

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار تليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Microbiologie environnementale et  
Infectieuse*

**THEME**

---

**Etude de la thermorésistance de spores de *Bacillus spp* isolées à  
partir du lait de vache cru commercialisé dans la ville de  
Laghouat**

---

**Présenté par : KARROUCHE Saadia**

**Devant le jury :**

**Président(e) : BOUKEROUIS Djoudi**

**Examineur(riche)s : GACEM Mohammed Amine**

**Rapporteur : ZIANE Mohammed**

**Co-Rapporteur : RAHMANI Mokhtar Mohammed**

*Promotion : juin – 2017*



## *Dédicace*

*Nous rends grâce à **dieu** de nous avoir donné  
la force, la patience, le courage et la volonté  
pour élaborer ce travail.*

*Je dédie ce modeste mémoire à chère ma Grand- mère **Dehaiba** que  
dieu te prête longue vie et **mes parents** en témoignage de ma  
connaissanc pour leur patience, leur sacrifice et leur  
soutien toute au long de mes études.*

*Sans oublier mes cher frère et sœur: **abdo** et **Raihane***

*A tous mes chers oncles et tantes : **Benaissa, Said,**  
**Ahmed, Belkacem, Omar, Suad, Fatma, et Saida .***

*Je dédie à mon cher ami : **Kouili Fatima.***

*A mes cousines : **Halima, Asmaa, Aicha, Fatima, Mariam***

*A Toute la famille **kerrouche** ainsi que la famille **Chibani**  
pour lesquelles J'éprouve beaucoup  
d'affection et de respect*

*A Tous mes collègues de la spécialité Microbiologie.*

***Saadia.K***



# **Remerciement**

*En premier, je remercie le bon **Dieu** le tout puissant qui m'a  
donné le courage et la volonté dans ma réussite.*

*J'exprime mes remerciements les plus distingués à mon  
professeur et encadreur **Mr Zaine Mohammed** maître de conférences classe A,  
de centre universitaire de Ain Témouchent, en reconnaissance de sa compétence,  
de son dévouement et de ses conseils judicieux qui m'ont été d'un grand soutien  
moral et qui m'ont amené à réaliser ce travail.*

*Et à mon co-incadereurs **Mr MOKHTAR RAHMANI Med** Maître-Assistant A  
pour ses précieux conseils, ses encouragements, sa compréhension et  
toute l'attention accordée à ce travail et à ma personne.*

*Je tiens également à exprimer mes remerciements à tous les membres du  
jury, désigné parmi les enseignants du département de biologie,  
**université de Laghouat**, d'avoir accepté d'examiner mon travail.*

*Sans oublier de remercier tous mes enseignants de département de biologie,  
qui ont contribué à ma formation durant mon parcours universitaire.*

*Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près  
pour l'élaboration de ce travail*

## الملخص

البكتيريا العصوية هي بكتيريا متواجدة في كل مكان، كما وجدت في العديد من الأطعمة بما في ذلك حليب البقر الذي يعتبر وسيلة مثالية للنمو الميكروبي. البكتيريا العصوية تتسبب في اتلاف الاغذية او تؤدي الى حالات مرضية. يهدف هذا العمل إلى العثور على هذه البكتيريا في الحليب المباع في الأغواط، ومن ثم تقييم مقاومتها للحرارة. اظهرت النتائج تلوث مع متوسط تلوث 3 لوغو (كفو / مل). تم (80min) % من 11 عينة التي تم تحليلها بعد التسخين (80 درجة مئوية / 10 الحصول على مجموعه 11 العزلة. 5 عزلات فقط تم تسخينها في درجات حرارة مختلفة. أظهرت هذه العزلات مقاومة مرتبطة بالعزل. في النهاية يمكن استخدام نتائج هذا العمل بعد التحديد الوراثي للعزلات والبيانات (D حرارية متغيرة (قيم إلى وضع نموذج لتقييم التعرض للخطر البكتيري المتواجد.

الكلمات المفتاحية : حليب البقرة، البكتيريا العصوية، مقاومة الحرارة، لتقييم التعرض للخطر

## Résumé

*Bacillus* spp. sont des bactéries ubiquitaires rencontrées dans plusieurs aliments notamment le lait de vache qui considéré comme milieu idéal pour toute croissance microbienne. Elles peuvent être soit une flore d'altération et/ou pathogène. Ce travail vise à rechercher et à dénombrer ces bactéries dans le lait vendu à Laghouat, ensuite, à évaluer leur thermoresistance. De ce fait, la prévalence de contamination de 11 échantillons du lait analysés après traitement thermique à 80°C/10min était de 80% avec une contamination moyenne de 3 log (ufc/mL). Au total 11 isolats ont été obtenu dont 5 étaient testés vis-à-vis la température. Ces isolats ont montré une thermorésistance (D values) variable qui dépend de l'isolat. Les résultats de ce travail peuvent être utilisés après l'identification moléculaire des isolats comme donnée à l'élaboration d'un modèle d'évaluation d'exposition au *B. cereus* s'il existe.

**Mots-clés :** Lait de vache, *Bacillus*, thermo-résistance, évaluation de l'exposition.

## Abstract

*Bacillus* spp. are ubiquitous bacteria found in several foods including cow's milk which is considered an ideal medium for microbial growth. The *Bacillus* spp are a flora of alteration and / or a pathogen. This work aims to find and count these bacteria in the milk sold in Laghouat, and then to evaluate their heat resistance. As a result, the contamination prevalence of 11 milk samples analyzed after heating (80 °C/10min) was 80% with an average contamination of 3 log (cfu/mL). A total of 11 isolates were obtained which 5 were heated at different temperatures. These isolates showed a variable heat resistance (D values) which depends on the isolate. The results of this work can be used after the molecular identification of the isolates as data to the setting a model of exposure evaluation of *B. cereus* if it exists.

**Keys words :** cow's milk, *Bacillus*, heat resistance, exposure assessment

## Sommaire

<i>Liste des abréviations</i>	<i>i</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>ii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>iv</i>
INTRODUCTION	1

### CHAPITRE I

#### Généralités sur le lait de vache

<b>I. 1. Généralité sur le lait</b>	<b>3</b>
I. 1. 1. <i>Définition du lait</i>	<b>3</b>
<b>I. 2. Types du lait</b>	<b>3</b>
<b>I. 3. Composition biochimique du lait</b>	<b>4</b>
<b>I. 4. Qualités du lait de vache</b>	<b>4</b>
1. 4. 1. <i>Qualités du lait de vache</i>	<b>4</b>
1. 4. 2. <i>Qualité physico-chimique</i>	<b>4</b>

### CHAPITRE II

#### Microbiologie du lait de vache

<b>II. 1. Microbiologique du lait cru de vache</b>	<b>6</b>
II.1.1. Flore indigène ou originelle	<b>6</b>
II. 1.2. Flore de contamination	<b>6</b>
II. 1.2.1. <i>Flore d'altération</i>	<b>7</b>
II. 1.2.2. <i>Flores pathogènes</i>	<b>8</b>
II.1.2. 3. <i>Flore thermorésistante</i>	<b>8</b>
<b>II. 2. Principales activités des microorganismes dans le lait</b>	<b>9</b>
II. 2. 1. <i>Acidification</i>	<b>9</b>
II. 2. 2. <i>Protéolyse</i>	<b>9</b>
II. 2. 3. <i>Lipolyse</i>	<b>10</b>
II. 2. 4. <i>Production de gaz</i>	<b>10</b>

### CHAPITRE III

#### Bactéries aérobies mésophiles sporulées *Bacillus spp*

<b>III. 1. Genre de <i>Bacillus spp</i></b>	<b>11</b>
<b>III. 2. Taxonomie de <i>Bacillus</i></b>	<b>11</b>
III. 2. 1. <i>Caractéristiques du genre de <i>Bacillus</i></i>	<b>11</b>

III. 2. 2 <i>Classification du genre Bacillus</i>	11
III. 2. 3 <i>Principaux caractères d'identification biochimique</i>	12
<b>III. 3. Spores du Bacillus spp</b>	<b>13</b>
III. 3. 1 <i>Structure des spores</i>	14
III. 3. 2 <i>Sporulation</i>	16
III. 3. 4 <i>Germination</i>	18
III. 3. 5 <i>Thermorésistance de Bacillus spp</i>	18
<b>III. 4. Pathogénicité du Bacillus spp</b>	<b>19</b>
III. 4. 1 <i>Bacillus anthracis</i>	19
III. 4. 2 <i>Bacillus cereus</i>	19
<b>IV. MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>IV. 1. Echantillonnage du lait de vache cru</b>	<b>20</b>
<b>IV. 2. Prélèvement des échantillons du lait de vache cru</b>	<b>21</b>
<b>IV. 3. Transport des échantillons</b>	<b>21</b>
<b>IV. 4. Recherche, dénombrement de Bacillus spp aérobies mésophiles</b>	<b>21</b>
<b>IV. 5. Confirmation de la pureté des isolats</b>	<b>22</b>
<b>IV. 6. Production et conservation des spores de Bacillus spp</b>	<b>23</b>
<b>IV. 7. Etude de la thermorésistance de spores des isolats</b>	<b>23</b>
<b>IV. 8. Dénombrement de spores de Bacillus spp</b>	<b>24</b>
<b>IV. 9. Détermination des paramètres de la thermorésistance</b>	<b>24</b>
<b>V. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>V. 1. Isolements et purifications des isolats</b>	<b>25</b>
V. 1. 1 <i>Aspect macroscopique de purification</i>	25
V. 1. 2 <i>Aspect microscopique</i>	25
<b>V. 2. Dénombrement de Bacillus spp</b>	<b>26</b>
<b>V. 3. Etude de la thermorésistance des spores bactériennes</b>	<b>27</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>28</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>29</b>
<b>Annexes</b>	<b>35</b>

### *Liste des abréviations*

**°D** : degré Dornic

**ADN** : L'acide désoxyribonucléique

**BHI** : Brain-heart infusion

**D** : le temps de réduction décimale

**DPA** : Acide dipicolinique

**FAO** : Food Agriculture Organisation

**SASP** : Small Acid-Soluble Protein

## ***Liste des figures***

<b><i>Figure 01</i></b> : Schéma général de la structure de la spore bactérienne	15
<b><i>Figure 02</i></b> : Schéma simplifié des étapes du cycle de sporulation et de germination chez <i>B. subtilis</i>	16
<b><i>Figure 03</i></b> : Illustration de points de ventes et de prélèvement du lait de la ville de Laghouat	20
<b><i>Figure 04</i></b> : Echantillons du lait traité à 80°C pendant 10 min sans aucune altération organoleptique	22
<b><i>Figure 05</i></b> : Aspect macroscopique des isolats de <i>Bacillus spp</i> sur milieu nutritif gélosé	25
<b><i>Figure 06</i></b> : Observation microscopique des cellules de <i>Bacillus spp</i> .	26

## ***Liste des tableaux***

<b><i>Tableau 01</i></b> : Composition du lait de différentes espèces animales	4
<b><i>Tableau 02</i></b> : Composition physico-chimique moyenne du lait de vache	5
<b><i>Tableau 03</i></b> : Différentes sources de contamination du lait	7
<b><i>Tableau 04</i></b> : Flore microbienne du lait cru	8
<b><i>Tableau 05</i></b> : Classification des espèces appartenant au genre <i>Bacillus</i>	12
<b><i>Tableau 06</i></b> : Principaux caractères de bactéries du genre <i>Bacillus</i>	13
<b><i>Tableau 07</i></b> : Dimensions des spores de bactéries du genre <i>Bacillus spp</i> .	14
<b><i>Tableau 08</i></b> : Différentes échantillons et leur site et leur date et heure de la prélever	21
<b><i>Tableau 09</i></b> : Contamination du lait de vache commercialisé à Laghouat par <i>Bacillus spp</i>	26
<b><i>Tableau 10</i></b> : Valeurs des paramètres de thermorésistance (D- value (min) et Z value (°C)) des isolats testés dans le lait stérilisé à différentes températures	27

## ***INTRODUCTION***



Le lait est un aliment occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, il apporte la plus grande part des protéines d'origine animale. Parmi les différents types du lait disponible sur le marché, le lait de vache est le plus consommé en Algérie avec une moyenne de production de 0,7 litre par personne (Anonyme, 2013). Il est issu de traite des vaches dans des conditions d'hygiène parfois ne sont connues et ni respectées par les éleveurs.

De ce fait, un éventail des microorganismes peuvent être apporté au lait surtout qu'il est considéré comme aliment favorable au développement de microorganismes (Mourgues et *al.*, 1983). De plus, certains microorganismes peuvent se trouver déjà dans le lait des vaches atteints de mammites. En effet, plusieurs microorganismes sont énumérés dans le lait à savoir notamment *Staphylococcus aureus* (Tourette, 2002), *Listeria monocytogens* (Jami et *al.*, 2010), *E. coli* (Margo et *al.*, 2012) et des bactéries aérobies sporulantes comme *B. cereus* (Magnusson, 2007) et d'autres bactéries aérobies sporulantes (Gopal et *al.*, 2015). Ces bactéries sporulantes et surtout *B. cereus* n'étant pas recherchée dans le lait en Algérie. Cependant, *B. cereus* est considéré comme deuxième ou troisième agent causant des Toxi-infections alimentaires y compris le lait (Cadel, 2011). Alors, l'Algérie n'est épargnée de ce pathogène ubiquitaire surtout que le lait et les produits laitiers sont le quatrième groupe d'aliment incriminé dans les intoxications avec 19% de cas d'intoxication dont l'agent est inconnu (DGROA/DQC/SDNPA/2014).

*B. cereus* est une bactérie thermorésistante impliquée dans plusieurs cas d'intoxication alimentaire individuel ou même collective. Cette bactérie peut se trouve dans le denrée alimentaire et atteindre des concentrations toxiques de  $10^5$  bactérieis/mL altérer le lait (Chorin et *al.*, 1997). De plus, son caractère de thermorésistance lui permet de persister dans le lait chauffé au moment de la consommation. Tenant compte, la contamination initiale du lait de vache cru en spores aérobies mesophiles et leur thermorésistance, ces microorganismes peuvent persistés et par la suite se développer dans le produit pour atteindre de concentration toxique. Dans ce contexte, nous tenterons de rechercher, dénombrer puis isoler l'ensemble de spores bactériennes aérobies mésophiles dans le lait vendu dans la ville de Laghouat puis déterminer leur thermorésistance.

## *Introduction*

---

Par ailleurs, la continuité de ce travail sera discutée dans la partie perspective.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons partagé notre travail en deux parties :

- La première partie : se résume en une recherche bibliographique portant les généralités sur le lait, La flore microbienne du lait cru de vache et des généralités sur le genre *Bacillus* ;
- La deuxième partie expérimentale: décrite le matériel et les méthodes utilisées et les résultats obtenus.

## **CHAPITRE I**

### **Généralités sur le lait de vache**

## **I. 1. Généralité sur le lait**

Le lait est un aliment complet capable de fournir à l'organisme tous les éléments essentiels et nécessaires à sa croissance et à son développement telle que calcium, protéines, lipides, sels minéraux et vitamines (Kaan-Tekinsen *et al.*, 2007).

### **I. 1. 1. Définition du lait**

Selon le congrès international de la Répression des fraudes de Paris en 1909, « le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmène. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (Perrin, 1997). Il est défini également comme étant une sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites sans y ajouter ou en soustraire, destinée à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur (FAO, 2000).

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères, comme la vache, la chèvre et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animale naissant (Martin, 1996). Du point de vue physicochimique, le lait est un produit très complexe (Yobouet, 2016). Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physico-chimiques est indispensable à la compréhension des transformations du lait et leurs produits obtenus lors des différents traitements industriels (Amiot *et al.*, 2002).

### **1. 2. Types du lait**

En Algérie, le lait occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire, notamment le lait de vache qui fournit plus de substances alimentaires essentielles que tout autre aliment naturel (Yakhlef *et al.*, 2010). Selon Alais (1984), on peut classer les laits liquides en trois groupes :

- le premier groupe : le lait cru, qui fera l'objet de notre étude;
- le second groupe : les laits traités par la chaleur, ce sont les laits pasteurisés et stérilisés ;
- le troisième groupe : les laits transformés, ce sont les laits aromatisés, concentrés, acidifiés.

### **1. 3. Composition biochimique du lait**

Le lait en général, est constitué essentiellement d'eau, de lipides, de protéines et de glucides (Geneviève, 1996). La composition du lait varie d'une espèce animale à une autre comme montre le tableau 1.

**Tableau 1** : Composition du lait de différentes espèces animales (Amiot et *al.*, 2002 ; Pellerin, 2001).

<b>Animaux</b>	<b>Eau (%)</b>	<b>Matière Grasse (%)</b>	<b>Protéines (%)</b>	<b>Glucides (%)</b>	<b>Minéraux (%)</b>
Vache	87.5	3.7	3.2	4.6	0.8
Chèvre	87.0	3.8	2.9	4.4	0.9
Brebis	81.5	7.4	5.3	4.8	1.0
Chamelle	87.6	5.4	3.0	3.3	0.7
Jument	88.9	1.9	2.5	6.2	0.5

### **1. 4. Qualités du lait de vache**

#### **1. 4. 1. Qualité organoleptique**

Le lait, à l'état normal est un liquide peu plus pesant que l'eau, d'une odeur différente suivant les espèces, d'une saveur douce, légèrement sucré et très agréable (Jacquemier, 2010).

Le lait de vache est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en  $\beta$  carotènes (FAO, 1995). Il a une odeur peu marquée, mais caractéristique, son goût est agréable et douceâtre (FAO, 1995).

#### **1. 4. 2. Qualité physico-chimique**

Les principales caractéristiques physiques et physico-chimiques (cf. tableau 2) considérées dans l'industrie laitières sont la masse volumique (ou la densité), le point d'ébullition et l'acidité etc. (Mekroud, 2011).

**Tableau 2** : composition physico-chimique moyenne du lait (Anonyme., 2009)

<b>Paramètres</b>	<b>Valeurs moyennes</b>
Densité à 20°C	1.028 à 1.034
Chaleur spécifique	0.93
Point d'ébullition	+100.55°C
PH	6.6 à 6.8
Acidité (exprimée en degrés Dornic*)	16 à 18°D
Conductivité électrique	4.0 à 5.5ms/cm à 25°C
Valeur énergétique	275kj/ml

\* : 1°Dornic correspond à 0.1g d'acide lactique par litre de lait



## **CHAPITRE II**

### **Microbiologie du lait de vache**

## **II. 1. Microbiologique du lait cru de vache**

Le lait cru, provenant d'une traite effectuée dans des conditions de propreté et d'hygiène normales, renferme cependant de nombreux germes dont le développement rapide est assuré par sa température à la sortie de la mamelle (35°C) (Lenoir., 1992). S'il n'est pas l'objet d'un refroidissement immédiat en dessous de 4°C, sa population microbienne, au moment de la livraison, peut atteindre plusieurs millions de germe par millilitre (Veisseyre et Lenoir., 1992). Par conséquent, posent des problèmes pour la santé publique.

Les microorganismes principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais, on trouve également des levures et des moisissures, voire des virus (Anonyme., 2009). De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue, pour elles, un excellent substrat nutritif (Anonyme., 2009). Au cours de leur multiplication dans le lait, elles libèrent des gaz, des substances aromatiques, de l'acide lactique, diverses substances protéiques, voire des toxines pouvant être responsables de pathologie chez l'homme (Anonyme., 2009).

L'importance et la nature des bactéries contaminants le lait, dépendent, de l'état sanitaire de l'animal, de la nature des fourrages (Agabriel et *al.*, 1995), mais aussi des conditions hygiéniques observées lors de la traite, de la collecte, de la manutention et de la température de conservation du lait (Agabriel et *al.*, 1995).

### **II. 1. 1. Flores indigènes ou originelle**

La flore indigène représente l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis (Vignola., 2002). Les germes indigènes sont principalement des microorganismes mésophiles (Vignola.,2002) à savoir *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Lactococcus* (Larpent., 1997). Ces derniers constituent également la flore technologique du lait. A côté de cette flore technologique, nous avons les flores pathogènes et d'altération qui altèrent la qualité hygiénique et technologique du lait (Tchamba., 2007).

### **II. 1. 2. Flores de contamination**

Cette flore correspond à l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation (Vignola., 2002). Elle peut se composer

d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (Vignola., 2002). Les sources de contamination du lait sont nombreuses et variées. Le tableau 3 représente les différentes sources de contamination du lait notamment l'eau, le sol, le personnel et l'équipement laitier...etc.

**Tableau 3** : Différentes sources de contamination du lait (Beneddine et Djebrit., 2015).

Sources	Genres
Fèces et Téguments de l'animal	coliformes, Bacillus, Clostridium, Salmonella
Sol	Streptomyces, bactéries sporulées, spores de champignons
litières et aliments	Flore banal, lactobacilles, Clostridia butyriques (ensilage)
Air et Eau	flores diverses
équipement de traite et de stockage du lait	Flore lactique, microcoques, lactobacilles, Chromobacterium, Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinitobacter, levures
Manipulateurs	Staphylocoques des mains, germes d'expectoration et de contamination fécale
Vecteurs divers	insectes en particulier

### II. 1. 2.1. Flores d'altération

Elle est responsable de diverses dégradations du produit au niveau du gout, de l'arôme, de l'apparence ou de la texture. Par exemple, texture visqueuse à la surface du fromage, présence de longs filaments dans le lait, caillage du lait, production de mauvaises odeurs (soufrée, ammoniacale, fruitée et atypique) dues à certaines activités métaboliques telles que la protéolyse ou la lipolyse et gazéification du lait provoquant des trous involontaires ou des

gonflements durant l'affinage du fromage. Les principaux micro-organismes d'altération sont : *Pseudomonas sp* ; *Proteus sp* ; *Coliformes* ; principalement *E. coli*, *Enterobacter*, les sporulés, tels que *Bacillus spp* ; *Clostridium* et certaines levures et moisissures (Vignola., 2002).

### II.1. 2.2. Flores pathogènes

Elle fait partie de la flore contaminante du lait. Les bactéries pathogènes pour l'homme peuvent être présentes dans le lait cru, ou dans les produits laitiers qui en dérivent (Vignola., 2002). Elles sont capables de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits (Vignola., 2002). Les bactéries les plus importantes de cette flore pathogène sont le plus souvent mésophiles et les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* et certaines moisissures (Conte., 2008). L'ensemble de microorganismes susceptibles de rencontrer dans le lait sont illustrés dans le tableau 4.

**Tableau 4** : Flore microbienne du lait cru (Brisabois *et al.*, 2009).

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

### II.1. 2.3. Flore thermorésistante

Un certain nombre de bactéries sont capables de résister aux traitements thermiques usuels utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait, qui sont dites thermorésistantes (FAO, 1995 ; Rahli, 2015). Leur développement ultérieur peut altérer les produits et parfois, être dangereux pour la santé. On distingue :

- La flore thermorésistante totale, définie comme la flore résiduelle après un traitement à 63°C pendant 30 minutes ou un traitement équivalent tel que la pasteurisation HTST (High Température Short Time 72 °C pendant 15 secondes).
- La flore moyennement thermorésistante, qui n'est pas détruite par chauffage à 75°C pendant 12 secondes.
- La flore fortement thermorésistante, qui n'est pas détruite par chauffage à 80°C pendant 10 minutes. Elle comprend notamment des spores bactériennes, dont beaucoup nécessitent des températures supérieures à 100°C pour être inactivées (FAO., 1995).

### II. 3. Principales activités des microorganismes dans le lait

Les activités métaboliques des microorganismes présents dans le lait peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur l'apparence, l'odeur, la consistance ou la texture et le goût des produits laitiers (Vignola., 2002). Parmi ces activités on peut citer l'acidification, la protéolyse, la lipolyse, la production de gaz.

#### II. 3. 1. Acidification

C'est une production d'acide lactique à partir du lactose par les ferments lactiques lors de leur croissance (Abakar., 2012). Est produite par des germes thermotolérants ou des sporulés ayant résisté comme les *Clostridium* et les *Bacillus* (Bachtarzi., 2012). L'acidification est un bon indice pour évaluer la qualité microbiologique et le respect de la chaîne de froid du lait cru (Vignola., 2002).

#### II. 3. 2. Protéolyse

C'est la dégradation des protéines du lait avec formation de peptides, dont certains donnent des mauvais goûts aux produits laitiers (Conte., 2008). L'activité protéolytique des bactéries lactiques en est le meilleur exemple, ces bactéries dotées d'un système protéolytique complexe comprenant des protéases situées à la surface cellulaire, et une large gamme de peptidases intracellulaires, qui lorsqu'elles sont libérées dans le caillé fromager participent efficacement à l'affinage du fromage (Bachtarzi., 2012).

### **II. 3. 3. Lipolyse**

C'est une réaction enzymatique de dégradation de la matière grasse qui se traduit dans le lait par une augmentation de la teneur en acides gras libres. Au-delà de certains seuils, cette augmentation peut provoquer l'apparition de défauts de goûts (rance, savon...) dans les produits laitiers (Heuchel et *al.*, 2003).

Dans un lait cru réfrigéré, la flore dominante est représentée par les psychrotrophes. 70% ou plus de cette population possèdent une activité lipolytique.

Cependant, elle n'est perceptible au goût qu'à partir des teneurs de  $10^6$  à  $10^7$  germes/ml, c'est-à-dire pour des laits crus considérés comme très pollués (Richard., 1983 ; Chilliard et Lamberet., 1984).

### **II. 3. 4. Production de gaz**

Certaines bactéries (hétérofermentaires, bactéries telluriques) au cours de leur croissance produisent des gaz. Dans le cas de certains fromages on peut assister à l'apparition d'un défaut d'aspect, dû à la production de gaz, associé ou non à un défaut de goût (Conte., 2008).

Enfin, certains microorganismes ne semblent pas présenter les inconvénients cités plus haut. Leur présence en grand nombre dans le lait est toutefois l'indication d'une mauvaise hygiène générale au stade de la production du lait. Ces microorganismes peuvent être considérés comme « indicateurs » d'une hygiène défectueuse.

## **CHAPITRE III**

**Bactéries aérobies mésophiles sporulées *Bacillus spp***

### III. 1. Genre de *Bacillus* spp

Les bactéries aérobies sporulées du genre *Bacillus* font partie de la flore contaminant du lait cru. Elles sont responsables de la détérioration de la qualité du lait et de ses produits (Aouadhi et *al.*, 2015) Ce genre particulièrement hétérogène. L'hétérogénéité extrême du genre est reflétée par la grande variété de places écologiques que les nombreuses espèces occupent et par l'extrême diversité de leurs statuts taxonomiques (Yobouet., 2016).

### III. 2. Taxonomie de *Bacillus*

Selon Delarras, 2014 et Dromigny, 2008. Le genre de *Bacillus* établi en 1872 par Ferdinand Cohn, appartient à

Famille : **Bacillaceae.**

Ordre : **Bacillales .**

Classe : **bacilli.**

#### III. 2. 1. Caractéristiques du genre de *Bacillus*

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulés, à Gram positif, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*B. anthracis* et *B. mycoides* sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* et *B. subtilis* peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase (Holt et *al.*, 1994).

La caractéristique la plus importante de ce genre et qui lui permet d'héberger plusieurs niches écologiques et la capacité de former des endospores (Benabdallah., 2014).

#### III. 2. 2 Classification du genre *Bacillus*

En 1950, Smith propose une classification basée sur la forme de l'endospore et sur les modifications morphologiques qu'elle entraîne sur le corps bactérien. Cette

classification, toujours d'actualité, définit trois groupes (cf. Tableau 5) (Teyssou et al., 1998) :

- groupe I : endospore ovale non déformante ;
- groupe II : endospore ovale déformante ;
- groupe III : endospore ronde déformante.

**Tableau 5:** Classification des espèces appartenant au genre *Bacillus* (Teyssou et al., 1998).

<b>Groupe I :</b> endospore ovale non déformante		
<i>B. anthracis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. similibadius</i>
<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. firmus</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>B. longisporus</i>	<i>B. lentus</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. thermodenitrificans</i>	<i>B. nitritollens</i>
<i>B. coagulans</i>	<i>B. badius</i>	<i>B. licheniformis</i>
<b>Groupe II :</b> endospore ovale déformante		
<i>B. polymyxa</i>	<i>B. larvae</i>	<i>B. racemilacticus</i>
<i>B. macerans</i>	<i>B. caldovelox</i>	<i>B. alcalophilus</i>
<i>B. circulans</i>	<i>B. azotoformans</i>	<i>B. caldolyticus</i>
<i>B. brevis</i>	<i>B. caldotenax</i>	<i>B. fastidiosus</i>
<i>B. laterosporus</i>	<i>B. laevolacticus</i>	<i>B. acidocaldarius</i>
<i>B. alvei</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	
<b>Groupe III :</b> endospore ronde déformante		
<i>B. sphaericus</i>	<i>B. pasteurii</i>	<i>B. pantothenicus</i>

### III. 2. 3. Principaux caractères d'identification biochimique

Les caractères principaux des bactéries du genre *Bacillus*, les milieux d'isolement sélectif et l'identification biochimique, utile en analyse de routine sont présentés dans le tableau 6.

**Tableau 6:** Principaux caractères des bactéries du genre *Bacillus* (Delarras., 2014).

Caractères Principaux – Milieux de culture - Identification Biochimique	
Morphologie	Bacilles à extrémités plus ou moins rectangulaires de 3 à 9µm × 0.6 à 1µm Présence de capsules polypeptidiques chez <i>B. anthracis</i> et <i>B. megaterium</i> Spores ou endospores libres ou dans leur sporange
Coloration de Gram	Gram +
Mobilité	+ cellules à ciliation péritriche <i>B. anthracis</i> immobile
Type respiratoire	Aérobies stricts ou anaérobies facultatifs suivant espèces
Oxydase	± (- en général)
Catalase	+
Condition de culture	Espèces mésophiles: se développent à 30°C en 24 à 48 heures Espèces psychrotrophes (certaines souches de <i>B. cereus</i> ): se développent à 20°C en 18 à 48 heures. Espèces thermophiles : se développent à 55°C en 12 à 16 heures
Caractères spécifiques	Exigent 3 à 12% NaCl suivant les espèces Produisent des acides à partir du glucose
Milieux de culture	Milieux d'usage courant, donnant sur milieu gélosé des colonies de type R <sup>2</sup>
Milieux d'isolement spécifique	Gélose Mossel (MYP) bio- rad Gélose Bacara® AES Chemunex
Identification biochimique	API® 50 CH avec API® 50 CHB/E medium et API® 20E bio Mérieux® SA

### III. 3. Spores du *Bacillus spp*.

En général, les spores de genre *Bacillus* ont une forme ovale à sphérique ; elles sont terminales ou non, mesurant en moyenne 1µm par 1 à 2µm (cf ; Tableau 7).

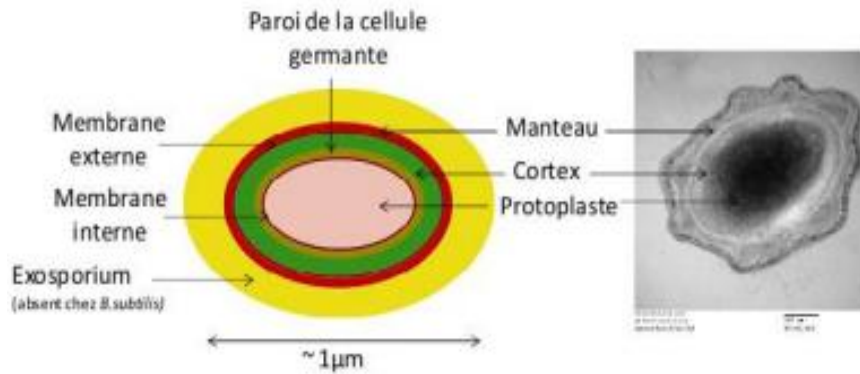
**Tableau 7 :** Dimensions des spores de bactéries du genre *Bacillus* (Guech., 2015).

	Longueur (µm)	Diamètre (µm)	Volume (µm)
7souches de <i>Bacillus anthracis</i>	De 1,23 à 1,67	De 0,81à 0,86	De 0,420 à 0,642
<i>B cereus</i>	1,55	0,90	0,657
<i>B thuringiensis</i>	1 ,61	0,80	0,549
Autres Bacillus			
<i>B atrophaeus</i>	1,22	0,65	0,273
<i>B megaterium</i>	1,73	0,88	0,696
<i>B sphaericus</i>	1,07	0,85	0,408
<i>B stearotherophilus</i>	1,74	0,98	0,894
<i>B subtilis</i>	1,07	0,48	0,160

Les volumes moyens de *B. anthracis* et *B. thuringiensis*, sont semblables à ceux de *B. cereus*. Les autres espèces proches présentent de plus grands volumes de spores que *B. anthracis*, comme on peut s'en rendre compte à la lecture du tableau (Guech., 2015). Les spores sont donc des éléments de très petites dimensions, ce qui leur donnera la capacité de contaminer les denrées alimentaires (dans ce cas le lait cru) à partir d'anfractuosités présentes dans les entreprises du secteur alimentaire (Guech., 2015).

### **III. 3. 1. Structure des spores**

La structure et la composition chimique des spores bactériennes diffèrent considérablement de celles des cellules végétatives. Ces différences sont à l'origine des propriétés de résistances uniques des spores (Abbas., 2014). 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). En 1876, Robert Koch et Ferdinand Cohn publient la première description morphologique des endospores de *B. anthracis* et *B. subtilis* (Eichenberger., 2007). La Figure 1 présente ainsi une schématisation de cette structure de résistance.



**Figure 1** : Schéma général de la structure de la spore bactérienne (l'échelle des différentes structures n'est pas respectée) et photographie en Microscopie Electronique à Transmission d'une spore de *Bacillus subtilis* (MET). Echelle : 100 nm (Loison., 2013).

Cette forme cellulaire est multicouche, chaque couche possédant des spécificités notamment en termes de composition. 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. Donc, la description des structures de cette spore sont :

**-la paroi sporale** : cette paroi contient du peptidoglycane normal qui deviendra, après la germination, la paroi de la cellule végétative (Gaillard., 2003).

**-le cortex** : il représente 10 à 20% de l'ensemble, c'est une couche épaisse d'aspect monomorphe, très transparente aux électrons; il est formé d'un peptidoglycane inhabituel avec beaucoup moins de liaisons internes et très sensible au lysozyme; il contient une forte proportion de dipicolinate de calcium; son autolyse constitue une étape déterminante de la germination (Gaillard., 2003).

**-l'exosporium** : c'est la couche la plus externe. Elle est constituée principalement de lipides, de polysaccharides et de protéines, elle n'est pas essentielle à la survie de la spore (Matz et al., 1970).

**-les tunique**s: elles représentent 20 à 35% de l'ensemble; elles sont composées d'une protéine type kératine riche en liaisons disulfures; imperméables, elles sont responsables de la résistance aux agents chimiques (Gaillard., 2003).

### III. 3. 2 Sporulation

Le processus de formation des spores thermorésistantes a été largement étudié pour la bactérie modèle *B. subtilis*. Ce processus est initié en réponse à un nombre de signaux externes et internes tels que l'augmentation de la densité cellulaire ainsi que l'appauvrissement du milieu en nutriments et dure généralement entre 8 et 10 h (de Hoon et *al.*, 2010). Les étapes morphologiques de la sporulation sont similaires chez toutes les espèces des genres *Bacillus* et *Clostridium* (Hilbert and Piggot., 2004). Elles ont été mis en évidence par microscopie électronique et sont au nombre de 7 étapes (cf. Figure 2) (Errington., 1993).

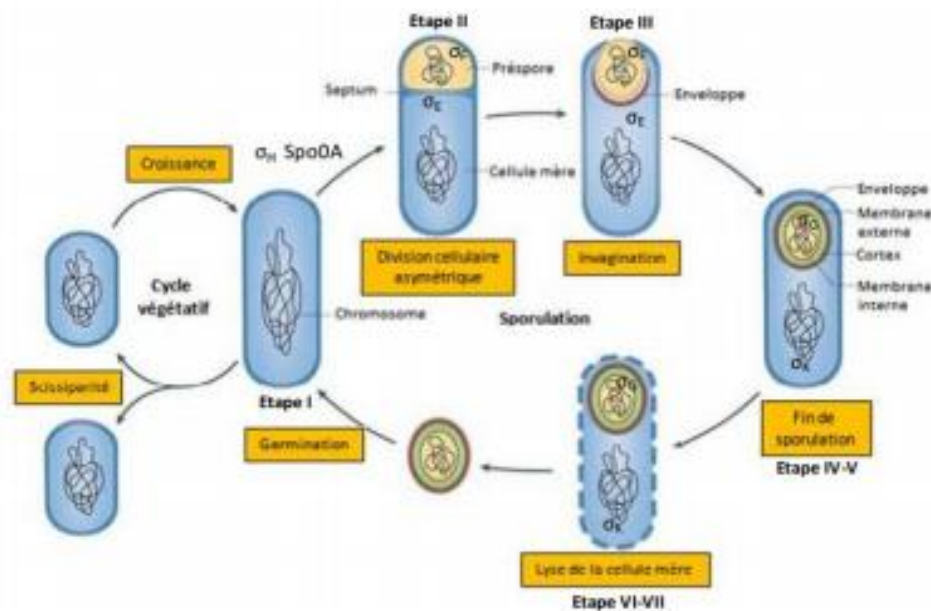


Figure 2: Schéma simplifié des étapes du cycle de sporulation et de germination chez *B. subtilis* (Loison., 2013).

Les étapes des sporulations s'agissent d'un processus complexe, divisé généralement en 6 à 7 étapes, contrôlé par 4 facteurs sigma distincts en plus de  $\sigma_H$  (Loison., 2013). Les cellules végétatives se préparent à la sporulation. Elle correspond généralement à la fin de la phase exponentielle de croissance (Errington., 1993).

**L'étape 1** : sporulation, le matériel nucléaire apparaît sous forme de filament disposé axialement (Errington., 1993).

Le développement d'un mésosome sporal se produit alors, qui deviendra plus tard associé à la partie du filament axial qui sera enfermé par le septum de la spore (Dromigny., 2009)

**L'étape 2** : la formation du septum de la spore est la conséquence d'un repliage de la membrane cytoplasmique (Errigton., 1993).

Le résultat immédiat de ce repliage de membrane est une structure de raccordement, entourée par une membrane unitaire (Dromigny., 2009).

**L'étape 3** : sporulation est caractérisée par le mouvement simultané des secteurs vésiculaires vers le pôle de la cellule et la progression du septum de la spore dans la même direction. (Errigton., 1993).

Les résultats de ce processus sont la formation d'une double membrane de « préspore » (ou « forespore ») qui enferme complètement l'ADN de la spore (Dromigny., 2009).

**L'étape 4** : sporulation voit apparaître le matériel cortical entre les composants opposés de la membrane de la « préspore » (Errigton., 1993). L'exosporium (Cette structure principalement protéique n'est présente que chez certaines espèces de *Bacillus* comme *B. cereus*, *B. anthracis* ou *Bacillus thurengiensis* mais est absente chez *B. subtilis*. Il s'agit de la couche la plus externe de la spore) apparaît dans cette étape. Tardivement, on assiste au développement du cortex, manifesté par une couche dense aux électrons, et au développement d'une couche corticale moins dense.

**L'étape 5** : est caractérisée par le fait qu'aucun matériel nucléaire n'est visible dans le noyau de la spore, mais des agrégats ribosomiaux peuvent être observés (Errigton, 1993). La membrane interne du septum initial de la spore est maintenant la membrane limitatrice du noyau de la spore.

**L'étape 6** : correspond à une spore définitive, toujours emballée dans le sporange. (Dromigny., 2009) mais au cours de cette période, les propriétés caractéristiques de résistance à la chaleur, de dormance et de germination apparaissent successivement (Nicholson and Setlow., 1990). La cellule mère se lyse ensuite pour libérer la spore mature, il s'agit du dernier stade, Cette spore libérée,

métaboliquement inactive, est ainsi résistante à de nombreux stress environnementaux extrêmes (hautes températures, radiations, détergents, solvants chimiques,...) et peut rester à l'état de dormance sur une très longue période de temps (Errington., 2003).

### **III. 3. 4. Germination**

La germination est un processus essentiellement biophysique aboutissant à la perte des propriétés spécifiques des spores telles que leur structure unique, leur extrême résistance et leur dormance. Elle se produit sans nécessité de synthèse de nouvelles macromolécules car l'appareil de germination est déjà présent dans la spore mature en dormance (Moir., 2006).

La germination peut être divisée en deux grandes étapes (Abbas., 2014).

- la première est appelée le déclenchement, elle est détectée dès les premières minutes après l'addition du germinant et consiste en la perte des résistances de la spore, la libération du DPA, la perte des cations ainsi que l'hydratation partielle du cœur de la spore.

- la seconde étape correspond à l'hydrolyse du cortex, à l'hydratation complète du cœur de la spore, à la chute de la densité optique et à la perte des propriétés de dormance. L'étape qui suit la germination est la reprise de la croissance cellulaire qui se traduit par la reprise du métabolisme cellulaire, la dégradation des protéines de type SASP et la synthèse de macromolécules (Abbas., 2014).

### **III. 3. 5. Thermorésistance de *Bacillus spp.***

Les spores sont résistantes à la chaleur, une rupture mécanique et une large variété de produits chimiques, ce qui rend très difficile de les détruire dans les produits laitiers lors du processus de fabrication. Dans le cas des Bacilles mésophiles et thermophile facultative, des combinaisons de plusieurs propriétés auraient contribué à l'ensemble résistance des spores de *Bacillus*, notamment de leur faible teneur en eau, l'imperméabilité de la membrane interne, la couche de spores, le peptidoglycane (Burgess et al., 2010). La spécificité des spores comparées aux cellules végétatives est leur remarquable résistance à la chaleur. Les spores de *B. subtilis* par exemple, peuvent survivre à une chaleur humide de 100 °C, avec une

valeur de D (temps de réduction décimale, le temps nécessaire pour abaisser la population par un facteur 10) comprise entre 20 et 30 min selon les souches. De plus, les spores sont approximativement 1000 fois plus résistantes à la chaleur sèche qu'à la chaleur humide (Abbas., 2014).

En 2001, Cazemie a conclu que la résistance aux fortes températures est due à trois facteurs principaux, la déshydratation du protoplaste, la minéralisation et l'adaptation thermique. Les trois facteurs ont été identifiés comme étant les principaux responsables des variations de résistance thermique. Le premier est inhérent au micro-organisme puisque la résistance thermique dépend de la température optimale de croissance. Généralement, les bactéries thermophiles produisent des spores plus thermorésistantes et les bactéries psychrophiles produisent des spores moins thermorésistantes. Le second facteur est lié à l'hydratation de la spore, plus une spore est déshydratée, plus elle est résistante aux traitements thermiques. Le troisième facteur est lié au type de minéralisation de la spore.

### **III. 4. Pathogénicité du *Bacillus spp***

La plupart de ces bactéries sont peu pathogènes pour l'homme, à deux exceptions près : *B. anthracis*, qui est responsable du charbon, et *B. cereus* qui est l'espèce la plus fréquemment isolée de produits pathologiques (Gaillard., 2003). Le danger engendré par ce groupe de bactéries est leur capacité de produire des enzymes ainsi que des toxines susceptibles d'altérer la qualité des produits et d'engendrer des possibilités d'intoxications alimentaires (Guech-Lamari et Gacemi., 2012).

#### **III. 4. 1. *Bacillus anthracis***

*B anthracis* est responsable du charbon (également appelée anthrax) (Gaillard., 2003). Cette affection peut atteindre les êtres humains lors d'une exposition à des animaux infectés, leurs tissus ou leurs produits (Dromigny., 2009)

#### **III. 4. 2. *Bacillus cereus***

*B cereus* fait partie des pathogènes puis qu'elle produit deux toxines pouvant être à l'origine de ToxiInfections Alimentaires Collectives (Granum., 1994;

Johnson., 1984). Qui sont à l'origine du syndrome émétique ou du syndrome diarrhéique.

- Le syndrome émétique est causé par l'ingestion de la toxine émétique (appelée céréulide) préformée dans l'aliment (Agata et *al.*, 2002; Rajkovic et *al.*, 2008) Ce syndrome est caractérisé par une courte période d'incubation (1 à 5 heures après ingestion des aliments) et se manifeste par des vomissements (Ehling-Schulz et *al.*, 2004).

- Le syndrome diarrhéique quant à lui, résulte des entérotoxines produites par les cellules végétatives de *B. cereus*. Ces dernières se trouvent au niveau de la couche de mucus et /ou attachées à l'épithélium dans l'intestin grêle (Ceuppens et *al.*, 2013). Le temps d'incubation est donc plus long que pour le syndrome émétique et varie entre 12 h et 24 h. Il se manifeste par des crampes abdominales et une diarrhée.

## **IV. MATERIEL ET METHODES**

## IV. Matériel et méthodes

L'objectif de cette étude était d'évaluer la thermorésistance de spores de *Bacillus* spp (spores aérobies mésophiles) isolées du lait de vache commercialisé dans la ville de Laghouat.

La totalité des manipes a été réalisée au laboratoire pédagogique de microbiologie de département de Biologie, Université de Laghouat.

### IV. 1. Echantillonnage du lait de vache cru

Les échantillons du lait de vache cru étudiés ont été prélevés de différents points de vente de la ville de Laghouat. Les points de vente ont été repérés suivant la méthode aréolaire décrite par Grawitz (2011). Elle consiste à repérer les points de vente du lait (connue) sur la carte de la ville de Laghouat. Les points de prélèvements sont illustrés sur la carte de la ville de Laghouat (cf. Figure 3).



**Figure 3 :** Illustration de points de ventes et de prélèvement du lait de la ville de Laghouat (image google map, 04/05/17,11h00).

#### **IV. 2. Prélèvement des échantillons du lait de vache cru**

Au total 11 échantillons ont été prélevés durant de le 29/01/2017 à 02/02/2017; Le tableau 7 rassemble les informations relatives aux prélèvements des échantillons. Les échantillons ont été prélevés à différents temps (moment) dans la journée pendant une semaine parfois chez les mêmes points de vente.

**Tableau 8:** Différentes échantillons et leur site et leur date et heure de la prélever.

Echantillon	Date de prélèvement	Heure de prélèvement.	Le site de prélèvement
Ech 01	28/01/2017	16 :37	EL-Wiam
Ech 02	28/01/2017	17 :40	El- Dhalea
Ech 03	28/01/2017	17 :45	Rahebet Ezzitoun
Ech 04	29/01/2017	13 :00	/
Ech 05	29/01/2017	17 :57	EL-Wiam
Ech 06	29/01/2017	17 :59	EL-Wiam
Ech 07	29/01/2017	18 :20	Rahebet Ezzitoun
Ech 08	29/01/2017	18 :25	EL-Wiam
Ech 09	30/01/2017	07 :58	El- Dhalea
Ech 10	30/01/2017	16 :02	EL-Maamoura
Ech 11	30/01/2017	16 :31	EL- Garbia

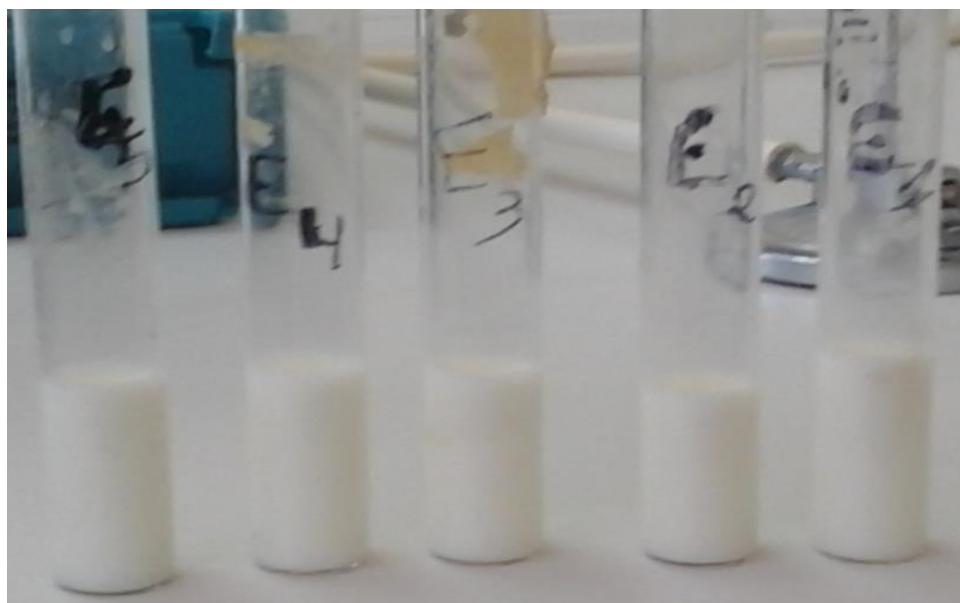
#### **IV. 3. Transport des échantillons**

Les échantillons ont été prélevés dans leur emballage et conditionnement de vente puis transféré au laboratoire pour l'analyse à la température 4°C.

#### **IV. 4. Recherche, dénombrement de *Bacillus* spp aérobies mésophiles**

##### ***Préparation des échantillons***

Un volume de 10ml de chaque échantillon a été introduit dans des tubes stériles (cf. Figure 4) puis apporté au bain marie à 80°C pendant 10 min afin de détruire les bactéries de formes végétatives omniprésentes. Après traitement thermique, une série des dilutions décimales a été réalisée dans l'eau physiologique stérile.



**Figure 4** : Echantillons du lait traité à 80°C pendant 10 min sans aucune altération organoleptique (coagulation).

#### ***Dénombrement et isolement des *Bacillus* spp***

La procédure suivie est inspirée de celle décrite par Ziane et *al.* (2016). Un volume de 1 ml de chaque dilution a été étalé en surface de la gélose Mueller Hinton coulée dans des boîtes de Pétri. Le Mueller Hinton Agar a été choisi pour sa teneur en amidon, ce qui améliore la récupération des bactéries sporulées. Le nombre total de spores a été énuméré après incubation à 37°C pendant 24 h pour tous les échantillons.

#### ***Purification des isolats***

La purification des isolats consiste à prélever une öse puis ensemencée en strie suivant la technique de cadrant sur la gélose nutritive. Les précultures étaient incubées à 37°C pendant 24h. Une succession de étalement a été réalisé jusqu'au l'obtention des colonies bien séparées.

#### **IV. 5. Confirmation de la pureté des isolats**

Pour confirmer la pureté des souches isolées, nous somme basée sur l'observation macroscopique de l'aspect des colonies puis par observation microscopique des cellules après coloration du Gram et la recherche de catalase.

### IV. 6. Production et conservation des spores de *Bacillus* spp

#### *Préparation de pré-culture*

Les isolats obtenus ont été ensemencés dans un milieu BHI (milieu liquide de couleur jaune) puis incubées à 37°C pendant 24h.

Un volume de 0,5 mL de la pré-culture était étalé sur la surface du milieu nutritif gélosé en boîtes de Pétri de 90 cm et supplémenté par 40mg/l de MnSO<sub>4</sub> et 100mg/l de CaCl<sub>2</sub>. Puis, les boîtes ensemencées ont été incubées à 37°C pendant un temps nécessaire à la sporulation de la population bactérienne (05 jours).

#### *Récupération et lavage des spores de *Bacillus* spp*

Après 05 jours d'incubation, lorsqu'un tapis se forme à la surface de la gélose nutritive, 2 à 3 ml d'eau distillé stérile était versée sur chaque boîte. Le tapi de spores formées est raclé avec une pipette Pasteur sous forme de râteau, puis récupérées dans des tubes stérile pour subir une série de centrifugations à 4000t/m pendant 5 minutes.

Le surnageant est jeté à chaque centrifugation puis les culots ont été récupérés puis lavés après chaque centrifugation. A la fin de série de lavage, un volume eau/éthanol (pour détruire les formes végétatives) a été ajouté puis gardé à 4°C pendant une nuit. En fin, le mélange était récupéré puis centrifugé. Ensuite, 500µl de l'eau distillée stérile a été ajoutée au culot pour former un stock de spores de 10<sup>11</sup> spores/mL (estimation faite après dénombrement classique sur gélose nutritive).

### IV. 7. Etude de la thermorésistance de spores des isolats

Le traitement thermique de spores de chaque isolat a été effectué à trois températures 75°C, 85°C et 95°C. Au total 5 isolats ont été sélectionnés au hasard (E1, E2, E3, E4 et E5).

Le traitement consiste à diluer 10µL de spores dans 9mL du lait stérilisé. Ensuite, 1mL a été transféré dans 8 tubes à essai contenant 9mL du lait stérilisé. Les 8 tubes étaient ensuite apporté au bain marie à la température désirée. Une fois la température au coeur du tube atteint la température souhaitée, le premier tube était retiré puis refroidit pour le dénombrement. Il correspond au dénombrement de t<sub>0</sub>. Les autres tubes étaient retirés à des intervalles du temps différents et de la même façon que le tube de t<sub>0</sub>.

A partir de chaque tube traité thermiquement (correspond à un temps fixe), une série de dilution a été réalisée dans de l'eau physiologique. Un volume de 1mL était ensemencé par profondeur dans des boîtes de Pétri stériles (duplicatas). L'incubation était effectuée à 37°C pendant 24h.

#### **IV. 8. Dénombrement de spores de *Bacillus* spp**

La charge de *Bacillus* spp était calculée suivant la formule de la norme AFNOR (1994) :

$$N = \frac{\Sigma c}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

où :

$\Sigma C$  : est le nombre des colonies comptées sur une boîte retenue des dilutions effectuées;

V : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

n1 : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution;

n2 : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution;

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

#### **IV. 9. Détermination des paramètres de la thermorésistance**

Les deux paramètres caractéristiques de la thermorésistance de *Bacillus spp étudiés* étaient déduits à partir des courbes obtenues :

- La valeur de D représente l'inverse de la pente de la courbe Log N en fonction de temps de traitement thermique (minutes) pour chaque niveau ;
- La valeur de z est calculée à partir de la courbe Log D en fonction de différents niveaux de température (°C) qui leurs correspond.

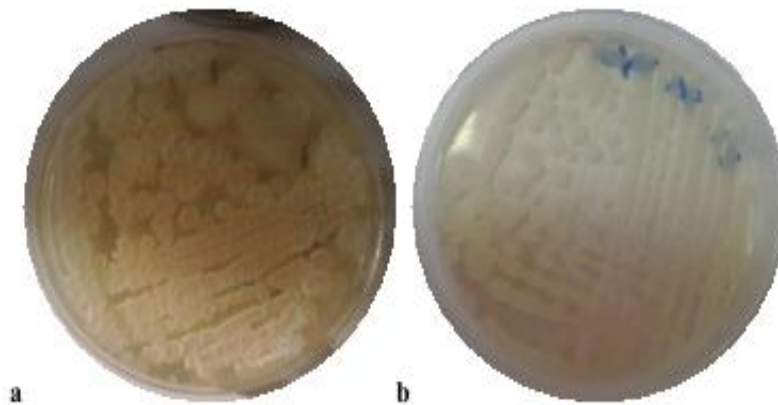
## **V. RESULTATS ET DISCUSSION**

### V. 1. Isolements et purifications des isolats

Après incubation des boîtes d'isolement à 37°C pendant 24h. Les colonies à différents aspects macroscopiques sont apparues. Une colonie, dont l'aspect est différent, de chaque échantillons a été repérée pour éviter l'isolement de même isolat. Au total 11 isolats ont été retenus selon les critères de sélection correspond au *Bacillus* spp. C'est-à-dire catalase positive, Gram positif et de forme bacillaire. Par ailleurs, le caractère de la thermorésistance est déjà prouvé par sa présence après traitement thermique à 80°C pendant 10min.

#### V. 1. 1. Aspect macroscopique de purification

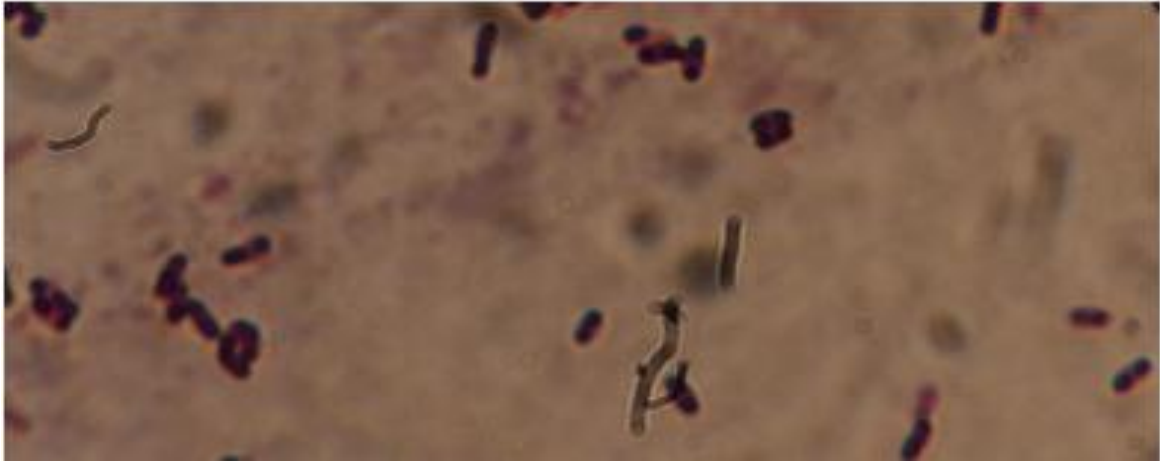
Généralement, la plus part des colonies de taille entre 2 et 4 mm avec de forme Ronde plate et translucide de couleur Blanche- Crème (cf. Tableau 8 & Figure 5).



**Figure 5 :** Aspect macroscopique des isolats de *Bacillus* spp sur milieu nutritif gélosé. a : isolats E1 et b) isolats E4.

#### V. 1. 2. Aspect microscopique

La sélection des isolats était basée sur les résultats de la recherche de catalase. Ensemble des isolats sont catalase positive (effervescence). Ensuite, l'examen microscopique des isolats après la coloration de Gram a montré que tous les isolats sont Gram positifs et à l'état pure et de formes bacillaires présentant des endospores non colorée réfringente central et non déformante (cf. Figure 6).



**Figure 6 :** Observation microscopique des cellules de *Bacillus* spp. après la coloration de Gram pour l'isolat E1 (100 x 10).

## V. 2. Dénombrement de *Bacillus* spp

L'un des objectifs était de compter le nombre de *Bacillus* spp dans le lait cru vendu dans la ville de Laghouat. Après traitement thermique à 80°C/10min, 80% des échantillons analysés sont contaminés par *Bacillus* spp. dont le nombre de spores comprise entre 10 et 104 spores par mL (cf. Tableau 9). Ces résultats sont en concordance avec les résultats montrés par Follys et Kischnerova (2006). Ces auteurs ont montré une contamination moyenne de 3 log dans le lait de vache.

Les *Bacillus* principalement sont considérés comme les contaminants les plus importants de l'industrie laitière (Murphy et al., 1999, Ronimus et al., 2003 ; Seale et al., 2008, Yuan et al., 2012). Elles sont essentiellement des indicateurs d'hygiène et résulte de non-respect de bonne pratiques de traite et d'hygiène comme expliqué par Meer et al.(1991), Te Giffel et al. (1997). Elle sont responsables d'altérations dues à leur propriété acidifiantes et leur potentiel enzymatique (Burgess et al., 2010).

**Tableau 9 :** Contamination du lait de vache. commercialisé à Laghouat par *Bacillus* spp

Nombre d'échantillons analysés	Prévalence (%)	Nombre des isolats	Concentration moyenne (cfu/mL)	
			Min	Max
11	80	11	Moy	3
			Min	1
			Max	4

Min : minimale ; max : maximale, moy : moyenne

### **V. 3. Etude de la thermorésistance des spores bactériennes**

La thermorésistance des isolats testés a été étudiée à différentes températures de 75°C, 85°C et 95°C. Les résultats de la thermorésistance sont illustrés sur le tableau 10. Les valeurs de D sont estimées après l'ajustement linéaire de courbes log N(ufc/mL) versus temps (min) de traitement. Les coefficients d'ajustement sont satisfaisants qui compris entre 0,80 et 0,90.

Les valeurs de D sont inversement proportionnelles à la température du traitement. Les résultats ont montré également que les valeurs de D sont dépendantes de la souche. Les isolats E2, E4 et E5 ont montré des valeurs élevées par rapport aux autres deux souches quelle que soit la température testée. Dans cette étude, les valeurs de D sont plus élevées que celle montré par Mazas et *al.* (1999) dans le lait. Ces auteurs ont montré que les valeurs de D comprise entre 0,90 et 1 minute. Cependant ces valeurs sont beaucoup plus faibles par rapport aux valeurs montrées par Brerendsen (2006). Par ailleurs, Janstova et Lukasova (2001) ont montré des valeurs de D concorde avec la thermorésistance de l'isolat E2 et E3.

Selon Mazas et *al.* (1999), les spores traitées dans le lait sont protégées par la matière grasse du lait. De ce fait, la thermorésistance est probablement plus élevée dans le milieu de laboratoire (milieu de culture, tampon phosphate...etc.).

**Tableau 10 :** Valeurs des paramètres de thermorésistance (D- value (min) et Z value (°C)) des isolats testés dans le lait stérilisé à différentes températures.

	E1	E2	E3	E4	E5
D75°C (min)	12,71	50,85	22,53	62,02	46,54
D85°C (min)	10,17	18,61	12,55	30,20	21,00
D95°C (min)	ND	6,83	5,72	16,84	14,42
ZT°C (°C)	3,93	22,93	33,59	35,32	39,30

Les valeurs de la thermosensibilité varie entre 3 et 39°C. Ces valeurs sont élevées par rapport à valeurs montrées par Ziane et *al.* (2016) et Luu-Thi et *al.* (2014).

## **CONCLUSION**

## *Conclusion*

---

La flore thermorésistante telle que les *Bacillus spp* est un groupe important de contaminants en industrie laitière. Leur développement ultérieur peut altérer les produits mais aussi provoque des intoxications à des concentrations toxiques notamment pour *Bacillus cereus* (bactérie reconnue comme pathogène au sein de ce groupe).

Le but fondamental de ce travail basé sur deux aspects : l'un est la recherche et le dénombrement de la flore sporulée aérobie puis l'isoler à partir du lait cru de vache commercialisé à Laghouat. Deuxième aspect est l'étude de la thermorésistance de spores des isolats obtenus.

Au total 11 isolats ont été obtenus à partir du 80% des échantillons contaminés. La concentration de spores dans les échantillons n'atteint pas les concentrations jugées toxiques pour *B. cereus* ( $10^5$  spores/mL) (si l'identification moléculaire envisagée a repartit l'un ou plusieurs isolats comme *B. cereus*).

Les mesures d'hygiène de traite et de vente sont recommandées pour minimiser la contamination du lait de vache par ces spores bactériennes ubiquitaires.

Comme perspective à ce travail, les isolats de spores de *Bacillus spp* doit être identifiée par le séquençage de gène d'ARNr 16S. Si l'identification a montré la présence de l'espèce *cereus*, une deuxième affiliation moléculaire basée sur le gène *panC* sera effectué.

Deuxième perspective, est l'étude de la thermorésistance à différents facteurs présente dans le lait et apporté par le consommateur du lait (T°C, pH, chocolat...etc) ainsi que leur croissance dans les différentes conditions environnementales. Au terme de ces résultats envisagés, une évaluation de l'exposition de *B. cereus* liée à la consommation du lait dans la ville de Laghouat sera réalisée.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

---

1. **Abakar M.N ;(2012)**. Essai de fabrication d'un fromage frais traditionnel sénégalais, à partir du lait de vache, coagulé par la papaine naturelle. Mémoire de diplôme de Master N°1. Université Cheikh Anta Diop de Dakar ; Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar (Eismv) : 5p.
2. **Abbas A.A ; (2004)**. Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus cereus*. Thèse, Ecole doctorale « Agrosience et Science ».
3. **Agabriel C., Coulon J.B., Brunschwig G., Sibra C. et Nafidi C ; (1995)**. Relations entre la qualité du lait livré et les caractéristiques des exploitations. *INRA Prod. Anim.*, 8(4) : 251-258 p.
4. **Agata N., Ohta M., et Yokoyama K.(2002)**. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology*; 73: 23-27p.
5. **Alais C ;(1984)**. Science de lait : principes des techniques laitières. 4ème édition, SEPAIC, Paris : 814 p.
6. **Ameur A., Rahal K. et Bouyoucef A ; (2011)**. Evaluation du nettoyage des tanks de réfrigération dans les fermes laitières de la région de Freha (Algérie). *Revue Nature et Technologie*. N°6 : 80-84.
7. **Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R. et Turgeon H ; (2002)**. Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait *In VIGNOLA C.L, Science et technologie du lait : Transformation du lait, École polytechnique de Montréal : 1P.*
8. **Aouadhi C., Rouissi Z., Mejri S., et Maaroufi A ; (2015)**. Effet des facteurs environnementaux sur l'inactivation des spores de *Bacillus sporothermodurans* par la nisine. *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 12 : 45 -52 p.
9. **Bachtarzi N ;(2012)**. Qualité Microbiologique Du Lait Cru Destiné A La Fabrication D'un Type De Camembert Dans Une Unité De L'est Algérien. Mémoire de Magister ; Université Mentouri – Constantine : 18-19p.
10. **Baweja R.B., Zaman M.S., Mattoo,A.R., Sharma K., Tripathi V., Aggarwal A., Dubey, G.P., Kurupati R.K., Ganguli M., Chaudhury N.K., Sen S., Das, T.K., Gade W.N., Singh, Y ;(2008)**. Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Archives of Microbiology* 189: 71-79p.
11. **Benabdallah A.M ; (2014)**. Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre *Bacillus* de la Sebkhia D'Oran (caractérisation phénotypique). Mémoire De Master ; Université de Tlemcen.
12. **Beneddine H. et Djebrit C ; (2015)**. Etude de l'activité antimicrobienne des quelques souches lactobacilles isolées à partir du lait de chamelle vis-à-vis des quelques souches

## Références bibliographiques

---

- pathogènes ciblées. Mémoire de Master Académique. Université KASDI Merbah Ouargla : 5p.
13. **Brisabois A., Lafarge V., Brouillaud A., De Buyser M.L., Collette C., Garin-Bastuji B. et 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): 452-471p.
  14. **Burgess S. A., Brooks J. D., Rakonjac J., Walker K. M., et Flint, S. H;(2009).** The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107:1012-1018p.
  15. **Burgess S.A., Lindsay D. et Flint S.H; (2010).** Thermophilic Bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology*, 144 : 215-225p.
  16. **Carlin ;(2011).** origin of bacterial spore contaminating foods; *food microbiology*, 28:177-182p.
  17. **Cazemier A., Wagenaars S. et Ter streeg P; (2001).** Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of applied Microbiology* 90: 761-770p.
  18. **Ceuppens S., Boon N., Uyttendaele M;( 2013).** Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS microbiology ecology* 84:433-450p.
  19. **Chilliard Y. et Lamberet G ; (1984).** La lipolyse dans le lait : les différents types, mécanismes, facteurs de variations, signification pratique. *Le lait*, 64 : 544-578 p.
  20. **Claus D. and Berkeley C. W. (1986).** The Genus *Bacillus*. In: Sneath PHA ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore:1105-1139p.
  21. **Conte S ; (2008).** Evolution des caractéristiques organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques du lait caillé traditionnel. Mémoire N°05. Université Cheikh Anta Diop de Dakar : 5-6 p.
  22. **De Hoon M.J.L., Eichenberger P. et Vitkup D ; (2010).** Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology*, 20 : 735-745 p.
  23. **Delarras C ; (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures- moisissures. *Edition Lavoisier Tec et Doc*, Paris :123-154p.
  24. **Dromigny É ;(2009).** *Bacillus anthracis*. édition *TEC et DOC/Médicales Internationales* :67-71p.
  25. **Ehling-Schulz M., Fricker M. et Scherer, S; (2004).** Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *Fems Microbiology Letters*; 232: 189-195p.
  26. **Eichenberger P;(2007).** Genomics and cellular biology of endospore formation. In *Bacillus: Cellular and molecular biology*. P. Graumann. Wymondham, UK, Caister Academic Press: 319-350 p.

## Références bibliographiques

---

27. **Errington J; (1993).** "*Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis." *Microbiological Reviews*, 57(1) : 1-33 p.
28. **FAO ; (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO Alimentation et nutrition n°28.
29. **FAO/OMS, (2000).** Codex Alimentarius : Lait et produit laitiers, 2eme édition- Rome: FAO ; OMS: 136p.
30. **Gaillard S ; (2003).** Modélisation de la thermorésistance, de la Viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus*, en fonction de la température, du pH et de l'activité aqueuse. Thèse d'Université de Bretagne Occidentale.
31. **Geneviève F ;(1996).** Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre (France). Les colloque n°81 ; *Editions Quae*, Institut technique des produits laitiers caprins, Institut national de la recherche agronomique (France) : 11p.
32. **Granum P;(1994),***Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology* 76(Symposium supplement):61-66p.
33. **Guech F ; ( 2015).** Les bactéries du « groupe *Bacillus cereus* » dans les conserves à pH peu acide (petit pois) : détection, caractérisation par methode probabiliste numérisée, moléculaire et antibiorésistance. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba.
34. **Guech-Lamari F. et Kirane-Gacemi D ; (2012).** Les bactéries sporulées dans les conserves de légumes (petits pois) : Recherche et caractérisation phénotypique ; *Rev. Sci. Technol.*, Synthèse; 25: 131- 139p .
35. **Hamiroune M., Berber A .et Boubekour S ; (2014).** Qualité bactériologique du lait cru de vaches locales et améliorées vendu dans les régions de Jijel et de Blida (Algérie) et impact sur la santé publique ; *Ann. Méd. Vét* ;158 : 137-144p.
36. **Heuchel V., Chatelin Y.M., Breau S., Sobolewski F., Blancard N., Baraton Y. et Ayerbe A ; (2003).** Lipolyse du lait de vache et qualité organoleptique des produits laitiers. *Renc. Tech. Ruminant*, 10: 223-226 p.
37. **Hilbert D.W. et Piggot P.J;(2004).** Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 234 p.
38. **Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. et Williams S.T;(1994).** *Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology*. p: 518-537. 9th EDN., Williams and Wilkins, Baltimore.
39. **Institut de l'élevage; (2009).** Traite des vaches laitière. Matériel. Installation. Entretien. 1<sup>ère</sup> édition. France Agricole. Produire mieux : 55-554p.
40. **Jeantet R., Mahaut M., Brulé G. et Schuck P ; (2008).** Les produits laitiers, 2<sup>ème</sup> édition *Tec et Doc* lavoisier, Paris : 1P.

## Références bibliographiques

---

41. **Johnson,K; (1984).** *Bacillus cereus* food borne illness an update. Journal of Food Protection; 47(2):145-153p.
42. **Kaan Tekinsen K., Elmali M. et Ulukanli Z; (2007).** Microbiological Quality of UHT Milk Consumed in Turkey. Journal of Food Safety, 7 : 45-48p.
43. **Larpent J-P., (1997).** « Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Paris: Technique et documentation » : 273 p.
44. **Levy C ; (2010).** Principaux facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour la décontamination des microorganismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires ; Thèse de doctorat ; Ecole Doctorale "Science des procédés-science des aliments" Université Montpellier II : 7p.
45. **Lewis, M. J., et Deeth, H. C; (2009).** Heat treatment of milk. In A. Y. Tamime (Ed.), Milk processing and quality management : 168-204p.
46. **Loison P ;(2013).** Etude de la spore de *Bacillus subtilis* : caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. Thèse N°490. Université de Bourgogne ; Ecole Doctorale Environnement - Santé – STIC : 14p.
47. **Mami A ;(2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocine à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de Doctorat. Université d'Oran : 7P .
48. **Matz L. L., T. C. Beaman, et al ; (1970).** "Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*." Journal of Bacteriology 101(1): 196-201 p.
49. **Mekroud H ; (2011).** Effet de la température sur la production laitière dans la Région De Sétif ; Mémoire De Magister En Sciences Agronomiques ; Université Ferhat Abbas- Sétif : 9P.
50. **Moir A; (2006).** How do spores germinate?. Journal compilation: The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology, 101:526-530p.
51. **Murphy, P.M., Lynch D., and Kelly P.M. (1999).** Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. Int. J. Dairy Technol ; 52: 45–50p.
52. **Nguyen Thi Minh H., Durand A., Loison P., Perrier-Cornet J.-M. et Gervais P ;(2011).** Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. Applied Microbiology and Biotechnology; 90:1409-1417p.
53. **Nicholson W. L and Setlow P; (1990).** Sporulation, germination and outgrowth. In Molecular biological methods for Bacillus. C. Hardwood and S. Cutting. Chichester, UK, John Wiley & Sons Ltd: 391-450 p.
54. **Pellerin P ;(2001).** Mise au point intérêt nutritionnel de lait de chèvre Connaissance actuelles et perspectives. *Ann Pharm Fr* .59 :51- 62 p.

## Références bibliographiques

---

55. **Perrin G ; (1997)**. Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre. *Ed : INRA, Paris, les colloques n°81 : 102p.*
56. **Planchon S., Dargaignaratz C., Levy C., Ginies,C., Broussolle, V., Carlin, F;( 2011)**. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food Microbiology ;28 :291-297p.*
57. **Ponce., Adrian., Stephanie A. Connon., and Pun To Yung;(2008)**. "Detection and viability assessment of endospore-forming pathogens" *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer New York: 481-523 p.*
58. **Rahli F ;(2015)**. Valorisation du lait de chamelle par l'exploitation des potentialités technologiques des bactéries lactiques isolées localement. Thèse de Doctorat (LMD). Université d'Oran : 23-24p.
59. **Rajkovic A., Uyttendaele M., Vermeulen,A., Andjelkovic M., Fitz-James I., in't VeldP., Denon Q., Verhe R., Debevere J;( 2008)**. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology 46; 536-541p.*
60. **Richard J ;(1983)**. Nature de la flore microbienne dominante et sous-dominante des laits crus très pollués. *Le lait, 63 : 148-170 p.*
61. **Seale R.B., Flint S.H., McQuillan A.J., and Bremer P.J; (2008)**.Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Appl. Environ. Microbiol. ; 74:731–737p*
62. **Tchamba C.N ;(2007)**. Caractérisation de la flore lactique des laits fermentés artisanaux au Sénégal : cas de la zone des Niayes. Thèse n°19. Université Cheikh Anta Diop De Dakar : Ecole Inter-Etats Des Sciences Et Médecine Vétérinaires (E.I.S.M.V.) :15p.
63. **Teyssou R., Hance P., Nicand E., Nizou J,Y.et Buisson Y ; (1998)**. Les infections à *Bacillus cereus* : bactériologie, clinique et traitement. *La Lettre de l'Infectiologue- Tome XIII - n°3 :99-104p.*
64. **Veisseyre R. et Lenoir J ; (1992)**. Le lait, les fromages le beurre *In Alimentation et nutrition humaines. ESF éditeur ; Paris : 848 p.*
65. **Vignola C.L ; (2002)**. Science et technologie du lait : Transformation du Lait, École polytechnique de Montréal.
66. **Woese C. R. (1987)**. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews, 51: 221- 271p.*
67. **Yakhlef H., Madani T.,Ghozlane F et Bir B ;(2010)**.Rôle du matériel animal et de l'environnement dans l'orientation des systèmes d'élevages bovins en Algérie ;in <<la filière lait en Algérie>>. Communication aux 8èmes journées des sciences vétérinaire ,18 et 19 Avril. École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.
68. **Yobouet B.A ;(2016)**. Contamination du lait cru et de l'attiéké vendus sur les marchés informels à Abidjan (Côte d'Ivoire) par le groupe *Bacillus cereus* et analyse des risques. Thèse N° 296. Université Nangui Abrogoua : 11-26p.

## Références bibliographiques

---

69. Yuan D.D., Liu G.C., Ren D.Y., Zhang D., Zhao L., Kan C.P., Yang Y.Z., Ma W., Li Y., and Zhang L.B; (2012). A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milkpowders in China. Food Contr; 25: 752–757p

## Annexe

### **Compositions de Muller Hinton:**

Beef infusion solides .....	2.0g/l
Starch.....	1.5g/l
Casein hydrolysate.....	17.5g/l
Agar .....	17.0g/l

pH 7.4 +/- 0.2 at 25°C

### **Compositions de Gélose Nutritive:**

Beef Extract .....	3.0g/l
Gelatin peptone .....	5.0g/l
Bacteriological Agar.....	15.0g/l

pH 7

### **Compositions de BHI:**

Brain Heart Infusion (from solids)..	17.5 g/l
Proteose Peptone.....	10.0 g/l
Sodium Chloride .....	5.0 g/l
Glucose .....	2.0 g/l
Disodium Phosphate .....	2.5 g/l

pH 7.4 +/- 0.2 at 25°C

## الملخص

البكتيريا العصوية هي بكتيريا متواجدة في كل مكان، كما وجدت في العديد من الأطعمة بما في ذلك حليب البقر الذي يعتبر وسيلة مثالية للنمو الميكروبي. البكتيريا العصوية تتسبب في اتلاف الاغذية او تؤدي الى حالات مرضية. يهدف هذا العمل إلى العثور على هذه البكتيريا في الحليب المباع في الأغواط، ومن ثم تقييم مقاومتها للحرارة. اظهرت النتائج تلوث مع متوسط تلوث 3 لوغو (كفو / مل). تم (80min) % من 11 عينة التي تم تحليلها بعد التسخين (80 درجة مئوية / 10 الحصول على مجموعه 11 العزلة. 5 عزلات فقط تم تسخينها في درجات حرارة مختلفة. أظهرت هذه العزلات مقاومة مرتبطة بالعزل. في النهاية يمكن استخدام نتائج هذا العمل بعد التحديد الوراثي للعزلات والبيانات (D حرارية متغيرة (قيم إلى وضع نموذج لتقييم التعرض للخطر البكتيري المتواجد.

الكلمات المفتاحية : حليب البقرة، البكتيريا العصوية، مقاومة الحرارة، لتقييم التعرض للخطر

## Résumé

*Bacillus* spp. sont des bactéries ubiquitaires rencontrées dans plusieurs aliments notamment le lait de vache qui considéré comme milieu idéal pour toute croissance microbienne. Elles peuvent être soit une flore d'altération et/ou pathogène. Ce travail vise à rechercher et à dénombrer ces bactéries dans le lait vendu à Laghouat, ensuite, à évaluer leur thermoresistance. De ce fait, la prévalence de contamination de 11 échantillons du lait analysés après traitement thermique à 80°C/10min était de 80% avec une contamination moyenne de 3 log (ufc/mL). Au total 11 isolats ont été obtenu dont 5 étaient testés vis-à-vis la température. Ces isolats ont montré une thermorésistance (D values) variable qui dépend de l'isolat. Les résultats de ce travail peuvent être utilisés après l'identification moléculaire des isolats comme donnée à l'élaboration d'un modèle d'évaluation d'exposition au *B. cereus* s'il existe.

**Mots-clés :** Lait de vache, *Bacillus*, thermo-résistance, évaluation de l'exposition.

## Abstract

*Bacillus* spp. are ubiquitous bacteria found in several foods including cow's milk which is considered an ideal medium for microbial growth. The *Bacillus* spp are a flora of alteration and / or a pathogen. This work aims to find and count these bacteria in the milk sold in Laghouat, and then to evaluate their heat resistance. As a result, the contamination prevalence of 11 milk samples analyzed after heating (80 °C/10min) was 80% with an average contamination of 3 log (cfu/mL). A total of 11 isolates were obtained which 5 were heated at different temperatures. These isolates showed a variable heat resistance (D values) which depends on the isolate. The results of this work can be used after the molecular identification of the isolates as data to the setting a model of exposure evaluation of *B. cereus* if it exists.

**Keys words :** cow's milk, *Bacillus*, heat resistance, exposure assessment