

***Mémoire en vue de l'obtention du diplôme***

***Master en biologie***

**Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**Option : MICROBIOLOGIE**

***Présenté par***

**Batahri Narimane Imane**

**Intitulé du Thème**

**Propriété d'adhésion et pouvoir enzymatique des bacilles  
thermophiles isolés du lait liquide et en poudre**

**Soutenu le : 25/06/2015**

**Devant le jury composé de :**

<b>M<sup>me</sup>. Benariba N</b>	<b>Présidente</b>	<b>Maitre de conférences de classe B</b>
<b>M<sup>me</sup>. Malek F</b>	<b>Promoteur</b>	<b>Maitre de conférences de classe B</b>
<b>M<sup>me</sup>. Brixi Nigana Amel</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>Maitre de conférences de classe B</b>
<b>M<sup>me</sup>. Bensalah F</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>Maitre assistante de classe A</b>

**Année Universitaire : 2014-2015**

## Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'agronomie d'université Aboubekr Belkaid 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 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. Maitre de conférences de classe B au département de biologie, université Abou Baker Belkaid de Tlemcen pour la confiance qu'elle m'a attribuée en acceptant de diriger mon travail, pour sa patience, pour ces précieux conseils qu'elle n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail, ainsi que pour sa rigueur scientifique qui m'a illuminé pour l'élaboration de ce mémoire, et ses qualités humaines et amicales.

Mes remerciements s'étendent également à Mme BENARIBA.N. Maitre de conférences de classe B au département de biologie, université Abou Baker Belkaid 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 BRIXI NIGANA. A. Maitre de conférences de classe B au département de biologie, université Abou Baker Belkaid 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 classe A au département de biologie, université Abou Baker Belkaid de 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 Mme NESSRINE et tous les gents de laboratoire particulièrement HABI SALIM.

Je ne pourrai qu'exprimer un infini remerciement plein de gratitude, à ma famille, mes proches qui non 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 ce mémoire à : . . . .*

· *Mes parents :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit.*

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

*Tous mes professeurs qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.*

## Table de matières

### Introduction générale

### Synthèse bibliographique

#### Chapitre 1 : Le lait pasteurisé

1. Définition.....	1
2. Réglementation de contrôle du lait.....	1
3. La matière première du lait pasteurisé.....	2
3.1. Lait cru .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b> 2
3.1.1. La microflore du lait cru .....	2
3.2. Lait en poudre.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b> 3
3.2.1. Procédé de production du lait en poudre.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b> 3
3.2.2. La qualité de la poudre de lait.....	4
3.2.3. Flore du lait en poudre .....	4
4. Le procédé pasteurisation .....	5
5. Sources de contamination du lait.....	5
5.1. Contamination par la poudre de lait .....	7
5.2. Contamination à partir des équipements .....	7

#### Chapitre 2 : les bacilles thermophiles dans l'industrie laitière

1. Introduction .....	9
2. Les différents groupes de bacilles thermophiles.....	9
2.1. Les thermophiles obligatoires .....	9
2.2. Les thermophiles facultatifs .....	10
3. Position taxonomique et caractéristiques .....	10
3.1. Les nouveaux taxons du genre <i>Bacillus</i> .....	10
3.1.1. <i>Geobacillus</i> .....	10
3.1.2. <i>Anoxybacillus flavithermus</i> .....	12
4. Adaptation des thermophiles aux conditions de températures élevées.....	13
5. Les altérations causées par les bacilles thermophiles .....	13
6. La sporulation des bacilles thermophiles.....	15
6.1. La structure des endospores .....	16
6.2. Formation des spores.....	16
6.3. Résistance.....	17

6.4. La germination des endospores .....18

**Chapitre 3 : le biofilm des bacilles thermophiles**

1. Généralités sur les biofilms .....20

1.1. Propriété des microorganismes en biofilm.....20

1.2. Les étapes de formation de biofilm.....21

1.3. Facteurs influençant sur formation de biofilm .....22

2. Les biofilms des bacilles thermophiles.....23

2.1. Fixation des spores et les cellules végétatives dans le biofilm des thermophiles .....24

2.2. La croissance des populations attachées .....25

2.3. Le développement des spores dans les biofilms.....25

**Etude expérimentale expérimentale**

**Matériels et méthodes**

1. Isolement des souches .....27

1.1. Prélèvements .....27

1.2. Transport des échantillons.....27

2. Mise en culture .....29

2.1. Préparation des échantillons.....29

2.1.1. Préparation des dilutions.....29

2.1.2. Traitement thermique.....29

2.2. Ensemencement.....29

2.3. Enrichissement .....29

2.4. Conservation des souches.....30

3. Identification morphologique des souches .....30

3.1. Examen macroscopique.....30

3.2. Examen microscopique .....30

3.2.1. Observation à l'état frais.....30

3.2.2. Coloration de Gram.....30

3.2.3. Recherche des spores .....31

4. Identification biochimique.....31

4.1. Test de catalase.....31

4.2.	Identification par galerie API 20 E .....	31
4.2.1.	Préparation de l'inoculum.....	31
4.2.2.	Inoculation et lecture de la galerie .....	31
4.3.	Détermination des activités enzymatiques .....	31
4.3.1.	Recherche des amylases.....	31
4.3.2.	Recherche de la lipase.....	32
4.3.3.	Recherche des protéases .....	32
4.4.	Identification par galerie classique.....	33
4.4.1.	Utilisation des sucres (glucose, lactose, saccharose).....	33
4.4.2.	Utilisation du citrate .....	33
4.4.3.	Test du mannitol-mobilité .....	34
4.4.4.	Recherche de la production d'acétoïne .....	34
5.	Etude de l'adhésion et la formation des biofilm des bacilles thermophiles .....	<b>35</b>
5.1.	Observation microscopique des cellules adhérentes au verre.....	35
5.2.	Formation des biofilm dans les microplaques de titration .....	35

**Résultats et discussion**

1.	Le souche bactérien.....	37
2.	Résultats d'identification phénotypiques.....	37
2.1.	Les caractères culturels .....	37
2.2.	Morphologie cellulaire .....	40
3.	Caractères biochimiques.....	41
3.1.	L'étude du type respiratoire .....	41
4.	Les résultats de la galerie API 20 E.....	41
4.1.1.	Détermination des biotypes.....	43
4.2.	Résultats des activités enzymatiques : .....	45
4.2.1.	Activité protéolytique : .....	45
4.2.2.	Activité amylolytique : .....	46
4.2.3.	Activité lipolytique : .....	47
4.3.	Résultats de l'identification par la galerie classique .....	48
5.	Formation des biofilm : .....	50
5.1.	Caractérisation microscopique de l'adhésion au verre.....	50
5.2.	Formation de biofilm dans les microplaques de titration .....	52

**Liste des abréviations**

<b>P0%</b>	Lait en Poudre à 0% MG
<b>P26%</b>	Lait en Poudre à 26% MG
<b>VCC</b>	Lait de vache cru à partir de citerne de collecte
<b>VC(B)</b>	Lait de vache cru à partir de bidon
<b>VCC(C)</b>	Lait de vache cru à partir de la cuve de collecte (le même fournisseur que le bidon)
<b>VCC</b>	Lait de vache cru à partir de citerne
<b>VTP2</b>	Lait de vache à partir du tank de la première pasteurisation
<b>DLY</b>	Lait de vache en sachets
<b>LPPS</b>	Lait recombinaé pasteurisé en sachets
<b>EP</b>	Écouvillonnage à partir du pasteurisateur.
<b>EL</b>	Écouvillonnage à partir des lactoducs.
<b>EC</b>	Écouvillonnage à partir de la cuve de collecte.
<b>GC%</b>	Pourcentage en GC
<b>H</b>	Heure
<b>TSA</b>	Trypticase soja agar
<b>TSE</b>	Tryptone sel eau
<b>C°</b>	degré Celsius
<b>DO</b>	densité optique
<b>EDS</b>	Eau distillée stérile
<b>H</b>	Heure
<b>TSA</b>	Trypticase-Soja-Agar
<b>TSE</b>	Tryptone Sel-Eau
<b>DPA</b>	Acide dipicolinique
<b>EPS</b>	Extracellulaire polymérique substance (substance polymériques extracellulaire)
<b>UHT</b>	Ultra Hôte Température
<b>Ca</b>	Calcium

## Liste des figures

Figure 1 : diagramme de recombinaison et de pasteurisation du lait (Malek et al., 2013)	6
Figure 2 : Photomicrographie des spores subterminales de <i>Geobacillus sterothermophilus</i> (Chen et al., 2004)	12
Figure 3: Cliché au microscope électronique d'une coupe transversale d'un thermophile et d'une sporange et spore en formation. (Garcia et Coll., 1982)	16
Figure 4 : les étapes de germination des endospores chez <i>Bacillus</i>	18
Figure 5 : les étapes de formation de biofilm (Davies.,2001)	21
Figure 6 : Micrographie électronique à balayage d'un <i>A.flavithermus</i> 18h biofilm sur la surface d'acier inoxydable (Burgess et al., 2010)	24
Figure 7 : Biofilm mature de 20h formé par des bacilles thermophiles et observés au microscope électronique à balayage environnemental (Malek., 2015)	23
Figure 8: sites de prélèvements (a: pasteurisateur; b:Cuve de collecte; c:pasteurisateur).	28
Figure 9 : échantillons (a : lait cru ; b : poudre du lait ; c : prélèvement de surface)	28
Figure 10 : le protocole de la mise en culture des bacilles thermophiles	36
Figure 10 : schémas représentant le protocole de formation des biofilm par la méthode de microplaques de titration 96 puits)	36
Figure 11: l'aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA après une incubation de 48h	38
Figure 12 : La différence entre l'aspect des colonies sans enrichissement et avec enrichissement (SE : sans enrichissement; E : avec enrichissement)	40
Figure 13: Images des souches après la coloration de Gram sous microscope GX100	40
Figure 14 : Photographie des spores sous microscope photonique à GX100	41
Figure 15: les différents biotypes de bacilles thermophiles identifiés par galerie API 20 E	43
Figure 16 : Activité protéolytique des souches sur gélose au lait (a : protéase positif, b: protéase négatif).	45
Figure 17 : Activité amylolytique sur gélose à l'amidon	46
Figure 18 : Activité lipolytique des souches sur gélose au tween 80	47
Figure 19 : Répartition des souches selon le pouvoir enzymatique	48
Figure 20 : des colonies rhizoïdes formés après le phénomène de swarming mobilité	49
Figure 21 : Comparaison entre les résultats de la galerie classique et de la galerie API 20 E	50
Figure 22 : Images montrant l'adhésion au verre de cellules végétatives de souches bacilles thermophiles d'origine laitière (Microscope optique x 100 G)	51
Figure 23 : Formation des biofilm dans la microplaque de titration	52
Figure 24 : Formation de biofilm par les bacilles thermophiles à 37°C	53
Figure 25 : Formation de biofilm par les bacilles thermophiles à 47°C	54
Figure 26 : Formation de biofilm par les bacilles thermophiles à 55°C	55
Figure 27 : Formation de biofilm par les bacilles thermophiles à 65°C	55



Liste des tableaux

Tableau 1: Composition du lait de vache (Amiot et al., 2002)	2
Tableau 2: la flore du lait cru (Brisabois et al., 2009) )	2
Tableau 3 : la différence entre la composition en vitamine du lait pasteurisé entier, demi écrémé et écrémé (Vandercammen., 2011)	3
Tableau 4 : les différentes sources de contamination du lait (Frank et Hassan., 2002)	7
Tableau 5 : reclassification taxonomique du genre <i>Bacillus</i> (1986- 2004) ( <a href="http://textbookofbacteriology.com">http://textbookofbacteriology.com</a> )	11
Tableau 6: caractéristiques de certains des bacilles thermophiles (Burgess et al., 2010)	14
Tableau 7: facteurs influençant sur la formation de biofilm (O'Toole, 2000)	22
Tableau 8 : les différentes campagnes de prélèvement des échantillons	27
Tableau 9: les résultats relatifs à l'isolement des souches à partir de différentes origine	37
Tableau 10 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA après une 24 d'incubation	39
Tableau 11 : les résultats de l'identification des bacilles thermophiles par la galerie API 20E	42
Tableau12 : les Différents biotypes des souches de bacilles thermophiles	44
Tableau 13: activités enzymatiques des souches isolées.	45
Tableau 14 : Résultats de la galerie classique.	48

### 1. Introduction générale :

Le lait est un aliment riche en nutriment fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment complet. En Algérie, le lait est considéré comme un produit de base dans la consommation où il occupe une place importante dans la ration alimentaire de la population. Les besoins sont estimés à 3,2 milliard de litre par an et ne couvrent que 40% des besoins le reste des besoins est satisfait par l'importation de poudre de lait et des matières grasses laitières anhydres ( **Yakhlaf et al., 2010** ).

Le lait fournit aussi aux microorganismes un milieu favorable et des facteurs physico-chimiques pour une croissance optimale. Il est le siège du développement d'une flore de contamination dont l'importance dépend des conditions d'hygiène et des traitements que subit le lait. La pasteurisation, est un traitement thermique modéré qui peut réduire les formes végétatives mais n'a aucun effet sur les spores bactériennes. Le lait reconstitué dont la matière première est la poudre de lait est un cas particulier. Celle-ci est obtenue par séchage et déshydratation du lait, à haute température ( $> 130^{\circ}\text{C}$ ), qui aboutit à la sélection d'une flore thermophile de bactéries sporulées résistantes à la chaleur. Ces bactéries thermorésistantes sont impliquées dans les problèmes de la qualité et la durée de vie du lait pasteurisé.

Les bacilles thermophiles, tels que *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus spp* proviennent du lait et du lait en poudre surtout et sont capables de former des biofilms sur les surfaces des installations laitières. Ils provoquent des défauts de goût et l'altération de la qualité du lait.

L'objectif de ce travail est l'évaluation et la caractérisation de la contamination d'une laiterie produisant du lait pasteurisé par les bacilles thermophiles. Le plan expérimental de ce travail est :

- ✓ Mise en évidence la présence des bacilles thermophiles dans la matière première: (la poudre de lait, Le lait cru), le produit final (le lait pasteurisé (reconstitué et de vache) et les équipements de transformation du lait d'une laiterie de la région de Tlemcen.
- ✓ Identification des souches isolées par galerie classique et galerie API 20 E,
- ✓ Caractérisation des bacilles thermophiles isolés par :
  - Etude du pouvoir enzymatique
  - Etude des propriétés d'adhésion et de formation du biofilm.

# Synthèse bibliographique

## **Synthèse bibliographique**

# Chapitre 1 : Le lait pasteurisé

## 1. Définition

Lait pasteurisé peut être obtenu à partir de lait naturel provenant d'élevage ou de poudre de lait importée. Il est chauffé à une température inférieure au point d'ébullition pendant un laps de temps suffisant pour tuer tous les types banaux d'organismes pathogènes pouvant être présents dans le lait, de manière à en permettre l'usage en toute sécurité pour la consommation humaine. En plus de tuer une proportion d'organismes non pathogènes, mais susceptibles de provoquer des altérations de divers ordres de sorte que le lait se conserve durant un temps suffisamment long pour en permettre le transport, la distribution et la consommation comme lait nature ou l'utilisation pour des traitements ou fabrication ultérieures.

Selon la matière première utilisé dans sa production, le lait pasteurisé peut être commercialisé sous l'appellation de :

- ✓ **Lait de vache** : qui est obtenu à partir de lait cru naturelle provenant d'élevage des bovins.
- ✓ **Lait recombinaé** : qui est un mélange de lait reconstitué et de matière grasse de lait anhydre en vue d'obtenir un produit dont les caractéristiques ressemblent au lait de vache.
- ✓ **Lait reconstitué** : qui est un mélange d'eau et de lait en poudre (**Johnsson et Hooper., 1970**).

## 2. Réglementation de contrôle du lait

L'arrêté interministériel de 29 Safar 1414 correspondant au 18 Aout 1993 relatif à la spécification et à la présentation de certains laits de consommation **p. 16. JORA N° 69 du 27-10-1993** a déclaré l'obligation de la pasteurisation de lait crus de vache ou le lait reconstitué. Soit à une température de 63°C pendant une durée de 30 minutes, soit à une température de 85°C pendant une durée de 15 à 20 secondes. Ceci permet la destruction de la presque totalité de la microflore banale et pathogène, à condition de ne pas affecter la structure physique du lait, sa composition, son équilibre chimique, ses enzymes et ses vitamines (**Abdanouri., 2008**).

### 3. La matière première du lait pasteurisé

#### 3.1. Lait cru

Le lait est un produit à valeur nutritionnelle complète. Ses principaux constituants (**tableau1**) sont l'eau, la matière grasse, le lactose et les protéines. Il contient également des traces d'autres substances, telle que des pigments, des enzymes, des vitamines, des phospholipides et des traces des nucléotides (**Amiot et al., 2002**).

**Tableau 1:** Composition du lait de vache (**Amiot et al., 2002**)

Constituant	Composition
L'eau	84,3%
Protéines	3.5 %
Caséine	2.8 %
Protéine lactosérique	0.7 %
Matière grasse	3.7 %
Glucides	4.8 %
Cendres	0.7 %

#### 3.1.1. La microflore du lait cru

Le lait contient un nombre variable de cellules qui sont des constituants normaux comme les globules blancs et les bactéries lactiques, mais également à des éléments d'origine exogène qui sont la plupart des microorganismes contaminants (**tableau 2**) (**O'connor et al., 1969**).

**Tableau 2:** la flore du lait cru (**Brisabois et al., 2009**)

Flores	Exemples	Effets
Flore original	<i>Micrococcus sp</i>	
	<i>Lactobacillus</i>	
	<i>Streptococcus</i>	
Flore contaminant	<b>Flore d'altération</b>	Provoque la dégradation des composants du lait qui influencera le goût, l'arome, l'apparence ou la texture.
	<i>Bacillus</i>	
	Coliforme	
	Levures et moisissures	
Flore pathogène	Pseudomonas	Dérègle le système digestif provoquant des intoxications alimentaires
	Bactéries infectieux	
	Bactérie toxinogènes	

### 3.2. Lait en poudre

La poudre de lait est constituée essentiellement de matière sèche faible entre 2 et 5%. Elle est utilisée dans la recombinaison comme matière première pour la production de lait de poudre pasteurisé destiné à la consommation. Ce lait peut être semblable à du lait frais (**tableau 3**). Les poudres du lait sont entreposées à la température ambiante et sont facilement exportées vers les pays qui ont un déficit de la production de lait.

**Tableau 3** : la différence entre la composition en vitamine du lait pasteurisé entier, demi écrémé et écrémé (**Vandercammen., 2011**)

Vitamines	Lait pasteurisé		
	Entier	Demi-écrémé	Ecrémé
A (mg)	0,55	0,25	Traces
D (µg)	0,30	0,01	Traces
C (mg)	8	8	8
B <sub>1</sub> (mg)	0,40	0,35	0,40
B <sub>2</sub> (mg)	1,67	1,83	1,83
B <sub>6</sub> (mg)	0,60	0,61	0,65
B <sub>12</sub> (µg)	3,60	3,90	3,80

#### 3.2.1. Procédé de production du lait en poudre

Les poudres sont obtenues avec un traitement thermique bas ou élevé. Elles sont produites par 2 méthodes: le séchage sur cylindre ou le lait est distribué sur des tambours rotatifs chauffés à la vapeur (à 143°-149°C pendant 2 à 3 secondes sous pression atmosphérique) (**Crossley., 1959; O'dwey., 1968**). L'eau évaporée est éliminée par un courant d'air (**Abdenouri et al., 2008**). 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 tourne/ min (**Crossley., 1959 ;Twomey et al., 2000**).

### 3.2.2. La qualité de la poudre de lait

D'après **Jouve (1993)**, les qualités d'une bonne poudre de lait sont les suivantes.

- ✓ Aptitude à la reconstitution de façon à obtenir facilement un liquide homogène, exempte de particules macroscopiques elle est sous la dépendance des propriétés de mouillabilité de dispersibilité et de solubilité.
- ✓ Absence de saveurs anormale (gout de cuit, de brûlé, de rance... etc.).
- ✓ Absence de germes pathogènes (Salmonelle, Staphylocoques), de toxines et de microorganismes capables de nuire à la conservation du lait initial.
- ✓ Absence de modifications de la structure et de la composition physico-chimique.

### 3.2.3. Flore du lait en poudre

C'est une flore composée surtout de microorganismes aisément thermorésistants. Les principaux genres sont les suivants :

- Microcoques thermorésistants fréquents dans les approvisionnements laitiers et difficiles à éliminer complètement du matériel et des installations laitières.
- Streptocoques thermorésistants prolifèrent quand l'hygiène de l'installation est non respectée et peuvent engendrer de graves infections.
- Corynébactéries dont la fréquence est très variable. Les souches thermorésistantes proviennent d'origines laitières et ne semblent pas dues à un manque d'efficacité dans le nettoyage des installations.
- Spores bactériennes telles que *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheriformis* se trouvent dans presque toutes les poudres à moins que le lait ait été soumis à un traitement à très haute température.
- La flore peut comprendre aussi des microorganismes thermophiles à surveiller lorsque le lait en poudre est reconstitué.
- Des mésophiles qui peuvent provenir des contaminations atmosphériques ou d'un contact avec certaines surfaces de l'installation.
- Microorganismes pathogènes : le lait en poudre s'est toujours révélé exempt des pathogènes néanmoins au cours des années 1955 quelques épidémies d'intoxication alimentaires staphylococciques ont été imputées à un lait en poudre (**Hobbs.,1955**).

Les organismes incriminés étaient des souches de *Staphylococcus aureus* productrice de coagulase et l'intoxication provenait de leur multiplication dans le lait reconstitué (Crossley., 2002).

#### 4. Le procédé pasteurisation

- ✓ **Préchauffage** : Le lait refroidi à 5°C, est soutiré du tank de collecte, puis pompé vers l'échangeur à plaque, dans la section de préchauffage, où il est chauffé à une température de 68°C.
- ✓ **Dégazage** : Le lait préchauffé à 68°C est introduit tangentiellement dans la cuve sous vide. Les gaz véhiculés à la vapeur montent vers le haut de la chambre et sont aspirés par la pompe sous vide, et la vapeur se condense dans le condenseur et revient dans le lait.
- ✓ **Standardisation**: Une fois le lait sorti du dégazeur, on fait l'injection de la matière grasse laitière anhydre de façon à obtenir une teneur en matière grasse de 16 g/l.
- ✓ **Homogénéisation** : L'homogénéisation consiste à faire passer le lait sous forte pression à 60 bars à travers des orifices très étroits qui réduisent la taille des globules gras, et détruisent partiellement les micelles de caséines.
- ✓ **Pasteurisation proprement dite** : Le lait sort de l'homogénéisateur à une température de 60°C, il est conduit vers l'échangeur à plaque pour être chauffé à 90°C pendant 30 secondes dans le chambreur. Le lait pasteurisé est refroidi à une température de 5°C avec de l'eau glacée, puis stocké dans des tanks tampons (Savage., 1933). Le diagramme de fabrication du lait pasteurisé reconstitué est présenté dans la **figure 1**.

#### 5. Sources de contamination du lait

Les sources de contamination du lait sont nombreuses et variées, elles comprennent l'eau, le sol, le personnel et l'équipement laitier, (**tableau 4**). En outre il existe d'autres sources de contamination qui peuvent influencer la qualité du lait pasteurisé surtout le lait obtenu à partir d'une poudre.



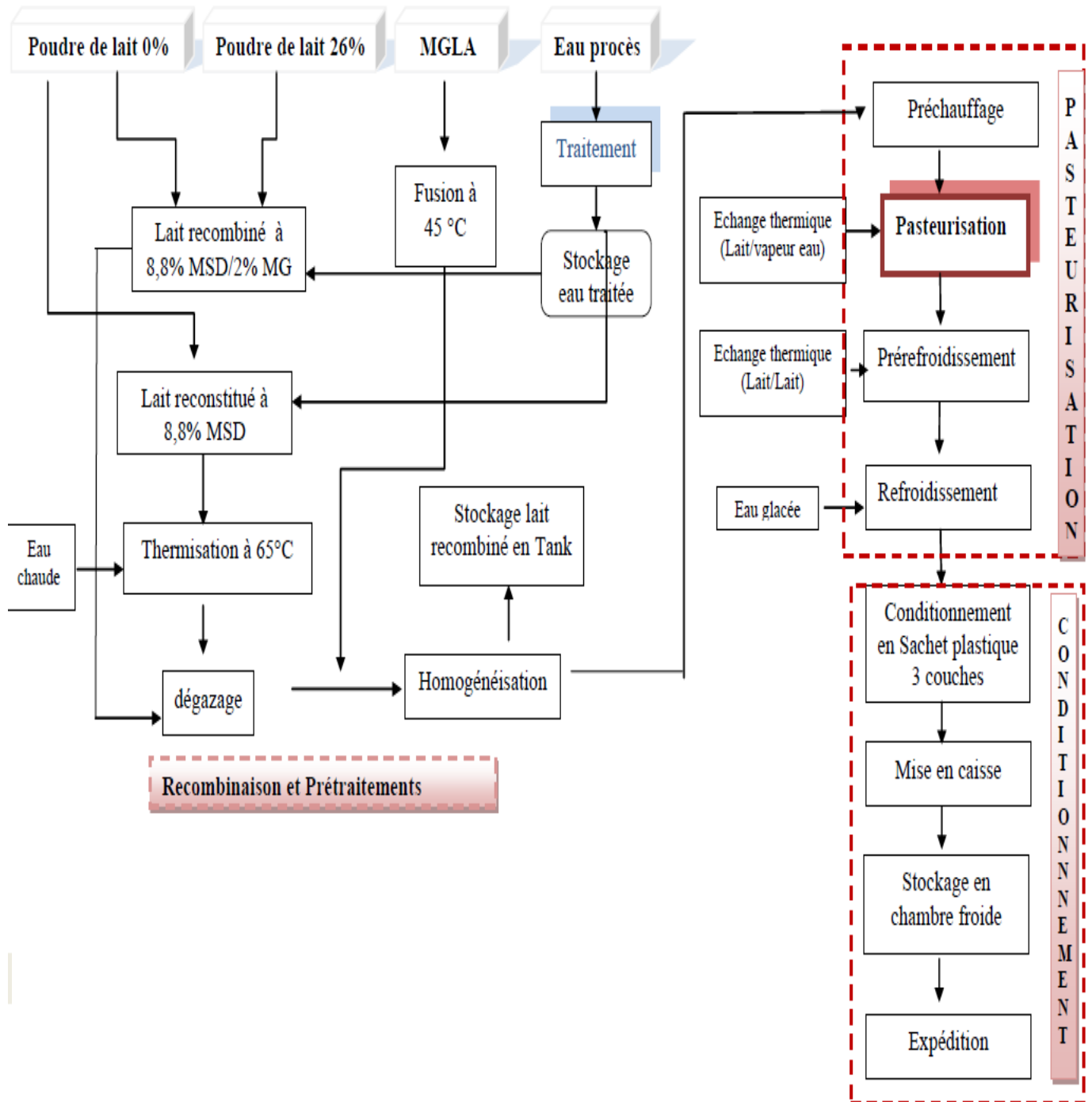


Figure 1 : diagramme de recombinaison et de pasteurisation du lait (Malek et al., 2013)

**Tableau 4** : les différentes sources de contamination du lait (Frank et Hassan., 2002)

Sources	Genres
Personnel	Coliformes, <i>Salmonella</i> , <i>Entérocooccus</i> <i>Staphylococcus</i>
Air	<i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Corynebactérium</i> , <i>Bacillus</i> Levure et Moisissures.
Intérieur du pis	<i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Corynebactérium</i>
Extérieur du pis	<i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Entérocooccus</i> , <i>Bacillus</i>
Fèces	<i>Eschérichia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Listéria</i> , <i>Mycobactérium</i> <i>Salmonella</i>
Appareil de traite	<i>Micrococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i> , Coliformes <i>Clostridium</i> ,
Litières	<i>Bacillus</i> , <i>Klebsiella</i>
Sol	<i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>Mycobactérium</i>
Alimentation	Levure et Moisissures
Eau	<i>Clostridium</i> , <i>Listéria</i> , <i>Bacillus</i> , Bactérie lactiques Coliformes, <i>Pseudomonas</i> , <i>Corynebactérium</i> , <i>Alcaligenes</i>

### 5.1. Contamination par la poudre de lait

Fournie est protégée de la contamination en eau avant utilisation, le nombre de micro-organismes présents augmentent généralement au cours du stockage, bien que le nombre de spores peut rester constant. Les producteurs de la poudre, ne prennent pas en charge la croissance des micro-organismes, le contenu microbiologique varie selon l'utilisation ultérieure de la poudre. Pour cette raison, les organismes gouvernementaux et les laboratoires ont développé des limites microbiologiques ou des spécifications qui s'appliquent à certains groupe de micro-organismes qui peuvent être présents dans le lait en poudre. Ces spécifications peuvent concerner les apports des matières à la qualité du lait et l'hygiène lors de la fabrication et du stockage. (Augustin et al., 2003).

### 5.2. Contamination à partir des équipements

Elle est souvent caractérisée par la formation des biofilms laitiers qui sont dominés par différentes bactéries. La formation de ces biofilms sur les équipements peut entraîner de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques dues à la détérioration des aliments et à la dépréciation des équipements (Flint et al., 1997). Les micro-organismes dans les biofilms

catalysent les réactions chimiques et biologiques provoquant la corrosion des métaux dans les tuyauteries et les réservoirs, et ils peuvent réduire l'efficacité de transfert de chaleur s'ils deviennent suffisamment épais (**Simoes et al., 2009**). Selon (**Petrus et al., 2009**) d'autres facteurs peuvent influencer la durée de vie du lait pasteurisé :

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

## Chapitre 2 : Les bacilles thermophiles dans l'industrie laitière

### 1. Introduction

Les bacilles thermophiles, comme *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus. spp* sont un groupe important de contaminant dans l'industrie laitière (**Ronimus et al 2003; Kumari et al., 2013**). Souvent elles ne sont pas pathogènes mais leur présence dans les produits laitiers est un indicateur de mauvaise hygiène (**Burgess et al., 2009, Kumari et al., 2013**). En outre, leur croissance peut conduire à des défauts de qualité dans les produits laitiers qui sont causés par la production d'acides ou d'enzymes, telle que l'altération de la saveur de l'aliment (**Satyanarayana et al., 2012; Chen et al., 2004**). Ces bacilles thermophiles sont généralement sélectionnés par les conditions de fabrication des produits laitiers. Ils sont capables de croître dans les compartiments de ces usines de fabrication où les températures atteignent 40 à 65°C (**Ronimus et al., 2003; Nazina et al., 2001**). De plus, ils sont difficiles à éliminer à cause de leur capacité de sporuler. Les bacilles thermophiles présentent aussi une large gamme de température de croissance optimale, caractérisée par un taux de croissance rapide (temps de génération d'environ 15 à 20 min) et une aptitude pour former facilement des biofilms (**Burgess et al., 2010**). En outre les biofilms des bacilles thermophiles sont spécifiques à cause de leur formation rapide dans les lignes de production du lait pasteurisé. Leur connaissance et la compréhension de leurs caractéristiques sont nécessaires pour développer des efficaces mesures de contrôle.

### 2. Les différents groupes de bacilles thermophiles

Les bacilles thermophiles peuvent être divisés en deux groupes: les thermophiles obligatoires et les thermophiles facultatifs (également connus sous le nom de micro-organismes thermotolérants) (**Crabb et al., 1974; Flint et al., 2001**).

#### 2.1. Les thermophiles obligatoires

Les thermophiles obligatoires ne poussent qu'à des températures élevées (Environ 40 à 68°C) et comprennent *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus spp* (**Flint et al., 2001; Ronimus et al., 2003**).

### 2.2. Les thermophiles facultatifs

Les thermophiles facultatifs appartiennent au genre *Bacillus* et ont la capacité de croître à deux températures mésophiles et thermophiles, en fonction de la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans* et *Bacillus subtilis* (Flint et al., 2001; Moreno Switt., 2014).

### 3. Position taxonomique et caractéristiques

#### 3.1. Les nouveaux taxons du genre *Bacillus*

Les études taxonomiques ont donné la preuve que le genre *Bacillus* est très diversifié. Tout au long des années 1980, une grande controverse tournait autour de la question de savoir si *Bacillus* était un genre unique ou pouvait être divisé en plusieurs genres (Gibbons et Murrey., 1978; Garcia et Coll., 1982), tels que suggéré par l'analyse de séquence d'ARNr 16S et des études d'hybridation d'ADN (Nasina et al., 2001).

L'espèce *Bacillus stearothermophilus* a été reclassée dans le nouveau genre *Geobacillus* (Nasina et al 2001; Logan., 2014). De même, l'espèce *Anoxybacillus pushchinoensis* est devenue *A. flavithermus*. Avant 2001, en industrie laitière *A. flavithermus* pouvait par erreur être identifiée comme *B. stearothermophilus* (Nasina et al 2001; Burgess et al., 2010). Le **tableau 5** montre les changements opérés dans la classification du genre *Bacillus*.

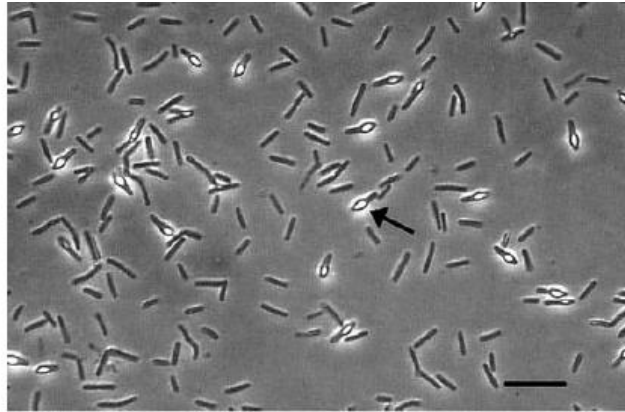
##### 3.1.1. *Geobacillus*

Le genre *Geobacillus* comprend des espèces thermophiles qui étaient précédemment classées selon leur ARNr dans le cinquième groupe du genre *Bacillus* (Nazina et al., 2001; Logan., 2014). C'est un genre avec des espèces particulières qui sont très étroitement liées, avec une similarité de séquence d'ADNr 16S de l'ordre de 96,5 à 99,5% (Feng et al., 2007). Les espèces présentant un pourcentage en GC% entre 45 et 69%, produisent des spores subterminales ou spores terminales déformantes (Nasina et al 2001; Postollec et al., 2010). La **figure 2** montre des spores déformantes observées au microscope à contraste de phase. La température de croissance optimale de ce genre est au dessus de 50°C. Les bactéries appartenant au genre *Geobacillus* ont été isolées à partir des zones de haute

température, ainsi que les environnements chauds, tels que les sources d'eau chaude, mer profonde sédiments, et les usines laitières (Ronimus et al., 2003; Deejing et al., 2005; Logan., 2014).

**Tableau 5 :** reclassification taxonomique du genre *Bacillus* (1986- 2004) (<http://textbookofbacteriology.com>)

Bergey's Manual of systematic bacteriology (1ere ed .1986)	Bergey's Manual of systematic bacteriology (1ere ed .2004)
<i>Bcillus acidocalderius</i>	<i>Acyclobacillus acidocalderius</i>
<i>Bacillus agri</i>	<i>Brevibacillus agri</i>
<i>Bacillus algénolyticus</i>	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>
<i>Bacillus amylolyticus</i>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
<i>Bacillus alvei</i>	<i>Paenibacillus alvei</i>
<i>Bacillus azotofixans</i>	<i>Paenibacillus azotofixans</i>
<i>Bacillus brevis</i>	<i>Brivibacillus brevis</i>
<i>Bacillus globisporus</i>	<i>Sporosarcina globisporus</i>
<i>Bacillus larvae</i>	<i>Paenibacillus larves</i>
<i>Bacillus laterosporus</i>	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
<i>Bacillus Lentimorbus</i>	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>
<i>Bacillus marcerans</i>	<i>Paenibacillus marcerans</i>
<i>Bacillus pasteurii</i>	<i>Sporosarcina pasteurii</i>
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
<i>Bacillus popiliae</i>	<i>Paenibacillus popiliae</i>
<i>Bacillus psychrophilus</i>	<i>Sporosarcina psychrophila</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus thermodenitrificans</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>



**Figure 2:** Photomicrographie des spores subterminales de *Geobacillus sterothermophilus* (Chen et al., 2004)

### 3.1.2. *Anoxybacillus flavithermus*

Cette bactérie a été d'abord isolée à partir de source d'eau chaude en Nouvelle-Zélande (Heinen et al., 1982; Niederberger et al., 2006), et a depuis, été isolée à partir de sources d'eau chaude aux Etats-Unis (Parc national de Yellowstone) et en Turquie. Ainsi que d'extraits de gélatine et le lait en poudre (Flint et al., 2001; Burgess et al., 2009; Postollec et al., 2010). L'espèce type, *A. pushchinoensis*, était d'abord décrite comme un anaérobie strict, d'où le nom *Anoxybacillus* (Pikuta et al., 2000). Cette description a été révisée à partir du moment que les membres de ce genre pouvaient apparaître anaérobies aérotolestants ou facultatifs.

*A. flavithermus* est décrit comme un thermophile anaérobie facultatif, mobile, avec des endospores terminales, une teneur en GC de 61% et une capacité à se développer dans la gamme de pH de 6 à 9. La caractérisation de la souche de Nouvelle-Zélande des sources d'eau chaude a montré que la gamme de température de croissance est comprise entre 30 et 70°C avec une température optimale de croissance de 60°C. Cependant, les isolats obtenus à partir du lait en poudre ont la tendance à avoir une température de croissance optimale comprise entre 50 et 65°C (Ronemus et al., 2003; Burgess et al., 2009). Les membres du genre *Bacillus* et les bacilles thermophiles obligatoires ont généralement des besoins nutritionnels simples; par conséquent, ils ne nécessitent pas des acides aminés spécifiques

pour la croissance et sont capables de croître sur des milieux simples tels que tryptone soja agar (TSA) (Ronimus et al., 2003; Burgess et al., 2010). Le tableau 6 résume les caractères d'identifications de certains bacilles thermophiles.

#### 4. Adaptation des thermophiles aux conditions de températures élevées

Les thermophiles ont subi de nombreuses adaptations physiologiques et biochimiques pour maintenir l'intégrité et la fonction de leurs cellules (Antranikian et al., 2005), dont les plus importants :

- Une enzyme spécifique, la reverse gyrase, qui augmente fortement le nombre de liens topologiques entre les deux brins d'ADN.
- La réparation rapide d'ADN et la reconstitution des protéines endommagées par la chaleur.
- Les ARN de transferts et les ARN ribosomiaux des thermophiles sont stabilisés par une proportion élevée de paires de bases GC et la présence de nombreux nucléotides modifiés qui permettent la formation d'interaction stable.
- Les protéines des hyperthermophiles sont très stables à haute température. la comparaison entre des protéines mésophiles et hyperthermophiles a montré que cette stabilité était due à une augmentation du nombre d'interactions faibles, en particulier des interactions ioniques. (Forterre et al., 2007).

#### 5. Les altérations causées par les bacilles thermophiles

La présence d'un grand nombre des bacilles thermophiles ( $N 10^4$  UCF/ g) dans les produits laitiers finis, comme le lait en poudre, est un indicateur de mauvaise d'hygiène pendant le traitement (Postollec et al., 2010; Gleeson et al., 2013). Ou le processus de fabrication des poudres favorisant la sélection des formes sporulé présents dans le lait cru (Postollec et al., 2010). Cependant, la charge du lait cru en bacilles thermophiles n'est pas liée au nombre des thermophiles présents dans le produit final issu de la poudre de lait. En effet, les niveaux des thermophiles dans le lait cru sont généralement très faibles, sauf en de rares occasions où des niveaux plus élevés sont trouvés (Gleeson et al., 2013). En outre les bacilles thermophiles qui sont trouvés de plus en plus dans les biofilm sur les surfaces



d'équipement de traitement ou dans les couches de souillure du lait, seraient responsable des problèmes de recontamination des produits traités ou crosscontamination (**Burgess et al., 2010**).

**Tableau 6:** caractéristiques de certains des bacilles thermophiles (**Burgess et al., 2010**)

Caractère	<i>A. flavithermus</i>	<i>G. stearothermophil</i>	<i>G. thermoleovorans</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. sporothermodura</i>
T°max	65-72	65-68	70	50-55	45-55	57-61	50-55	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	6-9	6-8	5.2-8	5.5-8.5	5.5-8.5	4-10.5	5.5-8.5	inconnue
S.G	oui	oui	oui	non	non	variable	non	non
p.de S	Terminal	Terminal	Terminal	central	central	Sub terminal	central	terminal
VP	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	non	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°), CA: croissance anaérobie, S.G: sporange gonflé, P de S: position de spore, VP: réaction de Voge 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.

En outre les souches bactériennes faisant partie des thermophiles obligatoires et facultatifs sont capables de produire des acides, ainsi qu'une variété d'enzymes stables à la chaleur (**Ward., et al., 1988**), y compris les protéases et les lipases, responsables de la détérioration des produits laitiers (**Burgess et al., 2009**).

Dans le cas des thermophiles facultatifs, certaines souches de *B.licheniformis* sont également capables de produire une substance visqueuse extracellulaire qui peut affecter la qualité du lait et de crème pasteurisés (Gilmour et Rowe, 1990). *B.subtilis* a été associé à l'altération du lait cru et du lait pasteurisé ainsi que des produits UHT et du lait en conserve (Heyndrickx et Scheldeman., 2002). *B.coagulans* est responsable aussi de la détérioration des produits laitiers UHT et en conserve en raison de la production d'acide lactique (Gilmour et Rowe., 1990).

Les thermophiles obligatoires ne sont pas connus pour être pathogènes. Cependant, certains des thermophiles facultatifs y compris les *B.licheniformis*, *B. pumilis* et *B. subtilis* peuvent produire des toxines, bien que cela a été étudié seulement à des températures mésophiles. En de rares occasions, ces trois organismes ont été impliqués dans des incidents d'intoxication alimentaire. Cependant, on ignore si ces organismes sont capables de produire des toxines à des températures de croissance des thermophiles (Burgess et al., 2010).

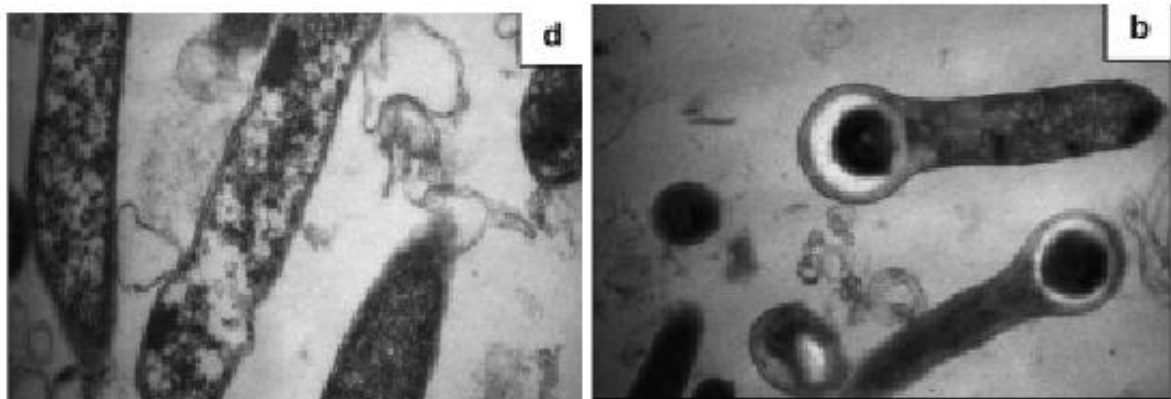
### 6. La sporulation des bacilles thermophiles

La sporulation est un processus naturel dans le cycle de croissance de certains groupes de bactéries telles que les espèces de *Bacillus* (Ponce et al., 2008). C'est un mécanisme de survie, généralement considéré comme un processus qui se produit lorsque l'organisme est en situation de stress (Barill et al., 2012). Dans l'environnement des produits laitiers, les bacilles thermophiles forment les endospore facilement dans les produits, mais les facteurs qui contribuent à ce processus ne sont pas clairement compris. (Nazina et al., 2001; Augustin., 2010; Burgess et al., 2009). La plupart des travaux effectués sur les spores ont porté sur les spores des bacilles mésophiles, *B.cereus* et *B.subtilis*. La structure, la sporulation et le processus de germination, ainsi que les mécanismes de résistance des spores, sont supposés d'être similaire à ceux des bacilles thermophiles (Ponce et al., 2008).

#### 6.1. La structure des endospores

Les spores sont constituées d'un noyau, autrement connu sous le nom de protoplastes, qui contient des matières nucléaires, entouré par la membrane corticale et le cortex, qui est à son tour enfermé dans le manteau des spores (Ponce et al., 2008). Certaines espèces,

comme *Geobacillus sp* et *B.cereus*, peuvent avoir une couche sur le manteau des spores appelés exosporium et d'autres espèces telles que *B.cereus* peuvent avoir des appendices (voir figure 3). La grande différence de structure des spores entre les espèces est le nombre des couches dans la spore, alors que le cortex et le noyau sont très similaires (Gibbons et Murrey., 1978).



**Figure 3:** Cliché au microscope électronique d'une coupe transversale d'un thermophile et d'une sporange et spore en formation. (Garcia et Coll., 1982)

### 6.2. Formation des spores

La sporulation est un processus complexe, divisé en une série d'étapes qui sont considérés comme étant très semblables entre les bactéries sporulées aérobies facultatives et les anaérobies (Gibbons et Murrey., 1978). La compréhension du processus de formation des spores est important, car cela peut aider à contrôler les spores dans les usines de transformation de produits laitiers (Augustin., 2010; Postollec et al., 2010). La sporulation chez les mésophiles peut être déclenchée par le besoin nutritionnel, une grande densité cellulaire ou des lésions de l'ADN (Nicholson et al., 2000; Gosh., 2009). Le premier stade de sporulation peut être inversé si la culture est transférée dans un environnement riche en nutriments.

En général, la température optimale et le pH optimal pour la formation des spores sont similaires à ceux pour la croissance cellulaire (Barill et al., 2012; Gosh., 2009), mais la gamme des deux paramètres sont plus étroits (Gibbons et Murrey., 1978). Les conditions qui déclenchent la formation des 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, peut jouer un rôle important. Ces minéraux sont importants pour

le développement d'une spore mature et peuvent être impliqués dans l'activation du processus de formation des spores. Les minéraux, notamment le calcium, s'accumulent dans la préspore (Nicholson et al., 2000). Le calcium permet d'augmenter l'expression des gènes impliqués dans le processus de sporulation (Gibbons et Murrey., 1978; Nicholson et al., 2000). Les sels minéraux sont couramment utilisés dans les milieux de sporulation. Étant donné que ces minéraux sont également présents dans le lait, ils peuvent aussi stimuler la formation des spores des bacilles thermophiles dans les processus laitiers. En outre, le temps nécessaire pour la formation des spores varie également largement entre les bacilles thermophiles.

### 6.3. Résistance

Les spores sont résistantes à la chaleur, la perturbation mécanique et une grande variété des produits chimiques (Ponce et al., 2008), ce qui rend très difficile leur destruction dans les produits laitiers par les procédés de fabrication (Gleeson et al., 2013).

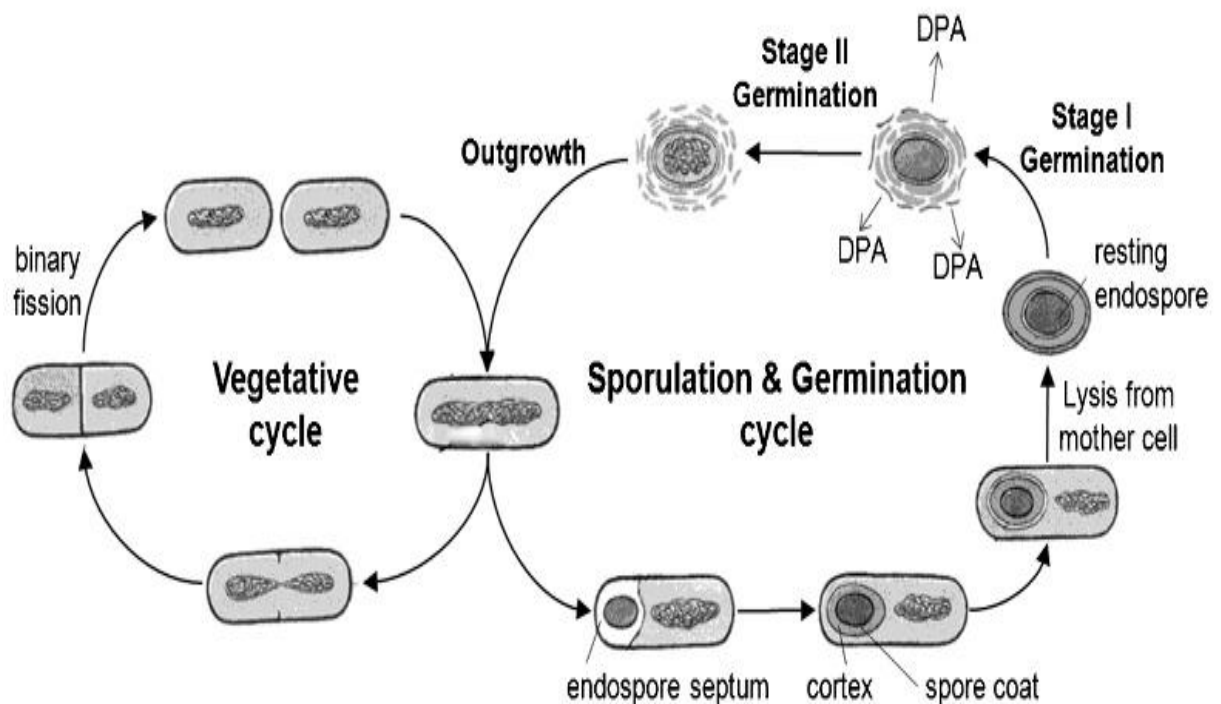
Dans le cas de bacilles mésophiles et facultativement thermophile, la combinaison de plusieurs propriétés participent à la résistance des spores de *Bacillus*, y compris leur faible teneur en eau, l'imperméabilité de la membrane interne, la couche de spore, le peptidoglycane Le cortex, de petites protéines (PAS) solubles dans l'acide et l'acide dipicolinique (DPA) (Walker et al., 1961; Ponce et al., 2008; Luu et Stelow., 2014). Les caractéristiques majeures des spores qui sont associées à la résistance à la chaleur sont supposées d'être la minéralisation et la faible activité d'eau. Des minéraux sous la forme de cations divalents sont situés dans la base des spores, principalement chélatés avec DPA (Luu et Stelow., 2014). Le cation divalent prédominant chélaté avec DPA est le  $\text{Ca}^{2+}$  (Setlow., 2014). Les spores de mutants qui étaient incapables de produire le DPA étaient également incapables d'accumuler de calcium (Walker et al., 1961; Luu et Stelow., 2014). La quantité de calcium dans les spores de *B.sporothermodurans* est connue pour être corrélée avec la résistance à la chaleur des spores des *Bacillus* mésophiles. Le type de cation divalent présent dans le noyau des spores a été montré résistante à la chaleur. L'activité de l'eau de la spore est également importante dans les spores résistantes (Nicholson et al., 2000).

Dans le cas des bacilles thermophiles, la résistance des spores à la chaleur varie considérablement, les spores de *Geobacillus Spp* ont le potentiel de survivre à un

traitement UHT (134 - 145 °C pendant 1 à 10 s) (Giffel et al., 1995; Ponce et al., 2008; Postollec et al., 2010). En outre, les spores de *Bacillus* dans les produits de lait en poudre peuvent rester en dormance pendant une année si les conditions ne sont pas bonnes pour la germination (Nicholson et al., 2000; Gosh et setlow., 2009; setlow., 2014). Par exemple, les spores viables de *B. subtilis* et *B. licheniformis* ont récemment été isolées à partir de 90 ans, dans le lait en poudre.

#### 6.4. La germination des endospores

Trois étapes sont impliquées dans le processus de conversion à partir d'une spore à une cellule végétative: activation, la germination et l'excroissance (figure 4) (Ponce et al., 2008; Setlow., 2014).



**Figure 4** : les étapes de germination des endospores chez *Bacillus* (Ponte et al., 2008)

Il est généralement admis que les spores doivent être activées avant que la germination ne se produise (Giffel et al., 1995). La chaleur, l'exposition aux produits chimiques et une diminution du pH à 2-3 peuvent activer les spores (Nicholson et al., 2000; Setlow., 2014). Dans l'industrie laitière, la chaleur est un mécanisme le plus probable de l'activation des spores thermophiles, en raison de l'utilisation très étendue de chaleur en tant que

technologie de préservation (**Giffel et al., 1995**). Par exemple, les spores de *G. stearothermophilus* peuvent être activées à des températures aussi élevées que 110°C, alors que les spores de *B. subtilis* auraient une plus faible température d'activation de 65 à 70°C. Les spores dormantes de long durée peuvent nécessiter une température ultérieure d'activation par rapport aux spores dormantes à courte durée qui germent facilement (**Gibbons et Murrey., 1978; Giffel et al., 1995; Nicholson et al., 2000**).

Après l'activation des spores mésophiles, la germination est déclenchée par des nutriments (par exemple L-alanine) qui se lient à des récepteurs de germination ou par d'autres moyens tels que haute pression, des sels ou lysozymes (**Giffel et al., 1995; Setlow., 2003**).

## Chapitre 3 : Le biofilm des bacilles thermophiles

### 1. Généralités sur les biofilms

Dans la nature, la plupart des microorganismes vivent au sein de communautés microbiennes appelées biofilm. Les biofilm sont constitués de microorganismes adhérents à une surface inerte ou vivant (**Costerton et al., 1995**), on parle alors de communautés microbienne fixées ou biofilm. Ces microorganismes sont incorporés dans une matrice organique généralement constituée de polymère extracellulaire ou EPS («extrapolymeric substance») synthétisé par ces mêmes microorganismes. Les polymères extracellulaires contiennent en majorités des polysaccharides macromoléculaires et en moindre mesure des protéines des lipides et des acides nucléiques (**Myszka et al., 2011**).

La supériorité de la vie sous formes de biofilm n'est confirmée qu'en 1978 avec Costerton montrant que plus de 99% des bactéries se trouve sous forme de biofilm sur une grande diversité de surface comme les métaux, les plastique, les tissus vivants, les surfaces minéraux (**Costerton., 2002**). Un biofilm bactérien peut être constitué d'une seule espèce bactérienne ou de différents espèces bactériennes ainsi que des champignons, algues, et protozoaires (**O'Toole et al., 2000**).

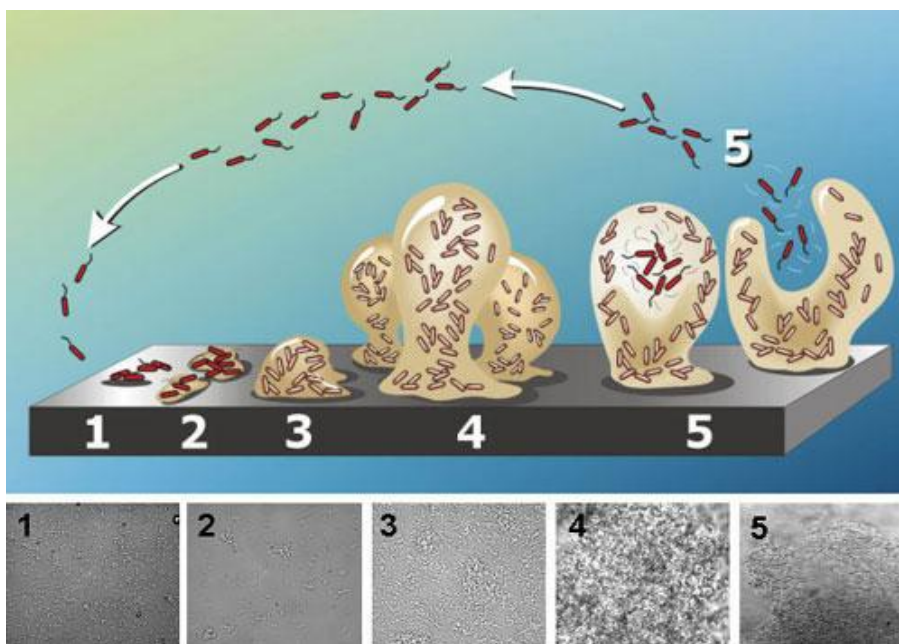
#### 1.1. Propriété des microorganismes en biofilm

Les microorganismes des biofilms possèdent des phénotypes différents des microorganismes planctoniques. Entre 3 et 50% du total des protéines chez les bactéries des biofilms est changé par rapport à celui des cellules en suspension. (**O'Toole et al., 2000**). Par conséquent, les microorganismes au sein d'un biofilm possèdent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques comme la disparition des flagelles, la synthèse d'exopolymères, la mise en place d'un système de communication chimique quorum sensing qui n'est pas uniquement liés à la densité cellulaire mais aussi à la localisation spatiale des cellules (**Costerton et al., 1995**). Des vésicules membranaires permettant le transport entre les cellules, de molécules comme l'ADN, et des molécules de signalisations et des protéines, ont également été trouvées (**Stewart., 2002**). Le biofilm permet aux bactéries de résister aux agents antimicrobiens et aux stress environnementaux (déshydratations, privation nutritionnelle, rayonnements ultraviolets (**Parot., 2007**)).

## 1.2. Les étapes de formation de biofilm

Le développement des biofilm se produit généralement par un certain nombre de stades comme le montre la **figure 5**.

- Attachement réversible des bactéries,
- Adhésion irréversible
- formation des micro-colonies et production d'EPS,
- Maturation du biofilm
- Détachement et dispersion du biofilm



**Figure 5** : les étapes de formation de biofilm (Davies et al., 2001)

Après l'adhésion et la production d'EPS, les microcolonies se développent, par la multiplication et l'empilement des cellules bactériennes et production de la matrice. Des canaux d'eau peuvent se développer dans la matrice des EPS pour permettre les échanges de gaz et la circulation des éléments nutritifs et des déchets. Cette matrice fournit également une source de nutriments pour des cellules bactériennes. Le processus de formation des biofilms diffère selon les espèces et l'environnement. Dans certains cas, les conditions environnementales peuvent ne pas permettre aux cellules de former des microcolonies et des structures de multicouches (Costerton et al., 1995; Flint et al., 2001; Parot., 2007).



### 1.3. Facteurs influençant sur formation de biofilm

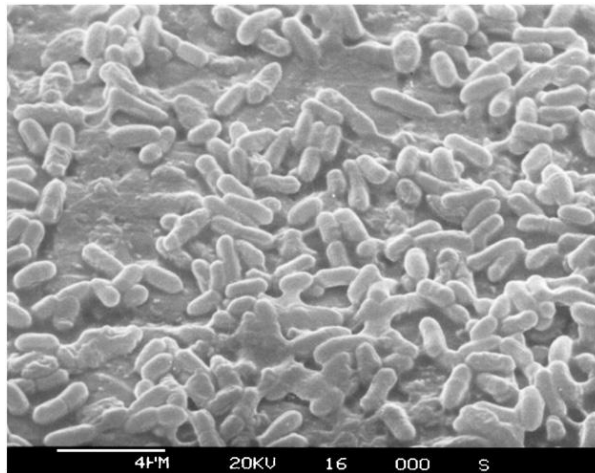
l'adhérence des bactéries aux surfaces et le développement ultérieur des biofilms est très commun dans de nombreux environnements tels que le médical, marine et de l'eau, l'unité de distribution d'eau et du traitement des aliments frais (Flint et al., 1997; 2001, Kumari et al., 2013). Elle est influencée par plusieurs facteurs (Tableau 7), tels que la surface, la disponibilité des nutriments, la bactérie et les caractéristiques du milieu aqueux.

**Tableau 7:** facteurs influençant sur la formation de biofilm (O'Toole, 2000)

Facteurs	Exemple	rôle et Importance
liés à la bactérie	Flagelles	Permet la mobilité et l'accrochement bactérien au support
	Pili	Permet, la fixation bactérienne au substrat
liée au substrat	Les propriétés physico-chimiques de la surface de substrat	Influencé l'attachement des cellules microbiennes
	Hydrophobicité de matériau	Hydrophobe ou hydrophile
Facteur liée à l'environnement	La concentration de nutriment	
	La température	
	Osmolarité	
	La concentration en oxygène et en ions	Influence le positionnement des aérobies au niveau de la surface aire-eau
	Le pH de milieu de croissance	Influence la charge de la surface

### 2. Les biofilms des bacilles thermophiles

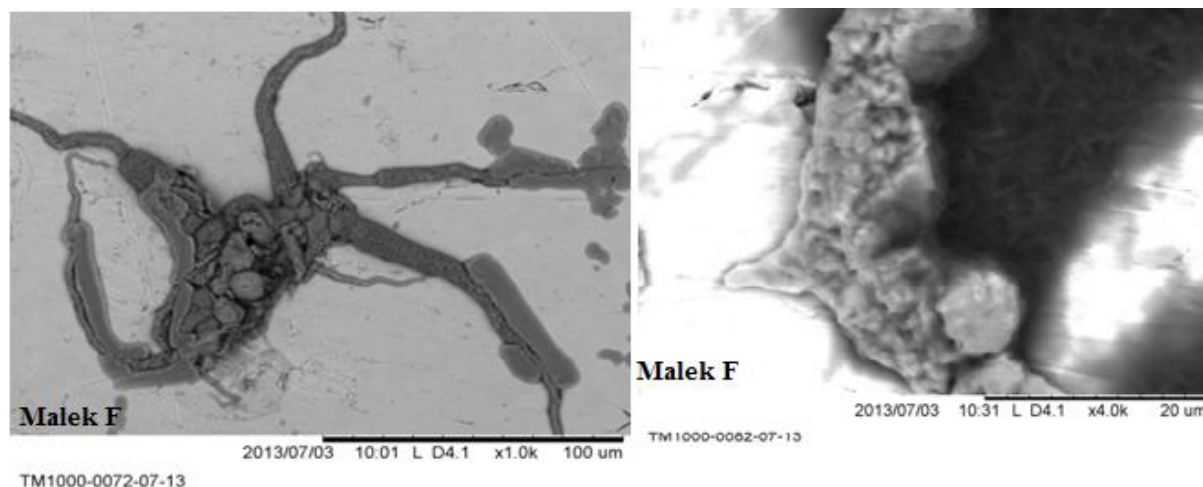
La croissance extensive des biofilms dans les chaînes de fabrication peut se produire lorsque les cycles de production sont trop longs, l'équipement de fabrication n'est pas nettoyé correctement entre les cycles de production (Pasvolsky., 2014) et l'utilisation des ingrédients ou des sous-produits contaminé par les thermophiles (Kumari et al., 2013).



**Figure 6:** Micrographie électronique à balayage d'un *A.flavithermus* 18h biofilm sur la surface d'acier inoxydable (Burgess et al., 2010).

Les biofilms des bacilles thermophiles (figure 6) sont appelés biofilms du proces. Ces biofilms particuliers sont généralement dominés par une seule espèce en raison de pressions sélectives de l'environnement (Burgess et al., 2009). Les pressions de sélections dans une usine de fabrication des produits laitiers peuvent inclure la chaleur, la composition du produit, le pH et l'activité de l'eau (Flint et al., 2001). La structure et la composition des biofilms des thermophiles ne sont pas très bien connues. D'après les travaux de Burgess et al., (2010), les biofilms des bacilles thermophiles sur l'acier inoxydable sont formées d'une monocouche, et ne présentent pas les caractéristiques d'un biofilm mature, avec une structure tridimensionnelle (figure 7). Ce phénomène est susceptible de se produire dans des zones d'une usine de fabrication de produits laitiers qui sont régulièrement nettoyés où il existe des taux de cisaillement élevés et qui sont des zones mortes, comme sur la surface des échangeurs de chaleur à plat (Flint et al., 2001). Cependant, dans certains sites des usines de fabrication laitière, où le flux est plus faible, comme sous les plaques de distribution d'évaporateurs, les

conditions peuvent permettre la formation des structures de couches multiples où les cellules bactériennes sont également piégées dans les souillures de lait.



**Figure 7:** Biofilm mature de 20h formé par des bacilles thermophiles et observés au microscope électronique à balayage environnemental (Malek., 2015)

La formation de biofilm des bacilles thermophiles se produit dans les sections des usines de fabrication de produits laitiers à des températures élevée de 40 à 65 °C (Lewis., 2003; Scott et al., 2007). Les exemples incluent des sections de préchauffage et d'évaporation de lait en poudre, échangeur de chaleur à plaques utilisés au cours du processus de pasteurisation, séparateurs centrifuges (utilisés pour séparer la crème de lait entier) fonctionnent à des températures chaudes (45- 55°C). Des études ont montrés l'adhérence et la croissance des biofilms à la fois d'*A.flavithermus* et de *Geobacillus spp* dans le domaine laitière (Burgess et al., 2010).

### 2.1. Fixation des spores et les cellules végétatives dans le biofilm des thermophiles

La formation d'un biofilm de bacilles thermophile est susceptible d'être initiée par la fixation des deux types de cellules: les spores et les cellules végétatives. Parkar et al, (2001) ont démontré qu'une variété de souches des bacilles thermophiles, y compris les espèces de *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* et *B. pumilus* sont capable de s'attacher à la surface de l'acier inoxydable et des souillures de lait. Il a été démontré que les spores ont une plus grande propension que les cellules végétatives pour l'adhésion aux surfaces inertes. Les caractéristiques physico-chimiques des spores sont impliquées dans leur fort pouvoir d'adhésion aux surfaces inertes. L'EPS, par contre, ne semble pas être impliqué

dans le processus de fixation des bacilles thermophiles sur des surfaces comme cela se produit dans d'autres espèces bactériennes (**Parkar et al, 2001; Burgess et al., 2010**).

### 2.2. La croissance des populations attachées

À la suite de l'attachement, les spores thermophiles germent et les cellules végétatives se reproduisent et la formation du biofilm. Cependant, il est également possible qu'un biofilm peut être initié à partir de spores et de cellules végétatives adhérentes (**Burgess et al., 2009**). Des travaux ont montré que des biofilms de *Geobacillus. spp* et *A.flavithermus* formés par des cellules végétatives inoculées dans le lait écrémé pasteurisé avaient un taux de croissance similaire est maximal (**Burgess et al, 2009; Flint et al., 2001; Parkar et al., 2003**).

### 2.3. Le développement des spores dans les biofilms

De nouvelles spores sont produites en même temps que le biofilm des thermophiles se développe. Dans le cas du biofilm d'*A.flavithermus*, la formation des spores semblent se produire simultanément dans le réacteur continu (**Burgess et al., 2010**). Cela diffère des autres études sur les bacilles mésophiles lactiques, qui ont suggéré que les biofilms et les voies de sporulation ne sont pas les mêmes. **Lindsay et al (2005)** ont comparés la sporulation de *B. subtilis* dans une culture planctonique à celle d'un biofilm. La sporulation a été détectée après 5h dans la culture planctonique comparée à 30 h dans le biofilm. La variation de température a un effet considérable sur la formation des spores par les bacilles thermophiles. Par exemple, le taux des spores représente 10 à 50% d'un biofilm de 8h chez *A.flavithermus* et peut être augmenté à 55 et 60°C, alors qu'aucune spore n'a été détectée dans le biofilm cultivé à 48°C (**Burgess et al., 2010**).

Etude expérimentale  
**Etude expérimentale**

## **Matériels et méthodes**

### **Objectif du travail**

Les bacilles thermophiles font partie de la flore d'altération de la qualité du lait pasteurisé et de la réduction de sa durée de vie. L'objectif de ce travail est l'évaluation et la caractérisation de la contamination d'une laiterie produisant du lait pasteurisé par les bacilles thermophiles. Le plan expérimental de ce travail est :

- ✓ Mise en évidence la présence des bacilles thermophiles dans la matière première: (la poudre du lait, Le lait cru), le produit final (le lait pasteurisé (recombiné et de vache) et les équipements de transformation du lait D'une laiterie de la région de Tlemcen.
  
- ✓ Identification des souches isolées par galerie classique et galerie API,
  
- ✓ Caractérisation des souches isolées à travers l'étude du pouvoir enzymatique et des propriétés d'adhésion et de formation du biofilm.

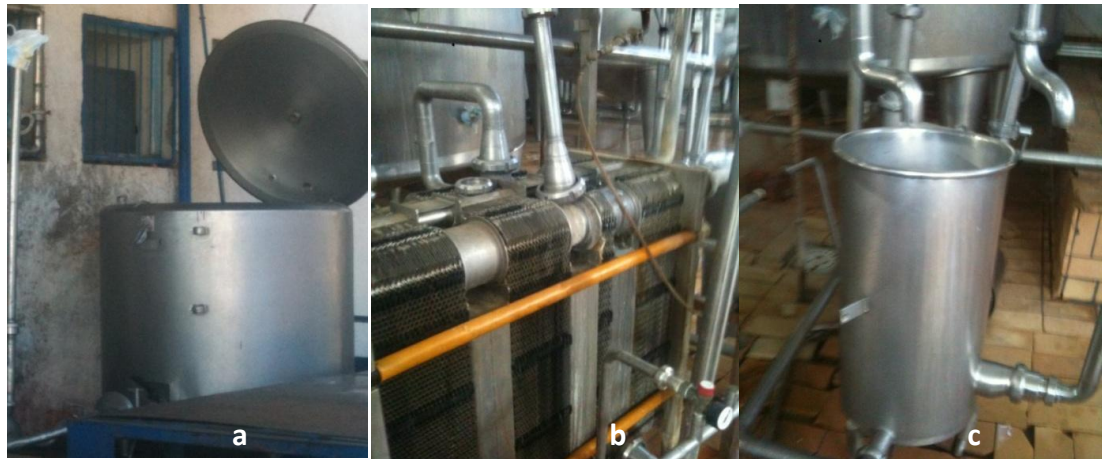
## 1. Isolement des souches

### 1.1. Prélèvements

14 échantillons ont été prélevés durant le mois de Mars et le mois d'Avril dans une laiterie de la région de Tlemcen tels que présentés dans le **tableau 8** et les **figures 8** et **9**.

**Tableau 8** : les différentes campagnes de prélèvement des échantillons

Echantillon	Date de prélèvement	Code
Lait en Poudre à 0% MG (France)	09/03/2015	P0%
Lait en Poudre à 0% MG (Pologne)	07/04/2015	
Lait en Poudre à 26% MG (Allemagne)	09/03/2015	P26%
Lait en poudre à 26% MG (Argentine)	07/04/2015	
Lait de vache cru à partir de le citerne de collecte	09/03/2015	VCC
Lait de vache cru à partir de bidon	07/04/2015	VC(B)
Lait de vache cru à partir de la cuve de collecte (le même fournisseur que le bidon)	07/04/2015	VC(M)
Lait de vache cru à partir de citerne réfrigérée	07/04/2015	VCC(C)
Lait de vache à partir du tank de la première pasteurisation	09/03/2015	VTP1
Lait de vache à partir du tank de la deuxième pasteurisation	09/03/2015	VTP2
Lait de vache en sachets	05/04/2015	LVPS
	07/04/2015	DLY
Lait recombinaé pasteurisé en sachets	09/03/2015	LPPS
Écouvillonnage à partir du pasteurisateur.	09/03/2015	EP
Écouvillonnage à partir des lactoducs.	09/03/2015	EL
Écouvillonnage à partir de la cuve de collecte.	09/03/2015	EC



**Figure 8:** sites de prélèvements (a: pasteurisateur; b:Cuve de collecte; c: pasteurisateur)

- les échantillons du lait en poudre sont prélevés en utilisant des boîtes de Pétri stériles.
- les échantillons du lait cru sont prélevés l'aide de flacons ou de tubes stériles.
- Le prélèvement à partir des équipements dans l'atelier ou au niveau de la réception du lait (cuve de collecte à ciel ouvert) est réalisé par écouvillonnage de la surface à l'aide d'un écouvillon imbibé de TSE.



**Figure 9 :** échantillons (a : lait cru ; b : poudre du lait ; c : prélèvement de surface)

### 1.2. Transport des échantillons

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



## 2. Mise en culture

### 2.1. Préparation des échantillons

#### 2.1.1. Préparation des dilutions

- **La solution mère du lait en poudre**

Aseptiquement, 1g de poudre est posé dans un tube qui contient 9 ml du liquide de dilution tryptone-sel-eau (TSE). Puis la solution est agitée au vortex.

- **La solution mère du lait**

9ml de chaque type de lait sont remplis dans des tubes stériles.

- **La solution mère après l'écouvillonnage**

Les tubes contenant les écouvillons sont agités pendant une minute dans un vortex pour détacher les bactéries de l'écouvillon.

- **Des dilutions décimales** des échantillons analysés sont effectuées en cascades jusqu'à la dilution  $10^{-2}$ .

#### 2.1.2. Traitement thermique

Un traitement thermique est réalisé à 80°C pendant 10 minutes pour tous les différents types du lait cru (VCC, VC(B), VCC(C), VC(M)) et les tube de (EL, EC) afin d'isoler les formes sporulées. Le traitement à la chaleur est suivi directement d'un refroidissement dans un bécher qui contient de la glace.

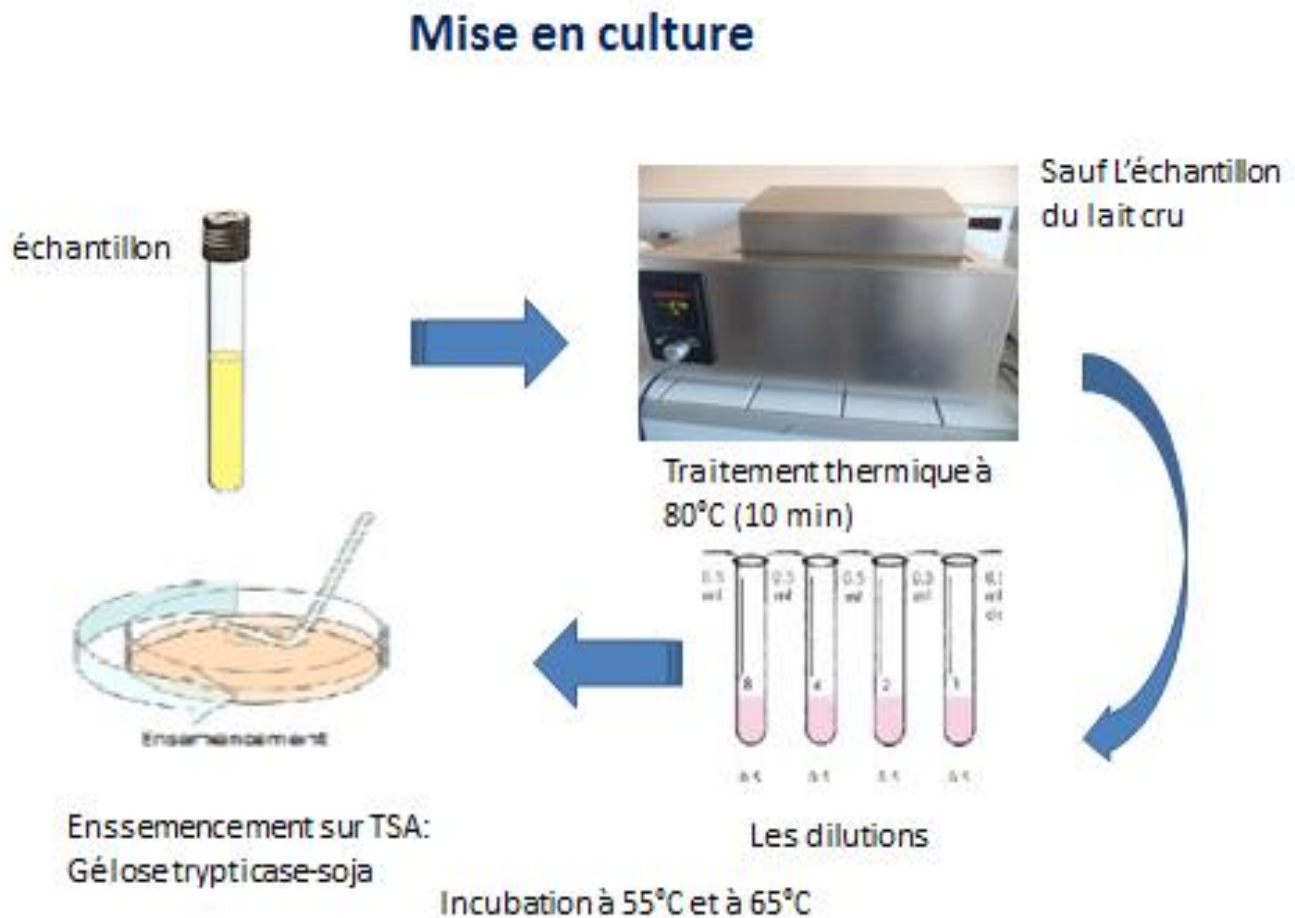
## 2.2. Ensemencement

L'ensemencement des bacilles thermophiles s'effectue en surface sur le milieu Trypticase Soja-agar (TSA), coulé dans des boites de pétri.

A l'aide de micropipette de 100 µl on dépose 0,1ml de la solution mère dans les boites de pétri préparée qui contient le milieu gélosé. On utilise des pipetes pasteur en forme d'un râteau pour étaler uniformément cet inoculum sur la gélose. L'ensemencement se fait à raison de deux boites par solution et l'incubation se fait à 30 °C et 55 °C pendant 24h à 48h. Certains échantillons ont été également incubés à 65°C.

## 2.3. Enrichissement

Un enrichissement des échantillons et de leurs dilutions est réalisé à 55°C et à 65°C pendant 24h.. L'isolement des thermophiles se fait toujours sur milieu TSA. L'incubation est réalisée à la même température d'enrichissement pendant 24h.



**Figure 10 :** le protocole de la mise en culture des bacilles thermophiles

#### 2.4. Conservation des souches

La conservation des souches s'effectue dans des tubes à essai contenant de la (TSA) inclinée. Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par des stries et incubées à 55°C pendant 24h, puis conservées à 4°C.

### 3. Identification morphologique des souches

L'identification phénotypique des souches isolées porte sur l'étude d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

### 3.1. Examen macroscopique

Cette étude consiste à l'observation directe à l'œil nu l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieu TSA (Trypticase soja agar) après 48h d'incubation en tenant compte des critères suivants :

- o **La forme des colonies** : rond, irrégulières, circulaire et autres caractéristiques.
- o **La taille des colonies par mesure de diamètre.**
- o **La couleur.**
- o **L'élévation** : convexe, concave, plate.
- o **L'opacité** : opaque, translucide ou transparente.
- o **La surface** : lisse, rugueuse, sèche, dentelée, et autres caractéristiques.

### 3.2. Examen microscopique

L'examen microscopique permet d'observer la forme, la taille, le Gram, le mode de regroupement, la mobilité, la pureté de la souche en plus la position de la spore et les inclusions cellulaires.

#### 3.2.1. Observation à l'état frais

Sur une lame propre dégraissée, on étale une goutte de suspension réalisée dans l'eau physiologique à partir des colonies de 24h. Puis on dépose une lamelle et on observe au GX100 (à l'immersion).

#### 3.2.2. Coloration de Gram

Des frottis sont préparés à partir des cultures jeunes et observés au microscope à l'immersion après coloration de Gram.

#### 3.2.3. Recherche des spores

La recherche des spores est réalisée sur des cultures de 7 jours après coloration à la fuchsine et observation au microscope, à l'immersion.

## 4. Identification biochimique

### 4.1. Test de catalase

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

## 4.2. Identification par galerie API 20 E

Les 12 premiers tests de la galerie API 20 E sont utilisés pour l'identification au genre *Bacillus* et autres genres proches. La fermentation des sucres par ces bactéries est étudiée en utilisant la galerie 50CHB. Vingt souches sont choisies et soumises à une détermination du biotype par la galerie API 20 E (**Guide API 20 E**) :

### 4.2.1. Préparation de l'inoculum

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

### 4.2.2. Inoculation et lecture de la galerie

La galerie est inoculée et lue selon le guide API 20 E. A cause de la déshydratation les plaques ont été incubées à 42°C.

## 4.3. Détermination des activités enzymatiques

### 4.3.1. Recherche des amylases

#### ➤ Principe

L'amylase ou amyloglucosidase hydrolyse le polymère de l'amidon en polysaccharides et en disaccharides puis en monosaccharide. Ces sucres chaines sont incapables de fixer l'iode et apparaissent incolores. Par contre les longues chaines hélicoïdales de l'amidon emprisonnent l'iode et donne la couleur bleu violet.

#### ➤ Technique

L'activité amylolytique est examinée en ajoutant 1% d'amidon soluble à la gélose nutritive. L'incubation est effectuée pendant 24h à 55°C.

#### ➤ Lecture

La lecture se fait par inondation des boites avec une solution de lugol. La présence de zone claire autour de l'ensemencement indique la production d'amylase (**Fooladi et al., 2010**).

### 4.3.2. Recherche de la lipase

#### ➤ Principe

Les bacilles thermophiles possèdent une activité lypolytique et estérasique qui décompose les graisses en acides gras et glycérol.

➤ **Technique**

L'activité lipolytique est réalisée sur gélose nutritive additionnée de tween 80, après préparation et autoclavage elle est répartie en boîtes de pétri pour la solidification puis ensemencée en une seule strie pour chaque souche. L'incubation se fait à 55 °C pendant 24h (Castro et al., 2005).

➤ **Lecture**

Les colonies de souches lipase positif sont entourées d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de lipolyse.

**4.3.3. Recherche des protéases**

➤ **Principe**

Les protéases hydrolysent les protéines en petits fragments peptidique et acide aminés. Les liaisons sont cassées par l'addition de l'eau entre les groupes adjacents CO-NH

**Technique**

l'activité protéolytique est révélée sur un milieu gélosé contenant 5% de poudre de lait (Lanyi., 1987). Une colonie de la souche à étudier est ensemencée par une strie avec une anse. L'incubation se fait à 55°C pendant 24h.

➤ **Lecture**

La présence de la caseinase se manifeste par la présence d'une zone claire autour des colonies. Par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture.

**4.4. Identification par galerie classique**

**4.4.1. Utilisation des sucres (glucose, lactose, saccharose)**

➤ **Principe**

Le TSI est un milieu incliné à trois sucres dont le glucose présent dans le culot, le lactose et le saccharose sont présents dans la pente. L'utilisation de glucose par les bactéries fermentatives entraîne une acidification du milieu avec production ou non de gaz. En outre le lactose et le saccharose seront oxydés et fermentés. Ce milieu permet aussi la révélation de la production de H<sub>2</sub>S qui se manifeste par un noircissement du culot.

### ➤ **Technique**

Une colonie est ensemencée en réalisant une piqure centrale dans le culot et des stries serrées sur la pente. Remettre le bouchon du tube sans le revisser. L'incubation a été réalisée à 55°C pendant 24h.

### ➤ **Lecture**

Un virage au jaune de la pente indique un résultat positif pour l'utilisation du lactose et du saccharose.

- Noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot indique H<sub>2</sub>S positif.
- La présence de bulles de gaz dans le culot indique la production de gaz par les bactéries.

## 4.4.2. Utilisation du citrate

### ➤ **Principe**

Le citrate de Simmons est un milieu qui ne contient que le citrate comme source de carbone ceci permet le développement des bactéries qui possèdent l'enzyme citrate perméase.

### ➤ **Technique**

La pente du milieu est ensemencée d'une colonie bactérienne, par stries longitudinales au moyen d'une anse. Les tubes sont légèrement fermés. L'incubation se fait à 55 °C pendant 5 jours. L'observation à lieu chaque jour.

### ➤ **Lecture**

La croissance de la bactérie sur le milieu indique que cette dernière possède l'enzyme citrate perméase. Cependant s'il n'ya pas de développement la bactérie ne possède pas cette enzyme.

## 4.4.3. Test du mannitol-mobilité

### ➤ **Principe**

Le mannitol est un produit de réduction du Dc-mannose. Ce test permet de rechercher la fermentation du mannitol et la mobilité.

### ➤ **Technique**

A l'aide d'une pipete pasteur boutonnée, une colonie de la souche est ensemencée par piqure centrale dans le tube de mannitol-mobilité et incubée à 55 °C pendant 24h.

➤ **Lecture**

Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol. Une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries.

**4.4.4 Recherche de la production d'acétoine**

➤ **Principe**

Certaines bactéries sont capables de produire de l'acétyl-méthyl carbinol, soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique. Soit au cours de la fermentation de 2,3-butylène glycolique. En présence d'une base forte l'acétoine donne une coloration rouge au milieu oxygéné. Ce composé réagit avec le réactif VP et donne une couleur rouge.

➤ **Technique**

Une colonie de la souche à étudier est ensemencée sur le milieu Clark et Lubs puis incubée à 55°C pendant 24h à 48h. Après l'incubation quelques gouttes des réactifs VP1 et VP2 sont ajoutées dans le tube.

➤ **Lecture**

La coloration rouge indique un résultat positif VP positif et la coloration jaunâtre correspond à un résultat VP négatif.

## 5. Etude de l'adhésion et la formation des biofilm des bacilles thermophiles

### 5.1. Observation microscopique des cellules adhérentes au verre

L'adhésion des bacilles thermophiles est étudiée sur des lames de microscope en verre. Pour cela, les cellules végétatives de cultures jeunes (moins de 24 h) sont laissées adhérentes au verre selon la technique de (Malek., 2015) et sont observées au microscope optique à l'immersion.

### 5.2. Formation des biofilm dans les microplaques de titration

La technique de microplaque de titration à 96 puits selon Auger et al (2009) est utilisée pour étudier la capacité des souches des bacilles thermophiles à former le biofilm.

#### ➤ Technique

Dans les puits des microplaques de titration en polystyrène stérile, 100µl du BHIB et 50µl de la suspension bactérienne préparée dans l'eau physiologique et ajustée à une DO (densité optique) de 0.6 à 0.8 nm sont introduits. La première rangée est laissée vide pour le contrôle du lecteur et la deuxième est remplie par le milieu non ensemencé comme un témoin.

Chaque plaque est incubée à 4 températures différentes : 37°C, 47°C, 55° ou 65°C pendant 24h.

#### ➤ Coloration des biofilm au cristal violet

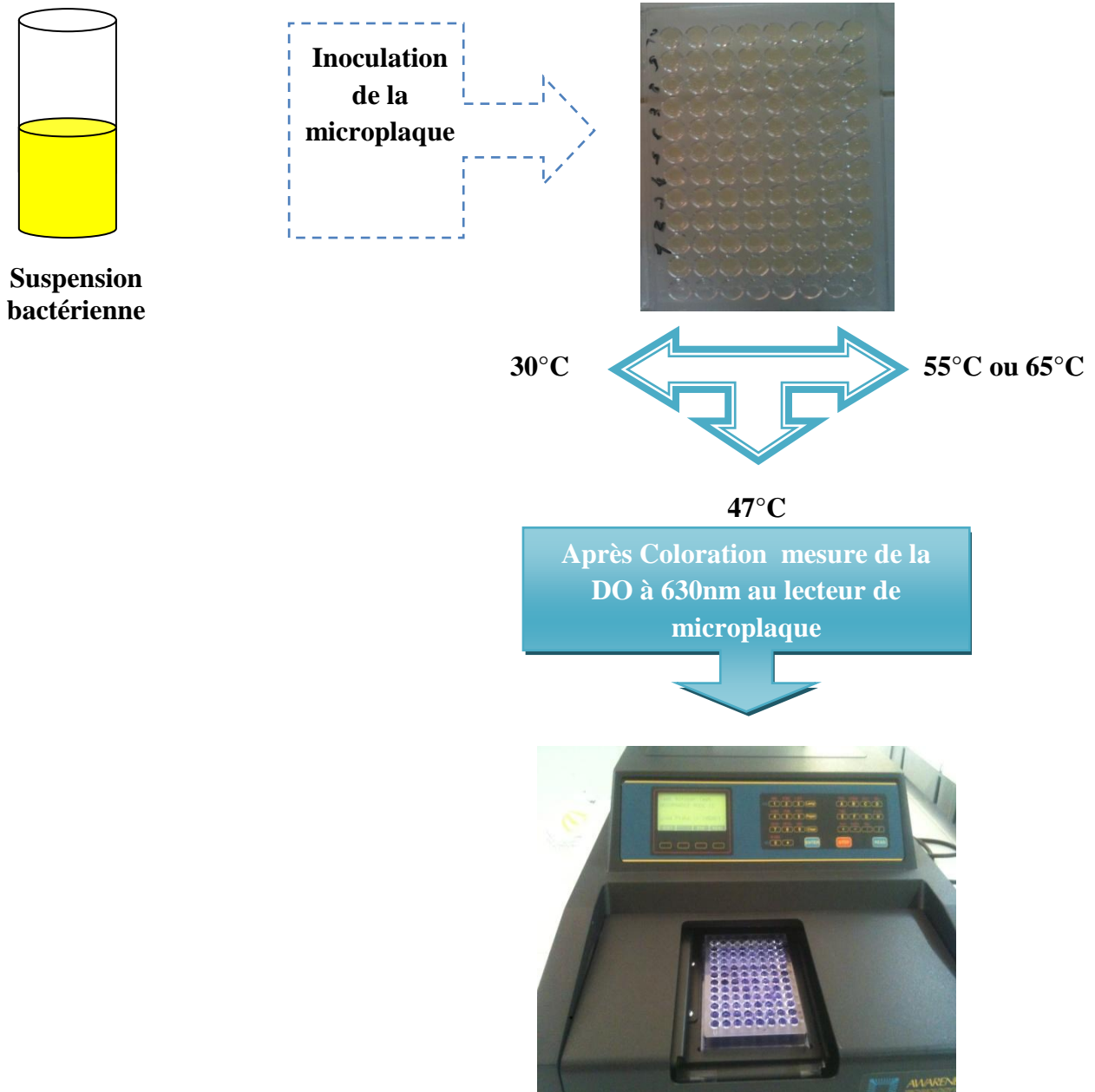
Après le temps d'incubation, les biofilms formés sur les parois des puits sont mis en évidence par coloration au cristal violet.

- Les microplaques sont d'abord vidées par la micropipette.
- Rinçage à l'eau distillée trois fois pour éliminer les cellules non adhérentes.
- Laisser sécher 10 à 15 min.
- Remplir les puits avec 200µl de cristal violet 1%
- Laisser agir 15 min puis rincer à l'EDS 3 fois.
- Séchage des plaques en position renversée.

#### ➤ Lecture

Avant la mesure de la DO au spectrophotomètre muni d'un lecteur de microplaque à 630 nm, les puits sont remplis avec une solution dissolvante constituée d'éthanol et d'acide acétique glacial dilués dans de l'eau distillée. Le protocole de formation des biofilm par la méthode microplaques de titration 96 puits est présenté dans la (figure 10).





**Figure 10** : schémas représentant le protocole de formation des biofilms par la méthode de microplaques de titration 96 puits

# Résultats et discussions

## 1. Le soucier bactérien

Le soucier bactérien construit de l'analyse des différents échantillons de la poudre de lait, du lait cru et du lait pasteurisé est constitué de l'isolement de 32 souches de bacilles thermophiles. Les différentes origines des souches sont mentionnées dans le **tableau 9**.

**Tableau 9:** les résultats relatifs à l'isolement des souches à partir de différentes origines

Origines	Nombres des souches	
	isolées à 55°C	isolées 65°C
Poudre du lait	6	6
Lait cru	1	1
Lait recombinaé pasteurisé	2	0
Lait de vache pasteurisé	10	1

### Remarque :

On n'a pas trouvés des souches des bacilles thermophiles à partir des prélèvements des équipements laitiers.

Dans le même contexte plusieurs recherches ont été réalisées sur les bacilles thermophiles dans le lait et la poudre du lait. Des souches des thermophiles sont identifiées par les techniques de biologie moléculaire (Chen et al., 2003 ; Burgess et al.,2010 ; Delgado et al., 2013., Zhao et al., 2013).

## 1. Résultats d'identification phénotypiques

Les isolements des échantillons de lait liquide et en poudres et des échantillons de surfaces ont été réalisés à deux températures : 55°C et 65°C sans enrichissement ou après enrichissement 24h à 55°C (**voir tableau en annexe**). L'identification apportée sur l'étude des caractères, cultureux, microscopiques et biochimiques.

### 1.1. Les caractères cultureux

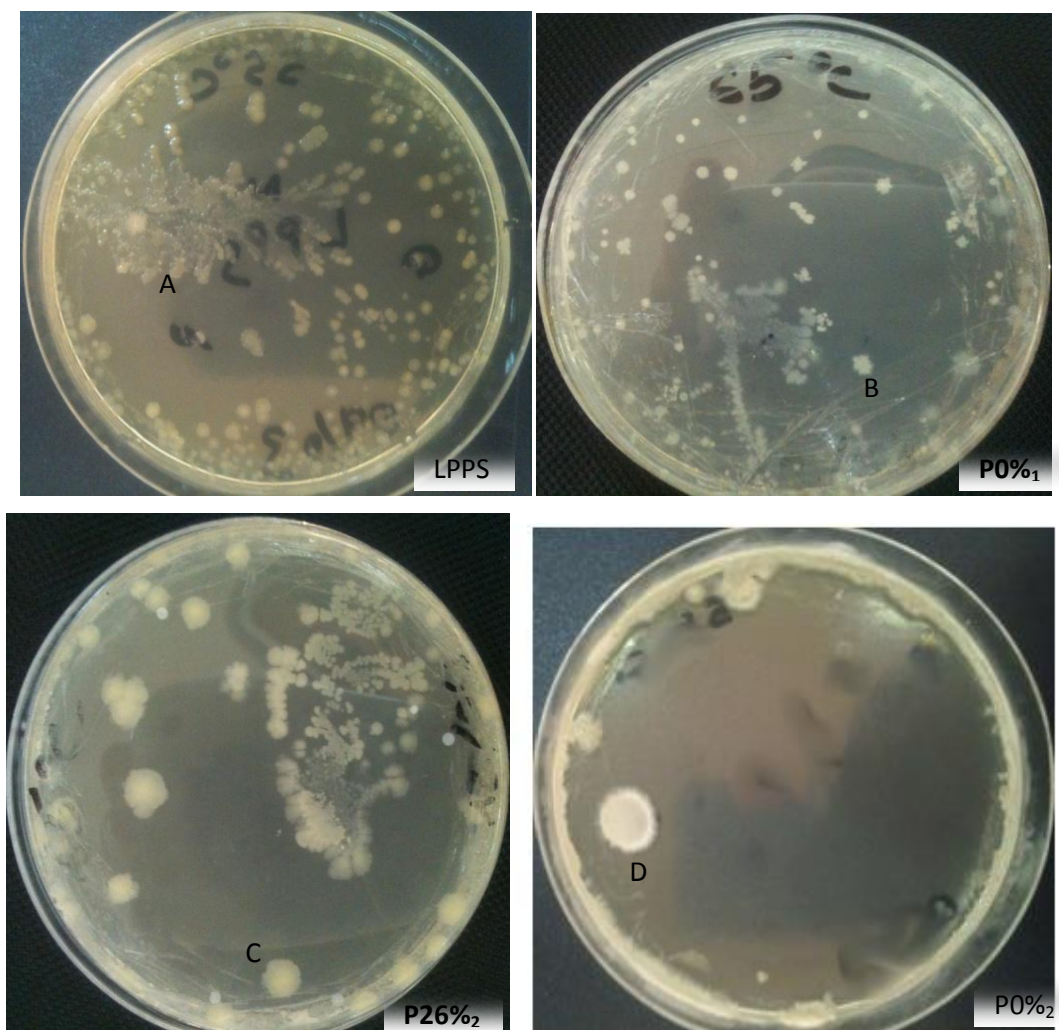
Tel que montré par le **tableau 10**, l'aspect des colonies des souches sur le milieu TSA après une incubation de 24h permet de distinguer différentes colonies :

**Colonies de type 1 :** 4 souches présentent des colonies rondes, planes, à contour circulaires, régulier, à surface crémeuse ou lisse, de couleur blanchâtre, opaque ou translucide (B).

**Colonies de type 2 :** 7 souches présentent des colonies irrégulières, bombées, à bord filamenteux, lobé ,circulaire ou crénelé ,à surface dur et sec, lisse , crémeuse ou visqueuse, opaque ou translucide, de couleur beige ou blanchâtre(C).

**Colonie de type 3 :** 16 souches présentent des colonies rondes, bombés, à bord rhizoïde ou circulaire, à surface crémeuse, rugueuse et sèches ou visqueuse et lisse, opaque ou translucide, blanchâtre, incolore ou beige(D).

**Colonie de types 4 :** 5 souches présentent des colonies irrégulières, planes à contour rhizoïde ou lobé, à surface visqueuse ou sèches et rugueuse, opaque ou translucide, à couleur beige ou blanchâtre(A).



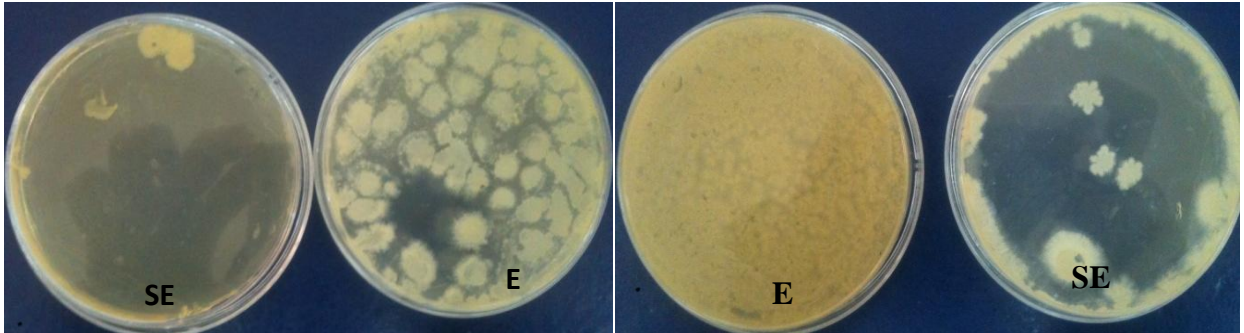
**Figure 11:** l'aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA après une incubation de 48h (A : types 4 ; B : type 1 ; C : type 2 ; D : type 3)

Tableau 10 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA après une 24h d'incubation

Origine des souches : LPPS et poudre du lait							
forme	Bord	Surface	opacité	couleur	diamètre	temp	S
<b>Ronde et Plat</b>	Circulaire	crémeuse	Translucide	Blanchâtre	0,2	55	4 ; 7
<b>Irrégulière et bombé</b>	Rhizoïde	Rugueuse et sèche	opaque	beige	0,5	55	3 ; 9
		Visqueuse et lisse					
<b>Ronde et bombé</b>	Circulaire	Crémeuse	Opaque	Blanchâtre	0,4	65	13 ;
			Translucide			55	16 ; 20
	circulaire	crémeuse	Opaque	Blanchâtre	0,3	65	24
	Rhizoïde	Rugueuse et sèche	Opaque	Blanchâtre	0,7	55	5
	circulaire	visqueuse	transparente	incolore	Punctiforme	55	26
	circulaire	visqueuse	transparente	incolore	Punctiforme		17
<b>Irrégulière et plane</b>	Rhizoïde	Visqueuse	translucide	Blanchâtre	1cm	55	6
Origines des souches : le lait de vache cru et pasteurisé							
<b>Irrégulière et bombé</b>	Lobé	Lisse	translucide	Blanchâtre	1cm	55	21
	circulaire	Visqueuse	Opaque	beige	0,5	65	18
	Crénelé	Lisse et crémeuse	Opaque	Beige	0,5	55	1 ; 2 ; 8
<b>Ronde plane</b>	Circulaire	Lisse	Opaque	Blanchâtre	Punctiforme	55	15
	Circulaire	Lisse	Translucide	Blanchâtre	Punctiforme	65	19
<b>Ronde bombé</b>	Circulaire	Crémeuse	Transparente	Incolore	Punctiforme	65	2 ; 31
	Circulaire	lisse	Transparente	Incolore	Punctiforme	55	25 ; 11
	Ondulé	Lisse et visqueuse	opaque	Blanchâtre	0,4cm	65	14 ; 28
	Circulaire	Lisse et visqueuse	opaque	Blanchâtre	0,3cm	55	10
	Lobé	Lisse et visqueuse	opaque	beige	0,3cm	55	27
	Circulaire	Crémeuse	opaque	Blanchâtre	0,3cm	30	29
<b>Irrégulière plane</b>	Lobé	Rugueuse et sèche	Opaque	Beige	1cm	55	32 ; 12
	Lobé	Rugueuse et sèche	Opaque	Beige	1cm	30	3 ; 22

T°=température ; S : souches

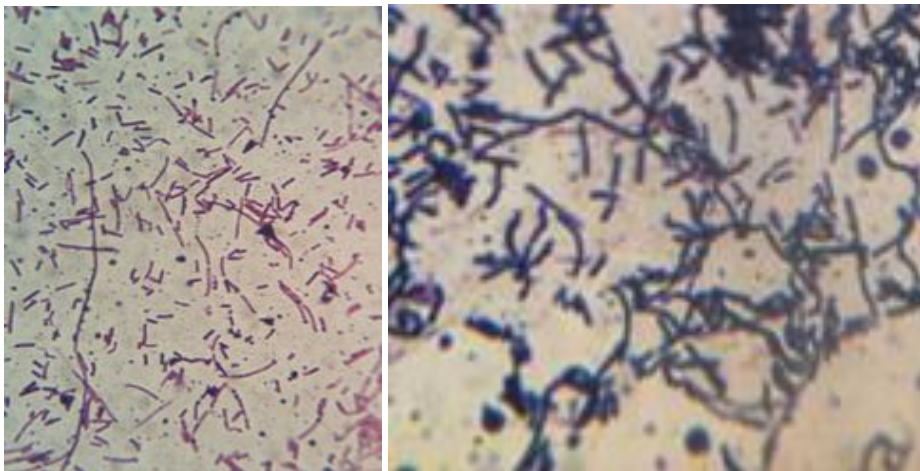
Il est important de remarquer que l'enrichissement des échantillons a augmenté le nombre des colonies des bacilles thermophiles isolés sur boîte de petri dans l'échantillon par un facteur  $> 10$ , certaines boîtes se sont montrées complètement indénombrable **figure 11**.



**Figure 12 :** La différence entre l'aspect des colonies sans enrichissement et avec enrichissement (**SE** : sans enrichissement; **E** : avec enrichissement)

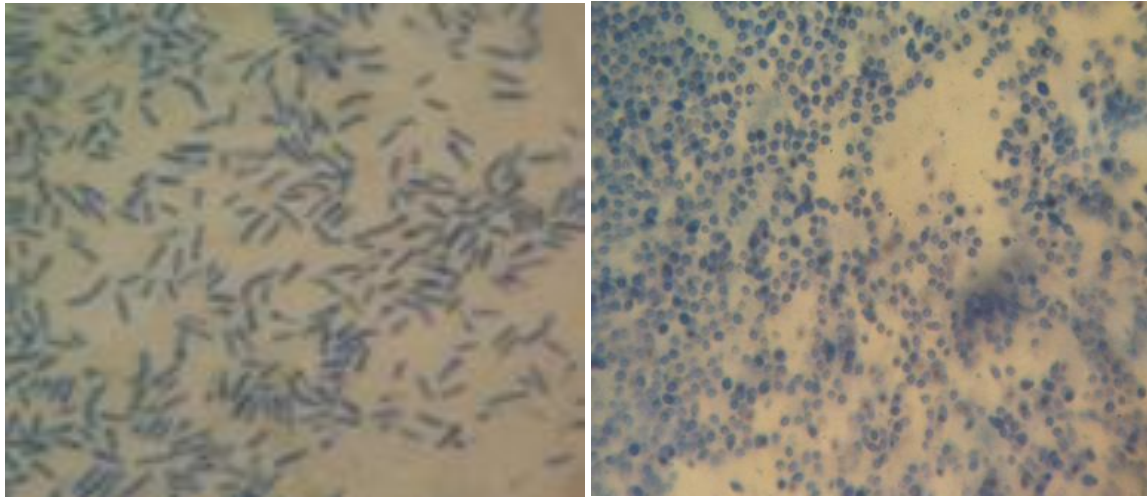
### 1.2. Morphologie cellulaire

L'aspect microscopique observé aussi bien à l'état frais qu'après coloration de Gram, a permis de révéler que toutes les souche se présentent sous formes de bâtonnets de taille variable droits à extrémités arrondies et regroupés sous formes de diplobacille, palissade ou en chainettes, à Gram positifs(**Figure 12**), mobiles ou immobiles avec une endospore ovale centrale ou sub-terminale non déformante. L'autre sont des bacilles fins et longs à spore terminale déformante; ou biens des bacilles fins et longs à spore ovale terminale déformant le sporange. Les résultats sont conformes au trais généraux du genre *Bacillus* et autres genres proches, notamment les bacilles thermophiles décrits dans la littérature (**de VOS et al., 2009**) et (**Madigan et al., 2006**).



**Figure13:** Images des souches après la coloration de Gram sous microscope GX100

L'identification phénotypique comprenant la morphologie des colonies, la forme, le Gram et la mobilité des souches, la production des endospores (**figure 13**), en plus du caractère de catalase lient les souches au genre *Bacillus* et principalement aux groupes 3 de la classification de Gordon qui est basé sur la morphologie de la spore et du sporange. (**Gordon et al., 1973**).



**Figure 14** : Photographie des spores sous microscope photonique à GX100

## 2. Caractères biochimiques

### 2.1. L'étude du type respiratoire

Les résultats du test de la catalase ont montré que toutes les souches analysées sont catalase positives. Toutefois quelques rares souches de sont montrées catalase négatives. La présence de catalase se traduit par la production des bulles de gaz. Ce résultat confirme l'identité des bacilles thermophiles qui font partie de la flore sporogone aérobie

### 2.2. Les résultats de la galerie API 20 E

Les résultats de l'identification par galerie API 20 E sont présentés dans le dans le **tableau 11**. D'après les résultats obtenus on constate qu'un grand nombre des caractères sont négatifs. De ce fait la distinction des souches peut se faire par l'analyse des résultats positifs. D'autre part l'analyse des différents profils biochimiques (biotype) a permis d'orienter vers les espèces appartenant aux genres *Bacillus*, *Geobacillus*, ainsi qu'à l'espèce *Anoxybacillus flavithermis*.

**Tableau 11** : les résultats de l'identification des bacilles thermophiles par la galerie API  
20E

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	Nitrate	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
S1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
S3	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S4	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		-	+	-	+	+
S5	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
S6	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S7	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S8	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
S9	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
S10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S13	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
S14	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S15	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
S16	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
S17	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
S18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S19	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S20	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
S19P	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-



### 2.2.1. Détermination des biotypes

Il est intéressant de remarquer que les 20 souches analysées par galerie API 20 E correspondent à 20 biotypes différents. Toutefois, la différence porte sur 1 seule caractères, parfois. Ce qui indique que ces souches sont phénotypiquement proches.

13 biotypes (**Biotypes** : 1,3,4,5,6,8,9,15,10,13,2,7,14,16) permettent la même orientation aux espèces de *bacillus* comme le montre le **tableau 12**, 10 souches possèdent la  $\beta$ -galactosidase, 8 souche l'arginine dihydrolase et 5 souches le citrate perméase, mais tout les 13souches possèdent la gélatinase, 11 souches réduisent les nitrates en nitrite et produire l'acétoïne. La **figure 14** présente les principaux biotypes.



**Figure 15:** les différents biotypes de bacilles thermophiles identifiés par galerie API 20 E.

Les 4 souches S12, S14, S17, S19 donnent une orientation vers l'espèce *Geobacillus Stearothermophilus*, avec les caractères de la  $\beta$ -galactosidase et l'arginine dihydrolase (S14, S17, S19),gélatinase (S12, S14, S17), production d'acétoïne (S12, S14) et les 4 souches réduisent les nitrates en nitrites.

Tableau12 : les Différents biotypes des souches de bacilles thermophiles

Biotype	Souches	Origine	Espèces
<b>Biotype 1</b>	S1	Dialy	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Biotype3</b>	S3	LPPS	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Biotype4</b>	S4	LPPS	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Biotype5</b>	S5	P0% <sub>1</sub>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Biotype6</b>	S6	P26% <sub>2</sub>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Biotype8</b>	S8	LVPS	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Biotype9</b>	S9	P0% <sub>1</sub>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Biotype15</b>	S15	VCC(C)	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Biotype10</b>	S10	VTP1	<i>Bacillus coagulans</i>
<b>Biotype13</b>	S13	P26% <sub>1</sub>	<i>Bacillus coagulans</i>
<b>Biotype2</b>	S2	VTP1	<i>Bacillus pumilus</i>
<b>Biotype7</b>	S7	P0% <sub>1</sub>	<i>Bacillus pumilus</i>
<b>Biotype14</b>	S14	Dialy	<i>GeobacillusStearothermophilus</i> <i>Anoxybacillus flavithermis</i>
<b>Biotype17</b>	S17	P0% <sub>2</sub>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<b>Biotype16</b>	S16	P26% <sub>2</sub>	<i>Bacillus sporothermodurans</i>
<b>Biotype12</b>	S12	VTP2	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>
<b>Biotype19</b>	S19	VCC(C)	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>
<b>Biotype18</b>	S18	P0% <sub>2</sub>	<i>Anoxybacillus flavithermis</i>
<b>Biotupe19P</b>	S19P	VCC(C)	<i>Anoxybacillus flavithermis</i>
<b>Biotype20</b>	S20	P26% <sub>2</sub>	<i>Anoxybacillus flavithermis</i>

Les souches S18, S19P, S20 permettent une orientation ver *Anoxybacillus flavithermis*, avec les caractères la  $\beta$ -galactosidase et l'arginine dihydrolase, réduisent de nitrate en nitrite et produit l'acétoïne à l'exception de S19P qui est VP négatif.

Les 12 premiers caractères biochimiques définit par la galerie API 20 E (la galactosidase, la gélatinase, la réduction de nitrate, prodction d'acétoïne) sont montrés comme des traits généraux des souches du genre *Geobacillus* et *Anoxybacillus* par **Burgess et al, (2010)** et **Poli et al., (2011)**.

### 2.3. Résultats des activités enzymatiques :

Une recherche de l'activité enzymatique à été réalisés et les résultats sont présentés dans le **tableau 13** et les **figure (16-19)**

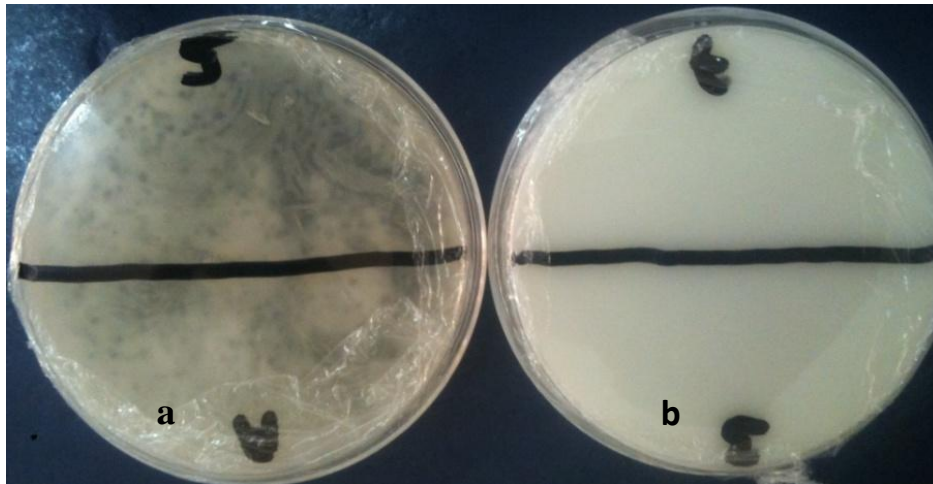
**Tableau 13:** activités enzymatiques des souches isolées

Souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20
Amy	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Prot	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Lip	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Amy : amylase; Prot : protéine; Lip : lipase; + : résultat positif, - : résultat négatif

#### 2.3.1. Activité protéolytique :

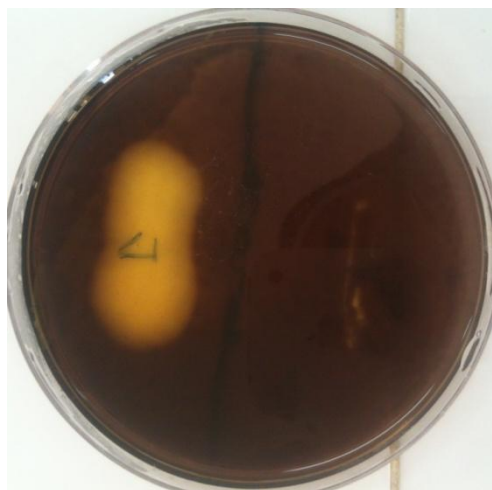
La majorité des souches présentent la caséinase qui est révélée par l'apparition d'une zone de clarification (voire **figure16**). La production de cette protéase par la flore de contamination du lait est responsable d'altération et de défaut de gout et d'arome, ou elle forme la para caséine k et la caséine micellaire qui provoque la déstabilisation et la coagulation du lait (**Chen et al., 2003**). Les bacilles thermophiles produisent des protéases thermostables (**Atasoy et al., 2011**).



**Figure 16 :** Activité protéolytique des souches sur gélose au lait (**a : protéase positif,**  
**b : protéase négatif**)

### 2.3.2. Activité amylolytique :

La majorité des souches possède une amylase qui est révélée sur gélose à l'amidon (voire **figure17**). Les souches qui possèdent l'amylase donnent une zone jaune au tour de strie d'ensemencement autour des colonies.



**Figure 17 :** Activité amylolytique sur gélose à l'amidon

L'activité amylolytique est trouvée chez les bactéries du genre *Bacillus*, elle est considérée comme une variété de stratégies moléculaires pour survivre aux conditions extrêmes (**Bertoldo et Antranikian, 2001 ; Rao et Satyanarayana., 2007**). Des amylases thermostables sont également isolées chez des souches thermophiles du genre *Geobacillus* (**Mok et al., 2013; Narolla et al., 2013**).

### 2.3.3. Activité lypolytique

La majorité des souches étudiées ont la capacité d'hydrolyser le tween 80 qui se traduit par un halo d'opacification autour de la culture. C'est la capacité d'utiliser les lipides comme substrat.



**Figure 18 :** Activité lypolytique des souches sur gélose au tween 80

La lipolyse est également une activité qui provoque des altérations de la qualité organoleptique des produits laitiers. Dans ce contexte il a été montrés une diversité d'enzymes lypolytiques thermostables telle que les estérases chez les espèces thermophiles du genre *Bacillus* qui sont relativement diversifiés dans leur propriétés et des spécificités de substrat (Miettinen et Zhang., 2005). En outre Shamsuzzaman et al (1987) à découvrent les lipases thermostables de *Bacillus.sp* et de *Geobacillus* restent actives dans le lait en poudre même après un séchage par atomisation du lait écrémé (voir figure 18).

les espèces du genre *Bacillus* ou des genres proches peuvent synthétiser une grande variété des enzymes extracellulaires (figure 18) thermostables telle que les protéase, les lipase et les amylases durant la phase stationnaire avant la sporulation (Priest., 1977 ; Chen et al., 2003). Ces enzymes provoquent la détérioration des produits finaux au cours du stockage même si la bactérie est sporulé. Actuellement il existe des techniques chromatographiques permettant la détection de l'activité enzymatique dans le lait et les poudre du lait au court du stockage. (Chen et al 2003).

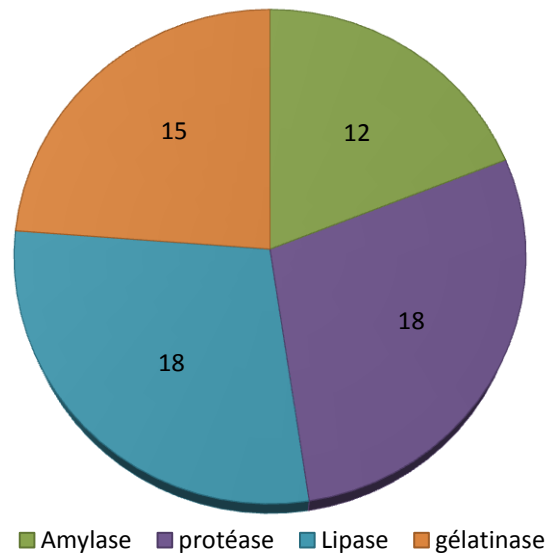


Figure 19 : Répartition des souches selon le pouvoir enzymatique

#### 2.4. Résultats de l'identification par la galerie classique

Les 20 souches ont été identifiées par la galerie classique et le tableau (14) suivant représente les résultats des tests biochimiques classiques.

Tableau 14 : Résultats de la galerie classique.

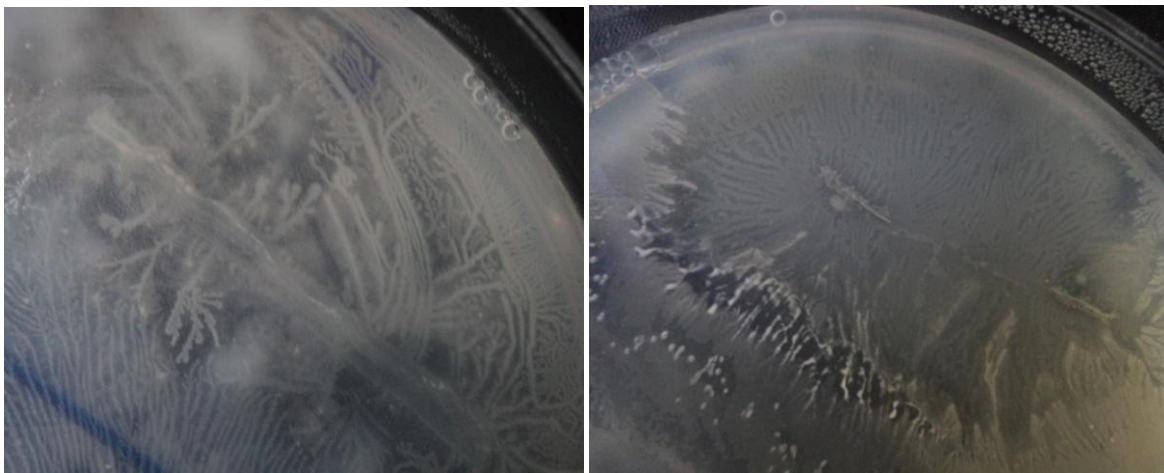
S	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20
Gn	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Sac	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Lac	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Man	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Mb	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
VP	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Cit	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

S : souches; Gn : glucose; Sac : saccharose; Lac: lactose ; Man: mannitol ; Mb : mobilité; Cit: citrate ; VP : production d'acétoine ; + : résultat positif ; - : résultats négatif.

Selon les résultats de la galerie classique des souches on remarque que :

Le pouvoir de dégradation des sucres à 55°C varie d'une souche à une autre. 6 souches sont capables d'utiliser les trois sucres : glucose, lactose et saccharose, les autres montrent des résultats variables.

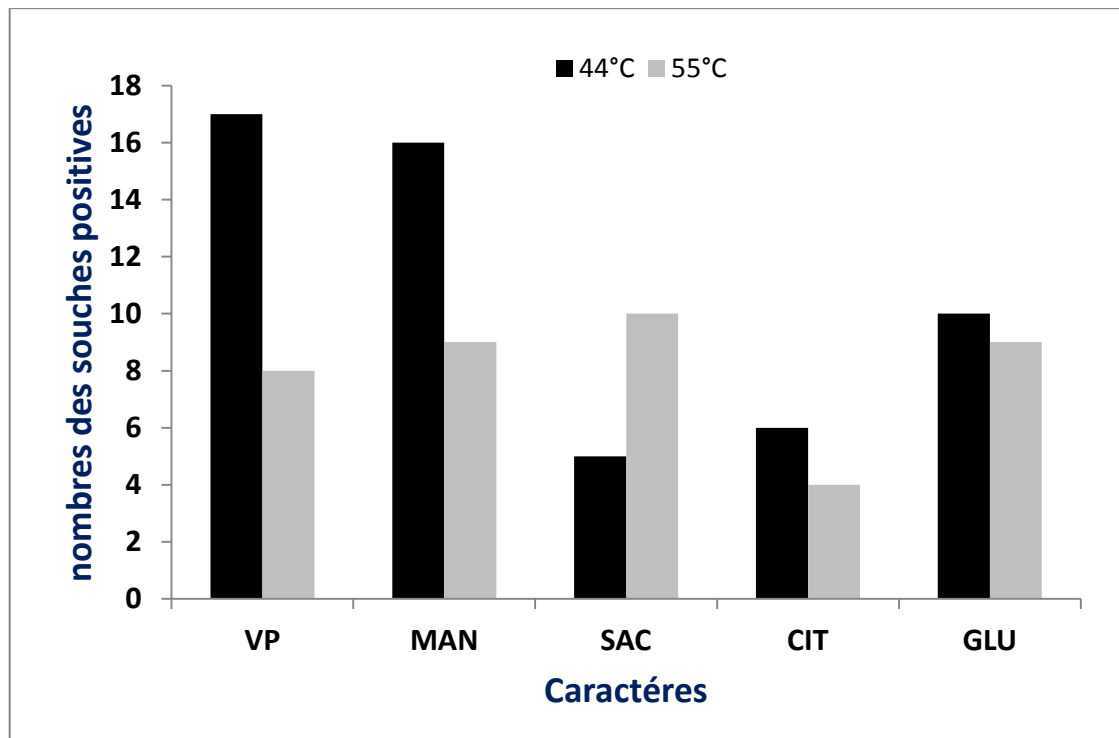
En outre 9 souches ont fermenté le mannitol après une dégradation du mannose du milieu mannitol-mobilité et la plupart des (16) souches sont mobiles. Certaines souches ont montré une mobilité de type swarming sur gélose au lait (**figure 20**).



**Figure 20:** des colonies rhizoïdes formés après le phénomène de « **swarming** » mobilité

Dans la production d'acétoïne, 8 souches sont VP positifs. De même, dans l'utilisation de citrate comme source de carbone 4 souches ont la citrate perméase.

La comparaison entre ces résultats et les résultats de la galerie API 20 E montre une différence importante. Ceci peut-être dû aux deux températures d'incubation différent qui sont à 44°C (galerie API 20 e) et 55°C (galerie classique), permettant la croissance d'espèces différentes par rapport à la température optimale. La **figure 21** montre cette différence entre les souches, en tenant compte du nombre de caractères positifs pour les tests d'identification obtenus par les deux systèmes d'identification.



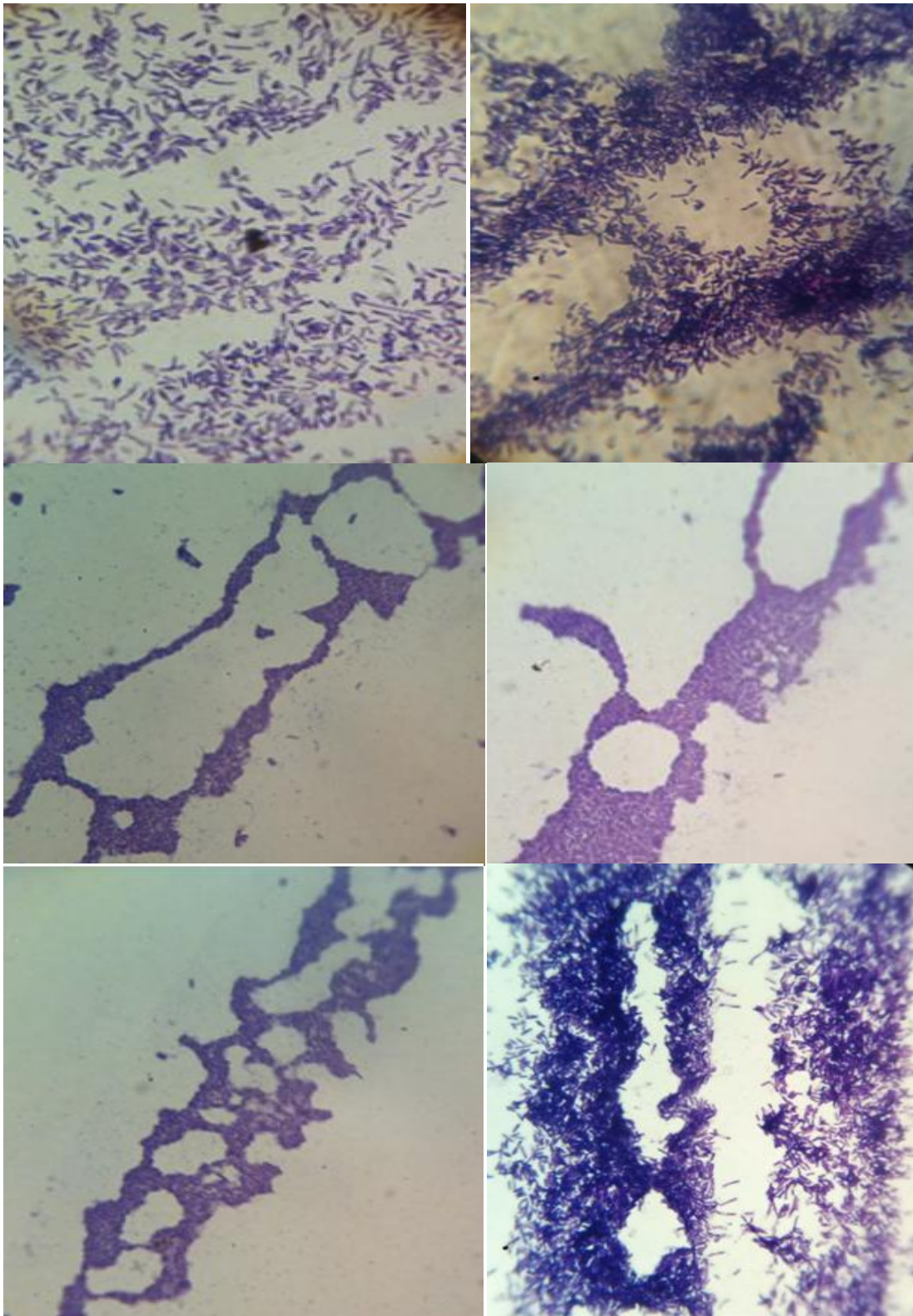
**Figure 21:** Comparaison entre les résultats de la galerie classique (55°C) et de la galerie API 20 E (44°C) (VP : production d'acétoïne ; MAN : mannitol ; SAC : saccharose ; CIT : citrate ; GLU : glucose)

## 1. Formation des biofilm

### 1.1. Caractérisation microscopique de l'adhésion au verre

Les résultats de l'adhésion des cellules végétatives au verre selon la technique microscopique de (Malek..., 2015), sont montrés par la **figure 22**. A première vue, il est facile de constater que ces images sont différentes de celles des frottis colorés pour une quelconque observation microscopique. La disposition des cellules n'est pas anarchique. Celles-ci sont organisées selon des plans ordonnés telle que : la disposition en lignes parallèles avec des déplacements cellulaires entre les deux lignes dans un sens ou dans l'autre, la disposition en cercle avec un regroupement cellulaires. Les cellules dans les lames d'adhésion, donnent l'impression qu'elles sont en mouvements. Ces observations peuvent être expliquées par les différentes interactions entre les cellules et avec le substrat. Les cellules peuvent avoir des charges ioniques différentes; et sont influencée par divers autres interactions telles que les forces de Van Der Waals, les interactions électrostatiques ainsi que plus d'autres.



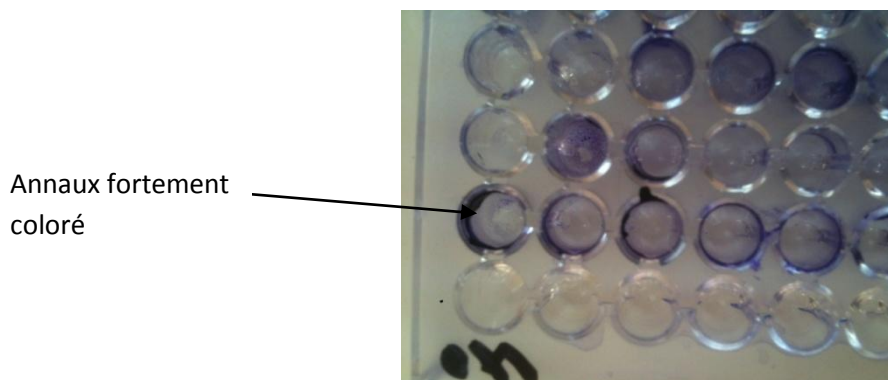


**Figure 22:** Images montrant l'adhésion au verre de cellules végétatives de souches bacilles thermophiles d'origine laitière. (Microscope optique G X100)

## 1.2. Formation de biofilm dans les microplaques de titration

La formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits, est analysée par simple observation à l'œil nu des puits, après une coloration au cristal violet. Alors que les parois des puits sont faiblement colorées, des anneaux fortement colorés sont formés à l'interface du milieu avec l'air (**Figure 23**).

Ces résultats sont conformes à ceux trouvés par **Wijman et al. , (2007)** sur d'autres sporogènes aérobies, notamment le groupe *Bacillus cereus* qui forment des biofilms, préférentiellement aux surfaces exposées à l'air notamment les interfaces des milieux de cultures avec l'air ambiant.



**Figure 23** : formation des biofilm dans la microplaque de titration

L'estimation quantitative du taux de formation des biofilm par les souches thermophiles à 4 températures (37°C, 47°C, 55°C, 65°C) sur le milieu BHIB est obtenue par la mesure de la DO à 630 nm au lecteur de microplaque. D'après les travaux **d'Auger et al (2009)** une DO de 0,5 est la valeur seuil d'estimation du potentiel de formation du biofilm chez *B. cereus*. Si on considère cette échelle, chez les bacilles thermophiles, il est possible de distinguer 4 classes :

- **Classe 1** :  $DO < 0,5$  : Faiblement productrice du biofilm.
- **Classe 2** :  $0,5 < DO < 1,5$  : Moyennement productrice du biofilm.
- **Classe 3** :  $1,5 < DO < 2,5$  : Fortement productrice de biofilm.
- **Classe 4** :  $DO < 2,5$  : Hyper productrice.

Selon les résultats présentés dans les **figures (24-27)**. On peut distinguer plusieurs classes en fonction des températures aux quelles sont formés les biofilms.

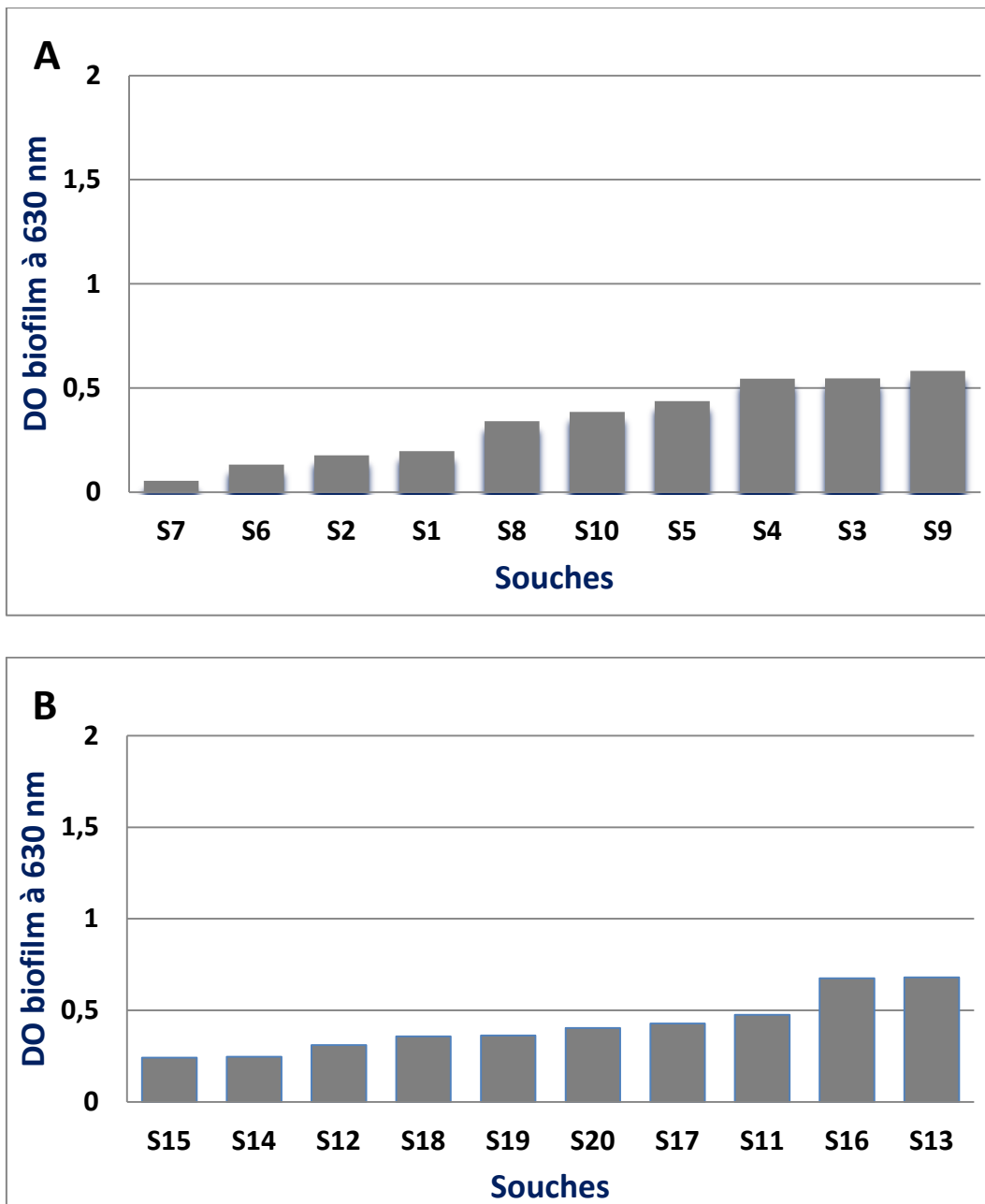


Figure 24 : formation de biofilm par les bacilles thermophiles à 37°C

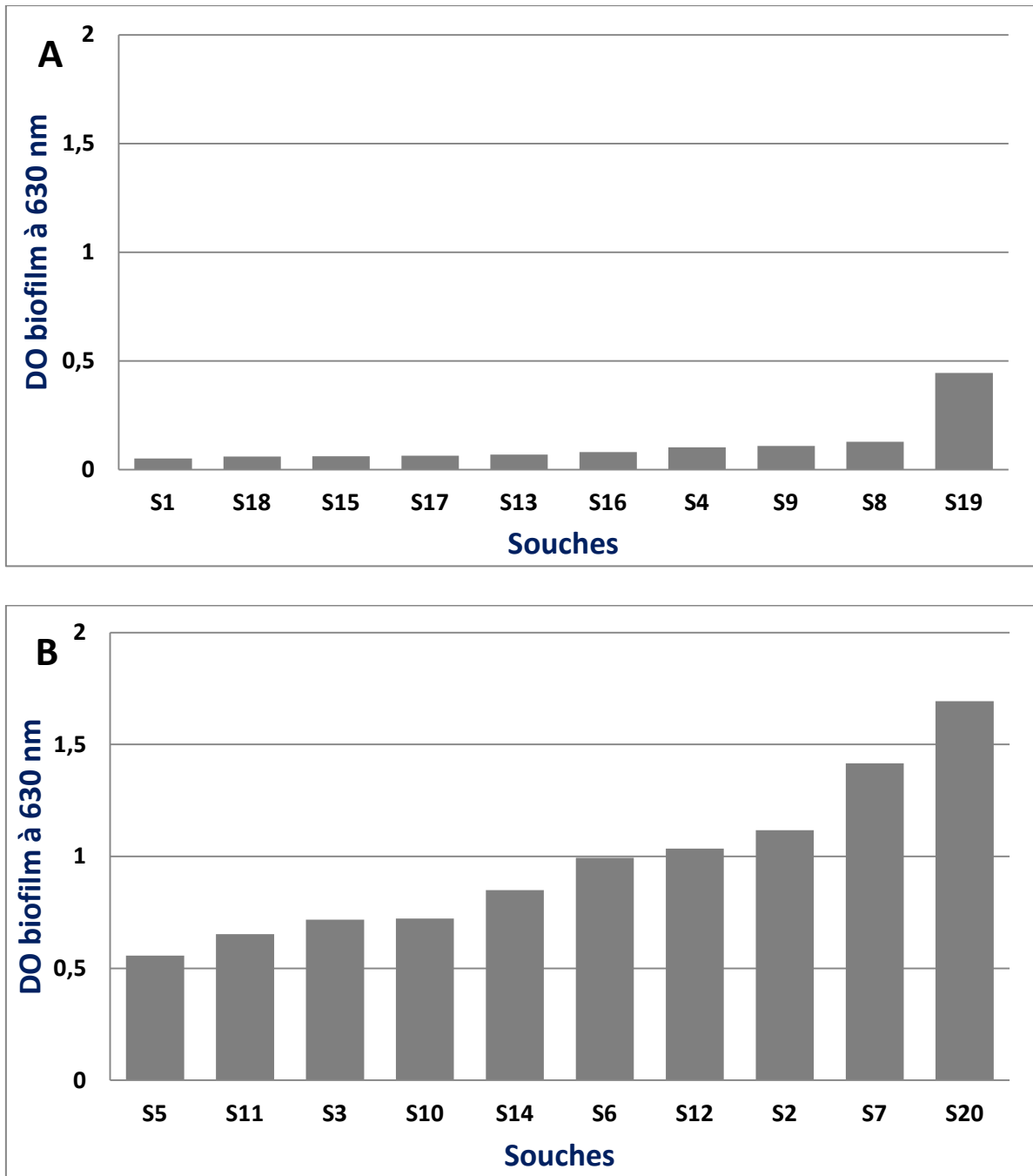


Figure 25 : formation de biofilm par les bacilles thermophiles à 47°C

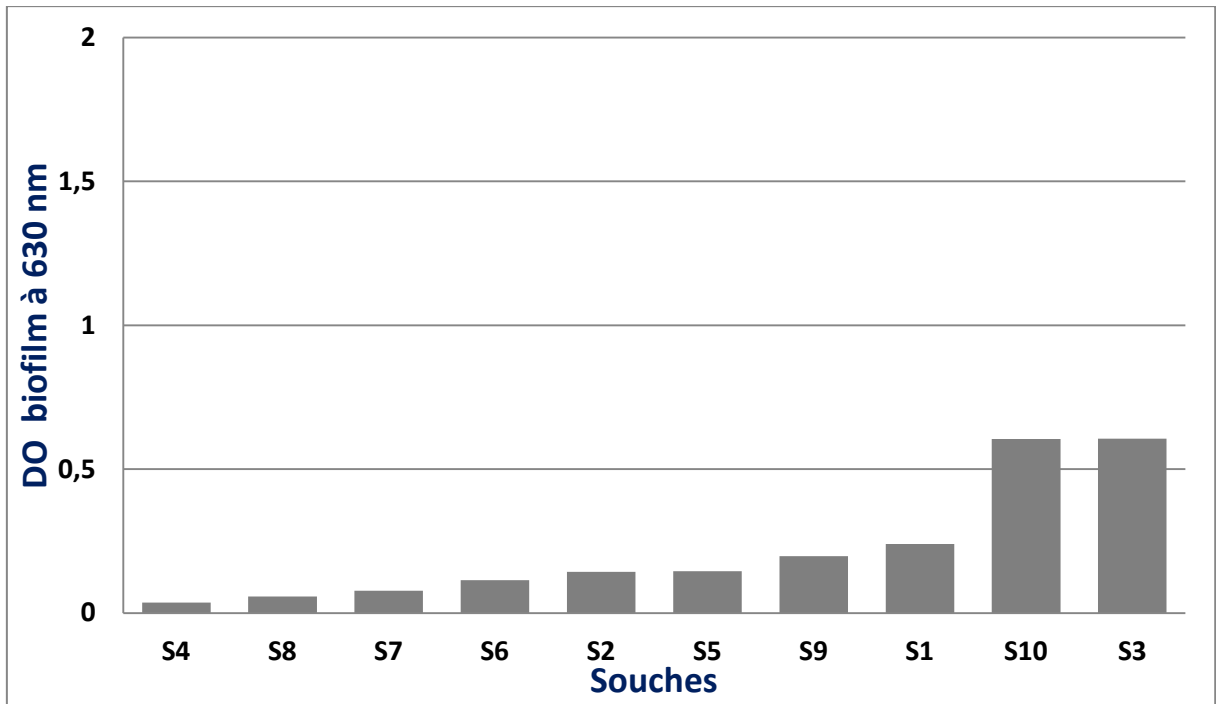


Figure 26 : formation de biofilm par les bacilles thermophiles à 55°C

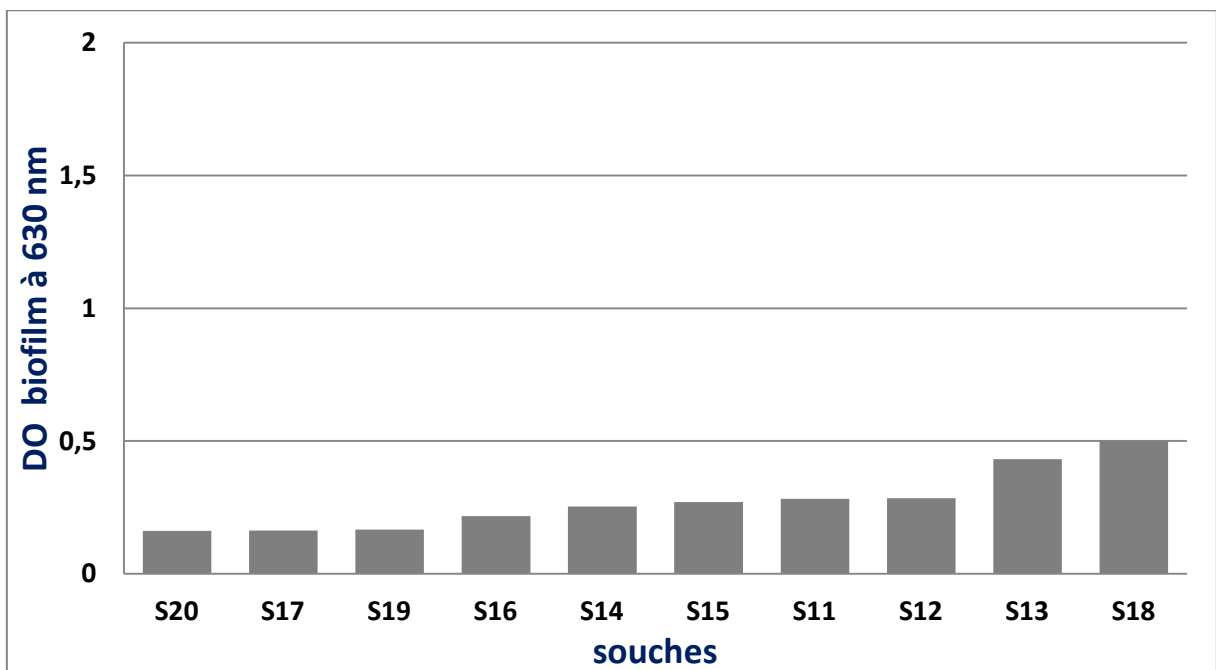


Figure 27: formation de biofilm par les bacilles thermophiles à 65°C

A 30°C les souches se répartissent en trois catégories, la première comprend neuf souches (S7, S6, S2, S1, S8, S15, S14, S12, S18) dont les DO de formation des biofilms sont  $< 0,5$  : elles ont un pouvoir d'adhésion faible.

Les autres souches ont des DO comprises entre 0,5 et 1 ou 1,5 et peuvent être considérées comme des producteurs moyens de biofilm.

Par contre à 47°C, les souches montrent une formation de biofilm importante supérieure à 1,5; la moitié des souches ont une DO inférieure ou égale à 0,5, l'autre moitié ont un pouvoir d'adhésion faible.

La souche S20 avec une DO supérieure à 1,5. Elle est fortement productrice de biofilm.

Tandis que les souches qui ont été isolées à 55°C ou à 65°C sont faiblement productrices de biofilm à ces mêmes températures. Elles ont une DO inférieure à 0,5. Les résultats obtenus par **Burgess (2010)** sont différents une formation importante de biofilm sont obtenus aux températures élevées. Cette différence peut être expliquée d'un part par la différence des souches, d'autre part la technique utilisée.

D'après les résultats présentés dans les 6 graphes, il est possible de dire que, le potentiel de formation de biofilm est influencé par la température et que 47°C est la température optimale de formation du biofilm par certaines souches de bacilles thermophiles isolées du lait liquide ou en poudre.

D'après les résultats obtenus la température pour une production optimale des biofilms par les bacilles thermophiles est 47°C elle est inférieure à leur température optimale de croissance. Ces résultats confirment ceux obtenus par les autres mémoires ayant travaillé dans la même laiterie (**Recherche et caractérisation des bacilles thermophiles dans le lait cru et le lait en poudre., 2013 ; Recherche et caractérisation des bacilles thermophiles dans le lait de vache et le lait reconstitué., 2013; Recherche et caractérisation des bacilles dans les équipements laitiers., 2013**).

### Conclusion générale

Le but fondamental de ce travail basé sur deux aspects : l'un est l'isolement des souches de bacilles thermophiles à partir d'échantillon de la poudre du lait et lait de vache local (matière première) ainsi que à partir de lait pasteurisé et des équipements d'installation laitière de la région de Tlemcen. L'autre point est la caractérisation phénotypique des souches isolées, notamment la détermination de leurs pouvoirs enzymatiques et leur potentiel de formation des biofilms.

Vingt souches sont isolées et retenues pour cette étude. La caractérisation morphologique de ces souches a révélé qu'elles sont des bâtonnets à Gram positif, capable de croître à 55°C et à 65°C et de former les endospores. Elles sont biochimiquement différentes mais partagent quelques caractères entre elles, et sont identifiées aux genres *Bacillus* et *Geobacillus*, ainsi qu'à l'espèce *Anoxybacillus flavithermus*. Elles sont également caractérisées par leur capacité de produire des différents enzymes extracellulaires importante qui provoquent la dégradation du lait au court du stockage.

En outre, une meilleure compréhension du potentiel de formation des biofilms des vingt souches thermophiles dans l'environnement de transformation du lait, est nécessaire pour développer de meilleures mesures de contrôle. La détermination de ce potentiel est réalisée après une observation microscopique de l'adhésion de ces souches au verre, ainsi que l'évaluation de la formation de biofilms dans les microplques à 96 puits, selon la technique au cristal violet. Les résultats obtenus montrent qu'elles se répartissent en trois classes : fortement productrice, moyennement productrice, et faiblement productrice du biofilm. Ces résultats montrent clairement, dans cette laiterie, le passage de ces thermophiles de la matière première et les équipements d'installations au produit fini.

Pour cela des mesures de contrôle doivent être prises pour lutter contre les spores et les biofilms de cette flore thermophile contaminant, telles que :

- Contrôle de la chaîne de fabrication de la matière première jusqu'à produit fini.
- Amélioration de système de nettoyage et de désinfection appliqué par l'unité de production en tenant compte des caractéristiques du contaminant dominant du groupe de thermophile.

# Références



## Références

1. **Abdenouri, N., A. Idlimam, and M. Kouhila.** "Etude hygroscopique du lait en poudre." *Revue des énergies renouvelables* (2009): 35-44.
2. **Amiot . J ;Lapointe-Vignola, Carole.** *Science et technologie du lait: transformation du lait.* Presses inter Polytechnique, 2002.
3. **Anderson, M., Hinds, P., Hurditt, S., Miller, P., McGrowder, D., & Alexander-Lindo, R.** (2011). The microbial content of unexpired pasteurized milk from selected supermarkets in a developing country. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1(3), 205-211.
4. **Arrêté interministériel (1993).** D'après le journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire. N°69 correspondant aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. P 2- 5.
5. **Atasoy, P. Y., Inan, K., Kaçağan, M., Çanakçı, S., & Beldüz, A. O.** (2011). Isolation and characterization of extracellular protease producing *Geobacillus* sp. from various hot springs in Turkey. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, S89.
6. **Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., & Gohar, M.** (2009). Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Applied and environmental microbiology*, 75(20), 6616-6618.
7. **Augustin, Jean-Christophe.** "Challenges in risk assessment and predictive microbiology of foodborne spore-forming bacteria." *Food microbiology* 28.2 (2011): 209-213.
8. **Augustin, M. A., P. T. Clarke, and H. M. Craven.** "Powdered milk: characteristics of milk powders." *Encyclopedia of Food Science and Nutrition* (2003): 4703-4711.
9. **Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., ... & Mafart, P.** (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and a w. *Food microbiology*, 32(1), 79-86.
10. **Beermann, Christopher, and Julia Hartung.** "Current enzymatic milk fermentation procedures." *European Food Research and Technology* 235, no. 1 (2012): 1-12.
11. **Bensafi Mariem Amel.**, « caractérisation des bacilles thermophiles dan le lai cru et en poudre » Univercité Aboubekr Belkaid Tlemcen (2013)

12. **Benyahia Nassima Ilhem.**, « caractérisation des bacilles thermophiles dans les équipements laitiers » Université Aboubekr Belkaid Tlemcen (2013)
13. **Bertoldo, C., Grote, R., & Antranikian, G.** (2001). Biocatalysis under extreme conditions. *Biotechnology Set, Second Edition*, 61-103.
14. **Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., De Buyser, M. L., Collette, C., Garin-Bastuji, B., & Thorel, M. F.** (1997). Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 16(1), 452-471.
15. **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(3), 1012-1018.
16. **Burgess, Sara A., Denise Lindsay, and Steve H. Flint.** "Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing." *International journal of food microbiology* 144.2 (2010): 215-225.
17. **Castro-Ochoa, L. D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., & Ros, R. O.** (2005). Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(6), 648-654.
18. **Chen, L., Tim Coolbear, and Roy M. Daniel.** "Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines." *International dairy journal* 14.6 (2004): 495-504.
19. **Chen, X. G., Stabnikova, O., Tay, J. H., Wang, J. Y., & Tay, S. T. L.** (2004). Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. *Extremophiles*, 8(6), 489-498.
20. **Chouti fadia.**, « caractérisation des bacilles thermophiles dans le lait recombinaé et le lait de vache » Université Aboubekr Belkaid Tlemcen (2013)
21. **Costerton, J. W.** (2007). *The biofilm primer* (Vol. 1). Springer.
22. **Costerton, J. William.** "Phenotypic plasticity in bacterial biofilms as it affects issues of viability and culturability." *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Springer US, 2000. 131-145.
23. **Crabb, J. W., A. L. Murdock, and R. E. Amelunxen.** "A proposed mechanism of thermophily in facultative thermophiles." *Biochemical and biophysical research communications* 62.3 (1975): 627-633.

24. **CROSSLEY, EL.** "Modern dairy science." *Journal of the Royal Society of Arts* (1970): 402-413.
25. **Deeijing, S., Yoshimune, K., Lumyong, S., & Moriguchi, M.** (2005). Purification and characterization of hyperthermotolerant leucine aminopeptidase from *Geobacillus thermoleovorans* 47b. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(7), 269-276.
26. **Delgado, S., Rachid, C. T., Fernández, E., Rychlik, T., Alegría, Á., Peixoto, R. S., & Mayo, B.** (2013). Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food microbiology*, 36(1), 103-111.
27. **Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., ... & Wang, L.** (2007). Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5602-5607.
28. **Flint, S. H., P. J. Bremer, and J. D. Brooks.** "Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control." *Biofouling* 11.1 (1997): 81-97.
29. **Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., & Crawford, R.** (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, 90(2), 151-157.
30. **Fooladi, J., & Sajjadian, A.** (2010). Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable  $\alpha$ -amylase producing strain. *Iranian journal of microbiology*, 2(1), 46.
31. **Forterre, Patrick, Simonetta Gribaldo, Daniele Gadelle, and Marie-Claude Serre.** "Origin and evolution of DNA topoisomerases." *Biochimie* 89, no. 4 (2007): 427-446.
32. **Garcia, J. L., Bensoussan, M., Bianchi, A., & Mandel, M.** (1982). Taxonomie numérique de *Bacillus* thermophiles isolés de sols de rizière de l'Afrique de l'Ouest. *Annales de Microbiologie de l'Institut Pasteur (Paris) A*, 133, 471-488.
33. **Ghosh, Sonali, and Peter Setlow.** "Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species." *Journal of bacteriology* 191.6 (2009): 1787-1797.
34. **Gleeson, David, Aine O'Connell, and Kieran Jordan.** "Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk-tank milk." *Irish Journal of Agricultural and Food Research* (2013): 217-227.

35. **Gordon, R. E., Haynes, W. C., Pang, C. H. N., & Smith, N. R.** (1973). The genus bacillus.
36. **Hassan, Ashraf N., Joseph F. Frank, and Karsten B. Qvist.** "Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy." *Journal of Dairy Science* 85.7 (2002): 1705-1708.
37. **Heinemann, U., & Saenger, W.** (1982). Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1–2'-guanylic acid complex: an X-ray study.
38. **Heyndrickx, M., & Scheldeman, P.** (2002). Bacilli associated with spoilage in dairy products and other food. *Applications and systematics of Bacillus and relatives*, 64-82.
39. **Hobbs, Betty C., and Muriel E. Smith.** "Outbreaks of paratyphoid B fever associated with imported frozen egg. II. Bacteriology." *Journal of Applied Bacteriology* 18.3 (1955): 471-477.
40. <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>
41. **Jabbour, D., Sorger, A., Sahm, K., & Antranikian, G.** (2013). A highly thermoactive and salt-tolerant  $\alpha$ -amylase isolated from a pilot-plant biogas reactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(7), 2971-2978.
42. **James, G. A., Beaudette, L., & Costerton, J. W.** (1995). Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(4), 257-262.
43. **Johnson, J. M., and Charles Warren Hooper.** "Antineuritic vitamine in skim milk powder." *Public Health Reports (1896-1970)* (1921): 2037-2043.
44. **Jouve, Jean-Louis.** "HACCP as applied in the EEC." *Food Control* 5.3 (1994): 181-186.
45. **Kumari, S., & Sarkar, P. K.** (2014). In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control*, 36(1), 153-158.
46. **Kumari, Sarita, and Prabir K. Sarkar.** "In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology." *Food Control* 36.1 (2014): 153-158.
47. **Lanyi, B.** (1987). Classical and rapid identification methods for medically important. *Method Microbiol*, 19(1).
48. **Lindsay, D., V. S. Brözel, and A. Von Holy.** "Spore formation in *Bacillus subtilis* biofilms." *Journal of Food Protection*® 68.4 (2005): 860-865.
49. **Logan, Niall A.** "The Genus *Geobacillus*." *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, 2014. 133-147.

50. **Luu, Stephanie, and Peter Setlow.** "Analysis of the loss in heat and acid resistance during germination of spores of Bacillus species." *Journal of bacteriology* 196.9 (2014): 1733-1740.
51. **Madigan, M. T.** (2006). The family heliobacteriaceae. In *The prokaryotes* (pp. 951-964). Springer US.
52. **Malek, F., Boudjemaa, B. M., Aouar-Métri, A., & Kihal, M.** (2013). Identification and genetic diversity of Bacillus cereus strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. *Dairy Science & Technology*, 93(1), 73-82.
53. **McGUIGGAN, J. A. M. E. S., ARTHUR GILMOUR, and LORNA M. LAWRENCE.** "Factors influencing the recovery of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic Bacillus spp from bulk raw milk." *International Journal of Dairy Technology* 47.4 (1994): 111-116.
54. **Mok, S. C., Teh, A. H., Saito, J. A., Najimudin, N., & Alam, M.** (2013). Crystal structure of a compact  $\alpha$ -amylase from Geobacillus thermoleovorans. *Enzyme and microbial technology*, 53(1), 46-54.
55. **Myszka, K., & Czaczyk, K.** (2011). Bacterial biofilms on food contact surfaces-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), 173-180.
56. **Nasrollahi, S., Golalizadeh, L., Sajedi, R. H., Taghdir, M., Asghari, S. M., & Rassa, M.** (2013). Substrate preference of a Geobacillus maltogenic amylase: a kinetic and thermodynamic analysis. *International journal of biological macromolecules*, 60, 1-9.
57. **Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... & Ivanov, M. V.** (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of Geobacillus subterraneus gen. nov., sp. nov. and Geobacillus uzenensis sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus thermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermodenitrificans to Geobacillus as the new combinations G. stearothermophilus, G. th. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433-446.

58. **Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P.** (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548-572.
59. **Niederberger, T. D., Ronimus, R. S., & Morgan, H. W.** (2008). The microbial ecology of a high-temperature near-neutral spring situated in Rotorua, New Zealand. *Microbiological research*, 163(5), 594-603.
60. **Norme marocain., 2004. 08.0.109.** Microbiologie alimentaire –Dénombrement des Enterobacteriaceae par comptage des colonies à 30°C.
61. **O'Connor, F., B. M. McKenna, and A. C. O'Sullivan.** "Bacteriological and whey protein denaturation aspects of heating processes used in the manufacture of low-heat skim-milk powder." *Irish Journal of Agricultural Research* (1969): 417-430.
62. **O'Dwyer, Thomas.** "Determination of the optimum number, location and size of dairy manufacturing plants." *Irish Journal of Agricultural Economics and Rural Sociology* (1968): 267-281.
63. **O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R.** (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
64. **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(1), 110-116.
65. **Pasvolsky, Ronit, et al.** "Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species." *International journal of food microbiology* 181 (2014): 19-27.
66. **Petrus, R. R., C. G. Loiola, and C. A. F. Oliveira.** "Microbiological shelf life of pasteurized milk in bottle and pouch." *Journal of food science* 75.1 (2010): M36-M40.
67. **Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., ... & Laurinavichius, K.** (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. *International Journal of Systematic and evolutionary microbiology*, 50(6), 2109-2117.
68. **Poli, A., Laezza, G., Gul-Guven, R., Orlando, P., & Nicolaus, B.** (2011). *Geobacillus galactosidasius* sp. nov., a new thermophilic galactosidase-producing bacterium isolated from compost. *Systematic and applied microbiology*, 34(6), 419-423.

69. **Ponce, Adrian, Stephanie A. Connon, and Pun To Yung.** "Detection and viability assessment of endospore-forming pathogens." *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*. Springer New York, 2008. 481-523.
70. **Postollec, F., Bonilla, S., Baron, F., Jan, S., Gautier, M., Mathot, A. G., ... & Sohler, D.** (2010). A multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food. *International journal of food microbiology*, 142(1), 78-88.
71. **Priest, Fergus G.** "Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*." *Bacteriological reviews* 41.3 (1977): 711.
72. **Rao, JL Uma Maheswar, and T. Satyanarayana.** "Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming  $\alpha$ -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications." *Bioresource Technology* 98.2 (2007): 345-352.
73. **Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. W.** (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International journal of food microbiology*, 85(1), 45-61.
74. Satyanarayana, T., Sharma, A., Mehta, D., Puri, A. K., Kumar, V., Nisha, M., & Joshi, S. (2012). Biotechnological applications of biocatalysts from the firmicutes *Bacillus* and *Geobacillus* species. In *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology* (pp. 343-379). Springer Netherlands.
75. **Schleifer, Karl-Heinz.** "Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5)." *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer New York, 2009. 19-1317.
76. **Setlow, P.** (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology*, 6(6), 550-556.
77. **Setlow, Peter.** "Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know." *Journal of bacteriology* 196.7 (2014): 1297-1305.
78. **Shamsuzzaman, Kazi, Wayne Modler, and Robin C. McKellar.** "Survival of lipase during manufacture of nonfat dry milk." *Journal of Dairy Science* 70.4 (1987): 746-751.
79. **Simões, Manuel, Lúcia C. Simões, and Maria J. Vieira.** "A review of current and emergent biofilm control strategies." *LWT-Food Science and Technology* 43.4 (2010): 573-583

80. **Stewart, P. S.** (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107-113
81. **Switt, A. I. M., Andrus, A. D., Ranieri, M. L., Orsi, R. H., Ivy, R., den Bakker, H. C., & Boor, K. J.** (2014). Genomic comparison of sporeforming bacilli isolated from milk. *BMC genomics*, 15(1), 26.
82. **Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Hoekstra, J., & Rombouts, F. M.** (1995). Germination of bacterial spores during sample preparation. *Food microbiology*, 12, 327-332.
83. **Twomey, M., Keogh, M. K., O'Kennedy, B. T., & Mulvihill, D. M.** (2002). Seasonal effects of some milk powder characteristics on the rheology of milk chocolate. *Irish journal of agricultural and food research*, 105-116.
84. **Vandercammen M.,** (2011). Quel lait choisir crioc centre de recherche et d'information des organisation de consommateurs. 015-11. P1-3.
85. **Vos P. D & Logan, N. A.** (2009). Bacillus. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
86. **Walker, N. E.** (2012). PHYSIOLOGICAL AND GENETIC FACTORS AFFECTING TRANSFECTION AND TRANSFORMATION IN BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS. *Biochemistry of Thermophily*, 127.
87. **Ward, O. P., and M. Moo-Young.** "Thermostable enzymes." *Biotechnology advances* 6.1 (1988): 39-69.
88. **Wijman, J. G., de Leeuw, P. P., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T.** (2007). Air-liquid interface biofilms of Bacillus cereus: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and environmental microbiology*, 73(5), 1481-1488.
89. **Zhao, Y., Caspers, M. P., Metselaar, K. I., de Boer, P., Roeselers, G., Moezelaar, R., & Kort, R.** (2013). Abiotic and microbiotic factors controlling biofilm formation by thermophilic sporeformers. *Applied and environmental microbiology*, 79(18), 5652-5660.



# Annexe

- **Trypticase soja agar (TSA)**

Poudre déshydraté	40g
Eau distillée	1000ml

- **Tryptone-sel-eau (TSE)**

Eau distillée	1000ml
NaCl	8.5g
Tryptone	1g

- **Eau physiologie**

Eau distillée	1000 ml
NaCl	1g

- **Solution dissolvent**

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

- **Gélose à l'amidon**

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

- **Milk agar**

Poudre de lait	5g
Eau distillée (a)	50ml
Agar	2g
Eau distillée (b)	50 ml

- **Gélose au tween**

Milieu TSE	200ml
Tween	80 gouttes

- **Cristal violet**

Cristal violet	2g
Eau distillée	100ml

- **Origine des souches**

Souches	Origines	Date de prélèvements
S1	DLY	07/04/2015
S2	VTP1	09/03/2015
S3	LPPS	09/03/2015
S4	LPPS	09/03/2015
S5	P0%	09/03/2015
S6	P26%	07/04/2015
S7	P0%	09/03/2015
S8	LVPS	05/04/2015
S9	P0%	09/03/2015
S10	VTP1	09/03/2015
S11	VCC	09/03/2015
S12	VTP2	09/03/2015
S13	P26%	09/03/2015
S14	DLY	07/04/2015
S15	LVPS	05/04/2015
S16	P26%	07/04/2015
S17	P0%	07/04/2015
S18	P0%	07/04/2015
S19	VCC(C)	07/04/2015
S20	P26%	07/04/2015
S21	P26	07/04/2015
S22	VCC	09/03/2015
S23	DILY	07/04/2015
S24	P0%	07/04/2015
S25	LVPS	05/04/2015
S26	P0%	12/04/2015
S27	LVPS	05/04/2015
S28	DLY	07/04/2015
S29	VTP2	09/03/2015
S30	VTP2	09/03/2015
S31	VTP2	09/03/2015
S32	VTP2	09/03/2015

### Résumé

Cette étude porte sur l'identification et la caractérisation des bacilles thermophiles dans une laiterie de la région de Tlemcen.

Les bacilles thermophiles ont été isolés, dans toute la chaîne de production du lait pasteurisé. Selon les taux de contamination obtenus les produits analysés se classent comme suit : la poudre de lait, le lait pasteurisé et le lait de vache local. Sur la base de caractères morphologiques et biochimiques, les souches isolées ont été identifiées aux genres : *Bacillus* et *Geobacillus* ainsi qu'à l'espèce *Anoxybacillus flavithermus*.

Ces bacilles thermophiles sont également caractérisés par la production d'enzymes extracellulaires : protéases, amylases et lipases, traduisant un potentiel important de dégradation des constituants du lait et d'altération de la qualité du lait pasteurisé.

La technique de coloration au cristal violet a montré que les souches testées sont également caractérisées par un grand potentiel d'adhésion au verre et de formation de biofilm dans les microplaques en polystyrène.

Ces résultats montrent la contamination du lait liquide et en poudre par les bacilles thermophiles et soulignent le problème des spores et de leur biofilm dans l'industrie laitière.

### Abstract

This study based on the identification and characterization of thermophilic bacilli at a dairy industry in Tlemcen.

Thermophilic bacilli were isolated, to the pasteurized milk production line. According contamination rates obtained products analyzed rank are as follows: powdered milk, pasteurized milk and milk from local cows. With a morphological and biochemical characters, the isolates were identified to the genus *Bacillus* and *Geobacillus* as well as to the species *Anoxybacillus flavithermus*.

These thermophilic bacilli are also characterized by the production of extracellular enzymes: protease, amylase and lipase, reflecting significant potential for degradation of milk components and impaired quality of pasteurized milk.

The technique of crystal violet staining showed that the tested strains are also characterized by a great potential for glass adhesion and biofilm formation in polystyrene microplates. These results show contamination of liquid and powder milk by thermophilic bacilli and spores highlight biofilm the problem and there in the dairy industry.