

Mémoire de master

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE



Présentée par

Benyahia Nassima Ilhem

Intitulé du Thème:

Recherche et caractérisation des bacilles thermophiles dans les équipements laitiers

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



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.

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.

Je tiens d'abord à exprimer toute ma gratitude, mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance à ma promotrice **DR. MALEK F.** maître assistante classe A 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} BENARIBA, N.** maître assistante CLASSE A 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 BOUBLENZA.L.** Maître assistante CLASSE A 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.** maître assistante CLASSE A 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.

Merci

✿ Je dédie cette thèse à ... ✍

** mes chers parents*

Affable, honorable, aimable : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vos prières et vos bénédictions m'ont été un grand secours pour mener les biens de mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous m'avez donnés depuis ma naissance, durant mon enfance.

** A mon frère Amine et ma sœur Manel, qui m'ont encouragé et m'ont donné la force d'aller jusqu'au bout, qu'allah les protègent.*

** et à toute ma famille et mes amies Fadia et Meriem.*

**et Aux étudiants de Master de microbiologie promotion 2012/2013*

Avec toute ma reconnaissance

Benyahia Naïma Item

Résumé :

Les bacilles thermophiles sont des contaminants fréquents de l'environnement des laiteries et sont impliqués dans les problèmes d'altération du lait pasteurisé.

Dans cette étude nous avons réalisé l'isolement des bacilles thermophiles organisé en biofilm sur des équipements laitiers. L'identification phénotypique par galerie API 20 E a permis de classer ces souches dans cinq biotypes différents.

La caractérisation des souches isolées à 55°C sur milieu TSA a révélée des pouvoirs enzymatiques caractérisé par la production de la protéase, d'amylase, et lipase.

Le potentiel des souches à former le biofilm a été testé par la technique des microplaques de titration ,

Les résultats ont montré que la formation de biofilm est optimal à 42°C pour les souches testés mais elle reste possible a 30 et à 55°C.

Mot clé : Biofilm, bacille thermophile, équipements laitiers, activité enzymatique, biotype, cristal violet.

Abstract

Thermophilic bacilli are common environmental contaminants and dairies are involved in corruption problems of pasteurized milk.

In this study we carried out the isolation of thermophilic bacilli organized biofilm on dairy equipment. The phenotypic identification by API 20 E possible to classify these strains in five different biotypes.

Characterization of isolated 55 ° C on TSA medium revealed enzymatic powers characterized by the production of protease, amylase and lipase strains.

The potential of stem to form biofilms was tested by the microtiter technique, the results showed that biofilm formation is optimal at 42 ° C for strains tested, but it is still possible at 30 and 55 ° C.

Keyword: Biofilm, thermophilic bacilli, dairy equipment, enzyme activity, biotype, crystal violet.

Liste des abréviations

AFNOR : associations française normalisation.

C°: degré Celsius.

CIP : cleaning in place.

DO : densité optique.

EPS : extracellulaire polymérique substance (substances polymériques extracellulaire).

EDS : eau distillée stérile.

H : heure.

NEP : nettoyage en place.

TSA : tripticase soja agar.

TSB : tripticase soja bouillon.

TSE : tryptone sel eau.

Liste des figures

Figure 01: Schéma montrant les étapes de formation du biofilm.....	3
Figure 02 : biofilm de bacille thermophile isolé à partir d'une usine de fabrication de produits laitiers.....	12
Figure 03 : les sites de prélèvements au niveau de l'unité de production laitière.....	18
Figure 04 : schéma montrant la technique des microplaques de titration.....	23
Figure 05 : : photo montrant différent aspect macroscopiques.....	26
Figure 06 : photo prise avec microscope optique des bâtonnet, Gram positif (G x 100).....	26
Figure07: observation microscopique d'une spore au grossissement x100.....	27
Figure 08 : photo d'une catalase positive	27
Figure 09: Photo montrant une galerie api 20 E de biotype 1.....	28
Figure 10 : Photo montrant une galerie api 20 E de biotype 2.....	29
Figure 11 : Photo montrant une galerie api 20 E de biotype 3.	29
Figure 12 : Photo montrant la production d'une amylase sur gélose à l'amidon.....	30
Figure 13: photo montrant la lecture de la microplaque.....	30
Figure 14 : Photo montrant la production d'une amylase sur gélose à l'amidon.....	31
Figure 15 : photo prise d'une microplaque renversé.....	32
Figure 16 : formation de biofilm sur le milieu TSB à 30°C.....	32
Figure 17 : formation de biofilm sur le milieu TSB à 42°C	33
Figure 18 : formation de biofilm sur le milieu TSB à 55°.....	34
Figure19 : formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 30°C.....	34
Figure 20 : formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 42°C.....	34
Figure 21: formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 55°C	35
Figure 22: Formation de biofilm sur deux milieux de culture a 42°C.....	36

Liste des tableaux

Tableau 1 : les principales caractéristiques de quelque bacille thermophile.....	10
Tableau 2 : les sources de la contamination du lait.....	16
Tableau 3 : Répartition des souches selon leur origine.....	25
Tableau 4 : Résultat de l'identification par galerie API 20 E.....	28
Tableau 5 : identification présomptive.....	29
Tableau 6 : Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires des isolats.....	31

Table des matières

Partie I : synthèses bibliographiques

Introduction générale	1
Chapitre I : le biofilm	
I-1.Généralité.....	2
I-2.Définition et composition.....	2
I-2-1..Matrice extracellulaire ou EPS.....	2
I-2-2.Rôle de la matrice.....	2
I-3..Le quorum sensing.....	3
I-4.La résistance du biofilm aux agents antimicrobiens.	3
I-5.Comment se forme le biofilm ?	3
I-5-1.Adhésion réversible.....	4
I-5-2.Adhésion irréversible.....	4
I-5-3.Formation de micro colonie.....	4
I-5-4.Maturation.....	5
I-5-5.Le détachement des cellules du biofilm.....	5
I-6.Le biofilm dans l'industrie laitière.	5
I-7.Les facteurs influençant la formation de biofilm.....	7
Chapitre II : les bacilles thermophiles	
II-1.Généralité	8
II-2 .Définition.....	8
II-3. Taxonomie.....	9
II-4. Caractéristiques des bacilles thermophiles.....	9
II-5. Importance des bacilles thermophiles dans l'industrie laitière.....	10

II-6. Propriétés des spores des bacilles thermophiles.....	10
II-6.-1.La formation de spores.....	11
II-6-2. Résistance.....	11
II-6-3..La germination des endospores	12
II-7. Les biofilm des bacilles thermophiles.....	12
II-8.Les conditions de formation des biofilms.....	13
II -9.Contrôle des bacilles thermophiles en industrie laitière.....	14
II-1. Le lait pasteurisé	14
II-1-1.. Les sources de contaminations du lait	14
II-2.La pasteurisation	15
II-2.Le barème de la pasteurisation.....	15
II-2-2.La qualité tout au long de la filière laitière.....	16

Partie II : étude expérimental

I-Matériel et méthode

I-1-1 .Prélèvement des échantillons.....	18
I-1-2.Technique de prélèvements	18
I-1-3.Transport des échantillons	18
I-1-4.Traitement des échantillons	19
I-1-5.Préparations des dilutions décimales	19
I-1-6. Ensemencement	19
I-2.Les tests d'identification préliminaire	19
I-2-1.Coloration de Gram	19
I-2-2.La recherche de la spore	20
I-2-3.Test de catalase	20
I-2-4. Conservation des souches	20
I-2-5.Détermination du profil biochimique des souches.....	20
I-3.Caractérisation des souches.....	21
I-3-1.Détermination des activités enzymatiques	21
I-3-1-1.Activité protéolytique.....	21
I-3-1-2.Activité lipolytique.....	21
I-3-1-3.Activité amylolytique	21
I-4.Détermination du potentiel de formation de biofilm.....	22
I-4-1. Protocole de formation du biofilm	22
I-4-2. Coloration des biofilms.....	24
I-4-3. Lecture des plaques	24

II-Résultats et discussion

II-1.Isolement	25
II-2.Répartition des souches selon leur origine.....	25
II-3.Caractérisation phénotypiques des isolats	25
II-4. Caractéristiques culturelles.....	26
II-4-1.Coloration de Gram.....	26
II-4-2.La recherche de la spore	26
II-5.Test de catalase.....	27
II-6.Caractéristique biochimique.....	27
II-7.le pouvoir enzymatique	28
III-Détermination du potentiel de formation du biofilm	31
III-1.Les microplaques de titrations.....	31
Conclusion	38
Perspectives.....	39

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Introduction générale

Le lait est un bon milieu de croissance pour les microorganismes en raison de sa teneur élevée en eau, de son pH proche de la neutralité et de sa composition en nutriments. En effet, Il est le siège de contamination microbienne variée durant sa production à la ferme et de sa transformation à l'usine. Les problèmes de contaminations en industrie laitière sont accentués par la formation de biofilm dont les nuisances affectent les équipements laitiers et abaisse la qualité du produit fini.

La contamination microbienne des surfaces industrielles comprend les systèmes de canalisation de la ligne de production du lait pasteurisé (lactoducs , valves et pompes) et les surfaces ouverte comme les tanks de stockage et les cuves. L'élimination des biofilms est difficile et la contamination qui en résulte diminue la durée de vie du lait pasteurisé.

Les bacilles thermophiles, tels que *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus spp.*, constituent un groupe important de contaminants bactériens dans l'industrie laitière.ils proviennent du lait principalement en poudre, et des équipements sur lesquels ils sont capables de former les biofilms.

Le but de cette étude est d'évaluer la présence des bacilles thermophiles dans les biofilms formée sur la surface des équipements de la ligne de production du lait pasteurisé dans une laiterie de Tlemcen.

Pour cela nous adopterons la démarche expérimentale suivante :

- Isolement de bacilles thermophile à partir des équipements laitiers.
- Identification phénotypique des souches isolées.
- Caractérisation des bacilles thermophiles isolés par l'étude du pouvoir enzymatique et la capacité de former des biofilms.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : le biofilm

I.1. Généralité :

La production de biofilm est le mode de vie par lequel les bactéries se développent au contact d'une surface et forment des structures capables de les protéger des agents antimicrobiens (**Donlan et Costerton., 2002**). la fixation des microorganismes, suivie par la formation de biofilms, est connue pour augmenter la résistance des cellules aux stress environnementaux (**Young et al.,2012**).La formation et le développement de biofilms est affectée par de nombreux facteurs comme les propriétés de surface des matériaux, et les paramètres environnementaux tels que le pH et la teneur en éléments nutritifs et la température (**Srey et al.,2013**).

N'importe quel type de micro-organismes, y compris ceux qui causent les altérations des aliments et les pathogènes, pourrait former un biofilm et jouer un rôle clé dans de nombreuses infections (**Srey et al.,2013**).

I-2.Définition et composition :

Le biofilm est défini comme une population bactérienne adhérente à une surface, incorporés dans des matrices d'exopolymères, qui sont attachés à des surfaces biotiques ou abiotiques (**Filloux et Vallet .,2003**).

Le biofilm est constitué de deux parties : l'une vivante (les microorganismes) et l'autre non vivante (la matrice) ,Il s'agit en général des cellules immobilisées sur un support inerte. Les micro-organismes attachés : croissent, prolifèrent et peuvent former des substances polymériques extra-cellulaires formant une matrice structurelle autour des cellules (**Imbeault., 1997**).

I-2-1. La matrice extracellulaire ou (EPS) :

La matrice est considérée comme une barrière physique contre l'entrée des agents antimicrobiens ; détergents et antibiotiques (**Donlan et Costerton, 2002**). Elle peut être abordée comme un amas de bio-polymères d'origine microbienne disposés à l'extérieur et au contact des composés de la membrane des cellules résidentes. Ces EPS(substance polymérique extracellulaire) sont des exopolysaccharides, des acides nucléiques, des protéines, des glycoprotéines et des phospholipides (**Mittelman.,1998**).

I-2-2. Rôles de la matrice

- Empêcher la déshydratation des microorganismes
- Rétention de l'eau par les exopolysaccharides (EPS)
- Rétention des nutriments
- Protection des microorganismes
- Structuration dans la matrice extracellulaire
- Support éventuel pour l'adhésion d'autres microorganismes (**Abdallah et al . ,2010**)

I-3. Le quorum sensing :

C'est un phénomène qui permet aux bactéries de communiquer entre elles non seulement dans une même espèce mais aussi entre espèce différentes. Il permet aux bactéries de se comporter comme une population et non comme des cellules individuelles (**Balestrino et al.,2005**). Le quorum sensing est un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production de petites molécules médiatrices chimiques appelées « autoinducteurs » qui sont produites en phase de croissance bactérienne (**Waters et al .,2005**).

I-4. La résistance du biofilm aux agents antimicrobiens :

Les bactéries incluses dans le biofilm sont extrêmement résistantes aux traitements des antibiotiques. D'abord les EPS (substance polymérique extracellulaire) secrétés par les bactéries du biofilm, agissant en tant que barrière physicochimique, empêchant de la pénétration des anticorps ou d'antibiotiques (**Mittelman.,1998**).

Dans le cas de *Bacillus* ; l'adhésion des spores et le développement du biofilm sur l'acier inoxydable accroît la résistance de *Bacillus cereus* aux différents agents antimicrobiens même après le nettoyage et la désinfection dans l'industrie agroalimentaire, en particuliers dans l'industrie laitière (**Faille et al.,2002**).

I-5. Comment se forment le biofilm ?

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (**Parot .,2007**). La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes (Figure 1.) :

- 1- adhésion réversible
- 2- adhésion irréversible
- 3- formation des micro-colonies
- 4- maturation du biofilm
- 5- détachement du biofilm

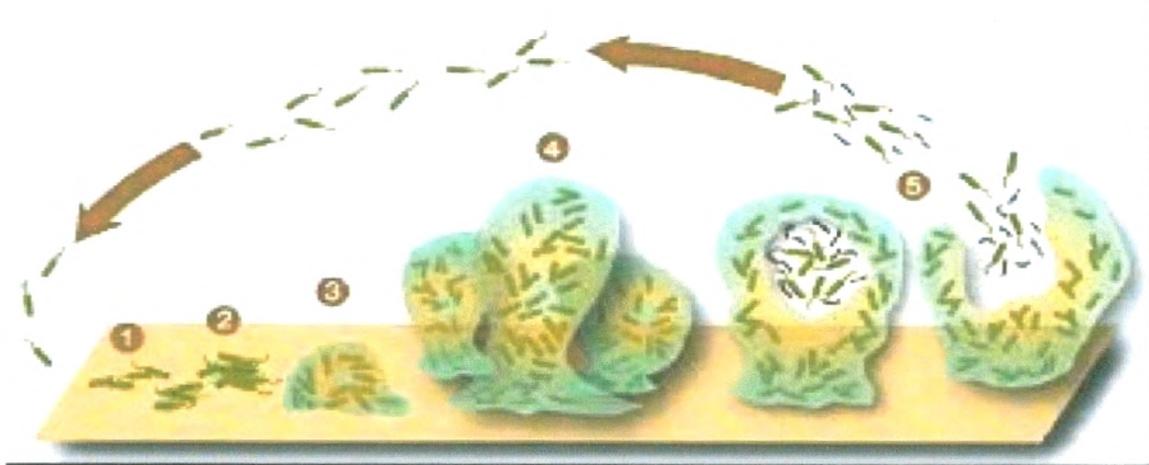


Figure 1: Schéma montrant les étapes de formation du biofilm (Marchand, et al.,2012)

I-5-1. L'adhésion réversible:

C'est le contact entre la bactérie et le substratum mettant en jeu les forces attractives de Vanderwaals, et les forces électrostatiques répulsives, dans ce cas la bactérie peut alors être enlevée facilement par simple rinçage (Chmielewski et Frank .,2003).

I-5-2. L'adhésion irréversible :

Elle nécessite des forces plus importantes pour retirer les bactéries. L'adhésion irréversible résulte de l'ancrage d'adjonction et /ou la production de polymère extracellulaire. Cette étape est caractérisée par des interactions de haute énergie (Filloux et Vallet .,2003).

I-5-3. la formation des microcolonies:

Dés qu'il ya un attachement irréversible, les bactéries commencent à se diviser et a former des microcolonies, à partir d'une concentration suffisamment dense , les microcolonies commencent la sécrétion du biofilm (Chmielewski et Frank .,2003).

Pendant la multiplication, les bactéries émettent des signaux chimiques pour se permettre une intercommunication. Une fois l'intensité de ses signaux atteint un certain niveau, les mécanismes génétiques contrôlant la production d'EPS sont activés (**Costerton et al.,1999**).

I-5-4. la maturation du biofilm :

Au sein du biofilm mature, les microorganismes sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfuies du biofilm et d'autre part d'évacuer les déchets (**Filloux et Vallet.,2003**). Le développement de ces microcolonies traduit le stade de maturation du biofilm et la colonisation de nouvelles surfaces. Le biofilm grandi et muri, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique, voire géant en conditions optimales (**Filloux et Vallet.,2003**).

I-5-5. Détachement des cellules du biofilm:

Cette étape correspond à la phase de dispersion, les microorganismes peuvent activement se séparer du biofilm parfois consommant la matrice qui représente une source d'énergie. Ces microorganismes retournent à l'état de libre circulation et peuvent aller coloniser de nouvelles surfaces complétant ainsi le cycle (**Srey et al.,2013**).

I-6. Le biofilm dans l'industrie laitière :

La capacité de certains micro-organismes à former des biofilms continue de constituer un défi majeur pour différentes industries. Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs des produits laitiers sont remises en cause par le problème des biofilms. En effet les principales sources de contamination des produits laitiers sont souvent dues à un mauvais nettoyage et de désinfection de l'équipement (**Srey et al.,2013**).

Dans les usines de productions laitières, la formation de biofilms peut avoir lieu dans différentes sites de la chaîne de transformation du lait (**Parkar et al.,2004**), ceci comprend les réservoirs de stockage du lait, et les canalisations, autour des joints . De même les surfaces de contact du produit dans les appareils de traitement telles que les pasteurisateurs et des évaporateurs, sont considéré comme une source importante de contamination du produit dans la ligne de transformation du lait. La croissance des biofilms laitiers conduit à l'augmentation des possibilités de contamination microbienne des produits laitiers transformés. Ces biofilms peuvent contenir des micro-organismes pathogènes et de détérioration (**Parkar et al.,2004**).

En effet, un biofilm est constitué de cellules bactériennes qui peuvent élever la numération sur plaque et abaisser la qualité du lait qui circule dans le lactoduc (**Taylor.,2006**).Le développement de Biofilm peut induire la corrosion des surfaces métalliques alimentaires réduisant l'efficacité des appareils par diminution de transfert de chaleur dans les échangeurs thermiques (**Simões et al.,2010**).

Les Bactéries dans les biofilms sont protégées contre les désinfectants en raison de la coopération multispécifique et de la présence des substances polymériques extracellulaires (EPS), qui favorise leur survie et leur contamination ultérieure des produits laitiers(**Marchand et al .,2012**).En effet, les biofilms sont composés d'espèces spécifiques qui sont bien adaptés pour survivre à des facteurs d'extrinsèque (chaleur, froid) et d'intrinsèques (pH, sel) qui sont associés à la transformation du lait(**Marchand, et al ;2012**).

Les Bactéries fixées sur les surfaces sont plus difficiles à tuer que les cellules vivant en liberté, et la contamination par les biofilms augmentent la charge microbienne et affecte potentiellement la sécurité et la qualité des produits laitiers. Minimiser l'initiation de biofilm et la croissance ultérieure est un défi croissant pour les fabricants de produits laitiers. Parmi les initiatives qui peuvent aider sont :

- l'amélioration de la manutention du lait cru afin de minimiser la charge microbienne initiale.
- élaboration de méthodes alternatives de nettoyage en place des produits chimiques, en utilisant des matériaux modifiés qui résistent à la colonisation microbienne.
- variations dans les conditions de fonctionnement au sein de l'usine de fabrication pour créer des conditions instables afin de perturber la croissance microbienne (**Simões et al.,2010**).

les Biofilms laitiers sont dominés par les bactéries, les substances polymériques extracellulaires (EPS) et les résidus de lait, pour la plupart des protéines et de phosphate de calcium. La formation de biofilms sur les équipements de l'industrie laitière peut conduire à de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques en raison de la détérioration des aliments et à la dépréciation d'équipement. Les micro-organismes dans les biofilms catalysent des réactions chimiques et biologiques responsables de la corrosion des métaux dans les tuyauteries et les réservoirs, et ils peuvent réduire l'efficacité de transfert de chaleur si les

biofilms deviennent suffisamment épaisses : échangeurs à plaques et des pipelines (**Simões et al.,2010**)

I-7.les facteurs influençant sur la formation de biofilm

Plusieurs facteurs influencent la formation de biofilm tels que la surface, la disponibilité des nutriments et les caractéristiques du milieu aqueux (**Carpentier et Cerft.,1993**).

Synthèse bibliographique

Chapitre II : les bacilles thermophiles

I-1 .Généralité :

Les bacilles thermophiles, comme *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus spp.*, Constituent un groupe important de contaminants dans l'industrie laitière. Bien que ces bacilles ne soient pas pathogènes, leur présence dans les produits laitiers est un indicateur d'une mauvaise hygiène, leur croissance peut entraîner des défauts de saveurs par la production d'acides ou d'enzymes (**Burgess et al.,2009**).

Les bacilles thermophiles sont sélectionnés par des conditions lors de la fabrication des produits laitiers .Ces bactéries sont capables de se développer dans les sections des usines de fabrication laitière où les températures atteignent 40-65 °C (**Burgess et al.,2010**). En outre, parce qu'ils sont sporulés, ils sont difficiles à éliminer, ils présentent une large gamme de température de croissance, présentent un taux de croissance rapide (temps de génération d'environ 15-20 min) et ont tendance à former facilement des biofilms (**Burgess et al.,2010**).

En industrie laitière de nombreuses stratégies ont été testées pour éliminer, prévenir et / ou retarder la formation de biofilms des bacilles thermophiles, mais avec un succès limité, et à cause du manque de connaissances sur la structure et la composition des biofilms des bacilles thermophiles (**Parkar et al.,2004**).

I-2. Définition :

Les bacilles thermophiles sont des contaminants potentiels dans une variété des industries où les températures élevées (40-65 ° C) prévalent lors du processus de fabrication ou du stockage. Ces industries comprennent l'industrie du papier, la mise en conserve, la pasteurisation du jus, le raffinage du sucre, la production de gélatine, la fabrication de légumes déshydratés et des produits laitiers (**Flint et al., 1997**).

Dans l'industrie laitière, les bacilles thermophiles sont formés d'espèces qui se développent de façon optimale à 55 ° C degrés sur l'acier inoxydable (**Parkar et al .,2004**). Ils peuvent être divisés en deux groupes: les thermophiles obligatoires et les thermophiles facultatifs (également connu sous le nom de micro-organismes thermotolérants). Les thermophiles obligatoires peuvent croître à des températures élevées (environ 40-68 ° C) et comprennent *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus sp*(**Flint et al., 2001**).

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*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans* et *Bacillus subtilis* (Flint et al., 2001).

I-3. La taxonomie :

Le genre *Bacillus* est une collection vaste et diversifié de bactéries Gram-positives aérobie et anaérobie facultatives, en forme de bâtonnet, formant des endospores. le genre comprend les thermophiles les psychrophiles, les acidophiles et les alcalophile (Nazina et al., 2001). La nouvelle classification a permis le reclassement des espèces du genre *Bacillus* dans des nouveaux genres. A titre d'exemples *Bacillus stearothermophilus* est reclassés dans le nouveau genre *Geobacillus*, et *Bacillus flavothermus* étant reclassés en *Anoxybacillus flavithermus* (Nazina et al., 2001).

I-4. Les caractéristiques des bacilles thermophiles :

Le genre *Bacillus* et les bacilles thermophiles obligatoire ont généralement de simples besoins nutritionnels, car ils n'ont pas besoin d'acides aminés spécifiques de croissance et ils sont capables de croître sur des milieux simples. La température optimale de croissance des bacilles thermophiles se situe généralement entre 50 et 65 ° C, mais varie selon les espèces et les souches (Burgess et al., 2010).

D'autres caractéristiques des bacilles thermophiles sont décrites dans le tableau n° 01 :d'après : (Burgess et al., 2010)

Tableau n° 01 : les principales caractéristiques de quelque bacilles thermophiles :

	Les thermophiles obligatoires			Les thermophiles facultatifs		
	<i>A.flavithermus</i>	<i>G. Stearotherophilus</i>	<i>G. Thermoleovorans</i>	<i>Bacillus Licheniformis</i>	<i>Bacillus Subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
T _{max} (° C)	65–72	65–68	70	50-55	45–55	57-61
T _{min} (° C)	30-38	37	37-47	15	5-20	15-25
croissance anaérobie	Oui	Non	Non	Oui	Non	Oui
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
Sporange onflé	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Variable
position deSpore	Terminal	Terminal	Terminal	Central	Central	Sub-terminal

Légende :

T_{max}(° C) : température de croissance maximale.

G : *Geobacillus*

T_{min}(° C) : températures de croissance minimale.

A : *Anoxybacillus*

1-5. Importance des bacilles thermophiles dans l'industrie laitière :

Dans le contexte de la production laitière, les bacilles thermophiles sont utilisés comme des indicateurs d'hygiène dans les produits transformés. C'est à cause de leur capacité de produire des enzymes et des acides qui peuvent conduire à des défauts de goûts. En outre leur présence dans l'environnement laitiers est renforcée par la capacité de former des spores et des biofilms (Seale et al.,2008).

les risques de détérioration des bacilles thermophiles varient en fonction de leur caractère obligatoires ou facultatifs qui sont capables de la production des acides, ainsi que d'une variété d'enzymes thermostables, y compris les protéinases et les lipases. Le potentiel réel pour les thermophiles obligatoires pour gâter les produits laitiers est considéré comme faible. les produits laitiers était généralement stockés à des températures inférieures à 37° C,

température à laquelle les thermophiles obligatoires ne se développera pas (**Chopra et Mathur., 1984**).

Cependant, *Geobacillus stearothermophilus* a été associée à l'altération dans une variété d'aliments en produits de conserve, y compris le lait évaporé. Dans le cas des thermophiles facultatifs, certaines souches de *Bacillus licheniformis* sont aussi capables de produire une substance visqueuse qui peut affecter la qualité du lait pasteurisé et de la crème (**Burges et al.,2010**).

Les thermophiles obligatoires ne sont pas connus pour être pathogènes. Cependant, quelques-unes des thermophiles facultatifs y compris *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* et *Bacillus subtilis* peuvent produire des toxines. En de rares occasions, ces trois organismes ont été impliqués dans des intoxications alimentaires .Cependant, on ignore si ces organismes sont capables de produire des toxines à des températures élevée (**Burgess et al.,2010**).

I-6.propriétés des spores des bacilles thermophiles :

Dans l'environnement des produits laitiers, la formation des endospores des bacilles thermophiles se produit rapidement, mais les facteurs qui contribuent à ce processus ne sont pas clairement compris (**Postollec et al., 2012**). La plupart des travaux sont effectués sur les spores des bacilles mésophile. *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*. La structure, sporulation et processus de germination, ainsi que la résistance de mécanismes de spores, est présumé être similaire pour les bacilles thermophiles (**Postollec., 2012**).

I-6.1. La formation de spores :

La sporulation est un processus complexe, divisé en une série d'étapes qui est considéré comme étant très similaires entre aérobie et bactéries anaérobies facultatives sporulées (**Seale et al.,2008**).

En général, la température et le pH optimal pour la formation des spores sont similaires à ceux pour la croissance des cellules végétative .Les conditions qui déclenchent la formation des spores des bactéries thermophiles dans l'environnement laitier comprennent entre autre la présence des minéraux tels que le magnésium, le calcium et le potassium et peuvent également être les mêmes pour le déclenchement de l'activation du processus de sporulation. Comme ces minéraux sont également présents dans le lait, ils peuvent aussi stimuler la formation des spores des bacilles thermophiles. Par conséquent l'environnement laitiers est favorable à la croissance et la sporulation des bacilles thermophiles (**Burgess et al.,2010**).

Les biofilms des bacilles thermophiles se forment suite à la fixation et l'adhésion des spores et des cellules végétatives. Toutefois les spores adhérentes en plus grand nombre que les cellules végétatives. Le nombre de spore adhérente peut atteindre $7,6 \log \text{ UFC /cm}^2$ alors que les cellules végétatives adhérentes et de l'ordre de $4-5 \log 10 \text{ cellules/cm}^2$ (**Burgess et al.,2010**).

La présence de spores de bacilles thermophiles sont un problème courant lors de la fabrication du lait .les bactéries de spores thermophiles telles que *Geobacillus* spp. sont normalement présents en faible nombre dans le lait cru . Cependant, un grand nombre sont souvent trouvés dans le lait en poudre. Les biofilms sont formés lorsque les spores présentes dans le lait cru de survivent à la pasteurisation, adhèrent à des surfaces en acier inoxydable, et germent quand et / où les conditions sont favorables. Les concentrations de spores aussi élevées que $10^5 \text{ spores g}^{-1}$ peut se produire dans le lait en poudre, ce qui lui a été abaissée à un produit de moindre valeur. Comme les biofilms établis sont difficiles à éradiquer, la prévention de l'adhérence initiale est une approche alternative pour contrôler la formation de biofilm(**Burgess et al.,2010**).

I-6-2. Résistance :

Parmi les bacilles thermophiles, *Bacillus sporothermodurans* a une quantité de calcium dans les spores qui a montré une corrélation avec la résistance thermique le laboratoire a démontré que, des bacilles thermophiles, seules les spores de *Geobacillus* sp, ont le potentiel pour survivre au traitements UHT ($134-145^\circ\text{C}$ pendant 1-10s) (**Flint et al.,2001**).

I-6-3. La germination des endospores :

Trois étapes sont impliquées dans le processus de passage d'une spore à une cellule végétative: l'activation, la germination et la prolifération. L'activation des spores avant la germination se produit sous l'action de la chaleur, les produits chimiques et de l'acidité (**Burgess et al.,2010**).

Dans l'industrie laitière, la chaleur est le mécanisme le plus probable de l'activation des spores thermophiles, en raison de l'utilisation extensive de la chaleur comme une technologie de conservation .Par exemple, les spores de *Geobacillus stearothermophilus* sont avérés être activées à des températures aussi élevée que 110°C . alors que les spores de *Bacillus subtilis* ont une plus faible température d'activation aurait de ($65-70^\circ\text{C}$)(**Seale et al.,2008**).

I-7.les biofilm des bacilles thermophiles :

En industrie laitière des pressions sélectives sont exercées par la chaleur, les résidus alimentaires, le pH et l'activité de l'eau. La structure des biofilms formés par les bacilles

thermophiles, basé sur l'acier inoxydable peuvent être former d'une monocouche (Fig. 02), (Flint et al.,1997).

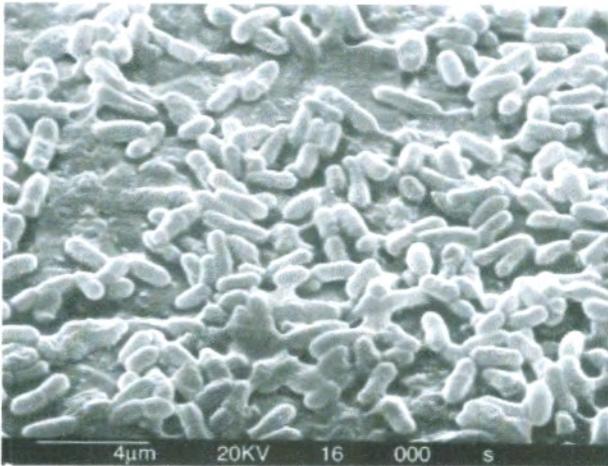


Figure 02. Un biofilm de bacilles thermophiles isolés à partir d'une usine de fabrication de produits laitiers, sur une surface en acier inoxydable. Source: D. Hopcroft, microscopie et d'imagerie Manawatu Centre, Massey University, Palmerston North, Nouvelle-Zélande.

Les biofilms monocouches se forment de préférence dans les usines qui sont régulièrement nettoyées au niveau des sites où les forces de cisaillement sont élevées ou qui ne présente pas d'extrémité morte tels que la surface des échangeurs thermiques. Dans d'autres sites où l'écoulement est faible et /ou les cellules bactériennes peuvent être piégés à l'intérieur de l'encrassement due au lait, les biofilms peuvent avoir une structure multicouche (Burgess et al.,2010).

En outre la formation de biofilm des bacilles thermophiles se produit dans les sections où les températures sont élevées de (40-65 ° C). Les exemples incluent les sections de préchauffage et de l'évaporation du lait, échangeurs de chaleur à plaques (PHE) utilisés lors du processus de la pasteurisation, séparateurs centrifuges (utilisé pour séparer la crème du lait entier) fonctionnent à des températures chaudes (45 - 55 ° C), le recyclage des boucles dans les usines de fabrication de beurre, chauffe-crème en matière grasse laitière anhydre (MGLA)(Burgess et al.,2010).

I-8.les conditions de formation des biofilms :

- Dans l'usine : les conditions favorables au développement des biofilms par les bacilles thermophiles comprennent :
 - ❖ Les cycles de production trop longs.
 - ❖ Un mauvais nettoyage des équipements entre les cycles de production.

- ❖ Réutilisation des ingrédients et sous produits contaminées par les bacilles thermophiles.

Quelques exemples des produits laitiers dont la croissance thermophile a été un problème comprennent : la poudre de lait, le lait pasteurisé, le babeurre et le lactosérum (**Flint et al, 1997**).

➤ le système CIP:

Le contrôle du biofilm dans les usines de fabrication de produits laitiers implique généralement un processus appelé le nettoyage en place (NEP). Ce processus de nettoyage est caractérisé par le nettoyage des éléments d'installations complètes ou des circuits de pipeline sans avoir besoin de démonter ou d'ouvrir l'appareil et avec la participation manuel peu ou pas de l'opérateur. Le CIP peut être définie comme la circulation des liquides de nettoyage à travers des machines et d'autres équipements dans un circuit de nettoyage (**Srey et al.,2013**).

Dans l'industrie laitière, les systèmes CIP impliquent généralement l'utilisation séquentielle de soude caustique (hydroxyde de sodium) et de l'acide (acide nitrique) les étapes de lavage et les produits chimiques à l'origine choisis pour leur capacité à éliminer des matières organiques (protéines et lipides) et inorganique (phosphate de calcium) (**Bremer et al.,2006**).

Dans certains cas, les produits désinfectants sont également intégrés dans le système CIP. Le choix de la procédure de nettoyage est déterminé par le type et la composition de la matière salissures ainsi que par la conception de l'équipement à nettoyer (**Bremer et al.,2006**).

.I-9.Contrôle des bacilles thermophiles en industrie laitière :

Les méthodes actuelles pour contrôler la croissance des bacilles thermophiles et leur biofilm dans les usines laitières comprennent :

- l'augmentation de la fréquence de nettoyage.
- l'utilisation des désinfectants, en modifiant la température.
- la limitation de la durée de production..

Entre chaque cycle de production, les parties humides des installations des produits laitiers sont nettoyées à l'aide d'un système de nettoyage en place (NEP). Dans certains laiteries des

désinfectants sont utilisés pour inactiver les microorganismes qui restent sur les surfaces des équipements (**Burgess et al.,2010**).

L'avantage d'utiliser les désinfectants est de compléter l'efficacité des CIP dans les lignes de production du lait. Après une procédure CIP les microorganismes peuvent rester sur la surface, même si elle peut paraître visiblement propre (**Srey et al., 2013**). Les bactéries thermophiles qui restent dans l'équipement après le nettoyage seront nourries des composants du lait et reformeront de nouveau le biofilm. De ce fait, l'utilisation d'un désinfectant est importante pour enlever et tuer les cellules microbiennes qui restent fixées à la surface (**Srey et al.,2013**).

Par exemple, Lindsay et al (2000) ont isolés divers *Bacillus spp* ainsi que *Bacillus cereus* à partir, des solutions caustiques (soude) réutilisées dans les procédures CIP. Parkar et al (2004) ont démontré qu'un CIP de lavage alcalin à 2% (75 ° C pendant 30 min), permet une élimination optimale de biofilm formée par les bacilles thermophiles.

II-1. Le lait pasteurisé :

II-1-1. Les sources de contaminations du lait :

Tableau N° 02 : les sources de contamination du lait d'après : (Faye et al., 2000).

étapes	Dangers	Causes
Centre de collecte	• Contamination croisée	*Nettoyage et désinfection inefficaces du matériel. *Absence ou mauvaise qualité de contrôle des laits avant le mélange.
	Contamination par des germes de l'environnement	*Utilisation d'eau contaminée pour le nettoyage des matériels.
Laiterie	Contamination croisée • Re-contaminations par des germes de l'environnement • Persistance des micro-organismes	*Absence ou mauvaise qualité de contrôle des laits avant sa transformation. *Mauvaise hygiène du conditionnement *Absence de traitements thermiques, ou traitements mal réalisés : non respect des couples temps/température

II-2. La pasteurisation :

La pasteurisation est un traitement thermique modéré permettant la destruction des Microorganismes pathogènes et d'un grand nombre de microorganismes d'altération. Ce Traitement permet d'une part, d'assurer la salubrité du produit et d'autre part, d'améliorer sa conservabilité (Ould Moustapha., 2012).

La conception des lignes de traitement du lait pasteurisé varie beaucoup d'un pays à l'autre, et même d'une laiterie à une autre, en fonction de la législation et de la réglementation locale. Ainsi, par exemple, la standardisation éventuelle de la matière grasse peut se faire

avant, après ou pendant la pasteurisation. D'autre part, la rapidité de ce traitement (quelques secondes) permet de conserver intactes les qualités organoleptiques et nutritionnelles du lait (**Ould Moustapha.,2012**).

II-2-1.Le barème de la pasteurisation :

Le processus de pasteurisation du lait a été identifié comme un point de contrôle critique(CCP), puisque la pasteurisation inadéquate permettrait aux bactéries pathogènes de survivre et potentiellement causer des problèmes de santé des consommateurs. Par conséquent le traitement thermique défini sur la température et le temps est considéré comme crucial pour la sécurité microbiologique des produits finis (**Smigic.,2012**).

Les barèmes températures/temps utilisé sont soit :

- Par pasteurisation basse ou avec chambrage : une température de 63° C pendant une durée de 30 minutes .Cette pasteurisation est presque abandonnée
 - ou une température de 85° C pendant une durée de 15 à 20 secondes ;(HTST/température moyenne) (**FAO et OMS.,1954**).
- « HTST » :high temperature, short time.

La durée de conservation du lait pasteurisé est liée à la qualité du lait cru et le contrôle de la contamination post pasteurisation. La contamination croisée possible de lait après pasteurisation doit être contrôlée en appliquant des règles strictes de nettoyage et de désinfection (**Smigic.,2012**). Le suivi de la formation de biofilms doivent être pris en compte dans l'élaboration des plans HACCP et dans les spécifications proposées par des organisations telles que l'Organisation internationale de normalisation (ISO) (**Smigic.,2012**).

II-2-2.La qualité tout au long de la filière laitière :

L'organisation de la filière laitière, ainsi que la faiblesse du système de réglementations et des structures de contrôle de la qualité des produits, ne permettent pas d'assurer une qualité hygiénique suffisante des produits laitiers. Ce problème est amplifié par les conditions climatiques, car la chaleur et parfois l'humidité ambiante ne favorisent pas la conservation du lait (**Faye et al.,2000**).

La gestion de la qualité par l'analyse des risques ou des dangers potentiels liés à un produit ou à un procédé (approche HACCP), doit alors être appliquée à l'ensemble de la

filière de la ferme jusqu'au consommateur. A chacun des risques potentiels identifiés correspondent des actions correctrices pertinentes et des plans de contrôle (**Faye et al.,2000**).

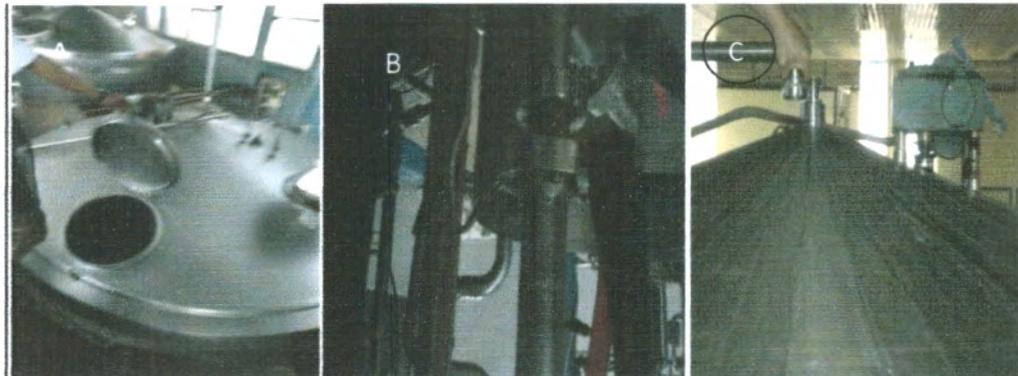
Etude expérimentale

Matériels et méthodes

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence la présence des bacilles thermophiles dans les équipements de transformation du lait produit dans une laiterie de la région de Tlemcen.

I-1-1 .Prélèvement des échantillons :

Les échantillons sont prélevés à partir de la ligne de production du lait pasteurisé dans une laiterie située à Tlemcen à partir des surfaces fermées : lactoducs, l'entrée et sortie des canalisations, le pasteurisateur et des surfaces ouvertes comme les tanks de stockage.



A)-tank de stockage

B)-section de lactoduc

C)-entrée de canalisation

Figure 03 : les sites de prélèvements au niveau de l'unité de production laitière.

I-1-2.Technique de prélèvements :

Les prélèvements sont effectués conformément aux règles citées dans la littérature [(Ronner et Wong .,1993 ; Huss.,1995)] par écouvillonnage.

A l'aide d'un écouvillon stérile humidifiée et imbibé dans un diluant (10 ml du TSE contenant 0.3 % du tween 80) puis essoré, on effectue le prélèvement sur une surface déterminée. On essuie la surface horizontalement et verticalement en grattant bien avec l'écouvillon, puis on le met dans le tube et on brise la partie qui était en contact avec les mains du manipulateur. Le tube présente la solution mère.

I-I-3.Transport des échantillons :

Les prélèvements sont transportés dans une glacière (4°C) et ensuite analysés juste après réception au laboratoire.

I-1-4.Traitement des échantillons :

I-1-4-1.Préparations des dilutions décimales :

Les tubes contenant les écouvillons sont agitées pendant une minute dans un vortex pour détacher les bactéries de l'écouvillon puis ils sont soumis a un traitement thermique dans un bain marie a 80°C pendant 10 min, ce qui permet de tuer les formes végétatives et l'isolement sélectif des formes sporulés. A l'issue du traitement thermique les tubes sont refroidis en les plongeant dans un bain d'eau glacée.

Des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à la dilution 10^{-3} .

I-1-6. Ensemencement :

L'ensemencement est effectués en surface dans des boites de pétri coulées préalablement, 0.1 ml de la suspension mère et de chaque dilutions sont étalées au râteau sur milieu TSA (Trypticase soja agar). Les boites sont incubées à 55 °C pendant 24 à 48 h.

I-2-.Les tests d'identification préliminaire :

Les souches isolées à partir des équipements laitiers sont identifiées en se basant sur l'étude des caractères cultureux, morphologiques et biochimiques.

Les caractères cultureux : forme des colonies, leur taille, leur couleur, l'aspect des contours sont notées pour chaque type de colonie.

Caractéristique microscopique : l'examen des fragments de colonies de culture jeune au microscope optique après coloration de Gram a permis de donner des informations sur la morphologie cellulaire et le mode de groupements.

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

I-2-1.Coloration de Gram :

Après être passé par les différentes étapes de coloration de Gram, les lames sont observées au microscope optique, en se basant sur les bâtonnets, Gram positif.

I-2-2.La recherche de la spore :

La coloration au violet de gentiane de cultures âgées de plus de 48h, permet l'observation de la morphologie cellulaire et la présence ou l'absence de la spore. Sur un frottis bactérien correctement fixé à la chaleur, on fait couler la solution de violet de gentiane jusqu'à ce que toutes les lames soit couverte.après un temps de réaction d'une minute, on rince abondamment à l'eau. Ensuite le frotti bactérien est séché par le papier joseph, puis observé au microscope au grossissement X 100. Les spores apparaissent comme un vide réfrangeant à l'intérieur de la cellule.

I-2-3.Test de catalase :

Sur une lame en verre bien nettoyée on a mis une goutte de TSE (puis on a déposé a laide d'une anse de platine la suspension, puis on a mis une goutte d'eau oxygénée. La formation de bulle d'air indique que la bactérie possède de la catalase.

I-2-4. Conservation des souches :

Les souches sont conservées sur TSA inclinées et incubée à 55°C pendant 24h et pour les conservé sous forme de spore elles ont été mise a l'étuve 3 jours supplémentaire, puis conservée a 4°C.

I-2-5.Détermination du profil biochimique des souches :

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

➤ Préparation de la galerie :

La galerie est préparée selon les directives du guide pour système API 20 E.

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

- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ Préparation de l'inoculum :

Préparer une suspension bactérienne, dans de l'eau physiologique.

➤ L'inoculation de la galerie :

- Homogénéiser la suspension bactérienne par une légère agitation.
- A l'aide d'une pipette stérile prendre la suspension préparée

- Remplir les tubes et les cupules des tests CIT,VP,GEL.
- Recouvrir d'huile de paraffine les cupules des cinq tests : ADH, LDC, ODC, H₂S ,URE.
- Remplir les tubes (et non les cupules) des autres tests avec la suspension de manière a éviter les bulles d'air.
- Incuber a 37°C pendant 18 à 24 heures.

➤ **Lecture de la galerie :**

Une première lecture a été effectuée après 24h . les galeries sont réincubées et après 48 h une 2^{ème} lecture se fait par observation de la galerie et ajout des réactifs adéquats pour certaines tests (réactif TDA, Kovaks, VP₁ et VP₂, nitrate 1 et nitrate 2 et poudre de zinc).

I-3.Caractérisation des souches

I-3-1.Détermination des activités enzymatiques :

L'étude de diverses activités enzymatiques est réalisée par la norme **AFNOR, (1995)**.

I-3-1-1.Activité protéolytique :

L'hydrolyse des protéines, due à l'action d'exoenzymes se traduit par une modification de l'aspect des milieux. Le milieu utilisé est la gélose au lait à 1 % de lait écrémé, coulé en boîte et ensemencé par strie transversale et on incube à 55°C pendant 24 à 48 h.

L'activité protéolytique se traduit par une zone de clarification autour des colonies protéolytiques.

I-3-1--2.Activité lipolytique :

Le milieu utilisé est le milieu TSA auquel on a ajouté du tween 80, l'ensemencement se fait en strie transversale et l'incubation se fait à 55°C pendant 24 h.

La présence d'une estérase se traduit par la formation d'une zone opacification autour de la strie ensemencée.

I-3-1-3.Activité amylolytique :

L'hydrolyse de l'amidon de fait par l'amylase, le milieu utilisé est une gélose à l'amidon 1 % (**Brigitta et al ,2003**).

L'ensemencement est toujours par strie, l'incubation est à 55°C pendant 24 h. la lecture consiste en la révélation des colonies amylolytiques au lugol versé sur le milieu, ce qui permet l'apparition de zone claire sur fond bleu ; ce sont des germes amylases positifs. Dans le cas d'une amylase négative il n'y a pas de modification du milieu.

I-4. Détermination du potentiel de formation de biofilm :

La capacité des souches des bacilles thermophiles à former un biofilm est testée par la méthode de microplaques de titration à 96 puits selon la technique d'Auger et al., (2006).

I-4-1. Protocole de formation du biofilm :

La formation de biofilm est réalisée dans deux milieux de cultures : le milieu TSB et le lait écrémé. Dans les puits des microplaques de titration stériles, 80 µl de TSB ou lait écrémé et 80 µl de la suspension bactérienne préparée dans l'eau physiologique et ajustée à une D.O (densité optique) de 0.6 à 0.8, sont introduits. La première rangée remplie par le milieu non ensemencé constitue le témoin. Les plaques sont incubées à trois températures 30, 42 et 55°C pendant 24h.

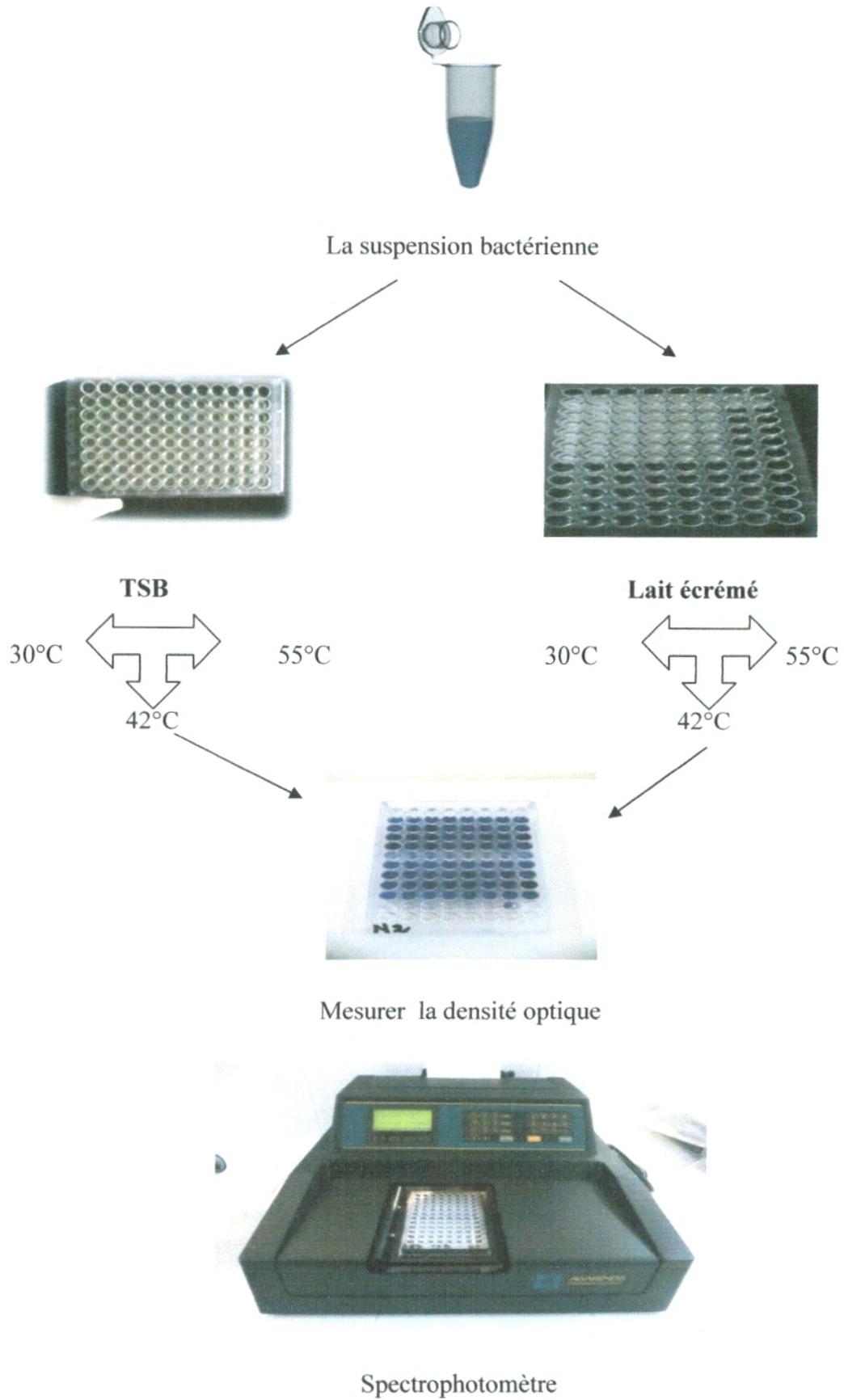


Figure 04 : schéma montrant la technique des microplaques de titration.

I-4-2. Coloration des biofilms:

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'eau distillée (EDS) trois fois pour éliminer les cellules non adhérentes.
- Laisser sécher 10 à 15 min.
- Remplir les puits avec 200 µl de cristal violet à 0.5 % qui a un rôle dans la révélation et la fixation de biofilm
- Le temps de coloration est de 20 min
- Rinçage à l'EDS 3 fois.
- Séchage des plaques en position renversée (**Peeters et al.,2008**)

I-4-3. Lecture des plaques :

Avant la mesure de la D.O au spectrophotomètre muni d'un lecteur de microplaque à 630 nm les puits sont remplis avec une solution dissolvante constituée d'un mélange d'éthanol et d'acide acétique glacial dilué dans de l'eau distillée (composition en annexe).

Etude expérimentale

Résultats et discussions

II-1. Isolement :

Le milieu de culture utilisé TSA (Trypticase soja agar) à permis l'isolement de 10 bâtonnets à Gram positif, ces derniers sont retenus pour cette étude et désignés selon un code composé de 1 jusqu'à 10.

Les observations des premiers isolements ont montré une croissance sur le milieu de culture TSA, les colonies sont apparues après 24h d'incubation à 55°C.

II-2. Répartition des souches selon leur origine:

Les souches prélevées à partir des équipements laitiers ont été isolées lors des différents prélèvements réalisées avant et après le CIP, comme montre le tableau 03

- 5 souches été isolées a partir du tank.
- Une souche du pasteurisateur.
- Et 2 souches des canalisations après CIP.

Tableau 03 : Répartition des souches selon leur origine.

Les souches	L'origine	La date de prélèvement
Souche 1	tank avant CIP.	14/05/2013
Souche 2	tank après CIP.	27/05/2013
Souche 3	pasteurisateur.	05/05/2013
Souche 4	tank après CIP.	05/05/2013
Souche 5	Tuyauterie (coude).	14/05/2013
Souche 6	tank après CIP.	14/05/2013
Souche 7	tank avant CIP.	30/05/2013
Souche 8	Canalisation (entrée coude)	30/05/2013
Souche 9	Canalisation (sortie coudes)	30/05/2013
Souche 10	Tank de préparation	05 /05/2013

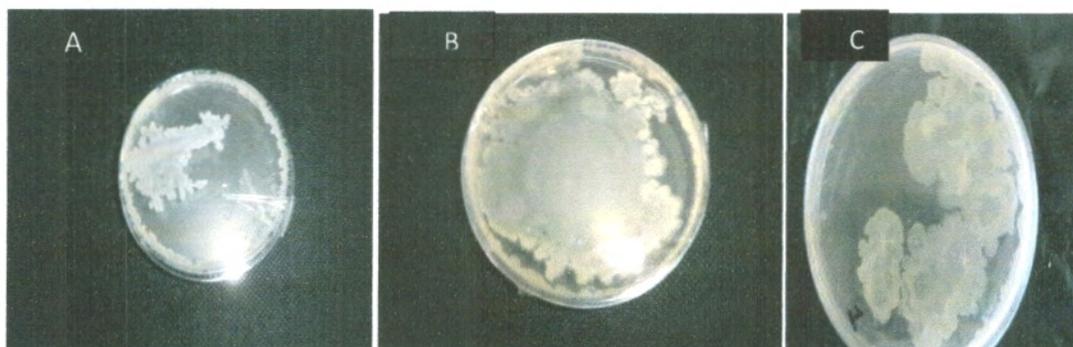
II-3. Caractérisation phénotypiques des isolats

Les souches isolés à partir des différentes segments et coude de production (canalisation) dans les lignes de production laitière au niveau de l'unité ont fait l'objet d'une identification sur la base de la morphologie des colonies, L'examen microscopique et les tests biochimiques.

II-4. Caractéristiques culturelles :

L'aspect macroscopique des souches sur TSA a permis de révéler des colonies de plusieurs formes : lisse, visqueuse, dentelée a bord irrégulier de couleur crème . (**figure 05**).

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



A : tank avant CIP

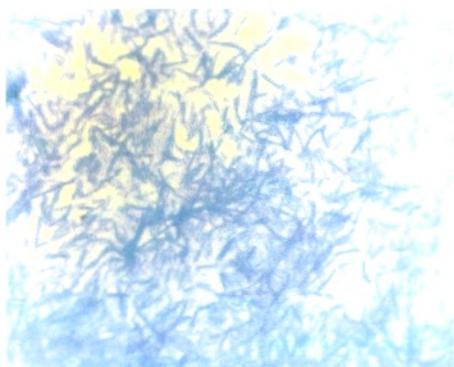
B : tank après CIP

C : pasteurisateur

Figure 05 : photo montrant différent aspect macroscopiques.

II-4-1. Coloration de Gram :

La coloration des souches a révélé que toute les souches était des bâtonnet à Gram positif



Bâtonnet

Figure 06 : photo prise avec microscope optique d'une souche isolée (G x 100).

II-4-2. La recherche de la spore :

La recherche des spores se fait par une coloration au violet gentiane sur des cultures âgées.

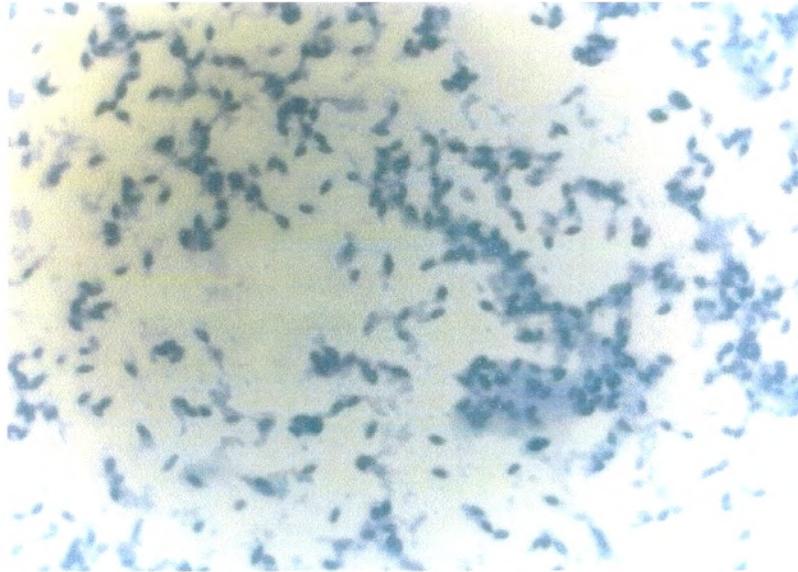


Figure 07 : observation microscopique d'une spore au grossissement x100.

II-5. Test de catalase :

Toutes les souches étudiées ont un catalase positive.



Figure 08 : photo d'une souche a catalase positive

II-6. Caractéristique biochimique :

➤ La galerie API 20 E :

Les tests biochimiques ont été réalisés par l'utilisation de la plaque API 20 E. Les résultats des différents caractères biochimiques des souches par la galerie sont résumés dans le tableau 5 .

Tableau 4 : Résultat de l'identification par galerie API 20 E.

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
4	+	+				-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

D'après les résultats du tableau 4, il est possible de noter que les souches possèdent la β -galactosidase, arginine Dihydrolase et la gélatinase par contre il y'a une absence d'uréase, lysine Décarboxylase, ornithine Décarboxylase et tryptophane Désaminase et aussi l'indole. Tous les isolats sont capables de dégrader le Glucose, par contre la majorité des souches n'ont pas dégradé les autres sucres (Rhaminose, Saccharose, Melibiose, Amygdaline et Arabinose).

En se basant sur les 12 premiers caractères de la galerie les souches se répartissent en 5 biotypes (tableau 6 et figure 9,10 , 11).

Biotype 1 :



Figure n° 09: Photo montrant une galerie api 20 E de biotype 1.

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

Biotype 2 :



Figure n°10: Photo montrant une galerie api 20 E de biotype 2.

Biotype 3 :



Figure n° 11: Photo montrant une galerie api 20 E de biotype 3.

Tableau 05 : identification présomptive :

Biotype	les souches	Orientation de logiciel
Biotype 1	1 et 2	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
Biotype 2	3 et 4 et 5	<i>Bacillus licheniformis</i>
Biotype 3	6 et 7	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Brevibacillus laterosporus</i>
Biotype 4	8 et 10	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
Biotype 5	9	<i>Bacillus firmus</i>

II-7.le pouvoir enzymatique :

La révélation du test de l'activité protéolytique sur la gélose au lait a donné des zones de clarification autour de la culture ce qui traduit la présence de la protéase.

II-7.le pouvoir enzymatique :

La révélation du test de l'activité protéolytique sur la gélose au lait a donné des zones de clarification autour de la culture ce qui traduit la présence de la protéase.



Figure 12 : photo montrant la production de protéase sur la gélose au lait.

- En ce qui concerne la présence de la lipase (estérase), celle-ci se traduit par la formation d'une zone d'opacification autour de la strie d'ensemencement (figure n°13)

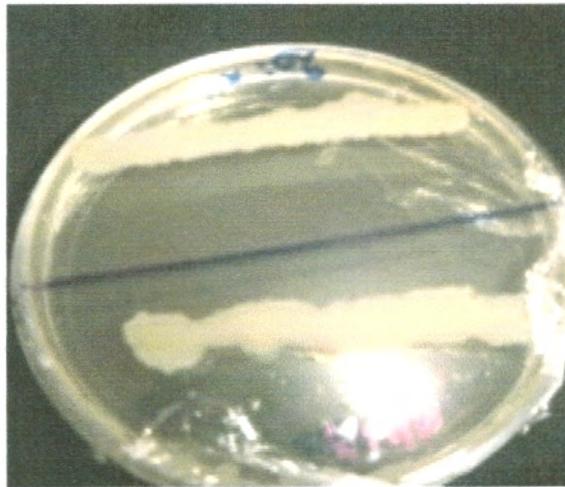
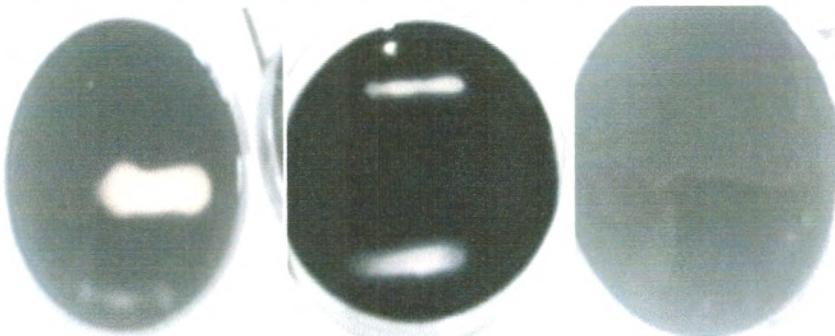


Figure 13 : photo montrant la production de lipase sur gélose au tween 80.

- Après 24heure d'incubation, la révélation de la production d'amylase par le lugol sur la gélose à l'amidon a permis de voir l'apparition de zone claire sur un fond bleu noirâtre caractéristique des souches amyloses positive (figure 14)



D'après le tableau 6 toute les souches testées ont présentées au moins deux activités enzymatiques, seul une souche n'a pas montrés d'activité hydrolytique et deux souches ce sont révélées protéases et amylases négative.

Tableau 6 : Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires des isolats

Souches	Amidon	Tween 80	Caséine
1	-	+	+
2	++	+	+
3	+	+	+
4	+++	+	+
5	-	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	-	+
9	-	+	-
10	+	+	-

les membres des genres thermophiles des *Bacillales* sont connus pour leur capacité à produire des enzymes d'hydrolyse (Malek et al., 2012).

III-Détermination du potentiel de formation du biofilm :

la formation de biofilm sur les microplaques de titration ont eu lieu préférentiellement sur le côté du puits, à l'endroit de l'interface entre le liquide et l'air, comme on peut le voir sur la figure (15). Ces résultats sont conformes à ceux trouvés par Wijman et al.,(2007) , concernant d'autre bacille sporogène aerobie.

III-1.Les microplaques de titrations :

➤ Lecture :

Les puits sont remplis de la solution dissolvante et le passage par le lecteur spectrophotomètre est nécessaire pour donner directement la DO de chaque puits par rapport au témoin.

La formation de biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible borde le mur et le fond du tube.

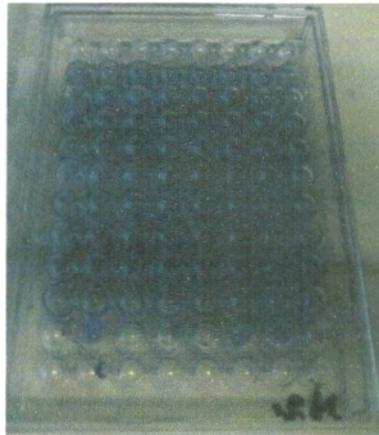


Figure 15 : photo prise d'une microplaque renversé.

Le degré de formation de biofilms a varié considérablement en fonction des souches , un aperçu des capacités de formation de biofilm a montrer un pouvoir important chez certains souches (figure 15).

Les résultats de la mesure de DO au lecteur des microplaques sont portés par les figures 16, 17, 18, 19, 20, 21.

Il y'a 4 classes :

- Classe 1 : $DO < 0.5$: faiblement productrice du biofilm.
- Classe 2 : $0.5 < DO < 1.5$: moyennement productrice du biofilm.
- Classe 3 : $1.5 < DO < 2.5$: Fortement productrice du biofilm.
- Classe 4 : $DO > 2.5$: hyper .

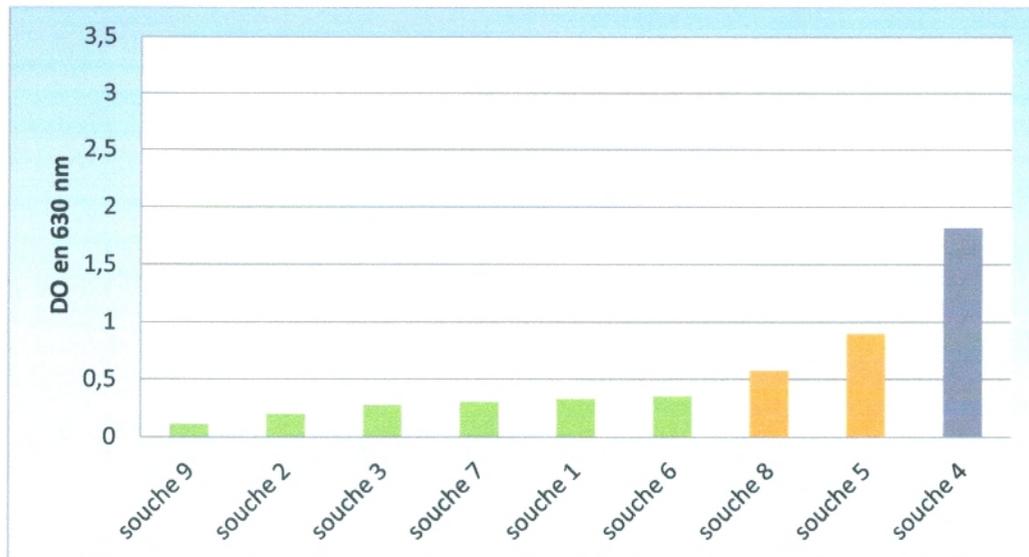


Figure 16 : formation de biofilm sur le milieu TSB à 30°C.

D'après **Auger et al.,2009**. La valeur seuil par la qu'elles les souches peuvent adhéré a été fixé a 0.5. Sur cette base nous avons défini plusieurs classes en fonction des températures aux quelles sont formés les biofilms.

A 30°C les souches se répartissent en 3 catégories, la première comprend six souches dont les DO de formation de biofilm sont < 0.5 : ce qui indique un faible pouvoir de production de biofilm.

2 souches (S_8 et S_5) ont des DO comprise entre 0.5 et 1, et peuvent être considérée comme des producteurs moyens de biofilm.

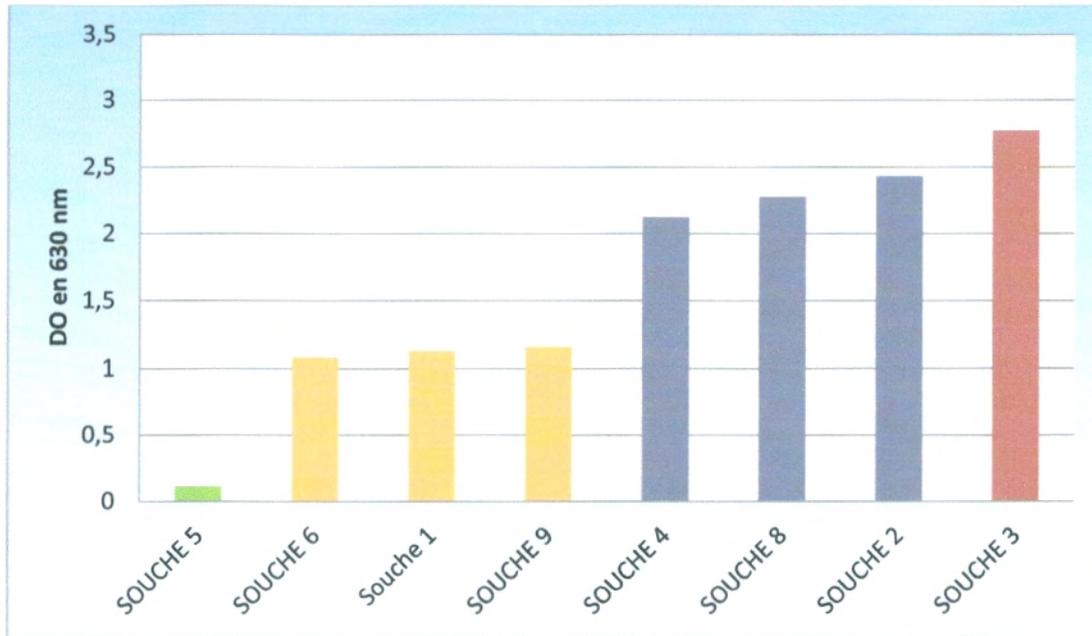


Figure 17 : formation de biofilm sur le milieu TSB à 42°C .

A l'exception de la souche 5, la formation de biofilm est importante pour toutes les souches.

3 souches ont donné des valeurs de DO supérieur à 1. Elles sont donc de bons producteurs de biofilm.

4 souches (S₄, S₈, S₂, S₃) ont des DO comprise entre (2-3) et elles sont donc caractérisés par le potentiel de formation du biofilms le plus élevée.

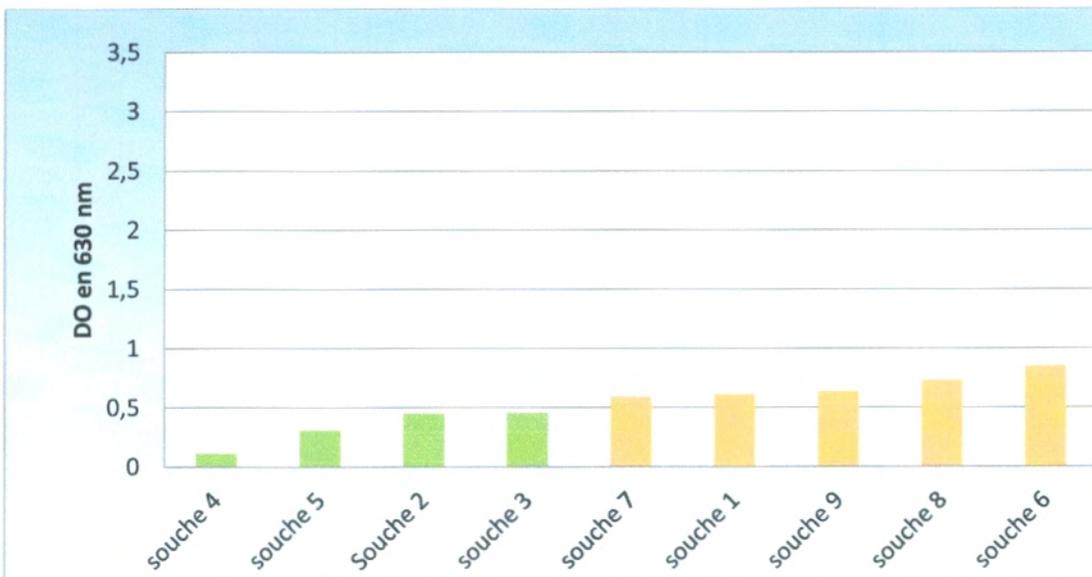


Figure 18 : formation de biofilm sur le milieu TSB à 55°C

La formation de biofilm est la moins importante, les souches se répartissent en 2 catégories, 4 souches avec des $DO < 0.5$ et 5 souches comprise entre 0.5 et 1.

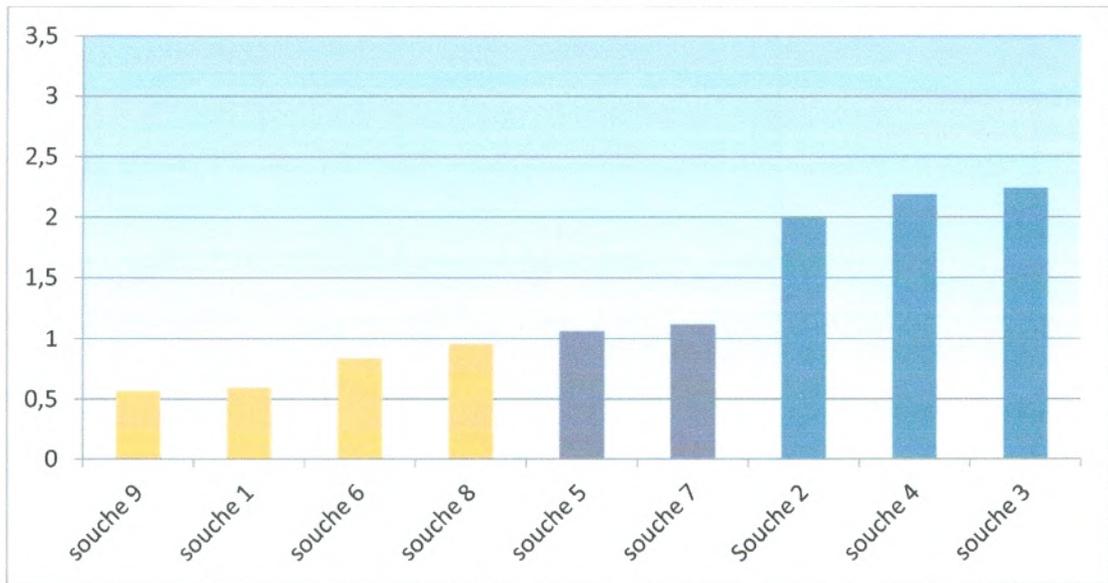


Figure 19: formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 30°C.

Les souches dans cette figure sont répartie en trois catégories. quatre souches leur DO est comprise entre (0.5 et 1), Deux souches entre 1 et 1.5 et 3 souches la DO est entre (1.5 et 2.5). Ces souches sont fortement productrice de biofilm.

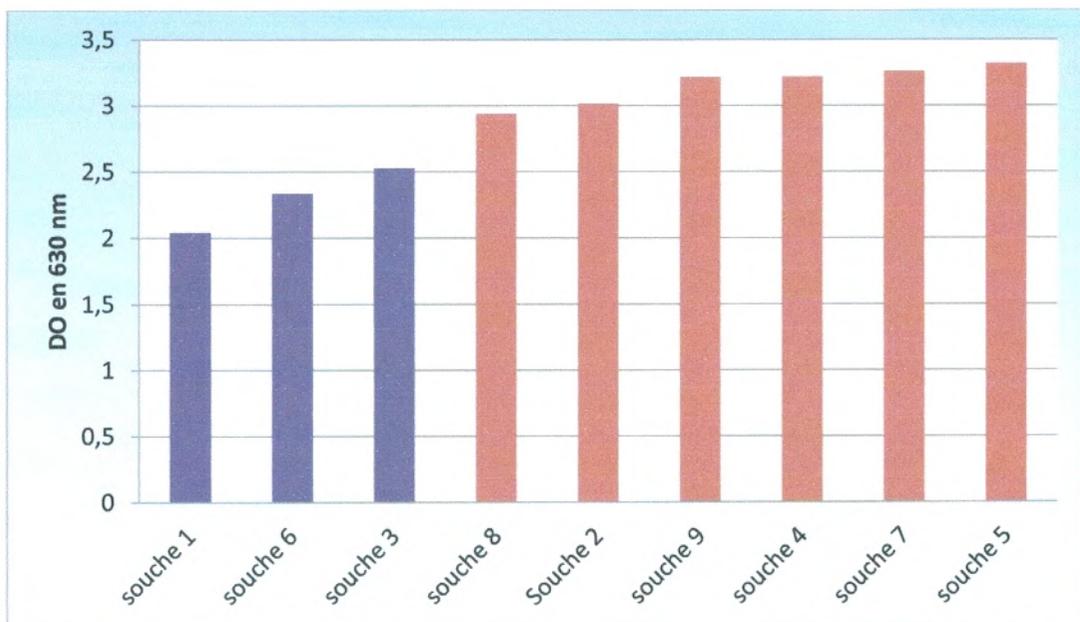


Figure 20: formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 42°C.

Pour cette figure, toutes les souches ont une DO comprise entre 2 et 3.5. La formation de biofilm est importante a cette température et a ce milieu.

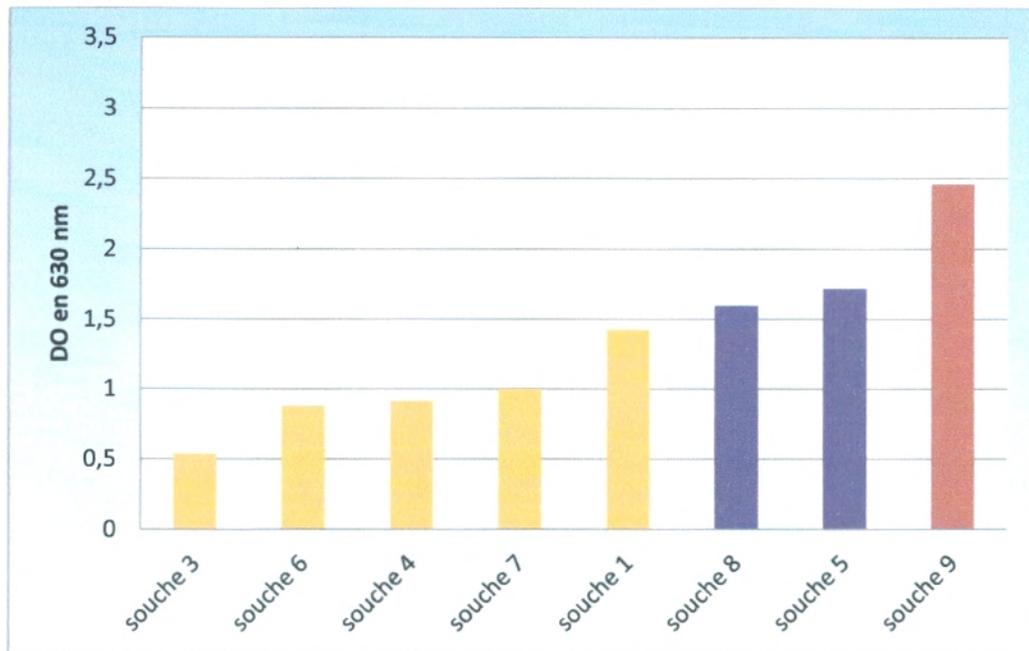


Figure 21 : formation de biofilm sur le milieu lait écrémé à 55°C.

Les résultats obtenus dans la figure 23 regroupent 3 classes : la première classe comporte 5 souches (S₃, S₆, S₄, S₇, et S₁) sont faiblement productrice de biofilm, la deuxième classe comporte la S₈ et S₅ sont moyennement productrice de biofilm par contre la souches 9 est fortement productrice de biofilm.

Les résultats obtenus pour les six figures, ont révélé que la DO des souches varient selon les conditions de température et du milieu.

Par titre d'exemple la DO des souches à 42°C des deux milieux utilisées on voit que les souches dans le milieu lait écrémé sont fortement productrice de biofilm si en la comparent avec le milieu TSB. Et à cette température il y'avait une bonne adhésion des souches. **Figure 22.**

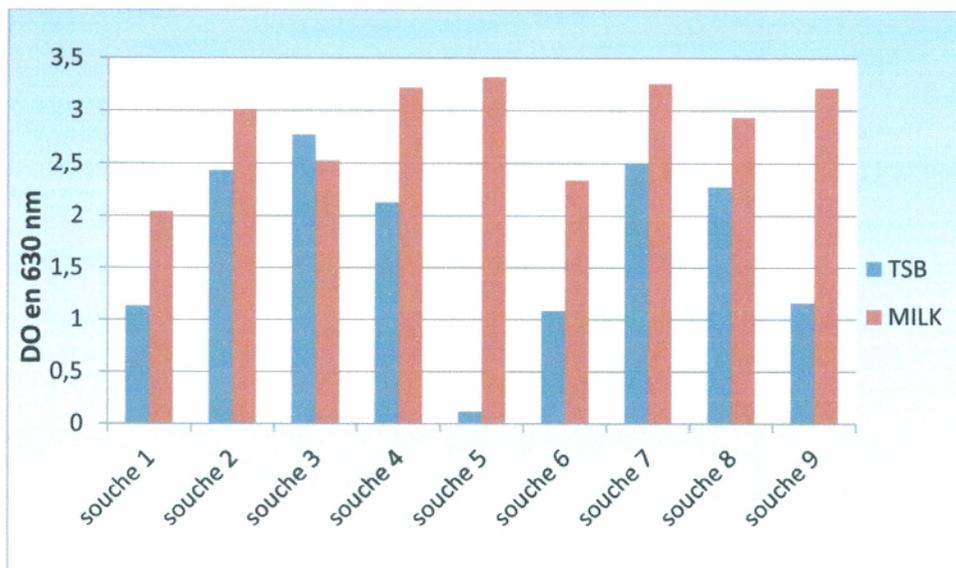


Figure n°22 : Formation de biofilm sur deux milieux de culture a 42°C.

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

Conclusion et perspectives

Conclusion générale :

A la lumière des résultats de ce modeste travail, nous constatons une contamination des équipements laitiers par les bacilles thermophiles. Cette contamination est due aux bactéries adhérents à la surface des équipements qui s'accumule grâce à la formation du biofilm.

Les souches thermophiles isolées à partir des équipements ont été identifiées par une caractérisation phénotypique la forme de bâtonnet à Gram positif, formant des spores et possédant la catalase. Elles sont biochimiquement différentes mais partagent quelques caractères. Leur spores ont un pouvoir d'adhésion aux matériaux des équipements laitiers et rend difficile leur élimination. Ces bactéries sont des contaminants importants en industrie laitière et ont pour origine la poudre de lait. Elles sont également caractérisées par leur capacité de produire des différents enzymes extracellulaires importants industriellement (amylase, protéase, lipase) à partir de plusieurs substrats (Amidon, Caséine, Tween 80).

En ce qui concerne la détermination du potentiel de la formation de biofilm, les souches ont été testées par la méthode des microplaques et le résultat obtenu montre qu'elles se répartissent en trois classes : hautement productrice, moyennement productrice et faiblement productrice du biofilm.

L'efficacité des procédures de nettoyage et désinfection est très importante, puisque ces microorganismes qui restent adhérents sur les surfaces sont dispersés dans les produits finis et conduisent à l'altération de ces produits et diminuent leur durée de vie. Pour cela il faut contrôler le problème de contamination au niveau de l'industrie laitière, nous proposons :

- Optimisation du système de nettoyage / désinfection appliqué par l'unité de production en tenant compte des caractéristiques du contaminant dominant : le genre *Bacillus*.
- Un contrôle de la chaîne de fabrication de la matière première jusqu'au produit fini (le lait en poudre écrémé, l'eau, la matière grasse ...).
- Utilisation des matériaux dont les propriétés seraient défavorables à l'adhésion des bactéries.

Pour nos perspectives de recherches au futur :

- Une meilleure caractérisation phénotypique et génotypique des souches par l'utilisation des galeries API 50 CHB, par des marqueurs de sélections tels que l'antibiogramme et par typage moléculaire par une technique de la PCR.
- L'étude des propriétés d'adhésion et de formation de biofilm.

Références bibliographiques

1-Abdallah M., F. Krier, P. Dhulster., 2010. Les Biofilms et l'hygiène des surfaces en milieu hospitalier. Université Lille1 Sciences et technologies :1515

2-AFNOR, 1995. Microbiologie des aliments : dénombrement de *Bacillus cereus* par comptage des colonies à 30 °C.

3-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.**

4-Balestrino Damien. , Haagensen, , Janus A. J , Rich, Chantal and Christiane Forestier. 2005. Characterization of Type 2 Quorum Sensing in *Klebsiella pneumoniae* and Relationship with Biofilm Formation. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* , , p. 2870–2880.

5-Betsey Pitts, Martin A. Hamilton, Nicholas Zelver, Philip S. Stewart., 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods* 54: 269– 276.

6-Bremer P. J., Fillery S., McQuillan. J, a., 2006. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology* 106 :254–262.

7-Brigitta, Svensson, Kerstin, Ekelund, Hiroshi Ogura, Anders Christiansson, 2004. *international dairy journal* 14. 17-27.

8-Burgess, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M., Flint, S.H., 2009. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1012–1018.

9-Burgess, S., 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 Mageri 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-Carpentier, B and O. Cerf., 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 499-511.

12-Chmielewski R.A.N. and J.F. Frank.,2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities.comprehensive reviews in food science and food safety.

13-Chopra,A.K.,Mathur,D.K.,1984.Isolation,screening and characterization of thermophilic Bacillus species isolated from dairy products. The Journal of Applied Bacteriology 57, 263–271.

14-Costerton J. W.,1 Philip S. Stewart,' E. P. Greenberg.,1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. American Association for the Advancement of Science. 1318-1322

15-Donlan R, M.Costerton J. W.,2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, p. 167–193.

16-Faille ,C., Bénézech, T a, W. Blé c, A. Ronse a, G. Ronse a, M. Clarisse a, C. Slomianny.,2013. Role of mechanical vs.chemical action in the removal of adherent Bacillus spores during CIP procedures. Food Microbiology 33: 149-157.

17- FAO , OMS.,1954. La pasteurisation du lait: organisation, installations ,exploitation et contrôle. Organisation mondiale de la santé, palais des nations.

18-FAYE B., G. LOISEAU ,2000. Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité. Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement

19-Filloux, A ,Vallet, I.,2003. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne . Medecine /Sciences. 77-83

20-Flint, S.H., Bremer, P.J., Brooks, J.D., 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant—description, current concerns and methods of control. Biofouling 11, 81–97.

21-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.

22-Imbeault Nathalie.,1997.Production d'acides gras par biodégradation anaerobie du perméat de lactosérum dans un bioréacteur en continu. Mémoire présenté à l'université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables.

23- Madigan M.T. and Martino J.M., 2006. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA

24-Malek F., B.Moussa-Boudjemaa., 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.

25-Marchand S., Jan De Block, Valerie De Jonghe, An Coorevits, Marc Heyndrickx, and Lieve Herma.,2012.Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments ;Influence on Milk Quality and Safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety: 134-143.

26- MITTELMAN., MARC W. 1998., Symposium: biofilms: development and control: Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. Dairy Science 81:2760–2764

27-Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius* and *Geobacillus thermodenitrificans*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 433–446

28-Ould Moustapha,A.,Demba N'diaye.,Ould Kory,B.,2012.Etude de la qualité du lait pasteurisé des industries laitière situées à Nouakchott (Mauritanie). ScienceLib :2111-4706

29-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.

30-Peeters E P, Hans J. Nelis, Tom Coenye.,2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiological Methods 72. 157–165.

31-Postollec, F., Mathot, A.G., Bernard, M., Divanac'h, M.L., Pavan, S., Sohier, D., 2012.

Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology* 158: 1–8.

32- Parot S. 2007. Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. L'institut national polytechnique de Toulouse. Thèse pour l'obtention du doctorat

33- Ronner, A.A, Wong., 1993. Biofilm development and sanitization inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel. *Food Protection*. vol 56 P : 750-58

34-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.

35-Simões Manuel a, ,Lu'cia C. Simões b, Maria J. Vieira ., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* 43: 573–583.

36-Smigic, N., , Djekic Ilija, A., Tomasevic Igor, A., Miocinovic J b, Ruzica, G., 2012.

Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. *Food Control* 25 :728-731

37-Srey, S., Jahid, I. K., , Sang-Do Ha., 2013. Biofilm Formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31:72e585

38-Taylor, V., 2012. Maintien de la qualité du lait par la maîtrise des biofilms dans les lactoducs. chef du programme d'assurance de la qualité du lait/MAAARO. Fiche technique p:01.

39-Waters Christopher M. and Bonnie L. Bassler., 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:319–46

40-Wijman J G. E., 1,2 Patrick P. L. A. de Leeuw, 1,3 Roy Moezelaar, 1,3 Marcel H. Zwietering, 2 and Tjakko Abeel, 2., 2007. Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Mar. 2007, p. 1481–1488

41-Young-Min Bae, Seung-Youb Baek, Sun-Young Lee.,2012. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology* 153 :465–473.

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