie API 20 E a montré l'existence de 4 biotypes différents.

Ces souches sont caractérisées par la production de diverses enzymes de dégradation des constituants du lait (protéase, amylase, lipase). Elles sont caractérisées par des potentiels de formation du biofilm plus ou moins importants en fonction des souches et des températures d'incubation. Les biofilms les plus importants sont obtenus à 42°C.

Mots clés :

Poudre de lait, lait cru, bacille thermophile, activité enzymatique, biope, cristal violet.

Abstract

Thermophilic bacilli are a group of very important contamination in the dairy industry and heavily involved in the corruption problems of pasteurized milk.

This study helps to show contamination in the powdered milk and local cow's milk by thermophilic bacilli isolated on TSA at 55 ° C.

Identification with thermophilic bacilli was confirmed by the presence of the spore and the enzyme catalase.

Determining the biochemical profile isolated by API 20 E gallery strains showed the existence of four different biotypes.

These strains are characterized by the production of various degradation enzyme milk components (protease, amylase, lipase). They are characterized by the potential of biofilm formation more or less significant depending on the strain and incubation temperatures. The most important biofilms are obtained at 42 ° C.

Key words:

Powder milk, raw milk, bacillus thermophilic , enzyme activity, bioype, crystal violet.

Liste des abréviations

AFNOR : associations française normalisation

°C : degré

CIP : Cleaing in place.

DO : Densité Optique

EDS : Eau distillée sterile

EPS : Extracellulaire polymérique substance

H :Heure.

LDV : Lait de vache.

Min : Minute.

ml : Millilitre

nm : Nanomètre

PDL : Poudre de lait

TSA :Trypticase-Soja- Agar.

TSB : Trypticase - Soja-Bouillon.

TSE :Tryptone-Sel-Eau

μ : Micro.



Liste des figures

Figure 1 : Les stades de développement des biofilms (Srey et al., 2013).....	12
Figure 2 :Micrographie électronique à balayage d'un biofilm de 18-h formé par <i>A. flavithermus</i> sur une surface en acier inoxydable (Flint et al.,2001).....	13
Figure 3 :Site de prélèvement du lait cru et l'échantillonnage.....	14
Figure 4 : Site de prélèvement de la poudre du lait et l'échantillonnage.....	14
Figure 5 : Photo de la galerie API 20 E.....	17
Figure 6 :Schéma représentant le protocole de formation des biofilms par la méthode des microplaques de titration 96puits.....	20
Figure 7 : Aspect des colonies sur la gélose TSA.....	22
Figure 8 : Photos prise au microscope optique (G×100).....	22
Figure 9 : Observation microscopique d'une spore centrale (G×100).....	23
Figure 10 : Une souche bactérienne de la catalase positif.....	23
Figure 11 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 1.....	24
Figure 12 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 2.....	25
Figure 13 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 3.....	25
Figure 14 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 4.....	25
Figure 15 :Activité protéolytique des souches sur gélose au lait.....	27
Figure 16 : Activité amylolytique sur gélose à l'amidon.....	27
Figure 17 : Activité lipolytique des souches sur gélose au tween 80.....	28
Figure 18 : Formation du biofilm sur milieu TSB à 30°C.....	30
Figure 19 : Formation du biofilm sur milieu TSB à 42°C.....	30
Figure 20 : Formation du biofilm sur milieu TSB à 55°C.....	31
Figure 21 : Formation du biofilm sur le milieu lait écrémé à 30°C.....	32
Figure 22 : Formation du biofilm sur le milieu lait écrémé à 42°C.....	32
Figure 23 : Formation du biofilm sur milieu lait écrémé à 55°C.....	33

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison entre la composition du lait cru et la poudre du lait.....3

Tableau 2 : Caractéristiques de certains des bacilles thermophiles.....9

Tableau 3 : résume les origines des souches isolées.....21

Tableau 4 : les résultats des testes biochimiques des souches.....24

Tableau 5 : tableau récapitulatif des biotypes.....26

Tableau 6 : tableau qui résume les activités enzymatiques28

TABLE DE MATIERE

Résumé

Abstract

Introduction générale

Partie I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les Laits

1. Généralités.....	1
2. le lait de vache.....	1
3. la poudre du lait.....	2
3.1 méthodes de production du lait en poudre.....	2
4. qualité organoleptique du lait.....	3
5. la valeur alimentaire du lait.....	3
6. composition chimique moyenne du lait.....	3
7. la contamination du lait	4

Chapitre II : La Flore Microbienne Du Lait

1. le lait de vache	5
1.1 la flore originale.....	5
1.2 la flore de contamination.....	5
2. la poudre du lait.....	6
2.1 La flore originale.....	6
2.2 la flore de contamination.....	7

Chapitre III : Les Bacilles Thermophiles

1. généralités.....	8
2. définition.....	8
3. les caractères physico-chimiques des bacilles thermophiles.....	9
4. importance des bacilles thermophiles dans l'industrie laitière.....	10

4.1 Des risques de détérioration des bacilles thermophiles	10
4.2 Formation de spore	10
4.3 Résistance	11
5. Bacilles thermophiles comme indicateurs d'hygiène	11
6. La formation du biofilm par des bacilles thermophiles en industrie laitière	11
6.1 généralités sur Les biofilms.....	11
6.2 formation du biofilm.....	12
6.3 Les biofilms des bacilles thermophiles.....	13

Partie II : ETUDE EXPERIMENTALE

Matériels et méthodes

1. Prélèvements.....	14
2 .Transport des échantillons.....	15
3 .Traitement des échantillons.....	15
3.1 Préparation des échantillons.....	15
3.2 Traitement thermique.....	15
3.3 Préparation des dilutions.....	15
3.4 Ensemencement.....	15
3.5 Identification phénotypiques des souches	16
3.5.1 Caractères morphologiques des souches.....	16
3.5.1.1 Aspect macroscopique	16
3.5.1.2 Aspect microscopique	16
3.5.2 Caractères biochimiques des souches.....	17
3.5.2.1 Teste de catalase	17
3.5.2.2 Système API 20 E.....	17
3.5.2.3 Détermination des activités enzymatiques.....	18
3.5.2.3.1 Activité protéolytique	18
3.5.2.3.2 Activité amylolytique	18
3.5.2.3.3 Activité lipolytique	18

3.6 Détermination du potentiel de la formation du biofilm.....19
3.6.1 Formation du biofilm dans les microplaques de titration.....19
3.6.1.1 Coloration des biofilm.....19

Résultats et discussion

1. Isolement.....21
2. Identification phénotypiques des souches.....21
2.1 Caractéristiques morphologiques des souches.....21
2.1.1 Aspect macroscopique.....21
2.1.2 Aspect microscopiques.....22
2.2 Caractères biochimiques des souches.....23
2.2.1 Test de catalase.....23
2.2.2 Système API 20 E23
2.2.3 Détermination des activités enzymatiques.....26
2.2.3.1 Activité protéolytique.....26
2.2.3.2 Activité amylolytique.....27
2.2.3.3 Activité lipolytique28
3. Détermination du potentiel de la formation du biofilm.....29

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes



Introduction générale

Introduction

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 et la multiplication cellulaire.

Les microorganismes existant de l'environnement vont trouver dans le lait un substrat idéal pour leur développement. La présence de nombreux facteurs de croissance permettra de satisfaire de nombreuses espèces microbiennes exigeantes et difficiles à cultiver dans un milieu moins complet. Les bactéries sporulées trouvent dans le lait et des produits laitiers les conditions favorables à leur croissance.

Les bacilles thermophiles sont capables de croître à des températures élevées (40-65°C) et sont caractérisés par leur pouvoir de former des spores thermorésistantes. Ce sont des contaminants importants dans l'industrie laitière, fréquemment isolés de la poudre de lait. Ils et sont responsables des altérations des laits traités thermiquement et de la diminution de leur durée de vie. Ils sont capables de former aussi sur les équipements laitiers des biofilms, qui participent à la dégradation de la qualité du lait.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la contamination de la poudre de lait et du lait cru liquide par les bacilles thermophiles, ainsi que leur contribution à la contamination du lait pasteurisé produit dans une laiterie de la région de Tlemcen. Pour cela nous adopterons la démarche expérimentale suivante :

- Isolement et dénombrement sur plaque des bacilles thermophiles dans des échantillons de poudre de lait et de lait cru liquide.
- Identification phénotypique des souches isolées.
- Caractérisation des bacilles thermophiles isolés par l'étude de leur pouvoir enzymatique et leur capacité de former des biofilm.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

La pasteurisation du lait



Chapitre I : Les Laits

1. Généralités

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

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

2. Le lait de vache cru

Le lait de vache a toujours été un aliment essentiel de l'alimentation humaine. L'augmentation des échanges commerciaux a rapidement posé des problèmes de qualité de ce lait. En 1905, la première loi de répression des fraudes est mise en place pour le lait. A cette époque, le lait était régulièrement coupé à l'eau et la qualité sanitaire parfois catastrophique de l'eau était responsable de nombreux cas d'intoxication. En 1969, la loi Godefroy a défini le paiement du lait à la qualité ; elle visait à élever la qualité bactériologique du lait et le niveau moyen de la composition en matières grasses et en matières azotées, grâce à un système d'incitation financière (paiement différentiel). Au fil des années, la liste des critères de rémunération du lait à l'éleveur s'est allongée avec notamment l'introduction du comptage des germes totaux (**Courtet- Leymarios., 2010**).

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

Le lait cru, ou lait n'ayant subi aucun traitement d'assainissement, peut contenir des bactéries pathogènes appartenant aux genres *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* qui peuvent causer des maladies d'origine alimentaire comme la fièvre, les vomissements, la diarrhée voire l'insuffisance rénale, et même la mort. Ignorants des bonnes pratiques d'hygiène, les acteurs de la filière laitière locale, contribuent à la dissémination et à la multiplication des germes pathogènes dans le lait lors de la traite et de

la commercialisation (**Kouame-Sina et al., 2010**). Une évaluation de la qualité hygiénique du lait permet de rechercher la microflore naturelle et des microorganismes témoins de contaminations extra-mammaires éventuelles (**Labioui et al., 2009**).

3. La poudre de lait

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

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

Bien que le lait en poudre est microbiologiquement stable et acceptable, de nombreux changements physico-chimique, tels que la cristallisation du lactose, l'agglomération de particules, des réactions d'oxydation de graisse, la réaction de Maillard, peuvent se produire pendant le stockage et modifier ces propriétés physiques et fonctionnelles telles que, la fluidité, propriétés de reconstitution, propriétés émulsifiantes et moussantes des poudres. L'ampleur de ces changements est fortement dépendantes des conditions de stockage (température, humidité et temps), et une meilleure compréhension de la modification physico-chimiques qui se produisent dans des conditions de stockage seront être très utiles pour prédire le comportement des poudres lors de leurs utilisation finale (**Esther et al., 2008**).

3.1 Méthodes de production de la poudre du lait

A l'échelle industrielle, le lait en poudre est produit par deux méthodes: le séchage sur cylindres et le séchage par atomisation (à une température de 143°C-149°C). Dans le cas du séchage sur cylindres, le lait est réparti sur des tambours rotatifs chauffés à la vapeur. L'eau évaporée est éliminée par un courant d'air. Dans la fabrication de poudre par atomisation, le lait subit une évaporation sous vide jusqu'à l'obtention d'environ 45 à 55 % d'extrait sec avant qu'il soit injecté dans une centrifugeuse qui tourne de 5000 à 25000 tr/min. L'atomisation donne lieu à un nuage de fines gouttelettes dont la surface effective est d'environ 700 fois plus importante (**Abdenouri et al., 2008**).

4. Qualité organoleptique du lait

L'aspect, l'odeur, la saveur, la texture ne peuvent être précisées qu'en comparaison avec un lait frais.

- La couleur :

blanc mat, est due en grande partie de la matière grasse, aux pigments de carotène, aux caséines et à la vitamine B2 pour la phase hydrique.

- L'odeur :

Elle est caractéristique du lait du fait de la matière grasse qu'il contient et fixe des odeurs animales. Elles sont liées à l'ambiance de la traite, à l'alimentation.

- La saveur :

Elle évolue en fonction de la température et de l'alimentation de l'animal, les laits industriels font en général l'objet d'une désaération antérieure au traitement thermique ; de ce fait les odeurs et saveurs sont diminuées et homogènes. **(Elisabeth-vierling, 2008).**

5. Valeur alimentaire du lait

Parmi les nombreuses vitamines que contient le lait, trois méritent une attention particulière :

- la vitamine A (croissance, protection de la peau et des muqueux mécanismes de la vision crépusculaire) ;
- la vitamine D (anti rachitique, meilleure fixation du calcium) ;
- la vitamine B2 (utilisation des glucides, protides, lipides). **(M.konte, 1999).**

6. Composition chimique moyenne du lait

Tableau 1 : Comparaison entre la composition du lait cru et la poudre du lait d'après **(Murwan et al., 2009 et Md. Aftab Uddin et al., 2010).**

Constituants	Le lait de vache	La poudre du lait
Eau	87,20%	4%
Lactose	4,90%	38%
Protéines	3,50%	26%
Matière grasse	3,70%	26%
Cendre	0,70%	6%

7. Contamination du lait

La contamination bactérienne du lait cru peut provenir de différentes sources: l'air, l'équipement de traite, aliments pour animaux, les sols, les matières fécales et de l'herbe (Karmen et al., 2008).

Les contaminations microbiennes primaires proviennent des mamelles, des mains des trayeurs. Les ustensiles et l'environnement constituent les sources de contamination secondaire du lait par les germes. Les contaminations liées aux mamelles, *S. aureus* était apporté secondairement dans le lait par l'eau de traite et les mains des trayeurs ; *E. coli* par l'environnement et les ustensiles ; les Entérocoques par l'environnement, l'eau de traite et les ustensiles. La présence de chiens et de rongeurs dans l'environnement des vaches peut constituer une source de contamination des ustensiles qui ne sont pas rangés hors de portée de ces animaux (Kouamé-Sina et al., 2010).

Un lait ne doit normalement pas contenir d'antibiotiques et/ou de résidus de médicaments. Les résidus d'antibiotiques peuvent induire une antibiorésistance des pathogènes, entraîner chez le consommateur des perturbations de la flore intestinale normale, des troubles digestifs et des réactions allergiques. D'autre part, un lait contenant des concentrations trop importantes d'antibiotiques est impropre à la fabrication de crème mature pour lesquelles une fermentation intervient (yaourt, fromage, beurre) (Kouamé-Sina et al., 2010).

Chapitre II : La flore microbienne du lait

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

1. le lait de vache

1.1 la flore originale

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

D'autres micro-organismes peuvent se retrouver dans le lait cru lorsqu'il est issu d'un animal malade, ils sont généralement pathogènes et dangereux au point de vue sanitaire. les pathogènes pour l'homme sont les micro-organismes suivants : *mycobactérium bovis*, *mycobactérium tuberculosis*, *mycobactérium paratuberculosis*, *brucella*, *streptococcus agalactiae*, *escherichia coli*, *salmonella*, *leptospira*, *listéria monocytogenes* , *bacillus cereus* , *pasteurella multocida*, *clostridium perfringens* , *coxiella burnetti*, *campylobacter*, *yersinia*. (**Bourgeois., 1996**).

1.2 la flore de contamination

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

- Fèces et téguments de l'animal : Coliformes, Entérocoques, Clostridium, éventuellement des entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*) .
- Sols : Streptomyces, Listéria, bactéries sporulées, spores fongiques.

- Litières et aliments : Flore banale variée, en particulier *Lactobacillus*, *Clostridium butyriques*.
- Equipement de trait et de stockage du lait : Microcoques, levures et flore lactique avec lactobacilles, Streptocoques, (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*) .
- Manipulateurs : Staphylocoques, dans le cas de traite manuelle, mais aussi germe provenant d'expectorations, de contaminations fécales.
- Air et eau : Flores diverses dont *Pseudomonas*, bactéries sporulées.
- Vecteurs divers (insectes en particulier) : Flore de contaminations fécales.

2. La poudre du lait

2.1 la flore originelle

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

Les bactéries thermophiles et en particulier les espèces du genre *Bacillus* ou ceux qui autrefois appartenait à ce genre sont une préoccupation majeure pour les producteurs de lait en poudre parce que ces bactéries peuvent survivre au traitement thermique au cours de la production (**Reginensi et al., 2011**). Les réchauffeurs et évaporateurs utilisés dans le traitement peuvent fournir un environnement très adapté à la croissance des micro-organismes thermophiles, et la sporogénèse permet aux membres de ces groupes de résister à des conditions environnementales difficiles qui permettent leur survie (**Reginensi et al., 2011**). En effet, les bactéries thermophiles se développent rapidement au cours de la fabrication de lait en poudre. *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus sp.* sont les principaux contaminants des bacilles thermophiles dans la poudre du lait (**Flint et al., 2006**).

2.2 la flore de contamination

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



Chapitre III

Les bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé

Chapitre III : les bacilles thermophiles

1. Généralités

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

2. Définition

Les bacilles aérobie thermophiles gram positive ont une répartition géographique très large distribution et sont capables de produire des spores, et sont donc des sources importantes de contamination à la fois pré-et post-pasteurisation (Ronimus et al., 2003).

En fonction de la température d'incubation, les bacilles thermophiles peuvent être divisés en deux groupes: les thermophiles obligatoires et les thermophiles facultatives (également connus sous le nom micro-organismes thermotolérants). Les thermophiles obligatoires peuvent croître seulement à des températures élevées (environ 40-68 ° C) et comprennent *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus sp* (Burgess et al., 2010). Les thermophiles facultatifs appartiennent au genre *Bacillus* et ont tendance à croître à des températures à la fois mésophiles et thermophiles, selon la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus coagulans licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans Bacillus* et *Bacillus subtilis* (Burgess et al., 2010).

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

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

Le nombre élevé de bacilles thermophiles dans les poudres de lait cru indique une mauvaise hygiène lors de la production du lait en poudre. En outre, le bacilles thermophiles pourraient non seulement entraîner l'altération en raison de leur production d'acides et de

l'excrétion enzyme thermostable, mais aussi causer des maladies d'origine alimentaire (Burgess et al., 2010).

3. Les caractères physiologiques des bacilles thermophiles

La plupart des bacilles thermophiles peuvent croître à 37 ° C (Burgess et al., 2010), ainsi ils pourraient contribuer à l'augmentation du dénombrement sur plaques dans les poudres de lait. Les nombres et les espèces de bacilles thermophiles dans le lait en poudre pourrait fournir d'importants l'information pour améliorer la qualité de la production (Yuan et al., 2011). Les principales caractéristiques des bacilles thermophiles sont résumées dans le tableau 2

Tableau 2 : Caractéristiques de certains des bacilles thermophiles (Burgess et al., 2010).

	<i>A. flavithermus</i>	<i>G. stearothermophilus</i>	<i>G. thermoleovorans</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. sporothermodurans</i>
T°max	65–72	65–68	70	50-55	45–55b	57-61	50-55b	45-55
T°min	30-38	37	37-47	15	5-20	15-25	5-15	20
C.A	oui	non	non	oui	non	oui	non	non
pH	6.0–9.0	6.0–8.0	5.2–8.0	5.5–8.5	5.5–8.5	4.0–10.5	5.5–8.5	inconnu
S.G	oui	oui	oui	non	non	variable	non	non
P. de S	Terminal	Terminal	Terminal	central	central	Sub-terminal	central	terminal
V P	positive	négative	négative	positive	positive	variable	positive	négative
C .NACL	non	non	non	oui	oui	non	oui	non
NA .NI	oui	variable	oui	oui	oui	variable	non	non
H .C	oui	variable	variable	oui	oui	non	oui	faible
H.G	No	oui	variable	oui	oui	variable	oui	non
H. A	oui	positive	variable	oui	oui	oui	non	non

T°max: température de croissance maximal(C°) , T°min :température de croissance minimal(C°), C.A :croissance anaérobie,S .G :sporange gonflé,P de S :position de spore, V.P :Réaction de Voges-Proskauer, C .NACL : La croissance de 7% NaCl, NA .NI : Nitrate réduit en nitrite, H.C :hydrolyse de la caséine , H.G :hydrolyse de la gélatine , H.A :hydrolyse de l'amidon

4. Importance des bacilles thermophiles en industrie laitière

Dans le contexte de la transformation laitière, les bacilles thermophiles sont utilisés comme indicateurs d'hygiène dans les produits laitiers. C'est à cause de leur capacité à former des endospores et des biofilms. En outre, les bacilles thermophiles sont les organismes responsables d'altération, car ils sont capables de produire des enzymes et des acides qui peuvent conduire à un mauvais goût dans le produit fini (**Burgess et al., 2010**).

4.1 Des risques de détérioration des bacilles thermophiles

Les souches des bacilles thermophiles obligatoires et facultatifs sont capables de produire des acides, ainsi qu'une variété de enzymes thermostables, y compris des protéinases et les lipases, ce qui pourrait entraîner la détérioration des produits laitiers produits (**Murugan et al., 2009**).

Les thermophiles obligatoires ne sont pas connus pour être pathogènes. Cependant, quelques-unes des thermophiles facultatifs y compris *B. licheniformis*, *B. pumilis* et *B. subtilis* peuvent produire des toxines, bien que cela n'ait été étudié qu'à des températures **mésophiles** (**De Jonghe et al., 2010**).

4.2 Formation de spore

La sporulation est un processus complexe, divisé en une série d'étapes qui est considéré comme étant très similaires entre aérobie et anaérobies facultatives des bactéries sporulées. Le début de la sporulation peut être inversé si la culture est transférée dans un milieu riche en nutriments. En général, la température optimale et le pH optimal pour la formation de spores sont similaires pour la croissance des cellules végétative, mais l'éventail de ces deux paramètres est plus étroit (**Seale et al., 2008**).

Les conditions qui déclenchent la formation de spores des bactéries thermophiles dans un environnement laitier sont mal définies. Cependant, la présence de minéraux tels que le magnésium, le calcium et le potassium composés peuvent jouer un rôle. Ces minéraux sont importants pour le développement d'une spore mature et peut être impliqué dans l'activation du processus de formation de spores. Minéraux, en calcium notamment peuvent s'accumuler dans la pré spore, notamment dans le noyau. Le calcium a été montré pour augmenter l'expression des gènes impliqués dans le processus de sporulation (**Ronimus et al., 2006**).

4.3 Résistance

Les spores sont résistantes à la chaleur, la rupture mécanique et une large variété de produits chimiques, ce qui rend très difficile de les détruire dans les produits laitiers et les procédés de fabrication. Les principales caractéristiques des spores qui sont associées à la résistance thermique sont considérées comme minéralisation et faible activité d'eau (**Scheldeman1 et al., 2006**).

5. Bacilles thermophiles comme indicateurs d'hygiène

Alors que, les niveaux de thermophiles dans le lait cru sont généralement très faibles (par exemple, <10 ufc / ml). La présence d'un nombre élevé (N104 ufc / g) de thermophiles dans produits laitiers finis, comme les poudres de lait, est un indicateur de mauvaise hygiène lors du traitement. Les contaminants thermophiles initiaux sont introduits dans le processus de fabrication de produits laitiers par le biais du lait cru sous la forme d'endospores. Cependant, la qualité du lait cru en termes des nombres de thermophiles est indépendante du nombre de thermophiles présents dans le produit fini (**Ronimus et al., 2006**).

Bien qu'il soit universellement reconnu que ces bacilles thermophiles ne constituent pas un risque pour la santé consommateurs, ils ont été considérés comme un indicateur de limites de plantes d'hygiène pendant le traitement, et la spécification ont été mis en œuvre en fonction du nombre des bacilles thermophiles dans les produits (**Rueckert et al., 2006**).

6. La formation du biofilm par des bacilles thermophiles en industrie laitière

6.1 Les biofilms

L'adhésion bactérienne sur les surfaces et le développement du biofilm après est très courante dans de nombreux environnements tels que le domaine médical, les milieux d'eau douce et marine et les unités de distribution d'eau et de la transformation des aliments. Les biofilms sont définis comme des colonies de cellules bactériennes micro enfermées dans une substance polymériques extracellulaires (EPS) matrice active et fixées sur une surface (**Parkar1 et al., 2003**).

Tout d'abord, des cellules s'attachent au substrat. Ensuite, la fixation initiale réversible est suivie par une fixation irréversible. Une fois que les cellules se sont fixées, elles commencent à ce multiplier et a produire EPS formant des micros colonies. Ces micro colonies vont se développer et former des multicouches de cellules bactériennes intégrés dans

la matrice EPS, qui sont séparés par des canaux d'eau (Simoões et al., 2009). Cette matrice fournit une source de nutriments pour les cellules bactériennes. Le procédé de fixation et de la production d'EPS rend les cellules bactériennes dans un biofilm beaucoup plus résistant que les cellules planctoniques à des conditions très dures (Burgess et al., 2010).

6.2 Formation du biofilm

Il y a un certain nombre de mécanismes par lesquels les espèces microbiennes sont capables d'entrer en contact plus étroit avec une surface, se fixer fermement à elle, favoriser les interactions cellule-cellule et grandir comme une structure complexe. La formation de biofilm comprend une séquence d'étapes (Simoões et al., 2009).

À l'heure actuelle, les processus régissant la formation de biofilm qui ont été recensés sont : (i) la fixation initiale, (ii) irréversible attachement, (iii) le développement précoce de l'architecture du biofilm, (iv) maturation, et (v) la dispersion (Srey et al., 2013).

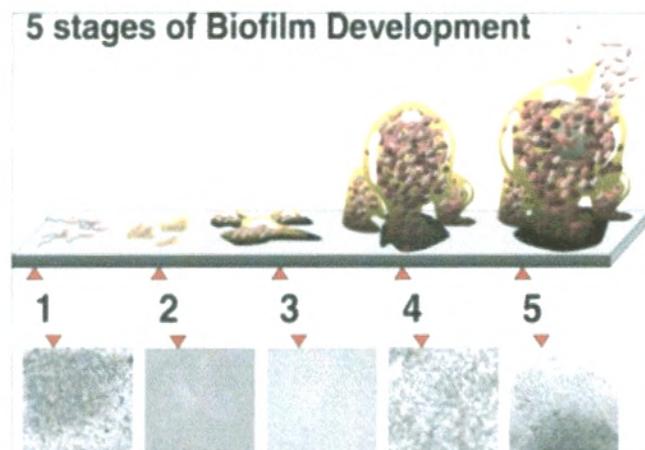


Figure 1: Les stades de développement des biofilms Ce schéma est un dessin animé des 5 étapes de développement du biofilm : 1 fixation réversible, 2 fixation irréversible, 3 au début développement de l'architecture du biofilm, 4 et 5 enfin maturation dispersion. Dans le cadre du caricature ya 5 micrographies électroniques montrant ce que le biofilm ressemble réellement à chaque étape. (Srey et al., 2013)

6.3 Les biofilms des bacilles thermophiles

La croissance des bacilles thermophiles lors de la fabrication de lait en poudre est censée se produire en biofilm. les bacilles thermophiles se forment sur la surface (**Flint et al., 2001**). Les micro-organismes dans un biofilm sont généralement plus résistants que cellules planctoniques à des produits de nettoyage et désinfectants couramment utilisé pour nettoyer les usines de fabrication de produits alimentaires (**Flint et al., 2001**).

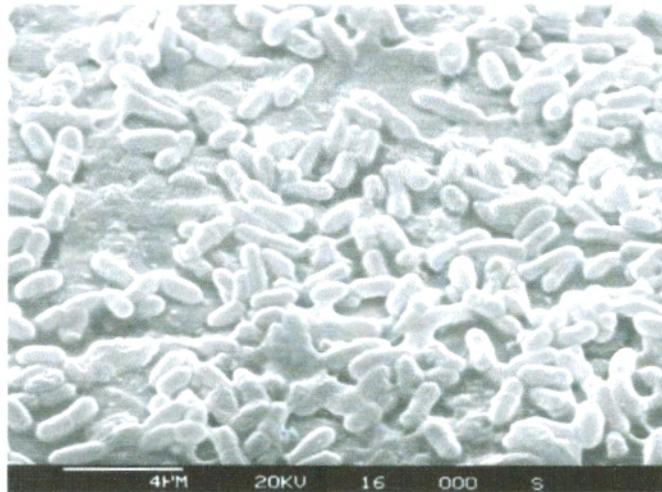


Figure. 2. Micrographie électronique à balayage d'un biofilm de 18-h formé par *A. flavithermus* sur une surface en acier inoxydable (**Flint et al.,2001**).

Etude expérimentale
Matériels et méthodes

La partie expérimentale de ce travail est consacrée à rechercher les bacilles thermophiles dans le lait cru et la poudre du lait dans une laiterie de la région de Tlemcen.

Après isolement des bactéries recherchées, les souches sont soumises à une caractérisation et identification basée sur l'étude de leurs propriétés à former le biofilm.

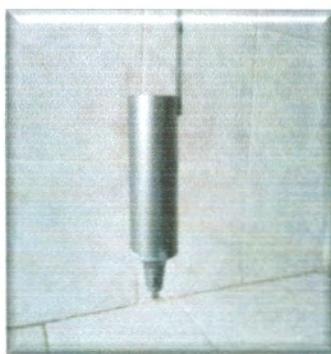
1. Prélèvements :

Six prélèvements ont été réalisés au niveau d'une laiterie de la région de Tlemcen.

- Les échantillons du lait cru sont prélevés des cuves de collectes à l'aide d'un préleveur dans des flacons stériles. (Figure 3).



Cuve de collecte



un préleveur



un échantillon

Figure 3 : site de prélèvement du lait cru et l'échantillonnage

- les échantillons de la poudre du lait sont prélevés des sachets de poudre du lait, en utilisant une cuillère stérile et en déposant la poudre dans des sachets stériles ou des boîtes de pétrie. (Figure 4)



Sachet de poudre



un échantillon

Figure 4 : site de prélèvement de la poudre du lait et l'échantillonnage

2. Transport des échantillons :

Selon NM 08.0.109., 2004, Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.les échantillons sont transportées dans un sac iso thermique ou une glacière (<4°C),et sont analysés tout de suite après leur réception au laboratoire.

3. Traitement des échantillons :

3.1 Préparation des échantillons :

➤ Analyse de la poudre du lait :

1g de poudre est placé dans un tube contient 9 ml du TSE, ce tube représente la solution mère.cette opération est suivie d'une agitation pendant 2 à4 minutes dans un vortex.la préparation se fait entre deux becs bunsen.

- **Analyse du lait cru :** 9 ml du lait de vache cru sont placé dans un tube stérile, ce tube représente la solution mère.

3.2Traitement thermique :

Après la préparation des échantillons, un traitement thermique est réalisé à 80°C pendant 10 minutes pour les deux solutions mères à fin d'isoler les formes sporulées, suivi directement d'un refroidissement dans un bécher qui contient de la glace.

3.3Préparation des dilutions :

Des dilutions sont effectuées en cascades de la dilution 10^{-1} à 10^{-3} .

1ml du lait est placé dans un tube contenant 9 ml du TSE, on homogénéise la solution à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes, puis on prend 1 ml de cette dernière pour le mettre dans un autre tube qui contient les 9 ml du TSE et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-3} .

3.4Ensemencement :

L'ensemencement en surface est effectué sur le milieu TSA (Trypticase soja agar).

On prépare des boites de pétries coulé de TSA .puis on dépose 0,1 ml de chaque dilution dans une boite de pétrie, par un râteau on étale la dilution. Ensuite l'incubation se fait à 55°C pendant 48 H à 72 H.

3.5 Identification phénotypiques des souches :

3.5.1 Caractères morphologiques des souches :

3.5.1.1 Aspect macroscopique :

Les souches isolées sont premièrement identifiées en se basant sur l'étude de l'aspect des colonies après incubation sur gélose TSA pendant 48H à 72H. D'après Akel *et al.*, (2008), les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- **La forme des colonies** : rondes, irrégulières,...etc.
- **La taille des colonies par la mesure du diamètre**
- **La couleur.**
- **L'élévation**: convexe, concave, plate.
- **L'opacité**: opaque, translucide ou transparente.
- **La surface**: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

3.5.1.2 Aspect microscopique :

Coloration de Gram :

La coloration permet en général d'apprécier la pureté des souches bactérienne avant toute identification. Le Protocole est le suivant :

- Préparer un frottis d'une culture bactérienne pure.
- recouvrir le frottis de violet de gentiane ; laisser agir une minute.
- Verser du lugol et laisser agir une minute ; rincer à l'eau.
- décolorer à l'alcool à 95°C, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau.
- Recolorer par la fushine pendant une minute puis rincer à l'eau.
- sécher le frottis sur un papier verger puis l'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion grossissements x100.

Les bactéries à Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries Gram négative se colorent en rose.

L'examen des fragments de colonies de culture jeune au microscope optique après coloration de gram à permis de donner des informations sur la morphologie cellulaire et le mode de groupement.

Recherche de la spore:

La recherche des spores a été effectuée sur des cultures âgées de 48H après coloration au violet de gentiane.

✚ Conservation des souches :

La conservation des souches se fait dans des tubes à essai contenant de la (TSA) incliné.

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

Et pour les conserver sous forme de spore elles sont mises à l'étuve de 30°C pendant 3 jours puis conserver à 4 °C.

3.5.2 Caractères biochimiques des souches :

3.5.2.1 Teste de catalase :

Sur une lame bien nettoyé et stérile on dépose une goutte d'eau oxygéné et on dissocié directement un peu de culture (jeune) à étudier prélever sur milieu solide.

-Lecture : Le dégagement d'oxygène se traduit par effervescence se qui signifie résultat positif, contrairement résultat négatif.

3.5.2.2 Système API 20 E :

A l'issue de l'identification préliminaire, dix souches sont choisies et soumises à une détermination du biotype par galerie API 20 E.

L'identification des souches par la galerie API 20 E est basée sur l'utilisation des 12 premiers testes biochimiques.

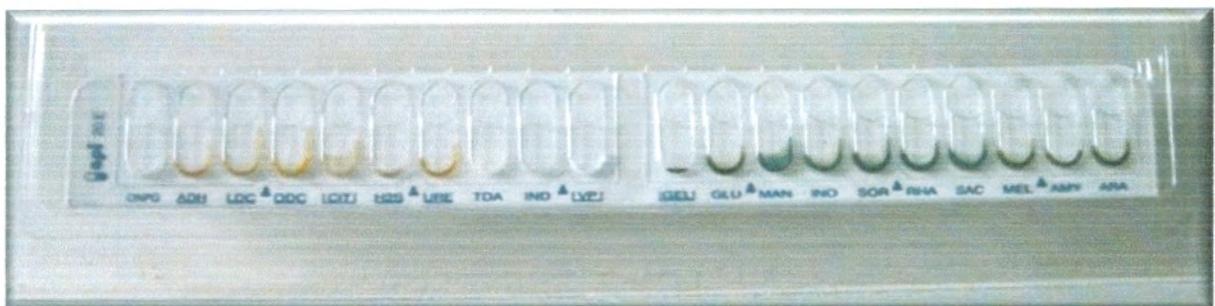


Figure 5 : photo de la galerie API 20 E

➤ l'inoculation de la galerie API 20 E :

La galerie est inoculée selon les directives du guide pour API 20 E, puis incubé à 37°C pendant 24 H à 48 H.

Les suspensions bactériennes sont préparées à partir de culture jeune de moins de 24H dans de l'eau physiologiques.

➤ **-la lecture de la galerie :**

Une première lecture est effectuée 24H après l'inoculation de la galerie, pour l'observation du caractère fermentatif ou oxydation.une deuxième est réalisée à 48H, par l'observation de la galerie Les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs adéquats pour les tests tel que :TAD,Kovacs ,VP1 et VP2,nitrate 1 et nitrate 2 et poudre de zinc.(Caccamo *et al.*, 2012).

3.5.2.3Détermination des activités enzymatiques :

Selon la norme **AFNOR 1995**, est effectuée l'étude de diverses activités enzymatiques.

3.5.2.3.1Activité protéolytique :

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode **Lanyi, (1987)** sur un milieu gélose contenant 5% de poudre de lait.

-Lecture : la présence d'une activité caséinolytique se manifeste par la présence d'un halo clair autour des colonies suites a l'hydrolyse de ce polymère. Par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture [(**Lanyi,1987**)(**Yakhlef et al., 2012**)].

3.5.2.3.2Activité amylolytique :

La présence de l'activité amylolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par **Fooladi et al.,(2010)**, en cultivant les souches sur le milieu gélose nutritive contenant 1% d'amidon. Après incubation à 55°C, des observations régulières sont effectuées durant 48 heures.

-Lecture : Une fois la culture est observée, la révélation se fait par ajout du Lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par apparition d'une zone claire autour de la colonie. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

3.5.2.3.3Activité lipolytique :

Elle est réaliser sur gélose nutritive additionné de tween 80, après préparation et autoclavage il est répartie en boites de pétri pour la solidification puis ensemencé en une seules strie pour chaque souche. L'incubation se fait à 55°C pendant 24H. (**Lelie et al., 2005**).

-Lecture : l'apparition d'un halo opaque autour des colonies exprime la présence d'une estérase.

3.6 Détermination du potentiel de la formation du biofilm :

La capacité des souches des bacilles thermophiles à former le biofilm est testée par la méthode de microplaques de titrations à 96 puits selon la technique **d'Auger et al., (2009)**.

3.6.1 Formation du biofilm dans les microplaques de titration :

La formation du biofilm est réalisé dans deux milieux de culture : le milieu TSB et le lait écrémé Dans les puits des microplaques de titration stériles, 100 µl du TSB ou lait écrémé et 80µl de la suspension bactérienne préparer dans l'eau physiologique est ajusté à une DO (densité optique) de 0,6 à 0,8 sont introduit .la première rangé qui est remplis par le milieu non ensemencé constitue le témoin.

les plaques sont incubées à trois températures (30°C ,42°C,55°C).

3.6.1.1Coloration des biofilm :

Après le temps d'incubation, les biofilms formés sur les parois des puits sont mis en évidence par coloration au cristal violet. Pour cela les plaques subissent le traitement suivant :

-les plaques sont d'abord vidées avec la micropipette.

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

-laisser sécher 10 à 15 min.

-remplir les puits avec 200 µl de cristal violet 0,5% qui a un rôle dans la révélation et la fixation de biofilm.

-le temps de coloration est de 20 mn.

-rinçage à l'EDS 3 fois.

-séchage des plaques en position renversé.

-Lecture :

Avant la mesure de la DO au spectrophotomètre munis d'un lecteur de microplaque à 630 nm, les puits sont remplis avec une solution dissolvante constitué d'éthanol et d'acide acétique glacial dilué dans du l'eau distillé (composition en annexe). (**Pitts et al.,2003**)

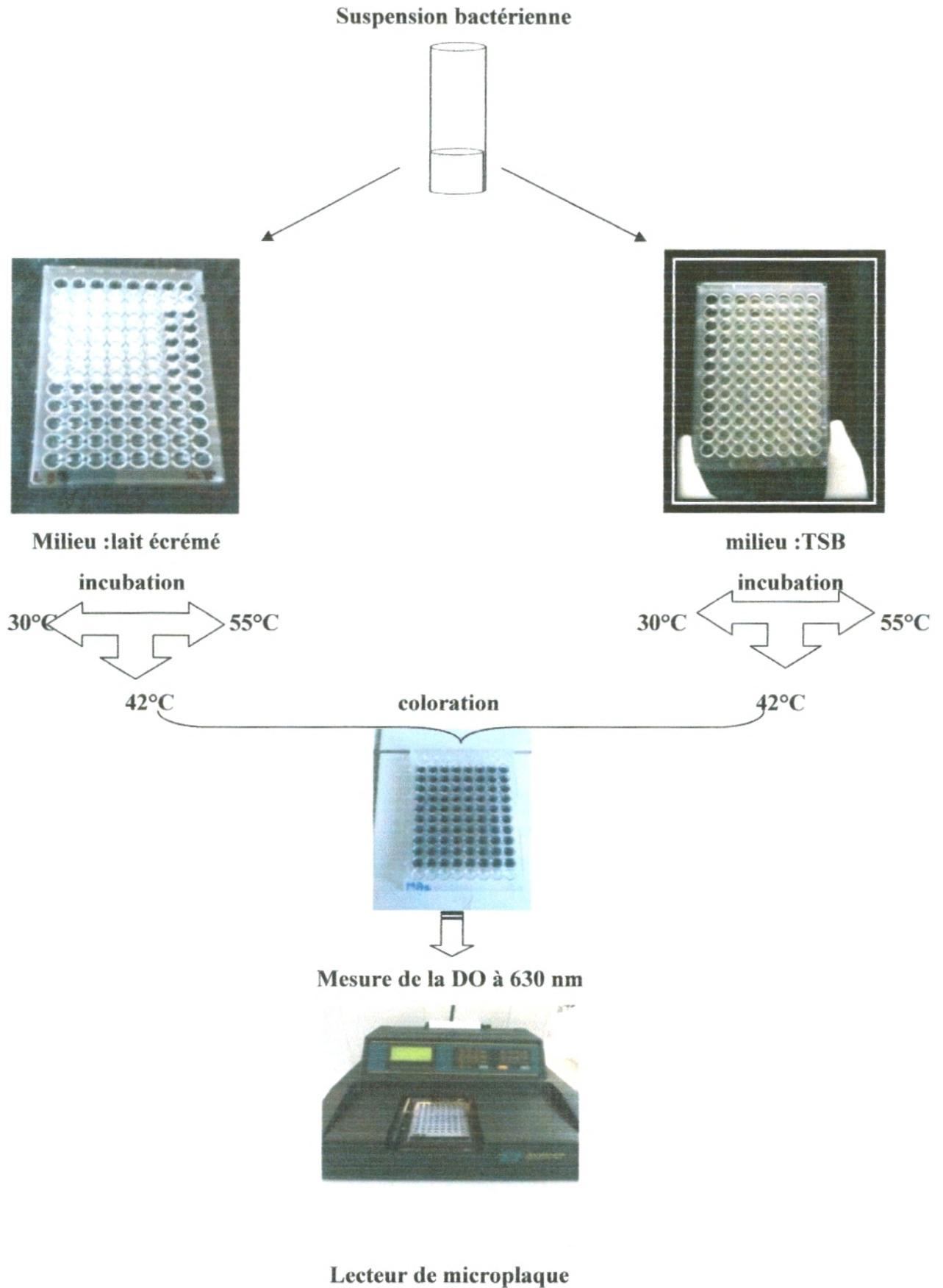


Figure 6:schéma représentant le protocole de formation des biofilms par la méthode des microplaques de titration 96puits

Etudes expérimentale
Résultats et discussions

1. Isolement des bactéries thermophiles :

Les dix souches ont été isolées sur le milieu TSA, qui est un Milieu de culture ordinaire permet le développement de germes non exigeants. C'est une gélose non sélective, qui ne contient pas d'indicateur coloré et dont le principal substrat est le glucose.

➤ Origine des souches :

Tableau 3 : résume les origines des souches isolées

souches	origines	Date de prélèvements
S1	PDL	14-05-2013
S2	PDL	27-05-2013
S3	LDV	30-04-2013
S4	LDV	27-05-2013
S5	PDL	27-05-2013
S6	PDL	27-05-2013
S7	LDV	05-05-2013
S8	PDL	14-05-2013
S9	LDV	14-05-2013
S10	LDV	14-05-2013

2. Identification phénotypiques des souches :

2.1 Caractéristiques morphologiques des souches :

2.1.1 Aspect macroscopique :

L'aspect macroscopique des souches a montré leur capacité de former des colonies sur des milieux ordinaire tel que le TSA de plusieurs formes (figure 7) : lisse, visqueuse, sèches, de bord régulier et irrégulier, racinaire, rhizoïde, envahissante, dentelé, de couleur opaque et transparente.



Figure 7 : Aspect des colonies sur la gélose TSA

2.1.2 Aspect microscopiques :

✚ Coloration de gram :

les examens microscopiques réalisés après coloration de Gram, ont révélé l'absence totale de bactéries Gram(-). toutes les bactéries observées se montraient sous la forme de bâtonnet Gram(+). (figure 8).



Une colonie isolée de LDV



une colonie isolé de PDL

Figure 8: photos prise au microscope optique (G×100)

L'étude des caractéristiques microscopique a révélé que toutes les souches sont capables de former des endospores ovale centrale ou sub-terminale non déformante. D'autre sont des bacilles fins, longs à spore terminale déformante(en tête d'épingle) ; ou bien des bacilles fins et longs à spore ovale terminale déformant le sporange(en raquette de tennis). traits généraux du genre *Bacillus*.

ces caractères sont conforme à ceux des bacilles thermophiles décrits dans la littérature [(De VOS *et al.*, 2009) et(Madigan *et al.*, 2006)].

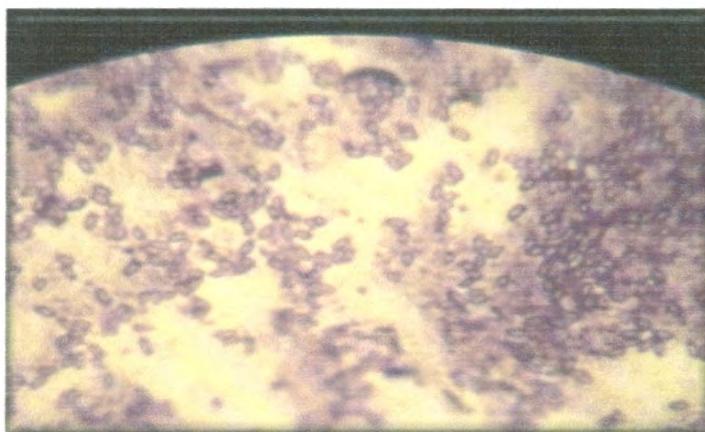


Figure 9 : observation microscopique d'une spore centrale (G×100)

2.2 Caractères biochimiques des souches :

2.2.1 Test de catalase :

Toutes les souches étudiées sont catalase positives, ce qui se traduit par la formation de bulles de gaz. Ce résultat confirme l'identité des bacilles thermophiles qui font partie de la flore sporogone aérobie.



Figure 10 : une souche bactérienne de la catalase positif

2.2.2 Système API 20 E :

L'identification biochimique a été réalisée par l'étude des 20 caractères de la galerie API 20 E. la détermination du biotype a été réalisée par logiciel API web. Toute fois cette galerie permet uniquement une orientation rapide et doit être confirmée par la galerie 50 CHB.

En effet le système API 20 E est largement utilisé dans les méthodes d'identification pour les membres du genre *Bacillus* et apparenté. Des études réalisées ont montré que la meilleure reproductibilité des tests pourrait être réalisée avec des plaques API qu'avec les tests classiques surtout pour la taxonomie du genre *Bacillus*. De plus, ces galeries se sont révélées utiles dans la caractérisation des espèces aérobies formant des endospores (De VOS *et al.*, 2009) .

Tableau 4 : les résultats des testes biochimiques des souches

SOUCHES	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
S6	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
S7	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
S8	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+

D'après les résultats du tableau 4, on peut conclure que les 10 souches se répartissent dans quatre biotypes comprenant 3 souches pour le premier, 4 pour le deuxième, une seule souche pour le troisième et 2 souches le quatrième.

Les trois souches S1, S2, S3 possèdent le même profil biochimique sont classés dans le biotype 1, ils réduisent les nitrates et libèrent de la gélatine. (Voir figure 11).(tableau 5)



Figure 11 : photo de la galerie API 20 E du biotype 1

Les souches S5, S6, S8, S10 qui sont dans biotype 3 possèdent la β -galactosidase, arginine Dihydrolase, la gélatinase, réduisent les nitrates et utilisent le citrate comme source de carbone (figure 12).



Figure 12 : photo de la galerie API 20 E du biotype 2

Par contre la souche 7 possède l'uréase. elle est classée dans le biotype 3 (figure 13), et pour ce qui concerne le biotype 4, les souches 4 et 9 ont la capacité de libérer la gélatine. (Figure 14).



Figure 13 : photo de la galerie API 20 E du biotype 3



Figure 14 : photo de la galerie API 20 E du biotype 4

Ces résultats sont en corrélation avec l'identification biochimique réalisée par Caccamo et al., (2000) d'un *Bacillus* .

Tableau5 : tableau récapitulatif des biotypes

biotypes	Nombres des souches	Orientation dans l'logiciel
Biotype 1	S1, S2, S3	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
Biotype 2	S5, S6, S8, S10	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Virgibacillus pantothenicus</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus megaterium</i>
Biotype 3	S7	<i>Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis</i> <i>Bacillus sphaericus/fusiformis/badius</i> <i>Bacillus firmus</i>
Biotype 4	S4, S9	<i>Aneurinbacillus aneurinilyticus</i> <i>Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis</i> <i>Brevibacillus laterosporus</i>

2.2.3 Détermination des activités enzymatiques :

2.2.3.1 Activité protéolytique :

La production de la protéase chez la flore de contamination du lait est responsable d'altération et de défaut de gout et d'arome.

Toute fois, l'activité protéolytique est révélée dans **la figure 15**, avec la présence d'une caséinase se traduisant par une zone de clarification. la majorité des souches testées possèdent la caséinase.

les membres thermophiles des *Bacillaceae* fournissent d'importantes protéases thermostables à l'industrie [(Rao *et al.*, 1998) (Haaki *et al.*, 2003)].

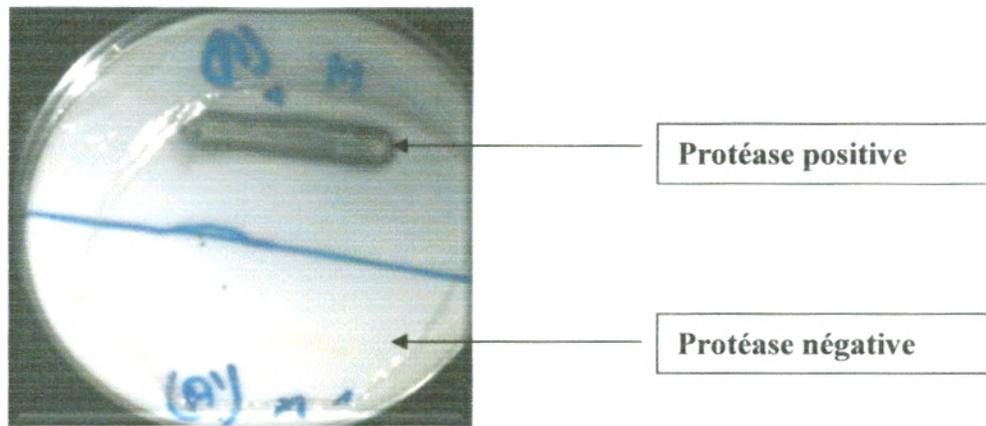


Figure 15 :Activité protéolytique des souches sur gélose au lait

2.2.3.2Activité amylolytique :

La recherche des amylases réalisées sur gélose à l'amidon a montré que la majorité des souches ont une activité amylyase positive.

Le pouvoir qu'ont les microorganismes à transformer un polyside « l'amidon »en osides grâce aux amylases, après révélation au lugol. (Figure 16)

La production d'amylyase est décrite chez les bactéries du genre *Bacillus*, elle est considérée comme une variété de stratégies moléculaires pour survivre aux conditions environnementales extrêmes. En fait, la majorité des souches, produisent une gamme d'enzymes amylolytiques. (Bertoldo et Antranikian, 2001)

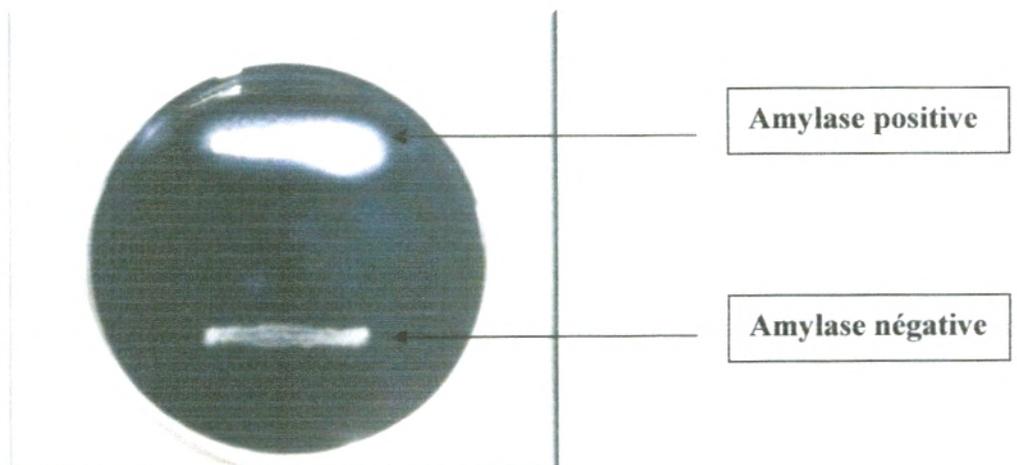


Figure 16 : activité amylolytique sur gélose à l'amidon

2.2.3.3 Activité lipolytique :

D'une manière générale, cette activité se résume, en la capacité des germes à utiliser les lipides comme substrat. L'activité positive comme montre la figure se traduit par un halo d'opacification autour de la culture. Toutes les souches étudiées ont la capacité d'hydrolysé le tween 80.(figure 17)

La lipolyse est également une activité qui provoque des altérations de la qualité organoleptique des produits laitiers.

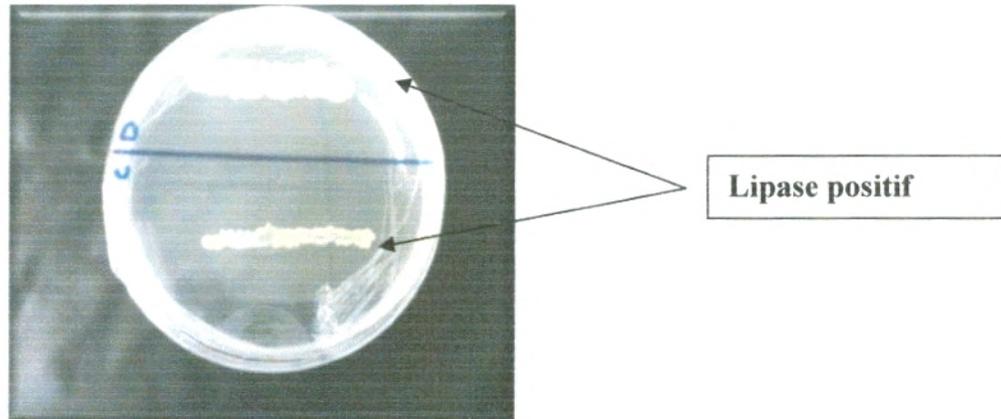


Figure 17 : Activité lipolytique des souches sur gélose au tween 80

Tableau 6 : tableau qui résume les activités enzymatiques

Les souches	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Activité Protéolytique	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Activité Amylolytique	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Activité lipolytique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Il est intéressant de remarquer que toutes les souches testées produisent des estérases comme montré sur la gélose au tween 80 alors que pour la production de protéase et amylase deux souches se sont révélées négatifs. les membres des genres thermophiles des *Bacillales* sont connus pour leur capacité à produire des enzymes d'hydrolyse (Malek et al., 2012).

3. Détermination du potentiel de la formation du biofilm :

La procédure des plaques de microtitration est une méthode indirecte d'estimation de bactéries in situ et qui peut être modifiée pour différents des essais de formation de biofilm. (D. Djordjevic et al., 2002).

Le taux de formation de biofilm par les souches thermophiles à trois températures (30°C—42°C-55°C) et sur deux milieux différents (TSB et lait écrémé) est obtenu par la mesure des D.O à 630 nm au lecteur des microplaques. Les résultats sont représentés dans les figures 17, 18, 19, 20, 21,22.

Le valeur seuil égale à une DO de l'ordre de 0,5 est défini pour les producteurs de biofilm séparés des non-producteurs de biofilm (Extremina et al., 2010),sur cette base nous avons défini les classes suivantes :

Classe 1 : DO<0,5	(+)	faiblement productrice de biofilm
Classe 2 : 0,5<DO<1,5	(++)	moyennement productrice de biofilm
Classe 3 : 1,5<DO<2,5	(+++)	fortement productrice de biofilm
Classe 4 : >2,5		hyper productrice de biofilm

Les résultats représentés dans (la figure 18) montrent que les DO à 630 nm obtenues varient entre 0,25 et 2.en effet, les souches 8 et 5 sont fortement productrice du biofilm leurs DO respective comprises entre 1,5< DO <2,5.et les souches 7,10,4 montrent des DO<0,5 et peuvent être classées dans la catégorie moyennement productrice de biofilm,par contre les 5 souches(S1,S3,S6,S2,S9) révèlent des pouvoirs de production de biofilm relativement faible.

Ces résultats peuvent être expliqués par la température relativement basse pour les thermophiles. En effet, les résultats obtenus à 42°C (**figure 19**) montrent une augmentation nette du pouvoir de production de biofilm chez les deux dernières classes.

➤ **Sur milieu TSB :**

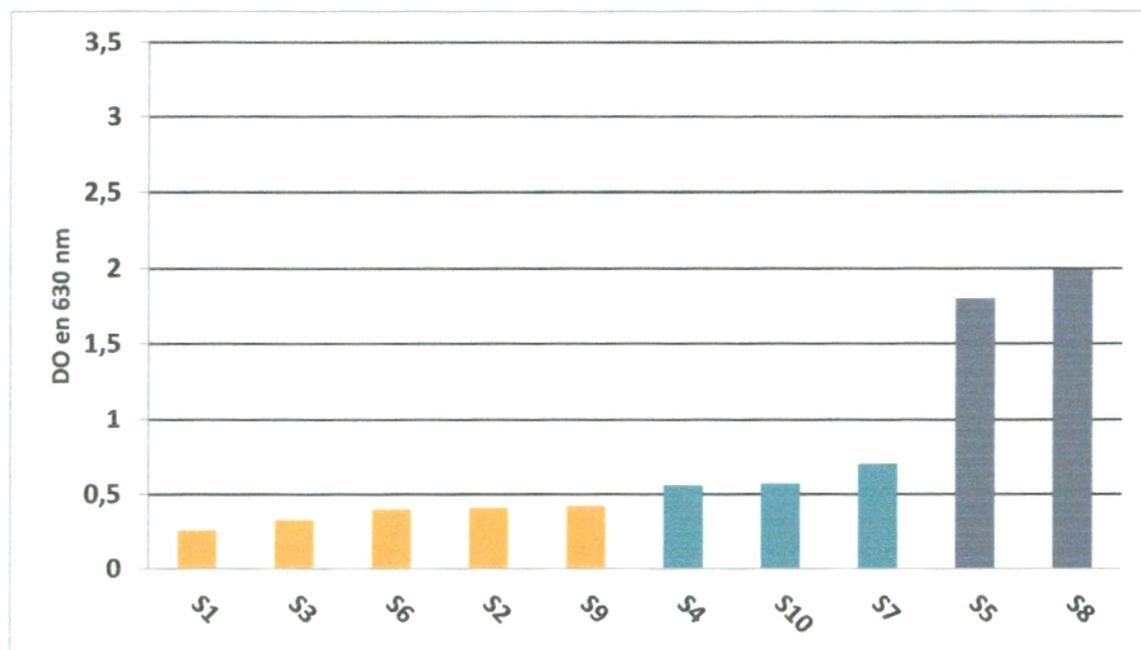


Figure 18: formation du biofilm sur milieu TSB à 30°C

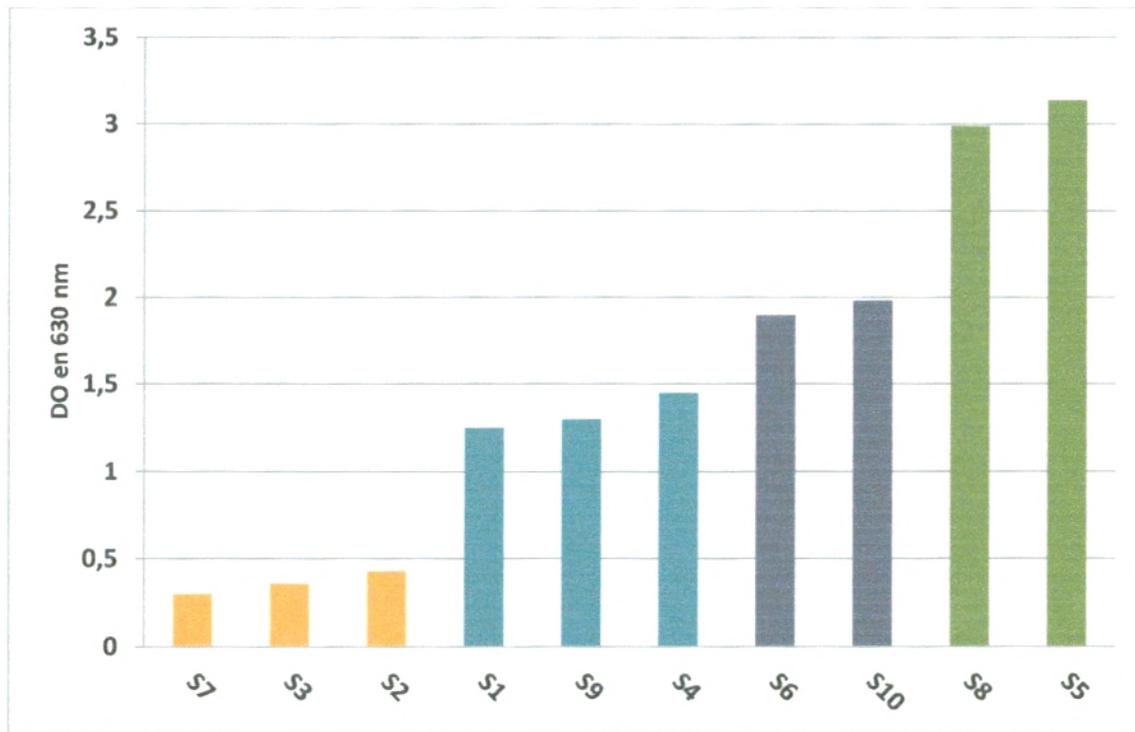


Figure 19 : formation du biofilm sur milieu TSB à 42°C

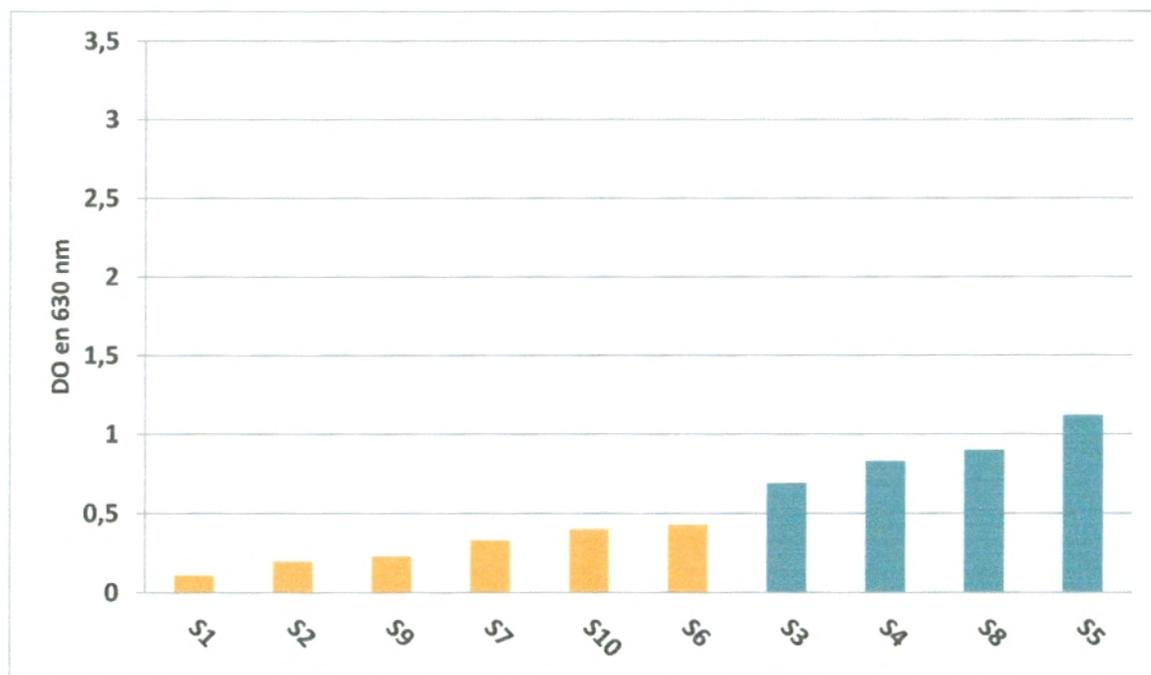


Figure 20 : formation du biofilm sur milieu TSB à 55°C

Dans la **figure 20**, on remarque une diminution de formation de biofilm. les résultats obtenus sont regroupés en deux classes, les souches (S1, S2, S9, S7, S10, S6) ont des $DO < 0,5$ sont faiblement productrice de biofilm et les 4 souches (S3, S4, S8, S5) sont classées

dans la catégorie de moyennement productrice de biofilm leur DO est comprise entre $0,5 < DO < 1,5$.

➤ **Sur milieu lait écrémé :**

Selon les résultats représentés dans (**la figure 21**), les souches sont regroupées dans les trois premières classes. la première classe comporte les souches S3, S4, S7 de $DO < 0,5$ sont faiblement productrice de biofilm, la deuxième classe comporte les quarts souches (S2, S6, S9, S1) sont moyennement productrice de biofilm et pour la troisième classe (S10, S5, S8) sont fortement productrice de biofilm.

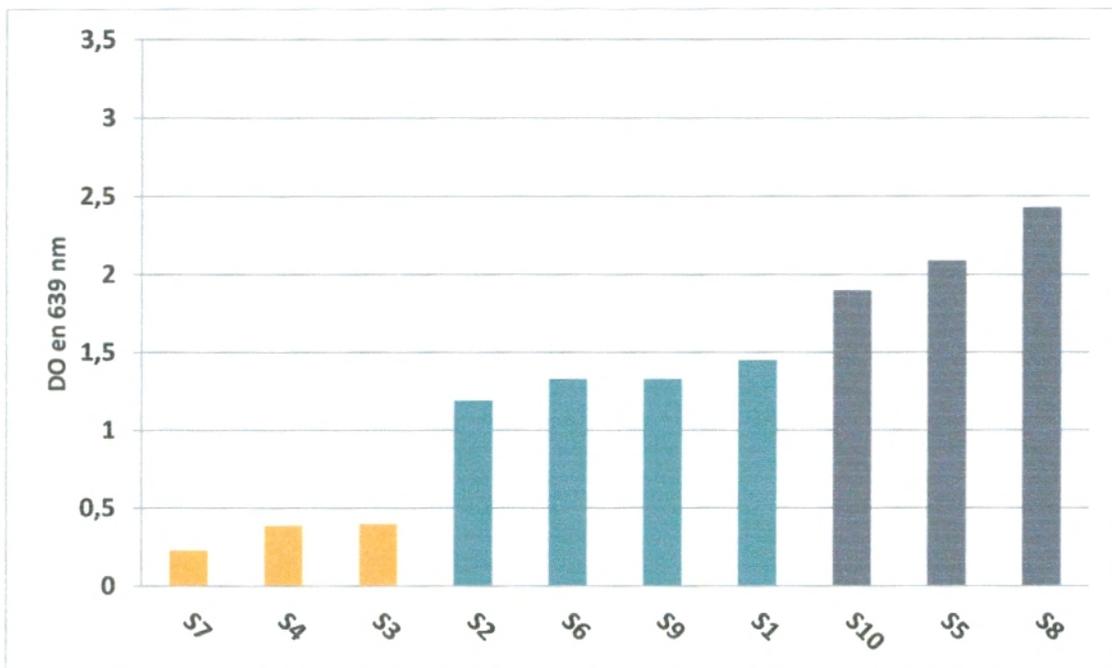


Figure 21 : formation du biofilm sur le milieu lait écrémé à 30°C

La même interprétation est observée dans la **figure 22**, les DO obtenues montrent une augmentation considérable du pouvoir de production de biofilm. les quatre classes sont présentes dans cette figure.

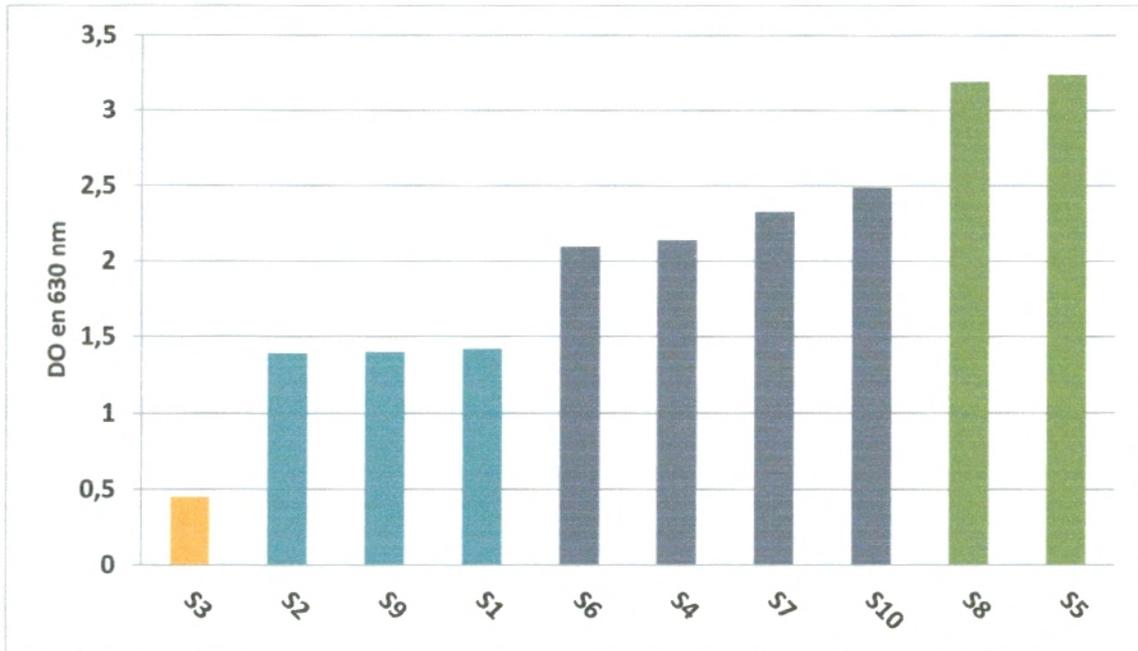


Figure 22: formation du biofilm sur le milieu lait écrémé à 42°C

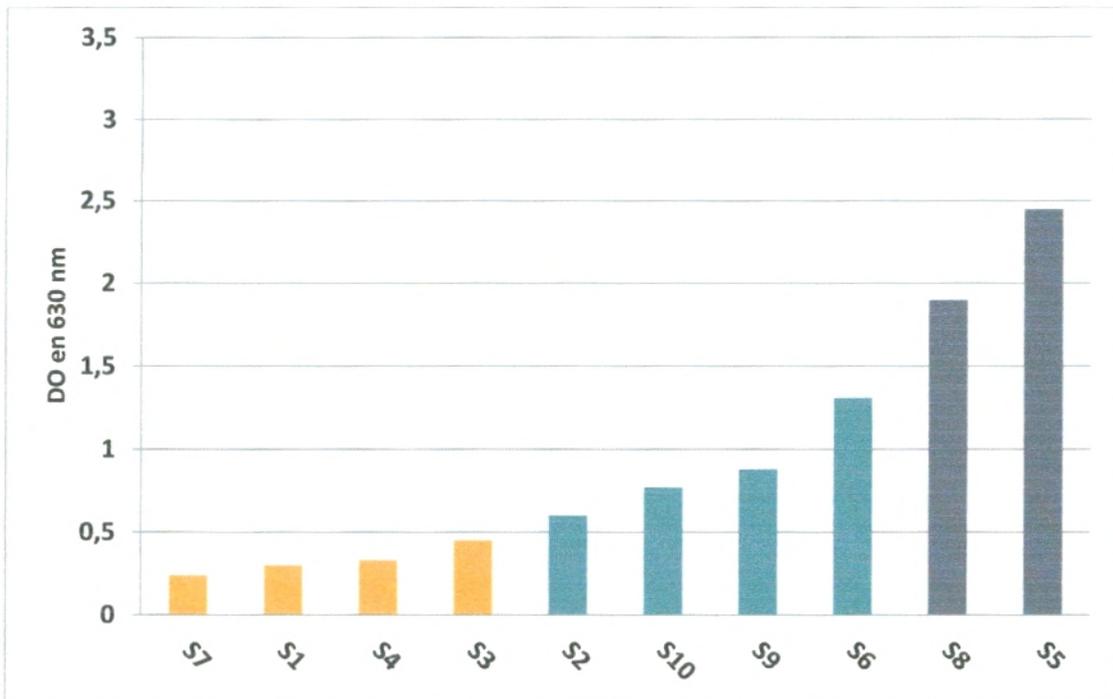


Figure 23: formation du biofilm sur milieu lait écrémé à 55°C

La figure 23 montre une réduction remarquable du taux de formation du biofilm, les souches S7, S1, S4 et S3 se regroupent dans la première classe faiblement productrice de biofilm, aussi 4 souches sont dans la deuxième classe moyennement productrice de biofilm et deux souches sont classées comme fortement productrices de biofilm.

D'après les résultats obtenus dans les six graphes, il est possible de dire que, le pouvoir du potentiel de former le biofilm est influé par la composition de milieu de culture, ce qui explique les différents résultats du TSB et lait écrémé.

Ceci est conforme avec ceux de (**Betsey et al., 2003**), qui a montré qu'une présence en éléments nutritifs conduit à une augmentation de la formation du biofilm.

Conclusion

Conclusion :

L'objectif essentiel de ce travail était d'une part un isolement des souches de bacilles thermophiles à partir d'échantillon de la poudre du lait et du lait de vache cru dans une laiterie de la région de Tlemcen. et d'autre part une caractérisation phénotypique. notamment la détermination des pouvoirs enzymatiques des souches et leur potentiel de formation du biofilm.

Dix souches sont isolées et retenus pour cette étude, l'observation au microscope optique a révélé que les dix souches sont des bâtonnets à Gram positif capable de croître à 55°C, de former les endospores, qui sont des critères d'identification au bacille thermophile. En effet toutes les souches sont assignées à ce groupe de bactérie.

Sur le plan de la production des enzymes hydrolytiques extracellulaires, ces dix souches possèdent un potentiel très important, la majorité produit des amylases des lipases et des protéases.

Les souches thermophiles isolés de la poudre du lait et du lait de vache cru ont été testées pour leur capacité de former un biofilm par la méthode des microplaques à 96 puits. les résultats ont montré que ces souches sont productrices de biofilm et se répartissent en trois classes : hautement productrice, moyennement productrice et faiblement productrice. Ces résultats montrent clairement le rôle joué par la matière première (lait cru et poudre de lait). Dans la contamination de cette Laiterie par les bacilles thermophiles et par conséquent leur passage potentiel dans le lait pasteurisé.

Pour cela des mesures doivent être prises pour lutter contre la présence des bacilles thermophiles dans la laiterie. Le contrôle de cette microflore peut se faire à un niveau curatif et préventif :

- en contrôlant la qualité microbiologique des matières entrant dans la recombinaison de la poudre du lait, eau et matière grasse.

- le respect des bonnes pratiques d'hygiène des bonnes pratiques de fabrication en surveillant la chaîne de production à tous les points critiques de la fabrication et en y appliquant les procédés d'hygiène .

Perspective :

Pour nos perspectives de recherches au futur nous envisageant :

- l'étude phylogénétique des souches par des techniques moléculaires.
- L'utilisation de la PCR pour la traçabilité des souches.
- Une meilleur caractérisation des souches par rapport à leur pouvoir toxigène et à leur capacité de former le biofilm.

Références bibliographiques

Référence bibliographique :

1. **Abdenouri, N., Idlimam ,A., et Kouhila,M., 2008.** Etude hygroskopique du lait en poudre. Revue des Energies Renouvelables SMSTS'08 Alger, 35-44.
2. **AFNOR., 1995.** Xp V 08-058. Microbiologie des aliments-dénombrement de *Bacillus Cereus* par comptage des colonies à 30°C .
3. **Akel H., Al-Quadran F., Atoum M.,Battikhi M., 2008.** Phenotypic and Genotypic Characterization of Three Novel Halophilic *Bacillus* Strains from Jordanian Hot Springs.
4. **Auger A,Ramarao N,Faille C,Fouet A,Aymerich S,Gohar M,2009.,**biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of bacillus cereus group.american society for microbiology.3:6616-6618.
5. **Aftab -Uddin,Md., Motazzim-ul-Haque, Md, H., Noor,R, 2011.** Isolation and Identification of Pathogenic *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp and *Staphylococcus* spp. in Raw Milk Samples Collected from Different Areas of Dhaka City. Bangladesh. Stamford Journal of Microbiology 1, 19-23.
6. **Bertoldo C., Antranikian G. (2001).** Amylolytic enzymes from-hyperthermophiles. Methods., Enzymol., 330:269-289.In **Gomri A, (2012).** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermals terrestres de l'Est Algérien, Université Mentouri-Constantine, Institut de la Nutrition,de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), département de Biotechnologie alimentaire.
7. **Betsey Pitts, Martin A. Hamilton, Nicholas Zilver, Philip S. Stewart., 2003.** A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. Journal of Microbiological Methods 54: 269– 276.
8. **Bourgeois,C.M.,Mescle,J.F.,Zucca,J.,1996.**Microbiologie alimentaire(tome 1).2ème édition.Lavoisier Tec Doc,Paris, p 274-275.
9. **Burgess, S. A., Lindsay, D., & Flint, S. H.,2010.** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. International Journal of Food Microbiology 144, 215-225.
10. **Caccamo D., Gugliandolo C., Stackebrandt E and Maugeri T-L., 2000.** *Bacillus vulcani* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a shallow marine hydrothermal vent. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50, 2009–2012.

11. **C.I. Extremina , L., Costa , A.I., Aguiar , L., Peixe , A.P., Fonseca., 2010.** Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *Journal of Microbiological Methods* .
12. **D. Djordjevic, M. Wiedmann and L. A. McLandsborough., 2002.** *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol*, 68(6):2950. DOI: 10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002.
13. **De Jonghe,V.D., Coorevits,A., Block,J.D., Coillie,E.V., Grijspeerdt,K., Herman,L., Vos,P.D., Heyndrickx ,M.,2010.** Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 136, 318–325.
14. **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*, 2nd edition., Volume Three, The Firmicutes. Springer, New York, USA.
15. **Deeb, Azza, M, M., Al-Hawary,I, I., Aman, I, M., Shahine, Douaa, M, H.,2010.** Bacteriological investigation on milk powder in the Egyptian market with emphasis on its safety. *Global veterinaria* 4, 424-433.
16. **El Khier,M.K.S., Yagoub, Ab- El G.,2009.** Quality Assessment of Milk Powders Packed in Sudan. *Pakistan Journal of Nutrition* 8, 388-391.
17. **Flint, S., Walker, K., Waters, B., Crawford, R., 2006.** Description and validation of a rapid (1 h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders. *Journal of applied microbiology* 102, 909–915.
18. **Flint, S.H., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., Crawford, R., 2001.** The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 90, 151–157.
19. **Florence court et leymarios., 2010.** Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d’amélioration par L’alimentation. Thèse, la faculte de medecine de creteil, p13.
20. **Fooladi J and Sajjadian., 2010.** Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable α - amylase producing strain.
21. **Fotou,K.,Tzora, A., , Voidarou,Ch., Alexopoulos,A., Plessas,S., Avgeris,I., , Bezirtzoglou,E., Akrida-Demertzi,K., Demertzis,P, G., 2011.** Isolation of microbial

- pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. *Anaerobe* 17, 315-319.
22. **Godič torkar, K., Golc teger, S., 2008.** The microbiological quality of raw milk after introducing the Two day's milk collecting system. *Acta agriculturae Slovenica* 92, 61–74.
23. **Guiraud, J-P., 2003.** *Microbiologie alimentaire*. 1ère édition. Dunod, Paris, p136-137.
24. **Kim, E.H.-J., Chen, X.D., Pearce, D., 2009.** Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 1. Development of surface composition during manufacture. *Journal of Food Engineering* 94, 163-168.
25. **Konte, M., 1999.** le lait et les produits laitiers, Développement de systèmes de production Intensive en Afrique de l'ouest. *Isrmjpv-lne*, 2-25.
26. **Kouamé-Sina, S, M., Bassa , A., Dadié ,A., Makita, K., Grace, D., Dje ,M., et Bonfoh ,B .,2010 .** Analyse des risques microbiens du lait cru local à Abidjan (Côte d'Ivoire) . *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales* 8, 35-42.
27. **Labioui, H., EL moualdi, L., Benzakour, A., EL Yachioui, M., Berny,EL,H., Ouhssine, M., 2009.** Etude physicochimique et microbiologique de laits crus . *bull. soc. pharm. bordeaux* 148, 7-16.
28. **Lanyi B., 1987.** Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods Microbiol*, (19): 1–67. in **Yakhlef W and Darbouche A, (2012).** Metabolic Diversity of Thermophilic Bacteria from Hot Springs in Algeria. *Journal Academica* Vol. 2(1), pp. 57-65 - Microbiology - ISSN 2161-3338.
29. **Lelie D. Castro-Ochoa, Citlali R-G, Gerardo V-A, Rosamaria O-R. (2005).** Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology* 37 (2005) 648–654.
30. **Madigan M.T. and Martino J.M., 2006.** *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed.; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA.
31. **Malek F., B.Moussa-Boudjema., F.Khaouani-yousfi., A.Kalai and M. Kihel.,2012.** Microflora of biofilm on algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. *African Journal of Microbiology Research* 6, 3863-3844.
32. **Murugan,B., Villi,R.A.,2009.** Proteolytic activity of bacillus species isolated from milk and dairy products. *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences* 5, 47-50.

33. **Ndiaye Ndéye Penda., 2002.** Contrôle de qualité de différentes marques de laits en poudre commercial au Sénégal. Thèse de doctora, université Chheikh Anta Diop de Dakar, p9.
34. **Norme Marocaine., 2004. 08.0.109.** Microbiologie alimentaire -Dénombrement des *Enterobacteriaceae* par comptage des colonies à 30°C.
35. **Parkar, S. G., Flint, S. H., Brooks, J. D., 2004.** Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 96,110-116.
36. **Rajput I R., Khaskheli, M., Kaleri, H, A., Fazlani, S, A., Dedi, K., Khaskheli, G, B.,2009.**determination of total,viable of cells end enterobacteraceas in categorized milk powder. *Pakistan journal of nutrition* 8, 1493-1496.
37. **Rao M-B., Tanksale A-M., Ghatge M-S., Deshpande V-V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635. In **Gomri A, (2012).** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermals terrestres de l'Est Algérien, Université Mentouri Constantine, Institut de la Nutrition,de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), département de Biotechnologie aliment.
38. **Reginensi,S, M., González,M, J., Olivera, J, A., Sosa,M., Juliano,P., Bermúdez,P.,2011.** RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International Journal of Food Microbiology* 148, 36-41.
39. **Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Rqckert, A., Morgan, H.W., 2003.** A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology* 85, 45–61.
40. **Ronimus,R.S., Rueckert,A.,Morgan,H.W.,2006.** Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90+ year old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds Hut in Antarctica. *Journal of Dairy Research* 73, 235-243.
41. **Rueckert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W.,2006.** Development of a real-time PCR assay targeting the sporulation gene, *spo0A*, for the enumeration of thermophilic bacilli in milk powder. *Food Microbiology* 23, 220-230.
42. **Seale,R.B., Flint,S.H., McQuillan,A.J., Bremer,P.J.,2008.** Recovery of Spores from Thermophilic Dairy Bacilli and Effects of Their Surface Characteristics on

- Attachment to Different Surfaces. *Applied and environmental microbiology* 74, 731-737.
43. **Simoães,M., Simoães,L.C., Vieira,M.J., 2010.** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*43, 573-583.
44. **Srdjan Stepanovic´, Dragana Vukovic´, Ivana Dakic´, Branislava Savic´, Milena S´vabic´-Vlahovic´, 2000.** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40 : 175–179.
45. **Srey,S., Jahid,I.K., Ha,S.D., 2013.** Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *food control* 31, 572-585.
46. **Vierling E., 2008.**aliments et boissons. Filière et produits. 2ème Edition. Biosciences et techniques,France, p15.
47. **Vilain, A-C., 2010.** Qu'est-ce que le lait ?. *Revue française d'allergologie* 50, 124–127.
48. **Yakhlef W and Darbouche A., 2012.** Metabolic Diversity of Thermophilic Bacteria from Hot Springs in Algeria. *Journal Academica* Vol. 2(1), pp. 57-65 - Microbiology - ISSN 2161-3338.
49. **Yuan,D.D., Liu,G.H., Ren,D.Y., Zhang,D., Zhao,L., Kan,C.P., Yang,y.Z., Ma, W.,Li,Y., Zhang, L, B.,2012.** A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food control* 25, 752-757.

Annexes

➤ **Trypticase soja agar (TSA)**

poudre déshydraté	40g
Eau distillée	1000 ml

➤ **Tryptone-sel-eau (TSE)**

Eau distillée	1000 ml
Nacl	8.5g
Tryptone	1g

➤ **Trypticase soja bouillon (TSB)**

poudre déshydraté	30g
Eau distillée.	1000 ml

➤ **Eau physiologique**

Eau distillée	1000ml
Nacl	1g

➤ **Solution dissolvante**

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

➤ **Gélose a l'amidon (recherche d'amylase)**

amidon	5g
L'eau distillée	50 ml
Gélose nutritive	500 ml

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

Poudre de lait	5 g
Eau distillée	50 ml

Stérilisé à 120°C pendant 30 minutes ⇒ 1

Agar	2 g
Eau distillée	50 ml

Stérilisé à 120°C pendant 30 minutes ⇒ 2

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

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

Milieu TSA	200ml
Tween	80 gouttes

➤ **Cristal violet :**

Cristal de violet	2 g
Eau distillé	100ml

➤ **Milieu lait écrémé :**

Poudre du lait écrémé	50g
Eau distillé	500ml