

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمار ثلجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR THELIDJI LAGHOUCAT

FACULTE DES SCIENCES

كلية العلوم

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

قسم البيولوجيا



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Science Biologique

Option : Microbiologie appliquée

THEME

Recherche des indicateurs de Biofilms dans le lait UHT Partiellement écrémé commercialisé dans la région de Laghouat

Présenté par : ZEROUIL Amel, MEKKI Imane, NEDJEM Affaf

Devant le jury :

Président : CHAIBI Rachid

MCA à l'université de Laghouat

Rapporteur : CHETATHA Mohamed

MAA à l'université de Laghouat

Examineur : MADOURI Redouane

MAA à l'université de Laghouat

Soutenue le : 22/09/2020

A decorative border with intricate black floral and vine patterns surrounds the text. The border features swirling vines, leaves, and small flowers, framing the central content.

Remerciements

Tout d'abord, on remercie le bon Dieu de nous avoir accordé la santé, le courage et le force d'aller jusqu'au bout de notre travail.

Nous exprimons tous nos remerciements à l'ensemble des membres de notre jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce mémoire:

CHAIBI Rachid président de jury MCA à l'université de Laghouat.

MADOURI Redouane examinateur MAA à l'université de Laghouat.


*Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à notre encadreur **CHETATHA Mohamed** MAA à l'université de Laghouat, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et sa contribution à l'élaboration de ce travail.*


Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire.

Merci


Dédicace


Je dédie ce mémoire

 *A* ma mère le plus cher à mon cœur, à celle qui m'a guidée pour faire mes premiers pas et qui m'a appris mon premier mot, à celle qui fut toujours à mes côtés.

 *A* mon père qui ont attendu et espèrent ma réussite, ma profonde gratitude pour tous ce qui a fait pour moi

 *A* mon cher frère. Que Dieu le protège

 *A* tous mes collègues de la promotion. *A* mes chers amis *Imane, Affaf, Assia, Meriem.*

 Sans oublier tous les professeurs de l'enseignement supérieur et surtout mon encadreur *chetetha.M.*

Amel

A decorative border with black floral and vine motifs surrounds the text. The border features intricate scrollwork, leaves, and small flowers, framing the central content.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à.

Avant tout, je remercie le grand dieu qui nous a aidés à élaborer ce modeste travail

Je dédie également mes chers parents qui m'encourager et de me soutenir pour accomplir ce travail

A mes chères sœurs Assia, Fatima et mes chers frères

A tout ma famille et toutes mes amies chacun par son nom et a mon fiancé

A mes chers trinômes AMEL, AFFAF pour leur patience et leur diligence

A toute la promotion de Microbiologie appliquée 2020-2021 et toute personne qui me connaît

MEKKI Imane



Dédicace

Je dédie cet évènement marquant :

- ✚ A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père
- ✚ A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère
- ✚ A mes chers frères : Aymen ,Idris ,Abdou
- ✚ A tout ma famille, les coussins, les voisins
- ✚ A mes trinômes : Amel ; Imane
- ✚ Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieure

MERCI INFINIMENT

Affaf

ملخص

تعتبر العصيات الشمعية (*Bacillus cereus*) من المؤشرات الرئيسية على وجود تلوث غذائي في الصناعات الغذائية و دليل هام على تثبيت البيوفيلم (Biofilms) على أسطح وأوعية المعدات وفي مجاري القنوات والأنابيب وفي حلقات البسترة والتعقيم.

هذه الدراسة هي تكملة للتحاليل التي أجريت السنة الماضية على أغلب العلامات التجارية الوطنية للحليب المعقم منزوع الدسم جزئياً وهذا لتقييم صحة الحليب الذي يتم تسويقه في منطقة الأغواط والذي يعتبر من أهم الأغذية الأساسية حيث تحصلنا على النتائج التالية للفحوصات الفيزيائية الكيميائية والميكروبيولوجية التي جعلت من الممكن التعرف إلى جنس السلالات العصيات وتصنيفها إلى سبعة في أنماط حيوية مختلفة، للأنواع التالية :

Bacillus spharricus, Bacillus fusiformis, Bacillus badius, Brevibacillus choshinensis, Bacillus centrosporus, Bacillus brevis, Bacillus cereus.

الكلمات المفتاحية: صناعة الحليب ، الحليب UHT ، Biofilms ، العصيات الشمعية ، الأغواط.

Résumé

Bacillus cereus est un indicateur majeur de la contamination des aliments dans l'industrie alimentaire et une preuve importante de la fixation des biofilms sur les surfaces et les conteneurs des équipements, dans les conduits et les tubes, et dans les anneaux de pasteurisation et de stérilisation.

Cette étude s'inscrit dans la continuité des analyses menées l'année dernière sur la plupart des marques nationales de lait partiellement écrémé stérilisé, et il s'agit d'évaluer la santé du lait commercialisé dans la région de Laghouat, considérée comme l'un des aliments de base les plus importants, car nous avons obtenu les résultats suivants des examens physico-chimiques et microbiologiques qui ont permis d'identifier Le genre des souches de bacilles et sa classification en sept biotypes différents, pour les types suivants: *Bacillus spharricus, Bacillus fusiformis, Bacillus badius, Brevibacillus choshinensis, Bacillus centrosporus, Bacillus brevis, Bacillus cereus.*

Mots clés : l'industrie laitière, Lait UHT, Biofilms, *Bacillus cereus*, Laghouat.

Abstract

Bacillus cereus is a major indicator of food contamination in the food industry and important evidence of the binding of biofilms to surfaces and containers of equipment, in ducts and tubes, and in pasteurization and sterilization rings.

This study follows on from the analyzes carried out last year on most of the national brands of sterilized partially skimmed milk, and it aims to assess the health of the milk marketed in the Laghouat region, considered to be the one of the most important staple foods, because we have obtained the following results of physical, chemical and microbiological examinations that have identified the genus of strains of bacilli and its classification into seven different biotypes, for the following types: *Bacillus spharricus, Bacillus fusiformis, Bacillus badius, Brevibacillus choshinensis, Bacillus centrosporus, bacillus brevis, Bacillus cereus.*

Keywords: Dairy Industry, UHT Milk, Biofilms , *Bacillus cereus*, Laghouat.

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Sommaire	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Historique	3

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralité sur le lait	4
I. Définition du lait	4
II. Composition du lait	4
II.1. Composition physicochimique	4
II.1.1. l'eau	5
II.1.2. Les glucides	5
II.1.3. La matière grasse	5
II.1.4. Les protéines	5
II.1.5. Les minéraux	6
II.1.6. Les vitamines	6
II.1.7. Les enzymes	6
III Caractéristiques du lait de vache	7
III.1. Caractéristiques organoleptiques	7
III.1.1. Couleur	7
III.1.2. Odeur	7
III.1.3. Viscosité	7
III.1.4. Saveur	7
III.2. Caractéristiques physicochimique	7

III.2.1. Densité	7
III.2.2. Acidité	7
III.2.3. Point de congélation	7
III.2.4. Point d'ébullition	8
III.2.5. Masse volumique	8
III.3. Les caractéristiques microbiologiques de lait	8
III.3.1. Flore indigène	8
III.3.2. Flore de contamination	8
III.3.2.1. Flore d'altération	8
III.2.2. Flore pathogène	8
IV. Les différents types du lait	9
IV.1. Lait cru	9
IV.2. Lait traités thermiquement	9
IV.2.1. Lait pasteurisé	9
IV.2.2. Lait stérilisé	9
IV.2.2.1. Lait stérilisé	9
IV.2.2.2. Lait UHT	9
IV.2.2.2.1. Procédé de fabrication du lait UHT	10
IV.2.2.2.2. Différents types du lait UHT	12
IV.2.2.2.2.1. Lait UHT	12
IV.2.2.2.2.2. Lait UHT partiellement écrémé	12
IV.2.2.2.2.3. Lait UHT écrémé	12
IV.2.2.2.3. Composition chimique du lait UHT	12
V. Qualité du lait UHT	13
V.1. Qualité microbiologique	13
V.2. Qualité organoleptique	13
VI. Inconvénients et avantages du traitement UHT	13
VI.1. Inconvénients	13
VI.2. Avantages	13
Chapitre II : Biofilms	

I. Généralité	14
II. Définition de biofilms	14
III. Etapes de formation du biofilm	14
IV. Les biofilms dans l'industrie laitière	15
IV.1 Généralité sur <i>Bacillus</i>	16
IV.1.1. Groupe <i>Bacillus cereus</i>	17
IV.1.2. <i>Bacillus cereus</i>	17
IV.1.3. Pouvoir pathogène	18
V. Biofilm de <i>Bacillus cereus</i>	18

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériels et méthodes

I. Echantillonnage	20
II. Prélèvement	20
III. Analyse physico-chimique	20
III.1. Mesure du pH	20
IV. Analyses organoleptiques	20
V. Analyses microbiologiques	21
V.1. Les germes recherchés	21
V.2. Préparation des dilutions décimales	22
V.3. Ensemencement et dénombrement	22
V.3.1. Inoculation en masse	22
V.3.2. Dénombrement sur milieu Mossel	24
V.3.3. Isolement et purification	24
V.4. Identification biochimique	24
V.4.1. Galerie Api 20 E	24

Résultats et discussions	
I. Résultats	26
II. Discussion	34
Conclusion	36
Références bibliographiques	37
Annexe	47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition moyenne du lait en générale.	04
Tableau 2 : Composition lipidique du lait.	05
Tableau 3 : Composition moyenne des différents types de lait UHT en g/l.	12
Tableau 4 : Les dates de prélèvement des différentes marques.	20
Tableau 5 : Résultat des caractéristiques organoleptiques du lait UHT.	28
Tableau 6: résultats de mesure de pH des différents échantillons du lait.	49
Tableau 7: résultats de dénombrement des FMAT sur le milieu PCA de différents échantillons du lait UHT.	49
Tableau 8 : résultats de dénombrement des Bacillus sur le milieu MOSSEL des différents échantillons du lait UHT.	50

Liste des figures

Figure 01 : composition minéral du lait de vache (g/l)	06
Figure02 : diagramme de fabrication du lait stérilisé UHT	11
Figure 03: Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilm	15
Figure 04 : <i>Bacillus cereus</i> en bâtonnets	16
Figure 05: Formation de biofilms par <i>Bacillus cereus</i> sur l'acier inoxydable	19
Figure 06: Analyses organoleptiques des 2 marques	21
Figure 07 : Préparation la dilution décimale	22
Figure 08: technique de préparation des dilutions décimale et Dénombrement de La FTAM dans le lait UHT.	23
Figure 09 : la galerie Api 20 E avant l'incubation	25
Figure 10 : Les mesures du pH de trois marques du quatre lots	26
Figure 11 : Les mesures du pH de deux marques	27
Figure12 : culture bactérienne sur milieu PCA	29
Figure 13: dénombrement des colonies des différents laits en UFC/ml	29
Figure 14 : Dénombrement des colonies des quatre lots en UFC/ml	30
Figure 15 : culture bactérienne sur milieu MOSSEL	30
Figure 16 : dénombrement des colonies sur milieu Mossel	31
Figure 17: Leur Résultats de dénombrement des colonies des quatre lots en UFC/ml sur milieu Mossel	31
Figure 18 : le résultat de l'isolement sur milieu MOSSEL	32
Figure 19 : Galerie api 20 E après l'incubation et l'addition des réactifs	32
Figure 20: la fiche du résultat de la galerie api 20 E	33

Liste des abréviations

µm : micromètre

Aw : l'activité de l'eau

Ca : calcium

CO₂ : dioxyde de carbone

EPS : extracellulaire substances (substance polymérique extracellulaire)

FAO: Food and Agriculture Organization

FTAM : Flore Totale Aérobie Mésophile

Galerie API 20 E : galerie d'identification des entéro-bactéries

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point

JORA : journal officiel de la république algérienne

MGLA : matière grasse laitière anhydre

Nacl : chlorure de sodium

NADP : nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCA : plate count agar

pH : potentiel Hydrogène

UFC/ml : unité faisant colonie par milli litre

UHT : ultra haute température

Vit : vitamine

Introduction



Introductions

Introduction

L'industrie alimentaire a connu une importante évolution favorable aux consommateurs, toujours à la recherche de produits de qualité adaptés à leurs besoins fondamentaux de santé et de sécurité. Aujourd'hui, pour conquérir de nouveaux marchés, l'industrie laitière doit maîtriser l'évolution qualitative de ses produits, les labellisés et obtenir ainsi la confiance de ses clients.

Grâce à la richesse de sa composition et la variété de ses constituants, le lait donne naissance par transformation à une très vaste famille de produits. Le lait représente également une excellente source de calcium, de phosphore, de riboflavine et relativement riche en thiamine, Vitamine A. Cependant il est pauvre en fer, cuivre, acide ascorbique et en vitamine D. (Alais et Linden1997)

Malgré l'évolution des processus technologiques qui assurent une certaine garantie hygiénique du lait, le consommateur reste très attaché au produit naturel et frais comme le lait cru, et le lait U.H.T. Depuis des dizaines d'années, tout le lait commercialisé est soumis au contrôle officiel de qualité. Ce contrôle fait l'objet d'une attention particulière et les exigences applicables à la commercialisation de ce produit sont déterminantes pour l'évaluation de sa qualité nutritive et hygiénique.

En fonction de divers traitements, les laits de consommation disponibles actuellement sur le marché algérien sont les suivants : le lait cru, le lait pasteurisé, le lait stérilisé, le lait stérilisé à Ultra Haute Température (U.H.T). Cependant, le lait peut faire l'objet d'un certain nombre d'altérations et de contaminations par des micro-organismes responsables d'intoxication ou de toxi-infection alimentaire : en effet, le lait s'il n'est pas seulement un aliment nutritif, il est souvent un milieu de culture idéal pour la croissance microbienne y compris les micro-organismes pathogènes pour l'homme dont l'ingestion peut causer différentes pathologies (Amiot et al. 2002).

La contamination du lait par une flore microbienne variée survient entre le moment où le lait est traité et le moment où il arrive à l'usine où il va être transformé. Cette microflore connaît des évolutions durant le processus technologique, et de nombreuses sources de contamination sont identifiées le long de la chaîne de production, en particulier les équipements laitiers siège de la formation des biofilms (Malek et al, 2013).

Les bactéries thermorésistantes du groupe *Bacillus cereus* sont bien connues des industriels de l'agroalimentaire, notamment dans le secteur laitier. Ils sont responsables de toxi-infections alimentaires. De par leur capacité de sporulation (Puterflam, 2009).

L'objectif de notre travail est de rechercher la présence des bactéries sporulées thermophiles du type *Bacillus cereus* dans le lait stérilisé UHT, qui est l'un des indices de formation de biofilms dans l'industrie laitière.

Existe-il des indices de la présence de biofilms de *Bacillus cereus* dans le produit fini du lait UHT ?

Introductions

Cette étude nous a permis d'apprécier et de savoir : s'il y a eu oui ou non des contaminations et donc s'ils répondent aux normes bactériologiques. Le document est structuré en une synthèse bibliographique, englobant des généralités sur le lait et le biofilms dans l'industrie laitière et le biofilms de *Bacillus cereus* suivie par la description de la partie matériel et méthodes, techniques utilisées pour l'appréciation de la qualité physico-chimique et microbiologique du lait collecté et enfin les résultats obtenus sont illustrés accompagnés de leur discussion et des principales conclusions auxquelles.

Introductions

Historiques

Un nouveau procédé a cependant bouleversé le mode de conditionnement et de distribution du lait : le traitement UHT (ultra haute température). Cette technique avait été mise au point en Suisse en 1951, mais son intérêt économique se manifesta quand elle fut associée au conditionnement en carton développé par la société suédoise Tétrapak. En 1962, la première chaîne de traitement UHT avec conditionnement aseptique en carton démarrait en Suisse. Le procédé fut adopté dans les autres pays au cours des années 60. En termes de conservation, il présentait des avantages décisifs sur la pasteurisation et, sur le plan organoleptique, se traduisait par un net progrès par rapport au lait stérilisé (**Pierre, 1994**).

La découverte des biofilms est attribuée à Leeuwenhoek (1683) qui observa la présence des communautés de microorganismes à la surface de ses propres dents. **Zobell (1943)** montra que, dans le milieu marin, la quantité de bactéries fixées sur un substrat est largement supérieure à la quantité de bactéries libres dans la phase liquide. **Costerton(1978)** et son équipe proposaient la théorie des biofilms en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté pour la plupart des microorganismes (**Rodney et al., 2002 ; Harold et al., 1997 ; Branger, 2007 ; Givskov et al., 2007**).

Partie bibliographique



Chapitre I

Généralité sur le lait



I. Définition du lait

Le lait est un produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères femelles après la naissance du jeune.

Selon le Congrès International de la Répression des Fraudes (GENEVE 1908), la dénomination LAIT désigne "le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum (**Pougheon et Goursaud, 2001**).

Le lait de vache est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, (**Aboutayeb 2009**) sécrété par les glandes mammaires, comme la vache la chèvre et brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant (**vignola, 2002**).

Selon Le code FAO/OMS "la dénomination lait est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale obtenue par une ou plusieurs traites sans addition ou soustraction (**Luquet, 1987**). Le lait, à la fois aliment et boisson à un grand intérêt nutritionnel grâce à son hétérogénéité (**Vierling, 1998**).

II. Composition du lait

II.1. Composition physico-chimique :

La composition chimique du lait de vache varie en fonction de la race de la vache considérée, d'on âge et de son alimentation (**Tableau 01**). Le lait est un système complexe constitué d'une solution vraie, d'une solution colloïdale, d'une suspension colloïdale et d'une émulsion (**Goursaud, 1985**). Les principales constitutions du lait son (Eau, glucides, protéines, matière grasse, sels minéraux...).

Tableau 01 : Composition moyenne du lait en générale (**Beal et Sodini, 2003**).

Composants	Valeur moyenne (%)
Eau	87.8
Glucides	4.8
Matière grasse	3.9
Protéine	3.2
Minéraux	0.7
Calcium	0.12
Phosphore	0.09
Potassium	0.14

Et des constituant mineurs : enzymes ; vitamines ; pigments ; cellules diverses.

II.1.1. L'eau

L'eau est le constituant majeur du lait, en proportion elle représente environ 80% du lait (**Goursaud et Boudier, 1985**). La présence d'un dipôle et de doublets d'électron libre et lui confère un caractère polaire. Ce caractère polaire et ce qui lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines (**vignola ,2002**).

II.1.2. Les glucides

Des glucides, principalement représentés par le lactose (**Kuzdzal et al.1980**). Le lactose est le constituant important de la matière séchée du lait, ou il représente plus de la moitié de l'extrait sec total (EST). Il joue un rôle dans l'élaboration du système nerveux (galactosidase du cerveau).

Il est hydrolysé en glucose et galactose par la lactase (β galactosidase) au niveau de la muqueuse intestinale.

II.1.3. La matière grasse

Des lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras (**Kuzdzal et al.1980**). La complexité des matières grasses du lait est plus grande car celles-ci comprennent outre des triglycérides, du cholestérol, des esters du cholestérol, des phospholipides. (**Toullec, 1966**).

Tableau 02: Composition lipidique du lait

Constituants	Proportion de lipides du lait (%)
Triglycérides	98
Phospholipides	1
Des fractions insaponifiables	1

II.1.4. Les protéines

Elles constituent avec les sels la partie la plus complexe du lait. Leur importance tient à plusieurs raisons : quatrième groupe de substances par son abondance après l'eau, le lactose et les matières grasses (**MATHIEU, 1998**).

On distingue deux grands groupes de protéines dans le lait : les caséines et les protéines (**POUGHEONet GOURSAUD, 2001**) :

Les caséines elles se répartissent sous forme micellaire de phosphocaséinate de calcium et elles sont facilement dégradées par toutes protéolytique.

Les protéines solubles du lactosérum se répartissent entre Les albumines (β lactoglobuline, Lactalbumine, Sérumalbumine) et Les globulines (Immunoglobulines, Lacto-transferrine), et

les enzymes (Lipase, protéase, phosphatase alcaline, Xanthine-oxydase, lactoperoxydase) (Luquet, 1985).

II.1.5. Les minéraux

Le lait de vache contient des quantités importantes de différents minéraux. Les principaux minéraux sont calcium, magnésium, sodium et potassium pour les cations et phosphate, chlorure et citrate pour les anions (Gaucheron, 2004).

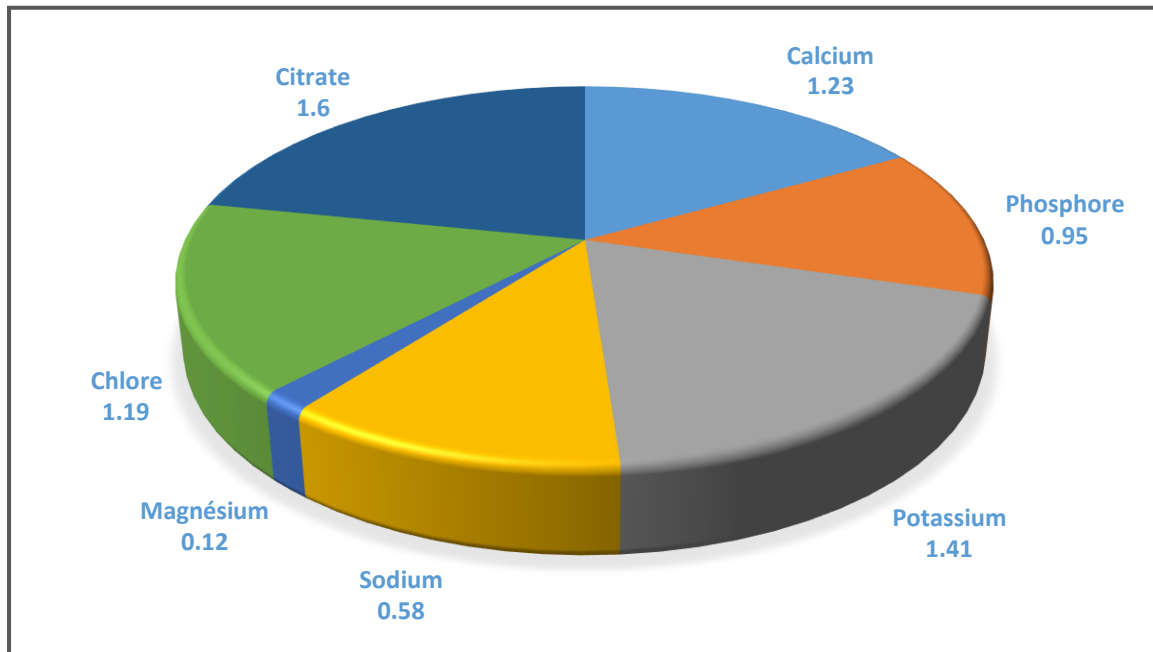


Figure 01 : composition minéral du lait de vache (g/l) (jeantet et al ,2008)

II.1.6. Les vitamines

Les vitamines sont des substances biologiquement indispensables à la vie puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires.

On répartit les vitamines en deux classes selon leur solubilité, soit les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B, vit C, vit H, acide folique, niacine et niacinamide, acide pantothénique), se retrouvent en plus grande concentration dans le sérum, et les vitamines liposolubles (vit A, vit D, vit E, vit K) qui sont associées à la matière grasse (Adrian, 1987).

II.1.7. Les enzymes

Le lait contient principalement trois groupes d'enzymes : les hydrolases, les déshydrogénases (ou oxydase) et les oxygénases. Les deux principaux facteurs qui influent sur l'activité enzymatique sont le pH et la température (kitchen et al, 1970).

III. Caractéristiques du lait de vache

III.1. Caractéristiques organoleptiques

III.1.1. Couleur :

Le lait est un liquide de couleur blanc jaunâtre à blanc mâté, cette dernière résulte du mélange de micelles de caséines, de matière grasse et des pigments de carotènes (**Fredot, 2005**).

III.1.2. Odeur :

La présence de la matière grasse dans le lait lui confère une odeur caractéristique, Au cours de sa conservation, le lait est caractérisé par une odeur aigüe due à l'acidification par l'acide lactique (**Vierling,1998**).

III.1.3. Viscosité :

Elle est fonction de l'espèce, on distingue :

-un lait visqueux chez les monogastriques (jument, carnivore et femme) On parle de lait albumineux.

-un lait moins visqueux chez les herbivores (lait de brebis plus visqueux que celui de la vache). Le lait est dit caséineux (**Alais,1984**).

III.1.4. Saveur :

Il est difficile de définir cette caractéristique du lait normal car elle provient de l'association d'éléments diversement appréciés selon l'observateur. En effet, on distingue la saveur douce du lactose, la saveur salée du Na Cl, la saveur particulière de lécithines qui s'équilibre et qui est atténuée par la masse des protéines (**Martin, 2000**).

III.2. Caractéristiques physicochimiques :

III.2.1. Densité :

La densité du lait à 15C° est en moyenne 1.032 (1.028_1.035), Elle est la résultante de la densité de chacun des constituants du lait et aussi donnée que la matière grasse est le seul constituant qui possède une densité inférieure de 1 (**vignola, 2002**).

III.2.2. Acidité :

Selon **JEAN et DIJON(1993)**, l'acidité du lait résulte de l'acidité naturelle, due à la caséine, aux groupes phosphate, au CO₂ et aux acides organiques et de l'acidité développée, due à l'acide lactique formé dans la fermentation lactique.

III.2.3. Point de congélation :

Le point de congélation est légèrement inférieur à celui de l'eau puisque la présence de solides abaisse le point de congélation, Il peut varier de 0.530C° à 0.575 C°, un point de congélation supérieur à 0.530C° permet de soupçonner une addition d'eau au lait (**vignola,2002**).

III.2.4. Point d'ébullition :

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de la substance ou la solution est égale à la pression appliquée, le point d'ébullition est légèrement supérieur au point d'ébullition d'eau (Vignola, 2002).

III.2.5. Masse volumique :

La masse volumique du lait à 20°C est environ 1030kg/m³. Elle varie en fonction de la composition du lait, notamment de sa teneur en matière grasse qui a un effet prépondérant en raison de sa variabilité suivant la race et l'alimentation (Croguennec et al, 2008).

III.3. Les caractéristiques microbiologiques de lait

Le lait, même provenant d'une traite effectuée dans des conditions de propreté et d'hygiène normale renferme de nombreux germes dont le développement rapide est assuré par sa température à la sortie de la mamelle (35°C) ainsi que par sa richesse en eau et en glucides (Fredoit, 2006). Les microorganismes du lait sont répartis selon leur importance en deux grandes classes : la flore indigène ou originale et la flore de contamination, cette dernière est subdivisée en deux classes : la flore d'altération et la flore pathogène (Vignola, 2002).

III.3.1. Flore indigène

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans des bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10³ germes/ml) (Guiraud, 1998). Cette flore se définit comme l'ensemble des microorganismes qui se retrouvent dans le lait à la sortie du pis, il devrait contenir moins de 5000 UFC/ml, les principales flores sont *Micrococcus* 30-90%, *Lactobacillus* 10-30%, *Streptococcus* et *Lactococcus* < 10 (Vignola, 2002).

III.3.2. Flore de contamination

La flore de contamination est l'ensemble des microorganismes dans le lait de la récolte jusqu'à la consommation. Elle se compose d'une flore d'altération et d'une flore pathogène (Lamontagne, 2002).

III.3.2.1. Flore d'altération

Elles sont des espèces bactériennes du lait cru capables de dégrader le lactose, les protéines ou les lipides de cette matière première (Richard, 1987). Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont *pseudomonas sp*, *proteussp*, les coliformes, soit principalement, *escherichia* et *enterobacter*, les *bacillus sp*, et *clostridium*, certains levures et moisissures, ils causeront des défauts sensoriels de gout, d'arômes, d'apparence ou de texture et peuvent réduire la vie de tablette du produit laitier (Lamontagne, 2002).

III.3.2.2. Flore pathogène

Parmi les bactéries pathogènes pouvant être retrouvées dans le lait, certaines ont peu de chance de se développer (*Bacilles* de Koch, *Compylobacter fætus*, *Salmonella*). D'autres peuvent se multiplier, c'est le cas des bactéries mésophiles, *E coli* et *Staphylococcus aureus* (Richard, 1987).

IV. Les différents types du lait

Les laits destinés à la consommation humaine existant actuellement peuvent être classés en deux catégories, selon leur mode de traitement :

-lait cru : sans traitement thermique.

-lait traité thermiquement.

IV.1. Lait cru

Le lait cru est un produit intéressant sur le plan de la nutrition puisqu'il n'a subi aucun traitement d'assainissement lui permettant d'une meilleure conservation, sa commercialisation doit être sévèrement contrôlée en raison des risques qu'il peut encore présenter pour la santé (**luquet, 1990**).

IV.2. Lait traités thermiquement

Les laits (traités) industriels peuvent consister en une modification de composition (lait écrémé...etc.) et en traitement thermique destiné à éliminer les éventuels germes pathogènes (**Guiraud, 2003**).

IV.2.1.Lait pasteurisé

La pasteurisation consiste à porter le lait à une température suffisante et pendant un délai pour détruire les bactéries pathogènes (**Veisseyre, 1979**).

- La pasteurisation inactive la phosphatase du lait cru.

- La pasteurisation à basse température 30 minutes à 65°C.

- Immédiatement après la pasteurisation, le lait doit être refroidi pour être ramené, dans les meilleurs délais à une température ne dépassent pas 6°C (**Vierling, 1998**).

IV.2.2. Lait stérilisé

LESEUR et MELIK (1999) ont montré que selon le procédé de stérilisation, on distingue le lait stérilisé et le lait stérilisé UHT. Ces laits doivent être stables jusqu'à la date limite de consommation.

IV.2.2.1. Lait stérilisé

Le lait stérilisé est obtenu après 20 minutes de chauffage à 120 °C dans un emballage étanche (**Guiraud, 1998**). Conditionné dans un récipient hermétiquement clos, étanche au liquide et au microorganisme pathogènes (**Leseur & Melik, 1990**), il peut se conserver très longtemps à température ambiante (**Guiraud, 2003**).

IV.2.2.2. Lait U.H.T. (Ultra haute température)

C'est le procédé le plus moderne et le plus courant de nos jours. Il consiste à chauffer le lait pendant 2 à 5 secondes à une température de 135° à 150°C puis à le refroidir quasi instantanément. La température est suffisante pour débarrasser le lait de tout

germe nuisible à sa conservation. Le temps de chauffe très réduit permet de n'altérer ni le goût ni les valeurs nutritives du lait.

Le lait est ensuite versé dans un emballage stérile. Le lait UHT se vend en carton sous forme de brique ou en bouteilles blanches de polyéthylène. Il se conserve 3 à 4 mois à température ambiante fraîche.

IV.2.2.2.1. Procédé de fabrication du lait UHT

Le lait stérilisé UHT est le lait dont la conservation est assurée par l'emploi successif de deux techniques suivantes :

Traitement par procédé de chauffage direct ou indirect, en flux continu, appliqué en une seule fois de façon ininterrompu, pendant un temps très court (1-3 secondes), à une température d'environ 140°C. Les procédés UHT mettent en œuvre:

- Soit le chauffage indirect dans des échangeurs tubulaires ou à plaque.
- Soit le chauffage direct par contact du lait et de vapeur d'eau sous pression (upérisation).

Conditionnement aseptique dans un contenant stérile hermétiquement clos, aux liquides et aux micro-organismes et permettant de soustraire le lait à toute influence défavorable de la lumière. (**Anonyme, 1993**)

Le traitement U.H.T consiste à chauffer le lait à un débit continu à une température d'au moins 132°C pendant quelques secondes, le refroidir à la température ambiante et à l'emballer aseptiquement (**Michel et al, 2002**).

Il permet une conservation longue du lait à température ambiante pendant plus de trois mois. La préparation du lait stérilisé se fait à partir des matières Premières suivantes : Eau (L'eau utilisée est l'eau de ville), poudre de lait, MGLA.

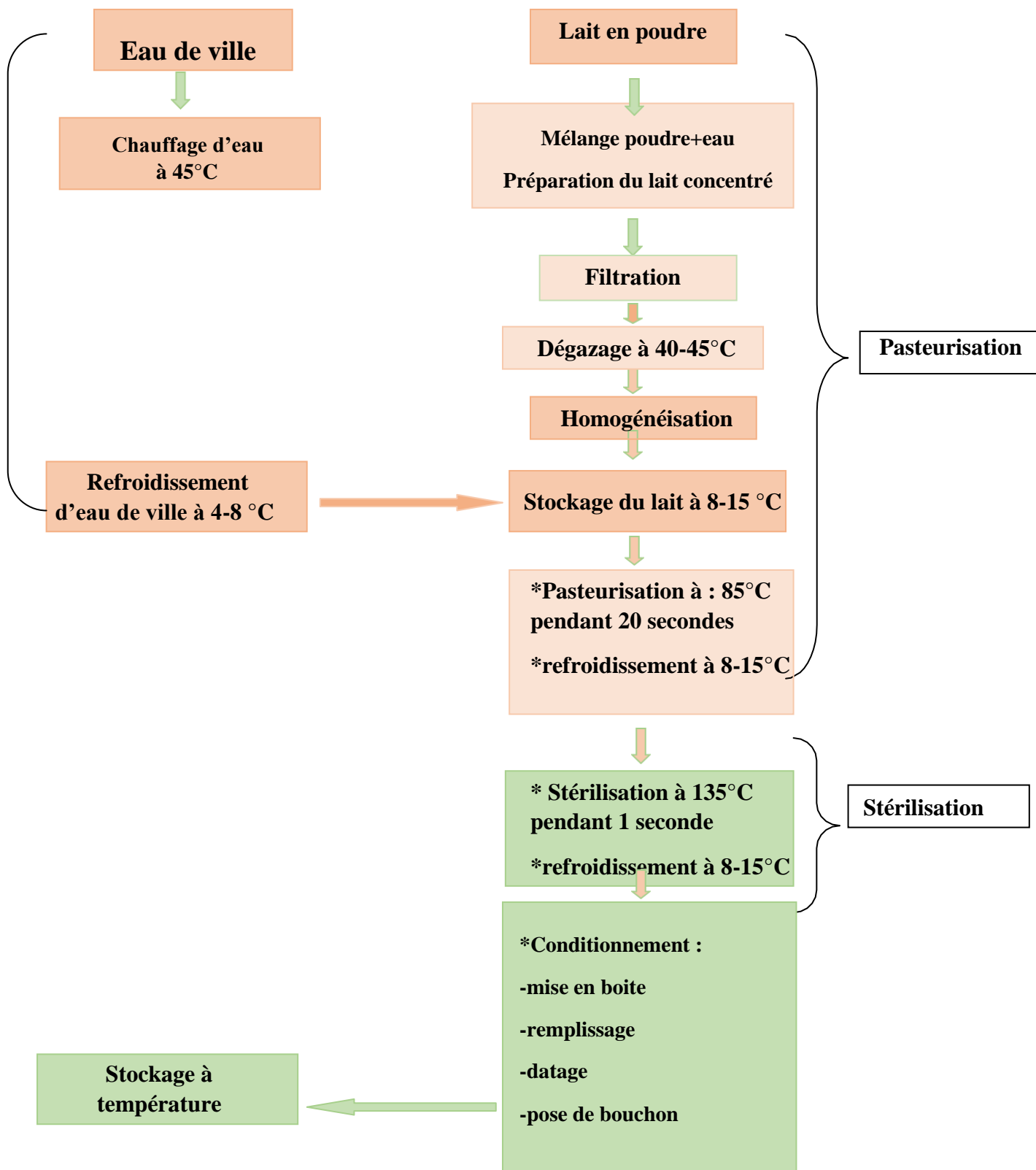


Figure 02 : diagramme de fabrication du lait stérilisé UHT (Veisseyre, 1979)

IV.2.2.2.2. Différents types du lait UHT

IV.2.2.2.2.1. Lait UHT entier

Sa teneur en matière grasse est de 2,8% au minimum (28 g de matière grasse au minimum par litre de lait)

IV.2.2.2.2.2. Lait UHT partiellement écrémé

Sa teneur en matière grasse est de 1,5% à 2% (15 à 20 g de matière grasse par litre de lait).

IV.2.2.2.2.3. Lait UHT écrémé

Sa teneur en matière grasse est de 0,15% ou au plus (1,5 g de matière grasse par litre de lait)

(J.O.R.A.N° 69,2003).

IV.2.2.2.3. Composition chimique du lait UHT

La composition des différents types du lait UHT est représentée dans le tableau

Tableau 03 : Composition moyenne des différents types de lait UHT en g/l (**Feinberg et al, 1987**).

Constituants	Lait UHT (g/l)		
	Lait UHT entier	Lait UHT demi écrémé	Lait UHT écrémé
Eau	878	896	910
Extrait sec total	122	164	90
Azote total	5	5	5.2
Protéine	31.9	31.9	32.9
Lipides	35.4	15.4	2
Glucides	44.7	45.3	45.4

V. Qualité du lait UHT

V.1. Qualité microbiologique

Un traitement thermique intense est souhaitable du point de vue microbiologique. Tous les organismes pathogènes courants susceptibles d'apparaître dans le lait sont tués par le traitement UHT. Il existe toutefois un risque de résistance de spores de certains germes comme *Clostridium* et *Bacillus*, et des enzymes thermostables naturelles du lait, n'ayant qu'un très léger effet sur les propriétés physiques du lait. Le contrôle des matières premières permet de réduire la charge microbienne (**Gosta, 1995**).

V.2. Qualité organoleptique

La couleur du lait après stérilisation UHT reste blanche. Le goût de cuit est faible même si la température est supérieure à celle de la stérilisation classique (**Sechet, 2001**).

VI. Inconvénients et avantages du traitement UHT

VI.1. Inconvénients :

Les traitements technologiques peuvent modifier la composition du lait et ce faisant sa valeur nutritive.

Les traitements UHT ne parviennent pas à inhiber totalement les activités de protéolyses dues à des protéases extracellulaires psychrotrophes. (**Cayot et Lorient, 1998**)

VI.2. Avantages

La stérilisation du lait permet une conservation de longue durée. Ce secteur des laits de consommation connaît avec le procédé UHT un développement important.

Le traitement UHT est considéré comme une révolution importante en technologie laitière depuis l'avènement de la pasteurisation (**Vignola ,2002**).

Chapitre II

Biofilms



I. Généralité

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

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

II. Définition de biofilms

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

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

III. Etapes de formation du biofilm

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (**Parot, 2007**).

Selon **Stoodley et al. (2002)**, on distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms, comme illustre sur la figure 03

- La phase de transport et d'attachement des cellules vers un substrat, ainsi que la création de ce qu'on appelle un film de conditionnement.
- L'adhésion des cellules de façon réversible avec la production d'EPS.
- Le début de la croissance microbienne et de l'évolution de l'architecture du biofilms avec le développement des micro-colonies primaires.
- La maturation du biofilms avec le développement des colonies.
- Le détachement microbien ou le détachement de colonies de biofilms en réponse aux conditions hydrodynamiques.

La communication intercellulaire (quorum sensing) est également indispensable lors de la formation et la maturation du biofilm (**Irie et Parsek, 2008**). Des études ont montré que les appendices de surface, nécessaires dans l'étape initiale de l'adhésion des microorganismes

aux surfaces, avaient tendance à disparaître lors de l'étape de maturation du biofilm, laissant place à d'autres déterminants qui permettent la structuration et le maintien du biofilm (Costerton, 1995).

Suite au détachement, les microorganismes (ou colonies) sont dispersés à nouveau dans le milieu environnant, où ils peuvent coloniser d'autres portions de la surface (Stoodley et al. 2002)

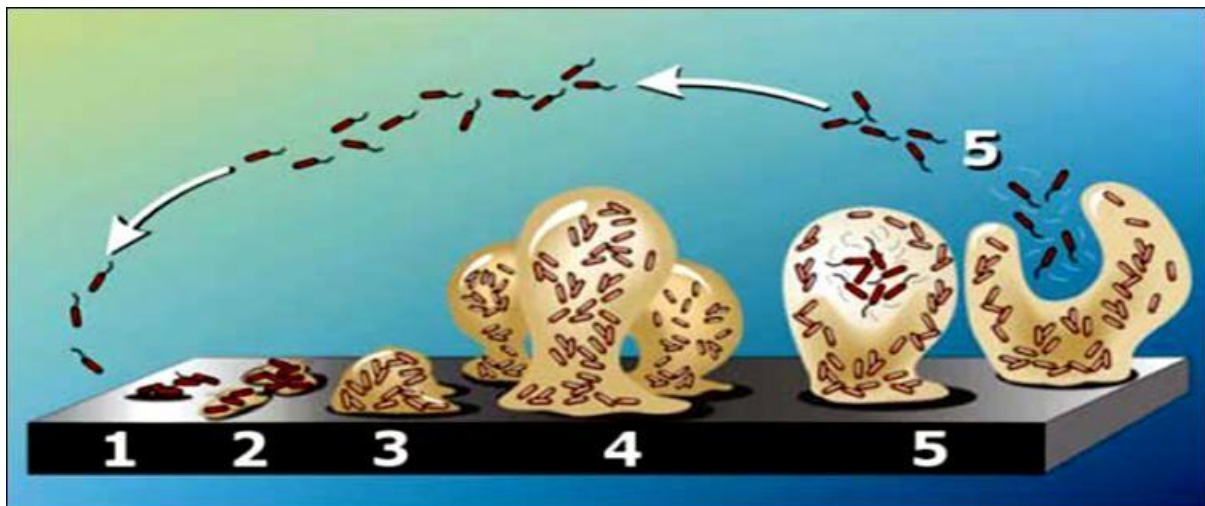


Figure 03 : Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilms (Stoodley et al, 2002).

IV. Les biofilms dans l'industrie laitière :

La capacité de certains micro-organismes à former des biofilms continue de constituer un défi majeur pour différentes industries. Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs des produits laitiers sont remises en cause par le problème des biofilms (Srey et al ,2013). Les équipements laitiers, principalement les tanks de stockage du lait et le système de canalisation ainsi que les appareils de traitement tels que les pasteurisateurs et des évaporateurs , sont reconnus pour être une source de contamination du lait traité par des germes d'altérations ainsi que des pathogènes (Austin et Bergeron, 1995; Kusumaningrum et al ., 2003; Brooks et Flint, 2008 ; Salutiano et al ., 2010 ; Marchand et al ., 2012).

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

IV.1. Généralité sur *Bacillus*

Les bactéries du genre *Bacillus* sont des grands bacilles à Gram positif, groupés en chaînettes, sporulant, chimio hétérotrophes et généralement mobiles avec des flagelles péritriches. Ce genre est aérobic, ou parfois facultatif et catalase positive (Klein et al, 2010).

La plupart sont des saprophytes du sol, de l'eau, de l'air et des plantes, comme *Bacillus cereus* et, *Bacillus subtilis*. Ces microorganismes ne font pas partie des flores commensales de l'homme ou des animaux. Certains sont pathogènes que pour les insectes (Delerras, 2007).

Les *Bacillus* sont responsables de l'altération des produits laitiers, les espèces les plus incriminées sont *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, cette altération est due principalement aux activités enzymatiques des souches contaminant les produits qu'elles peuvent introduire des anomalies dans le lait (la coagulation du lait) (Christieans et Zagorec, 2013).

Ces bactéries sporulées présentent une très forte résistance aux traitements thermiques, comme la pasteurisation. Elles peuvent être extrêmement difficiles à éradiquer à partir d'une usine de fabrication de produits laitiers (Flint et al, 2015).

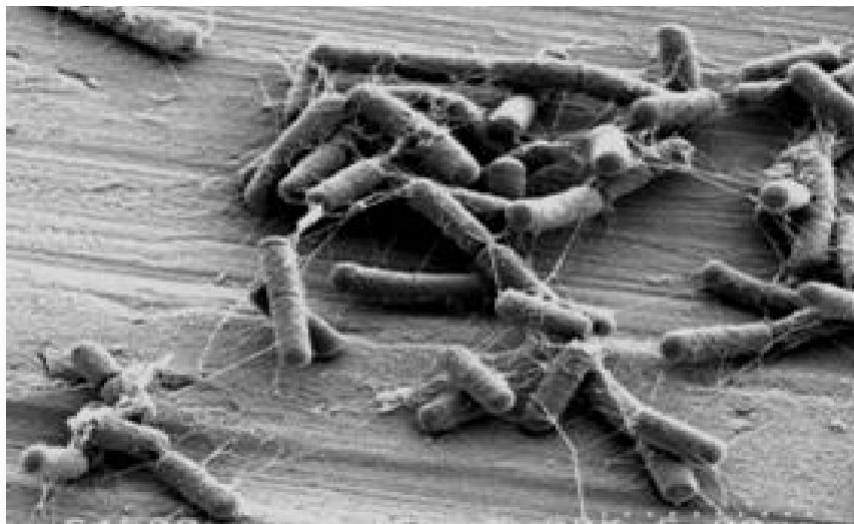


Figure 04 : *Bacillus cereus* en bâtonnets

IV.1.1. Groupe *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est une bactérie sporulée, aéro-anaérobie facultative et thermorésistante ; les températures de croissance de cette bactérie peuvent varier de 5 à 50 °C. Ces caractéristiques lui confèrent une résistance particulière à l'action de bactéricides, aux désinfectants, aux radiations, à la dessiccation et au cycle du froid (**Sabrina Cadel Six et al, 2010**).

Le genre *Bacillus* est capable de résister à des conditions environnementales hostiles en raison de son aptitude à élaborer des spores- (**Mansour &Milliere, 1999**).

Les souches de *Bacillus cereus* sont constituées de bacilles à Gram positif ou à Gram variable, aux extrémités arrondies, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieure à 3 µm et d'un diamètre moyen de 1,4 µm, souvent groupés en chaînes, formant des spores non déformantes, ovales (ou parfois cylindriques), en position subterminale (ou parfois en position paracentrale), aéro-anaérobies, (**Euzéby, 2003**).

Elle est lécithines positive (**Guiraud, 2004**), une activité catalase positive, oxydase négative, *Bacillus cereus* se développer à 7% de Na Cl et au Ph optimal de croissance compris entre 6 à 7 (**Dromigny, 2008**) avec une activité d'eau (Aw) minimale de 0.92 (**Branger, 2007**), la nésine peut avoir une activité inhibitrice sur *Bacillus cereus* (**Dromigny, 2008**).

IV.1.2. *Bacillus cereus* dans l'industrie laitière

Bacillus cereus est considéré comme étant un véritable problème dans les industries agroalimentaires. Cette bactérie résiste à toutes les étapes de la chaîne de production alimentaire et contamine d'une façon persistante les équipements de ces industries. Etant donné son ubiquité (**Faille et al, 2007**).

Pour cette bactérie, réside en sa capacité à former des biofilms. *Bacillus cereus* est capable de former des biofilms sur différentes surfaces (inox, verre, plastique) et dans des conditions très variées (**Wijman et al,2007, Houry et al, 2010**). En condition statique, *Bacillus cereus* et forment préférentiellement des biofilms à l'interface air-liquide, avec 2 composantes, une pellicule flottante sur le milieu de culture et un anneau extrêmement adhérent qui fixe la pellicule flottante sur la paroi du tube (**Fagerlund et al. 2014**). Il a été montré récemment (**El-Khoury et al. 2016**) que la sporulation est plus précoce dans l'anneau que dans la pellicule, et comme que l'anneau est la partie adhérente -- donc persistante - du biofilms, celui-ci représente une source de recontamination, surtout en milieu industriel. En dehors des spores, en mode de vie « sessile » (biofilms) les cellules végétatives baignent dans une matrice qui les protège contre les agents chimiques (**Ryu and Beuchat 2005**).

IV.1.3. Pouvoir pathogènes de *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est très largement réparti dans la nature, il se comporte comme un pathogène opportuniste et cette espèce est également responsable de toxi-infections alimentaires (**Ronner et husmark, 1990**).

Bacillus cereus provoque deux types distincts d'empoisonnement alimentaire, les syndromes diarrhéiques et émétiques, ainsi que d'une variété d'infection locale et systémique telles que l'endophtalmie, l'endocardite, la méningite, la parodontie, une ostéomyélite, infection de plaies, et la septicémie (**Wong, 2006**).

Bacillus cereus est particulièrement responsable de deux types de toxi-infection alimentaire (**Ramarao, 2005**).

- Une intoxication diarrhéique causée par un ensemble de toxine protéique produite dans l'intestin grêle par les bactéries ingérées.
- Une intoxication caractérisée par des vomissements, causée par un petit peptide toxique, extrêmement stable et qui serait produit dans l'aliment.

V. Biofilm de *Bacillus cereus*

Les Biofilms sur les surfaces d'équipements laitiers menacent la qualité et la sécurité des produits laitiers. Ces biofilms sur les lignes de transformation de produits laitiers se caractérisent par un développement rapide (<12 h) et la prédominance d'une seule espèce de bactéries (par exemple *Bacillus* spp.). (**Flint, Bremer & Brooks, 1997**).

De **Leeuw et al., (2007)**, ont montré dans leur étude que la formation de biofilm a lieu dans les 24 h et la dispersion s'effectue ultérieure dans les prochaines 24 h, le Biofilms de *Bacillus cereus* est épais et se développe à l'interface air-liquide, tandis que le montant d'un biofilms formé est beaucoup plus faible dans les systèmes immergés. Ceci suggère que les biofilms de *Bacillus cereus* peuvent se développer en particulier dans les accumulateurs industriels, et systèmes de tuyauterie qui sont partiellement remplis pendant le fonctionnement ou lorsque le liquide résiduel est resté après un cycle de production. En outre, selon la souche et les conditions de culture, les spores constituent jusqu'à 90% du total des chiffres de biofilms. Cela indique que les biofilms de *Bacillus cereus* peuvent agir comme un nid pour la formation de spores et par la suite peuvent libérer leurs spores dans des environnements de production alimentaire.

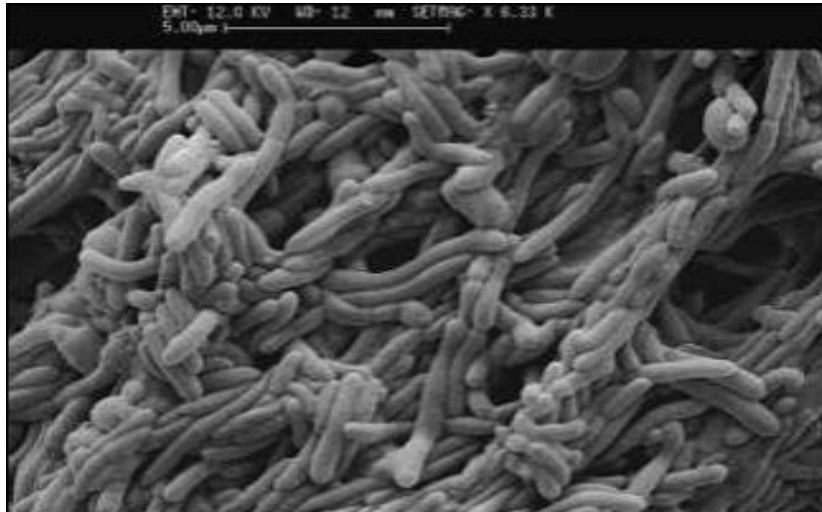


Figure 05: Formation de biofilms par *Bacillus cereus* sur l'acier inoxydable (Simoes et al, 2010)

Partie expérimentale



Matériel et méthodes



I. Echantillonnage

Suite aux examens réalisés à l'année passée, ont complètent les analyses physico-chimiques et microbiologiques du lait UHT partiellement écrémé au niveau de laboratoire pédagogique département de biologie (Wilaya Laghouat).

Nous avons analysé deux différentes marques Algériennes du lait UHT nommé comme suite (A, B, b), à partir un seul lot contient trois échantillons de volume d'un litre.

II. Prélèvement

Pour chaque laiterie, nous avons prélevé neuf échantillons pour un seul lot (trois échantillon de chaque marque). Les prélèvements des deux marques ont été réalisés à différente date.

Tableau 04: Les dates de prélèvement des différentes marques

	Echantillon	Date de fabrication	Date de péremption	Date de prélèvement
lots	A	/	28/01//2020	03/12/2019
	B	/	17/02/2020	03/12/2019
	b	/	07/02/2020	03/12/2019

III. Analyse physico-chimique

III.1. Mesure du pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre de paillasse type (EUTECH instruments Ion 510). La détermination du pH se fait directement en plongeant l'électrode dans un bécher contenant l'échantillon de lait.

IV. Analyses organoleptiques

Pour comparer les caractéristiques organoleptiques telles que la couleur, le goût et la textures des trois marques nous avons composé des jurys de trois étudiantes, on met une quantité de chaque échantillon dans des béchers, puis notée leur vue dans un tableau.



Figure 06 : Analyses organoleptiques des 2 marques.

V. Analyses microbiologiques

L'analyse microbiologique du lait UHT consiste en la recherche et /ou dénombrement d'un certain nombre de microorganismes susceptibles d'être présents dans le lait.

V.1. Les germes recherchés

Le contrôle microbiologique se base sur la recherche de microorganismes révélateurs de contamination, donc nous avons utilisé deux milieux :

- Milieu PCA est un milieu nutritif sans inhibiteur utilisée pour le dénombrement des FTAM.
- Milieu MOSSEL est un milieu utilisé pour la recherche et le dénombrement de *Bacillus cereus* par la technique de comptage des colonies à 30°C lors de l'analyse des produits alimentaire.

V.2. Préparation des dilutions décimale

Les dilutions décimales sont réalisées pour les milieux très riches en microorganismes pour faciliter le dénombrement on utilise l'eau physiologique peptone comme diluant. Pour obtenir une dilution de 10^{-1} on prélève à l'aide d'une pipette stérile 01 ml de lait qu'on introduit dans un tube de 9 ml d'eau physiologique peptone, puis on homogénéise par agitation, on obtient la dilution 10^{-1} . On prend 1 ml de la dilution 10^{-1} dans un autre tube stérile et on l'ajoute à 9 ml d'eau physiologique peptone on obtient la dilution 10^{-2} .



Figure07 : Préparation la dilution décimale

V.3. Ensemencement et dénombrement**V.3.1. Inoculation en masse**

La technique est celle de numération en milieu solide en boîte de Pétri avec l'ensemencement en masse sur le milieu PCA (**Labioui et al, 2009**).

On prépare le milieu de culture (PCA) en le mettant dans un bain-marie, ensuite il est refroidi à 45°C devant un bec bunsen et sur une paillasse bien stérile.

- On ajoute 01 ml de chaque dilution dans les boîtes de pétrie vides et stériles et on remplit le 1/3 de la boîte avec le milieu gélosé.
- Ensuite on mélange soigneusement en faisant des mouvements auscultatoires en forme huit (8) pour bien homogénéiser et on laisse les boîtes jusqu'à ce que le contenu devienne solide.
- On incube les boîtes de pétri à 30°C pendant 72h.

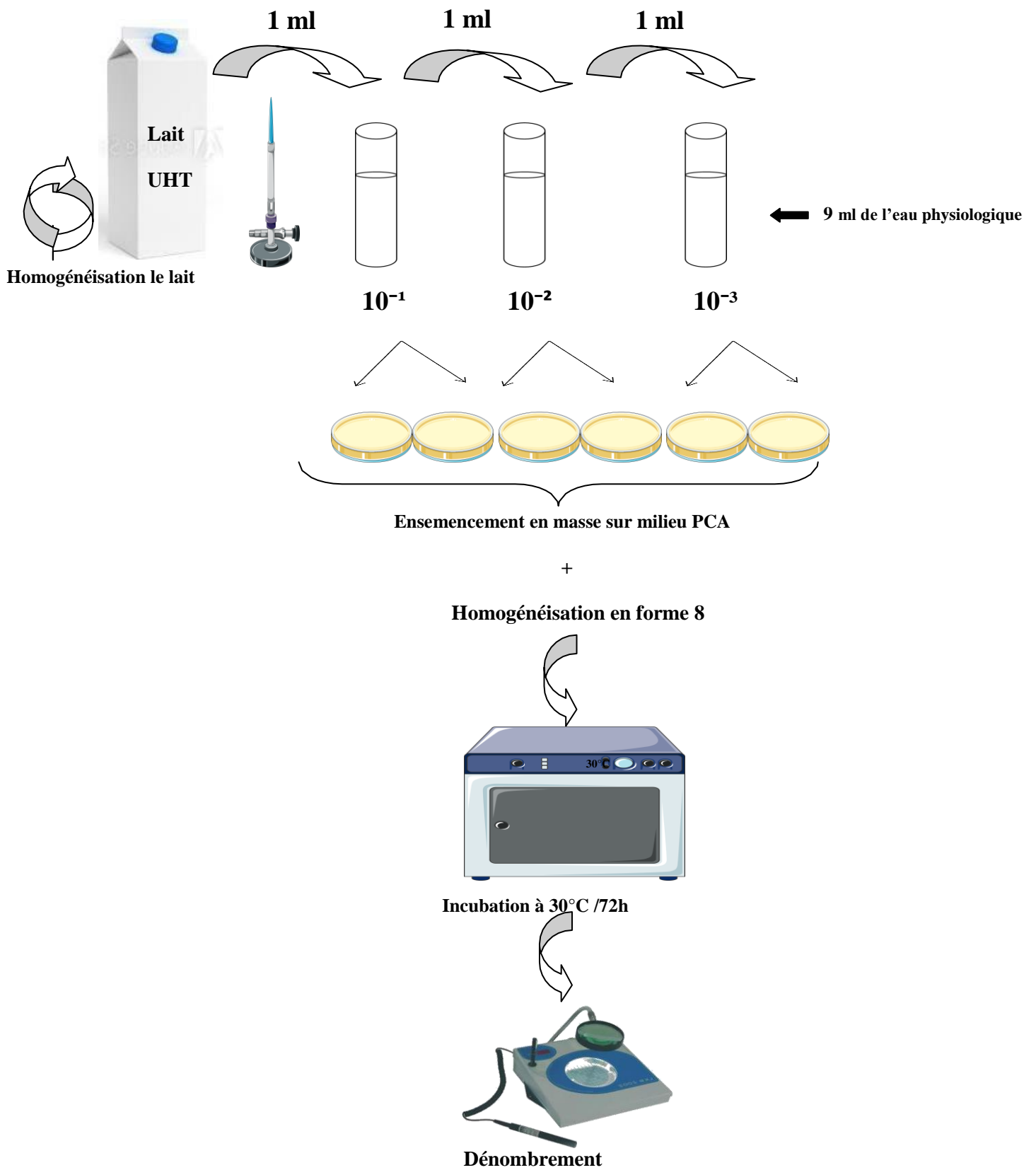


Figure 08 : technique de préparation des dilutions décimale et Dénombrement de la FTAM dans le lait UHT.

V.3.2. Dénombrement sur milieu MOSSEL

Au moment de l'emploi faire fondre un flacon contenant 225 ml de gélose MOSSEL, ensuite le refroidir dans un bain mari à 45°C, on ajout à 900 ml de milieu de base en surfusion ,100 ml d'une émulsion stérile de jaune d'œuf à 20% et 10 ml d'une solution de sulfate de polymyxine à 0.1 %, puis répartir le milieu en boites de pétri à raison de 15 à 18 ml par boite. Laisser solidifier les boites sur pailleasse.

A partir des dilutions décimales, porter aseptiquement 0.1 ml de chaque dilution répartie en surface, puis étaler à l'aide d'une pipette en râteaux stérile sur le milieu MOSSEL.

L'incubation se fait à 30°C pendant 24heures.

V.3.3. Isolement et purification

La purification des souches a été réalisée par pipette Pasteur sur le milieu gélosé de MOSSEL, nous avons utilisées méthode quadrant incubé 24h à 30°C (**Peng, 2001**).

V.4. Identification biochimique

V.4.1. Galerie Api 20E

L'identification biochimique permet d'identifier une espèce en s'appuyant sur ces caractères biochimiques. La galerie API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés. Ainsi qu'une base de données (**Murray et al.1999**).

Le principe la galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produit pendant la période d'incubation 24h à 30°C. Se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (**Moustardier, 1972**).



Figure 09 : la galerie Api 20 E avant l'incubation

Résultats et discussions



Résultats et Discussions

I. Résultats

I.1. Les résultats des tests physico-chimiques du lait UHT

I.1.1. Mesure de pH

Dans ce travail, nous avons mesuré le pH et ont été comparé aux résultats de l'année passée. La figure 10 représente le résultat de la mesure du pH de trois marques du quatre lots de l'année passée.

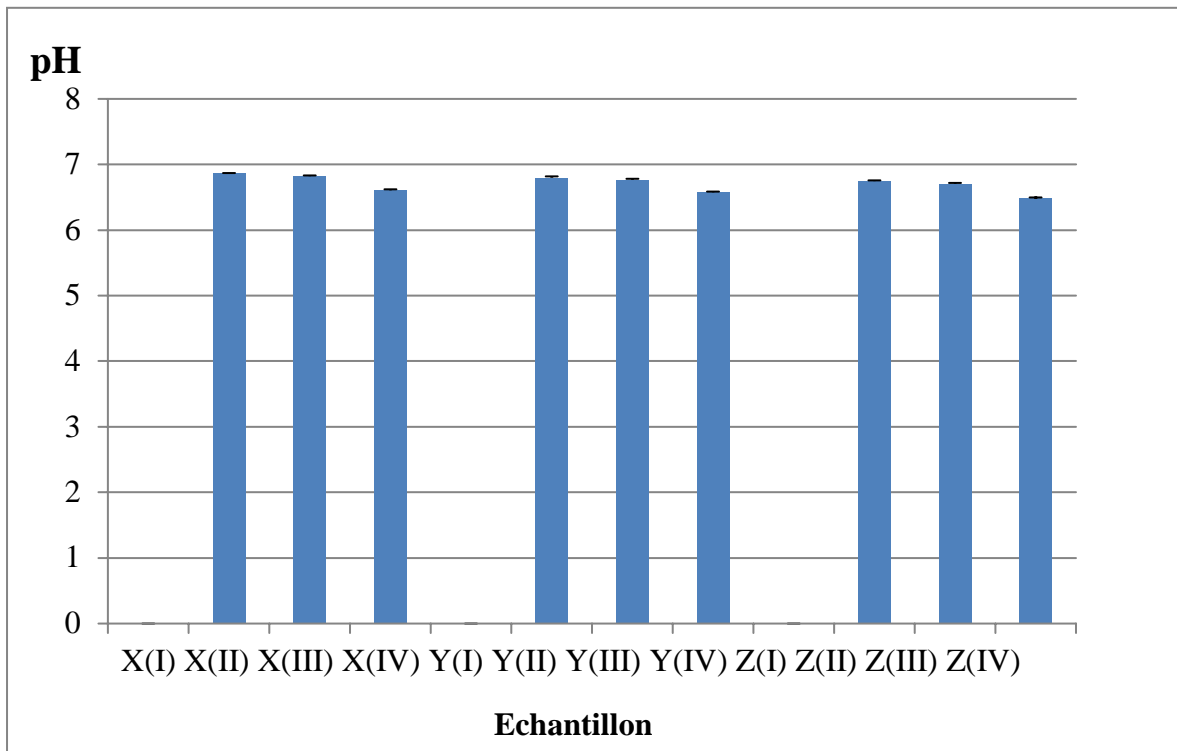


Figure10: Les mesures du pH de trois marques du quatre lots à l'année passée

Résultats et Discussions

La figure 11 montre que le pH du lait UHT, Les valeurs du pH des échantillons analysés sont comprises entre 6.81 et 6.92.

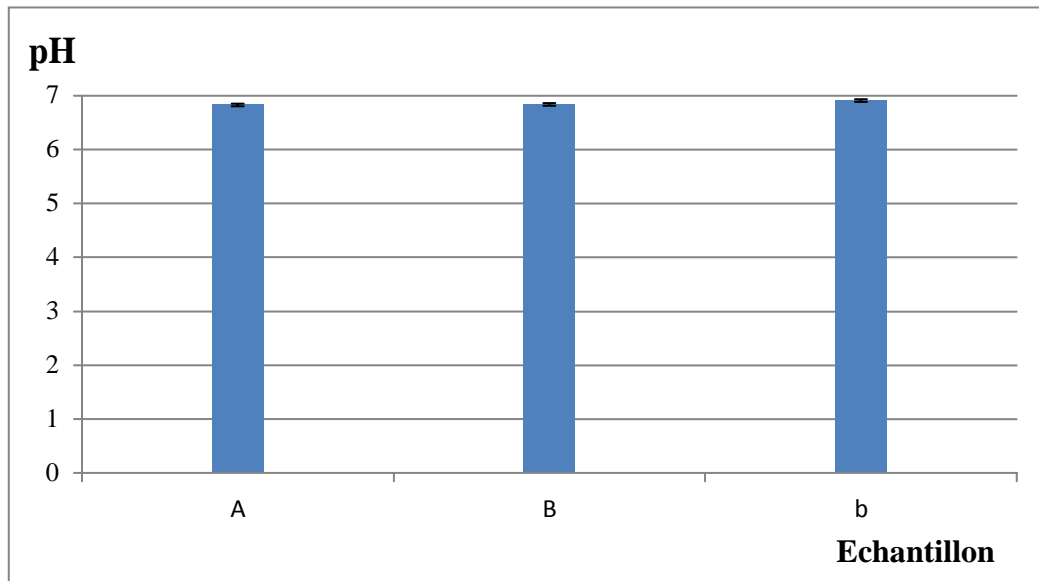


Figure 11 : Les mesures du pH de deux marques

Le PH mesurée de trois échantillons de chaque lait présent des valeurs comprises entre :

6.81 et 6.85 pour le lait **A** avec une moyenne de 6.83

6.82 et 6.86 pour le lait **B** avec une moyenne de 6.84

6.90 et 6.92 pour le lait **b** avec une moyenne de 6.91

D'après les résultats obtenus, on remarque qu'il n'existe pas de différence significative entre les 3 échantillons analysés et les valeurs de pH obtenues (6.81-6.92).Le pH est au voisinage de la neutralité.

Résultats et Discussions

I.2. Les caractéristique organoleptiques du lait UHT

Tableau 05 : Résultat des caractéristiques organoleptiques du lait UHT

Marques	Lot		
	A	B	b
Texture	Légère	Légère	Peu légère
Couleur	Blanc	Blanc jaunâtre	Blanc jaunâtre
Gout	Normal	peu sucré	Légèrement sucré
Odeur	Normal	Normal	Normal

I.3. Résultats des analyses bactériologiques

On retient les boites contenant de 15 à 300 colonies. Le dénombrement des colonies est réalisé selon la formule suivante : $N = \frac{\sum c}{(n1 + 0.1n2) d}$ (AFNOR, 1985 et ISO 8261, 1989).

$\sum c$: somme des colonies de toutes les boites.

d: le facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

n1 : nombre de boites comptées dans la première dilution.

n2 : nombre de boites comptées dans la deuxième dilution.

I.3.1. Dénombrement sur milieu PCA

Après 72h d'incubation à 30°C Les résultats du dénombrement effectué sur le lait UHT sont représentés dans figure 12.

Résultats et Discussions

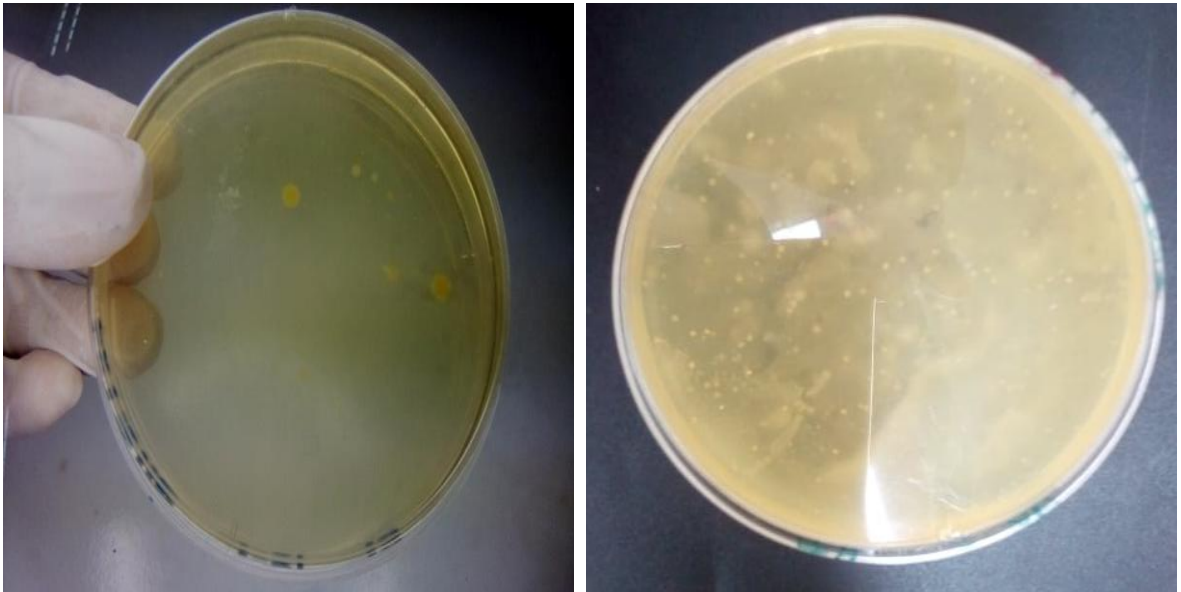


Figure 12 : culture bactérienne sur milieu PCA

Après l'incubation nous avons observé des petites colonies lenticulaires en masse avec couleur blanchâtre.

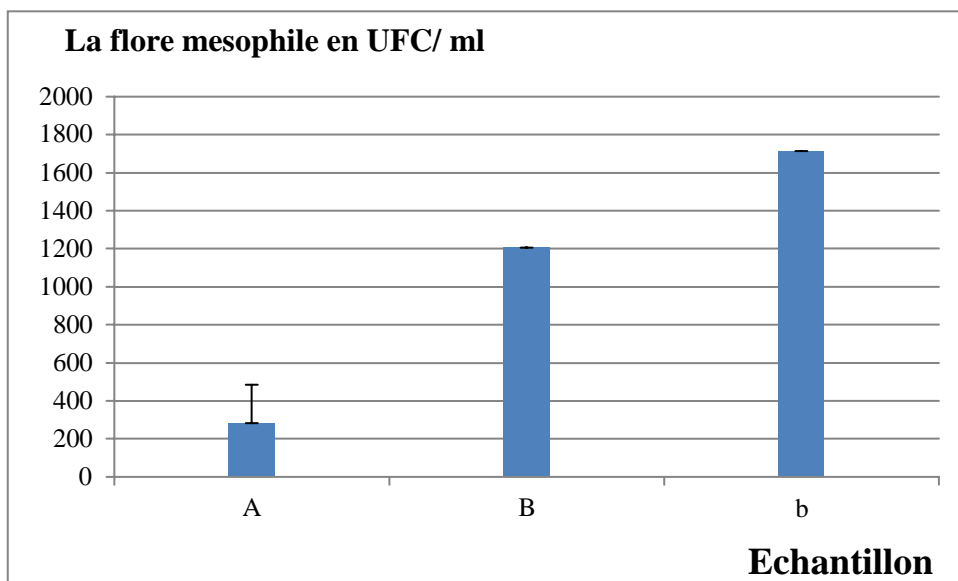


Figure 13: dénombrement des colonies des différents laits en UFC/ml

Les valeurs enregistrées sont situés entre 0 et $1,7 \cdot 10^3$ UFC/ml. La teneur élevée en flore totale en b puis B et la valeur inférieure en A.

Résultats et Discussions

Le dénombrement de la flore mésophile de l'année passée est résumé dans l'histogramme suivant :

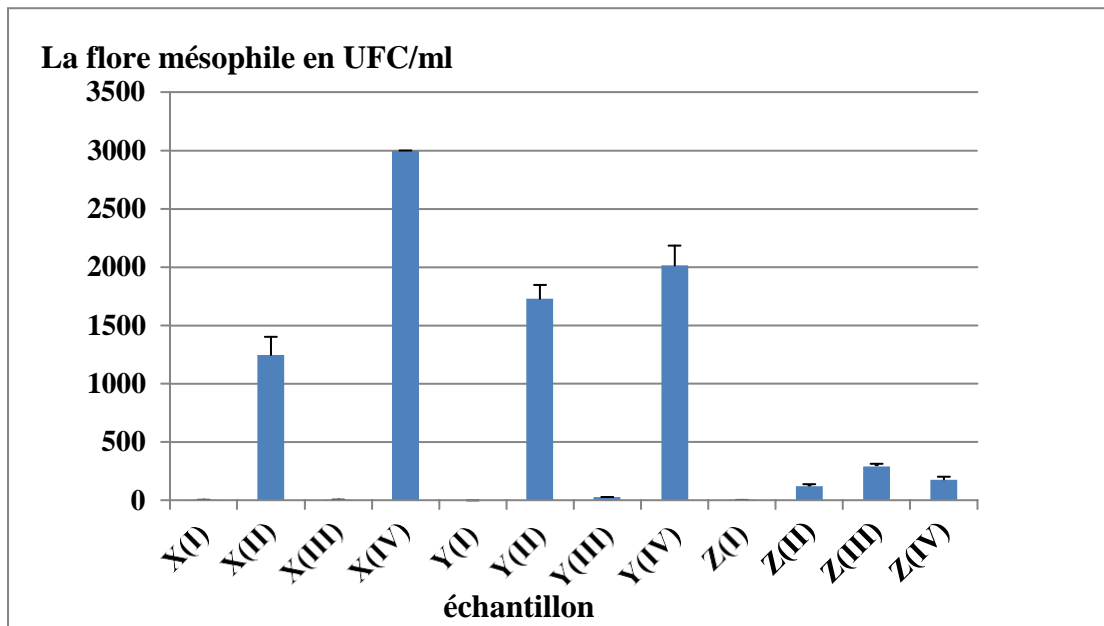


Figure 14: Dénombrement des colonies des quatre lots en UFC/ml à l'année passée

I.3.2. Dénombrement les Bacillus sur milieu MOSSEL

Après l'incubation de 24h à 30°C Les résultats du dénombrement effectué sur le lait UHT sont résumés dans la figure 15.



Figure 15 : culture bactérienne sur milieu MOSSEL

- ✓ Colonies rouges entourées d'un halo opaque et blanchâtre due à la présence de lécithine (lécithinase positif).
- ✓ Colonie jaune.

Résultats et Discussions

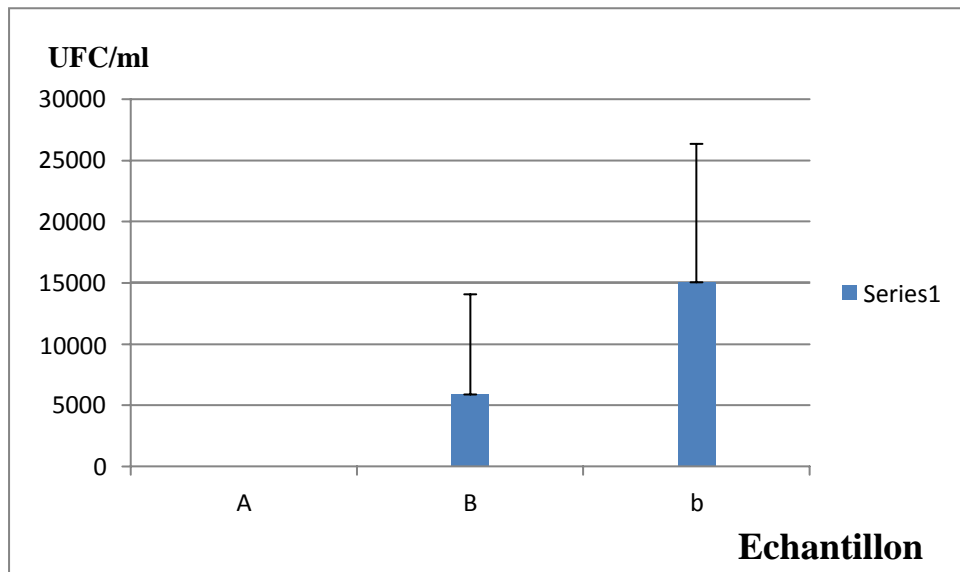


Figure 16: dénombrement des colonies sur milieu Mossel

Nos résultats indiquent que le b avec $1,5 \cdot 10^4$ UFC/ ml est plus contaminé par rapport aux autres échantillons, et la valeur plus faible dans la marque A.

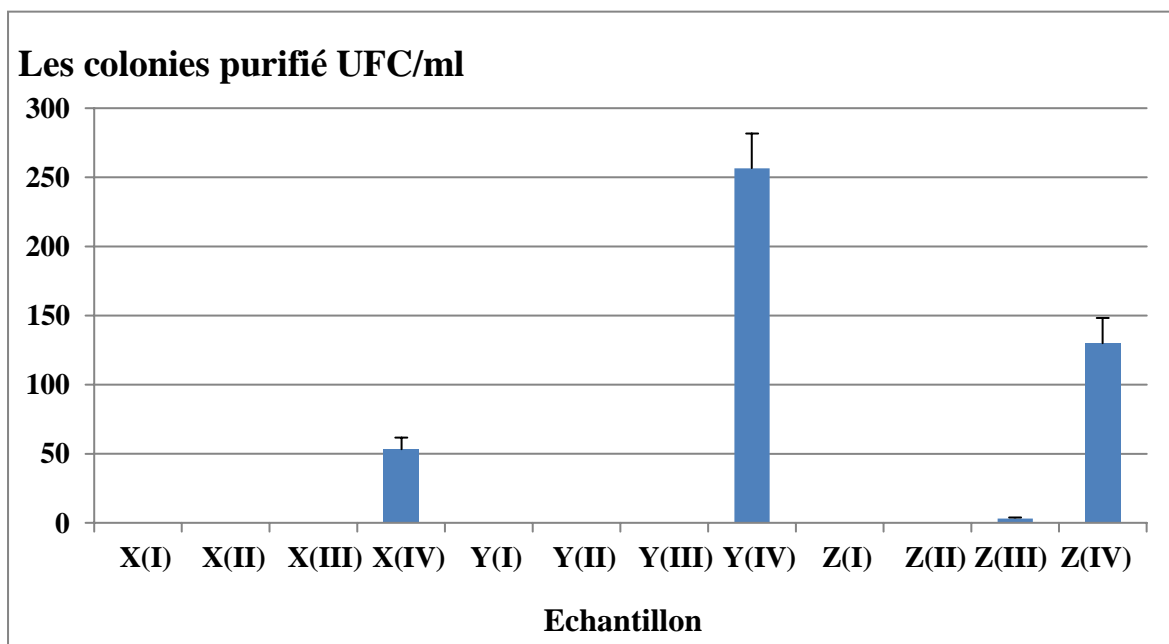


Figure 17: Leur Résultats de dénombrement des colonies des quatre lots en UFC/ml sur milieu Mossel à l'année passée.

Résultats et Discussions

I.4. Isolement et identification de Bacillus

I.4.1. Résultat de l'isolement

Après 24h l'incubation nous avons obtenu les résultats dans le figure suivante :

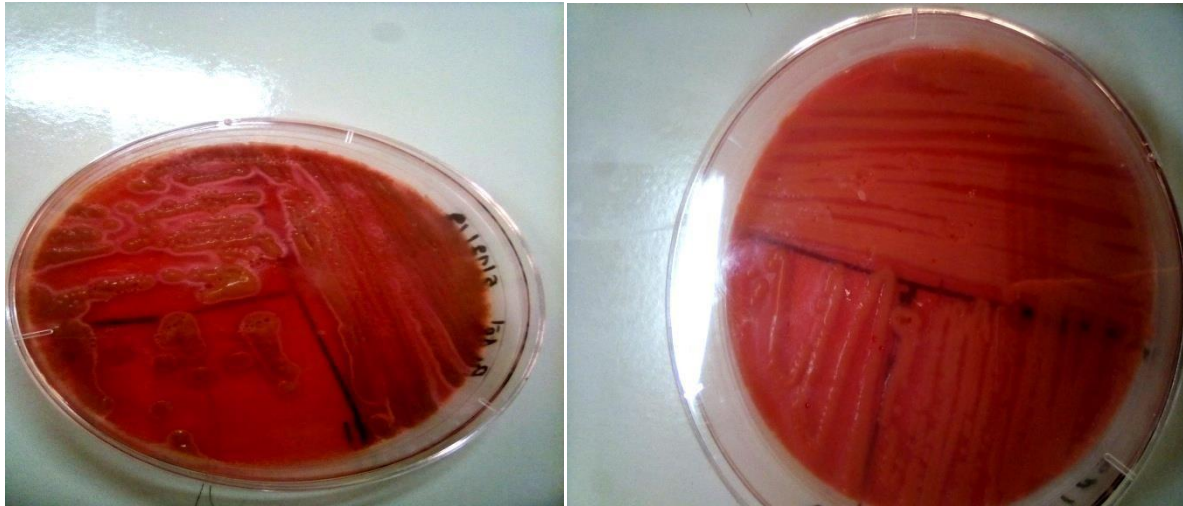


Figure 18 : le résultat de l'isolement sur milieu MOSSEL

I.4.2. Galerie api 20E

Lecture se fait après une incubation de 24h à 30°C, noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Nous avons ajouté des réactifs dans les tests nécessitant l'addition de réactifs (TDA, covacs, VP1 et VP2).



Figure 19 : Galerie api 20 E après l'incubation et l'addition des réactifs

Résultats et Discussion

II. Discussion

Les valeurs obtenues du pH se situent entre 6,81 et 6,92 pour le lait analysé. Ces valeurs sont conformes aux normes d'entreprise (6,50 - 6,80).

Selon Alias (1984), le pH n'est pas une valeur constante et peut varier selon le cycle de lactation et sous l'influence de l'alimentation. Dans le cas où le pH est supérieur à la norme cela indique une acidification du lait, qui peut être due à un stockage inadéquat (Diao, 2000).

Le pH est au voisinage de la neutralité, ce qui permet une longue conservation du produit, en sauvegardant ses qualités organoleptiques, et sa valeur nutritionnelle (Mathieu, 1998).

Les résultats des analyses physico-chimiques (pH) de l'année passée montrent que, le pH est au voisinage à la neutralité. Par rapport leurs résultats il n'existe aucune différence entre les marques du lait UHT.

Concernant les résultats organoleptiques, il existe une différence de goût entre les deux marques du lait UHT, Le lait à une saveur légèrement sucrée due à la présence d'un taux de lactose (Vierling, 1998) (à cause de l'ajoute du glucide exemple la marque **b** 5.74g/100ml).

Les échantillons prélevés présentent une charge en flore aérobie total mésophiles qui varie de 0 à $1,7 \cdot 10^3$ UFC/ ml.

En effet, selon (JORA, 2017), ces seuils de contaminations en flore totale dépassent la norme fixée à 10 UFC/0.1ml. Ces résultats ne répondent pas aux normes recommandées par le JORA N°39, 2017, donc le résultat du critère microbiologique est non satisfaisant. Leurs résultats de dénombrement de FTAM répondent aux normes recommandées par le JORA N°35.

Concernant la flore thermorésistante, le résultat qu'on a trouvé varient entre 0 et $1,5 \cdot 10^4$ UFC/ ml. En ce qui concerne le virage de couleur et Présence d'un halo: hydrolyse des lécithines par une lécithinase, et Colonie jaune c'est utilisation du mannitol par les *Bacillus* (Mannitol positif).

L'identification par la galerie API 20E bacillus, nous avons noté la présence des (*Bacillus cereus*, *Bacillus spharricus/ fusiformis/ badius* et *Brevibacillus choshinensis /centrosporus /brevis*) dans les échantillons analysée.

En relation avec les résultats de notre travail, nous pouvons dire que *Bacillus cereus* représente également une partie significative de la contamination de l'environnement laitier. Cet état a déjà été signalé par Hornstra *et al* (2007) et Ankolekar et Labbé(2010)

La contamination persistante des équipements de l'industrie agroalimentaire par *Bacillus cereus* est due aux spores qui peuvent survivre à la plupart des traitements thermiques (Kamat *et al*, 1989 ; Larsen *et al*, 1999 ; Kotiranta *et al*, 2000), et des biofilms, qui se sont avérés hautement résistants aux procédures de nettoyage (Peng *et al*, 2002).

Résultats et Discussion

Les caractéristiques hydrophobes des spores de *Bacillus cereus* ont comme conséquence l'adhérence sur des surfaces des matériaux fréquemment utilisés en industrie agroalimentaire comme l'acier inoxydable (Faille et al ., 2001 ; Lelievre et al ., 2001; Peng et al ., 2001; Faille et al ., 2002 ; Tauveron et al ., 2006).

Les spores adhérentes peuvent déclencher le processus de formation de biofilms (Ryu et Beuchat, 2005), ce qui peut être une source de contamination de produit (Flint et al ., 2001). Le nombre des spores adhérentes détermine d'ailleurs la durée de conservation du produit (Andersson et al ., 1995; Te Giffel et al ., 2002). Ont trouvé que les surfaces d'acier inoxydable souillées avec du lait attirent 10 à 100 fois plus de cellules végétatives et de spores de *Bacillus stearothermophilus* par rapport à l'acier inoxydable propre (Flint et al ., 2001).

Conclusion



Conclusion

Conclusion

Le problème fondamental de la filière lait en Algérie a toujours été l'obtention des matières premières, constitués principalement par la poudre de lait, ainsi que le manque d'attention et d'ignorance des pratiques d'hygiène, ce qui engendre des difficultés pour garantir une bonne qualité de produit et affecte négativement le procédé de fabrication du lait reconstitué.

L'objectif principal assigné à ce travail est de rechercher la présence des bactéries sporulées thermophiles du type *Bacillus cereus* dans le lait stérilisé UHT, qui est l'un des indices de formation de biofilms dans l'industrie laitière.

Dans cette étude les résultats de l'identification ont révélés que toutes les souches isolées sont des espèces du genre *Bacillus* avec des différentes probabilités.

Ces résultats montrent clairement le degré de contamination de la laiterie puisque ces bacilles thermophiles sont retrouvés dans tous les sites de prélèvements. Pour cela deux explications peuvent justifier leur présence à ces niveaux. La première c'est bien le pouvoir de sporulation qui leur permet de résister aux conditions de stockage (la poudre de lait) et aux températures élevées de la stérilisation. La deuxième est leur potentiel de formation des biofilms car il a été démontré que les bacilles thermophiles ont un grand pouvoir d'adhésion et de formation de biofilm au niveau des installations en acier inoxydable et qui sont très difficiles à éradiquer (**Steve Flint et al, 2015**).

Pour cela, des mesures de surveillance et de lutte efficaces doivent être prises, à tous les niveaux critiques de la chaîne de production pour éviter toute contamination du produit fini, telles que :

- Le contrôle continu de la qualité microbiologique tout le long de la chaîne de production, de la matière première jusqu'au produit fini, par l'application de la démarche HACCP (Analyse des dangers et des points critiques pour la maîtrise).
- L'amélioration de la qualité des activités hygiéniques du personnel au sein de la laiterie.
- Le renforcement et l'amélioration des systèmes de nettoyage et de désinfection des équipements et installations.

Références

Bibliographiques



Références bibliographiques

A

Aboutayeb R. (2009). Technologie du lait et dérivés laitiers.

Adrian, (1987). Valeur alimentaire du lait. La maison rustique, Paris 85 –95.

AFNOR. (1985). Contrôle de la qualité des produits laitiers –Analyses physiques et chimiques, 3^{ème} édition :

Alais .C. (1984) : Sciences du lait : principes des techniques laitières, ed. SEP, Paris.

Alias C et Linden G. (1997). Abrégé de biochimie alimentaire. Edition Masson, Paris.

Amiot J, Fourniers, Lebeuf.Y, Paquin.P, Simsoud.R. (2002). Chapitre 1 : composition. Propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyses du lait dans Science et technologie du lait, Edition : école polytechnique de Montreal.

Amiot., Laurent., Boutonnier. (2002). Science et technologie du lait. Edition Presses internationales Polytechnique. Canada.

Andersson A., Ronner U., Granum P.E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* Int. J. Food Microbiol.

Ankolekar C., Labbe´ R.G. 2(010). Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *bacillus cereus* group. Appl. Environ. Microbiol.

ANONYME, 1993 Arrêt interministériel du 18 août 1993 relatifs aux spécifications de certain lait de consommation.

Austin,JW . , Bergeron,G.(1995).Development of bacterial biofilms in dairy processing . Journal of dairy research 62 :509-519.

B

Branger,A ., Roustel,S . (2007). Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques . Edition Educagri. France.

Branger,A., Richer,MM., Roustel,S.(2007).Microbiochimie et alimentation. Edition Educagri Paris.

Branger A. (2007). Microbiochimie et alimentation.

Bremer Flint, J. D. Brooks, (1997): Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control- Article. Volume: 11, Issue 1, pages 81 – 97.

Références bibliographiques

Bremer Flint, J. D. Brooks, (1997): Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control- Article. Volume: 11, Issue 1, pages 81 – 97.

Bremer PJ, Seale B, Flint S, Palmer J.(2009). Biofilms in dairy processing. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, IV, editors. Biofilms in the food and beverage industries. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head.

Brooks, J.D., Flint, S.H., Parkar, S.G., (2004). Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. Journal of Applied Microbiology.

Brooks J.D., and S.H. Flint.(2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. International journal of food and science technology vol. 43 (12): 2163-2176.

C

Camille delerras. (2007). Microbiologie pratiques pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Tec and Doc, Lavoisier. p : 295 -296.

Cayot.P et Lorient.D.(1998) : Structure et technologique des protéines du lait Edition : Tec et Doc. Lovoisier.Paris.

Christieans Souad., Zagorec Monique. (2013). Flores protectrices pour la conservation des aliments. Editions Quae. p : 52.

Costerton JW. (1995). overview of microbial. Biofilms.Journal of antimicrobial. **15**,137-140.

Costerton.JW, Geesey.GG et Cheng.KJ. (1978). How bacteria stick. Scientific American.

Croguennec T., Jeantet R., Brulé G. (2008). Fondements physicochimiques de la technologie laitière. Edition : Tec et Doc, Lavoisier, Paris.

D

Donlan R, M.Costerton J. W.,(2002). Biofiims Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, p. 167-193.

Donlan R.(2002). Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging infectious diseases; 8(9):881-8.

Diao M. (2000). La qualité du lait et produits laitiers. Institut Sénégalais de recherches agricoles. Edition GRET/ ENDA-ERAF Dakar. pp :1-7.

Références bibliographiques

Dromigny,E.(2008). *Bacillus cereus* . Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.

E

El-Khoury, N., R. Majed, S. Perchat, M. Kallassy, D. Lereclus & M. Gohar (2016) Spatiotemporal Evolution of Sporulation in *Bacillus thuringiensis* Biofilm. *Front Microbiol*, 7, 1222.

Euzéby, (2003): Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, *Bacillus cereus*.

F

Fagerlund, A., T. Dubois, O. A. Okstad, E. Verplaetse, N. Gilois, I. Bennaceur, S. Perchat, M. Gominet, S. Aymerich, A. B. Kolsto, D. Lereclus & M. Gohar (2014). SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS One*.

Faille C., Fontaine F., Bénézech T.(2001). Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *J. Appl.Microbiol*.

Faille, C., G. Tauveron, C. Le Gentil-Lelievre & C. Slomianny (2007) Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of Food Protection*,70, 2346--2353.

Feinberg M., Favier JP et Ireland R. (1987). Répertoire générale des aliments: table de composition des produits laitiers. Ed : Tec et doc. Lavoisier, paris, p : 35.

Filloux, A .,Vallet, 1.,2003. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medecine /Sciences*. 77-83.

Flint S., Palmer J., Bloemen K., Brooks J., Crawford R. (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *J. Appl. Microbiol*.

Flint.S.H , Brooks J.D., (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International journal of food and science technology* vol. 43 (12): 2163-2176.

Fredot E. (2005). Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Edition : Tec et Doc, Lavoisier. p : 10-14-397.

Références bibliographiques

Fredoit E., 2006. Connaissance des aliments. Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Edition : Tec et Doc.

G

Gaucheron, (2004). Minéraux et produits laitiers, Tec et Doc, Lavoisier :783 p.922.

Giffel M. C., Wagendorp A., Herrewegh A., Driehuis F. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. Antonie Van Leeuwenhoek.

Givskov M., Kjelleberg S. (2007). The biofilm mode of life : Mechanisms and adaptation.

Gosta B. (1995). Les composants du traitement du lait. Le lait en poudre. In : manuel de transformation du lait. Ed. Tetra Pack processing system AB. Sweden, pp: 442-375-384.

Goursaud J. (1985). composition et propriétés physicochimique dans le lait Le lait et les produits laitiers vache, brebis, chèvre, tome1. Edition : tec et doc, Lavoisier, Paris.

Guiraud,JP . (1998). Microbiologie alimentaire .Edition Dunod .Paris.

Guiraud,J,P.(2003).Microbiologie alimentaire. Edition Dunod.Paris.

Guiraud,JP.,Rosec,JP.(2004).Pratique des normes en microbiologie alimentaire . Edition AFNOR .France.

Guiraud,J,P.(2014).Microbiologie alimentaire. Edition Dunod.Paris.

H

Harold C., Slavkin D.D. (1997). Biofilms, Microbial ecology and Antoni Van Leeuwenhoek. National institute of dental research ; 128(4) :492-495.

Hornstra L. M., Leeuw P. L. A., Moezelaar R., Wolbert E. J., de Vries Y. P., de Vos Abee T. (2007). Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. Int. J. Food Microbiol. **116**: 367–371.

Houry, A., R. Briandet, S. Aymerich & M. Gohar (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, 156, 1009--18.

Références bibliographiques

I

Irie Y et Parsek MR.(2008).Quorum sensing and microbial biofilms.Current topics in microbiology and immunology.**322**,67-84.

Imbeault Nthalic. (1997).Production d'acides gras par biodégradation anaérobie du perméat de lactosérum dans un bioréacteur en continu. Mémoire présenté à l'université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables.

Ireland R. et Favier JP (1987). Répertoire générale des aliments: table de composition des produits laitiers. Ed : Tec et doc. Lavoisier,

ISO 8261. (1989). lait et produits laitiers – préparation des échantillons pour essai et des dilutions en vue de l'examen microbiologique

J

JEAN C., et DIJON C. (1993) : Au fil du lait, ISBN 2-86621-172-3.

Jeanet.R ,Croguennec.T ,Cérard.B ,2008.Les produits laitiers.Edition Tec & Doc. lavoisier. paris p06.

J.O.R.A., 1993 Arrêt interministériel du 18 août 1993 relatifs aux spécifications de certain lait de consommation.

J.O.R.A. N° 35, (1998). Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 24 janvier 1998 fixant les critères microbiologiques des laits et des produits laitiers.

J.O.R.A.N° 69, (2003). Arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. Textes Législatifs. Lait et produits laitiers.

JORA N°39, (2017). Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.

K

Kamat A. S., Nerkar D. P., Nair P. M. (1989). *Bacillus cereus* in some Indian foods, incidence and antibiotics, heat and radiation resistance. J. Food Saf.

Kitchen B.J, Taylor G.C, White I.C (1970). Milkenzyme. Their distribution and activity. Dairy Rec.

Références bibliographiques

Kihal, M., Boudjemaa, B. M., Aouar- Métri, A., et Malek, F (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.

Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes Infect

Kusumaningrum,HD., Riboldi,G ., Hazelegar,WC., Robeumer,R.(2003). Survival of food borne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to food.International journal of food microbiologie 85 :227-236.

KuzdzalS, Manson.W, MooreJ, (1980). The constituent of cow'smilk ,International Dairy Federation Bull.

L

Labioui H, Elmoualdi L, Benzakour A, El yachioui M, Berny E, Ouhssine M. (2009). Etude physico-chimique et microbiologique de laits crus. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.

Lamontagne.M, Champagne.C.P.Ausseur.L (2002). Chapitre2 : microbiologie du lait dans : Science et technologie du lait. Edition : Canada.

Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein. (2003). Microbiologie. Editeur: De Boeck Supérieur. p : 142-836.

Lansing M. Prescott., Linda M. Sherwood., Christopher J. Woolverton. (2010). Microbiologie 3ème édition. De Boeck supérieur. p : 73-74 -75- 578.

Larsen H. D., Jorgensen K. (1999). Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. Int. J. Food Microbiol.

Lelievre C., Antonini G., Faille C., Benezech T. (2002). Cleaning-in-place—modelling of cleaning kinetics of pipes soiled by bacillus spores assuming a process combining removal and deposition. Food Bioprod. Process.

Lelievre C., Faille C., Benezech T. (2001). Removal kinetics of *Bacillus cereus* spores from stainless steel pipes under CIP procedure: influence of soiling and cleaning conditions. J. Food Process Eng.

Références bibliographiques

Leseur.R, Melik.N.(1990). Chapitre1 : lait de consommation dans : Lait et produits laitiers de vache volume (2). Edition : Tec et Doc. La Voisier, Paris.

Luquet F-M. (1985). Lait et produits laitiers: vache, brebis, chèvre». 3 volumes, Paris, Technique et documentation, Lavoisier, 150 p.

Luquet F.M. (1987). Laits et produits laitiers vache, Brebis, Chèvre. Volume I. Edition : Tecet Doc, Lavoisier

Luquet F.M. (1990). Laits et produits laitiers vache, Brebis, Chèvre..transformation et technologie.Edition : Tec et Doc, paris.

M

MATHIEU, (1998). Initiation à la physico-chimie du lait». Edition Lavoisier, Technique et documentation, Paris, 220 p.

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.

Malek,F. (2013).Le biofilm en industrie laitier :caractérisation, facteur de développement et élimination, cas de biofilm de *Bcillus cereus* dans quelque laitiers de la région de Telemcene, Thèse de Doctorat en microbiologie.Telemcene.

Mansour Marianne, Milliere Jean Bernard, (1999) : Mode d'action de la nisine, de la monolaurine et/ou du sorbate de potassium sur le cycle sporal de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580T : optimisation de leurs combinaisons par une approche multifactorielle - effets sur *Bacillus sp.* Travaux Universitaires - Thèse nouveau doctorat .220 p., No : 99 INPL 043N.

MATHIEU, (1998). Initiation à la physico-chimie du lait». Edition Lavoisier, Technique et documentation, Paris, 220 p.

Marchand, S. J. De Block, V.e De Jonghe, A. Coorevits, M. Heyndrickx, L. Herman. (2012). Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11: 133-147.

Martin J. C. (2000). Technologie des laits de consommation. Edition : Uni lait, CANDIA Direction Développement Technologique. P: 135.

Références bibliographiques

Michel.J.C, Pouliot. M et Richard.J .(2002). Science et technologie du lait. Edition : Canada.

Moustardier G. (1972).Bactériologie médicale ; 4^{émé} édition, librairie Maloine. S.A. éditeur, Paris.

Murray P.V., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C. et Tenover R.H. (1999). Manual of clinical microbiologie, 7th édition, Amer. Soc. Microbial; Washing, D.C.

P

Parkar, S.G., Flint, S.H., Brooks, J.D., (2004). Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. Journal of Applied Microbiology : 96, 110-116.

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

Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C. (2001). Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. Int. J. Food Microbiol.

Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. Int. J. Food Microbiol.

Pierre.B. (1994). Le lait et la machine. Gillet, Philippe (sous la direction de). Mémoires lactées. Blanc, bibliographie : le lait du monde. Autrement, Coll. Mutations/Mangeurs N°143, Paris.

Pougheon .S. Couraud.J. (2001). Le lait caractéristiques physicochimiques *In DEBRY G.,* Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 566 pages.

Puterflam Julie, Jan Sophie, Le Maréchal Caroline, Koné Abdoulaye Zié, Grosset Noël., Gautier Michel, et Baron Florence. (2009). Les bactéries du groupe *Bacillus cereus* dans la filière des ovoproduits : prévalence et facteurs de variation. Agrocampus Ouest/INRA, Science et technologie du lait et de l'œuf.

R

Ramarao.N. (2005), The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. Cellular Microbiology.

Rönner U., Husmark U. & Henriksson A., (1990): Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. J. Appl. Bacteriol.: 69 : 550-556.

Références bibliographiques

Ryu, J.H. , L.R. Beuchat (2005). Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid--based sanitizer. *J Food Prot.*

Richard.J Pouliot. M et Michel.J.C.,(2002). Science et technologie du lait. Edition : Canada.

S

SalustianoVC.,Andrade,NJ.,RibeiroJunior,JL.,Fernandes,PE.,Lopes,JP., Bernard,PC., Prtugal,JG.(2010).Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with the different cleaning and sanitizing procedure used in dairy plants .*Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.*62.

Sabrina Cadel Six, Marie-Laure De Buyser, Marie-Léone Vignaud, Trinh Tam Dao, Sabine Messio, Sylvie Pairaud, Jacques-Antoine Hennekinne, Nathalie Pihier, Anne Brisabois, (2010). toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus* : bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* no 50/S spécial Risques alimentaires microbiologiques.

Sara A. Burgess., Denise Lindsay., Steve H. Flint. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology.*

Simões M., Simões L.C., Vieira M.J.(2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.*

Sechet P. (2001). Le lait UHT : Généralités. Ed. Enilia, Surgères, p 34.

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

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187–209.

T

Tauveron G., Slomianny C., Henry C., Faille C.(2006). Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *Int. J. Food Microbiol.*

Te Giffel M. C., Wagendorp A., Herrewegh A., Driehuis F. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek.*

Références bibliographiques

Toullec, 1966. Lait et alimentation dans : Production du lait.

V

Vierling E, (1998). Aliments et boissons: technologies et aspect réglementaires. Ed WEKA, Suiss.

Vierling E, (2003). Alimentation et boisson : technique et aspect réglementaires. 1 ème édition, Doin.

Veisseyre,R.(1975).Technologie du lait :constitution, récolte, traitement et transformation. Edition La maison Rustique. Paris.

Veisseyre.R.(1979) Technologie du lait : constitution. Récolte, traitement et transformation du lait. Edition : la maison rustique. Flammarion. Paris.

Vignola. C.L, (2002). Science et technologie du lait, transformation du lait. Edition presses internationales polytechnique. Canada.

W

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

Wong,L, Eileen B, Didier Lereclus, and Amy C. (2006), Biofilm Formation by *Bacillus cereus* Is Influenced by PlcR, a Pleiotropic Regulator. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.

Y

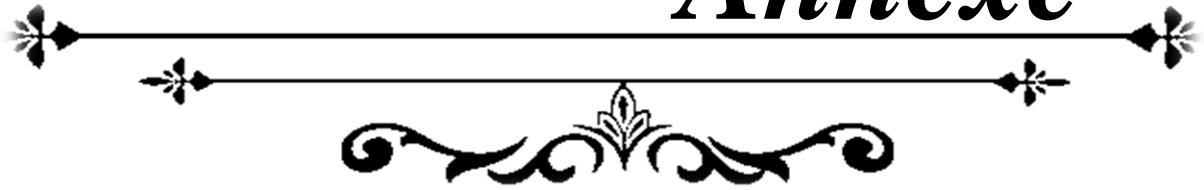
Yi-Huang Hsueh, Eileen B. Somers, Didier Lereclus, and Amy C. Lee Wong. (2006). Biofilm Formation by *Bacillus cereus* Is Influenced by PlcR, a Pleiotropic Regulator. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*

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

Z

Zobell.C.E. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J.Bacteriol* 46 :39–56.

Annexe



Annexe

Annexe 1

I. Matériels et produits utilisés

I.1. Matériels :

I.1.1. Appareillage

- Bec bunsen
- Etuve 30°C « memmert »
- Autoclave « vapour-Line »
- Compteur des colonies « daylight »
- Vortex
- Plaque chauffante agitant « stuart » et « bio cote »
- Balance
- Bain mari « memmert »
- pH mètre

I.1.2. verrerie et petits matériels

- Erlenmeyer 200ml « VWR brand »
- Boîtes de pétri
- Bécher
- Tubes à essai
- Flacons en verre de 250ml
- Micro pipette « scilogex »
- Spatule
- Ecouvillon stérile
- Pipette pasteur

I.2. Produits

I.2.1. Milieu de culture

- ❖ La gélose PCA
- ❖ La gélose MOSSEL
- ❖ Diluant TSE

I.2.2. Réactives et produit chimique :

Réactive

- ❖ Kovacs
- ❖ VP1+ VP2
- ❖ TDA

Annexe

Désinfectants

- ❖ Eau de javel
- ❖ alcool

II. Composition des milieux de culture

❖ Milieu PCA

Préparation : 23.5g de poudre de plat count agar dissoudre dans un litre d'eau distillé.
Puis autoclave pendant 15 min à 121 °C.

❖ Milieu MOSSEL

Dans un litre d'eau distillé ajouter :

Extrait de viande	1g
Peptone	10g
Mannitol	10g
Chlorure de sodium	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar	15g
pH	7.2

Autoclave 15min à 120°C. Ajouter à 900ml de milieu de base en surfusion, 100ml d'une émulsion stérile de jeune d'œuf à 20%. et 10 ml d'une solution de sulfate de polymyxine à 0.1 %

Annexe

Annexe 2

Tableau : résultats de mesure de pH des différents échantillons du lait.

Echantillons	Sous échantillons	pH	pH moyenne	Ecart-type
A	1	6.85	6.83	0.016
	2	6.83		
	3	6.81		
B	1	6.86	6.84	0.017
	2	6.83		
	3	6.82		
b	1	6.91	6.91	0.008
	2	6.9		
	3	6.92		

Tableau : résultats de dénombrement des FMAT sur le milieu PCA de différents échantillons du lait UHT.

Echantillons	UFC/ml.10 ³ Dilution (10 ⁻¹)	UFC/ml.10 ³ Dilution (10 ⁻²)	UFC/ml.10 ³ Dilution (10 ⁻³)
A1	0.45	0.01	0
A2	0	0	0
A3	0.40	0.07	0.004
B1	2.54	0.05	0.003
B2	0.45	0	0
B3	0.63	0.01	0
b1	5	0	0.002
b2	0.045	0	0
b3	0.1	0.031	0

Annexe

Tableau : résultats de dénombrement des Bacillus sur le milieu MOSSEL des
différents échantillons du lait UHT.

Echantillons	UFC/ml.10³ Dilution (10⁻¹)	UFC/ml.10³ Dilution (10⁻²)	UFC/ml.10³ Dilution (10⁻³)
A1	0.045	0	0.018
A2	0	0	0.001
A3	0	0.013	0.044
B1	17.45	0.13	0.002
B2	0.22	0.12	0.0004
B3	0	0	0
b1	27.27	1.52	0.13
b2	0	0.004	0
b3	17.86	0.35	0

Annexe

Résultats des colonies :

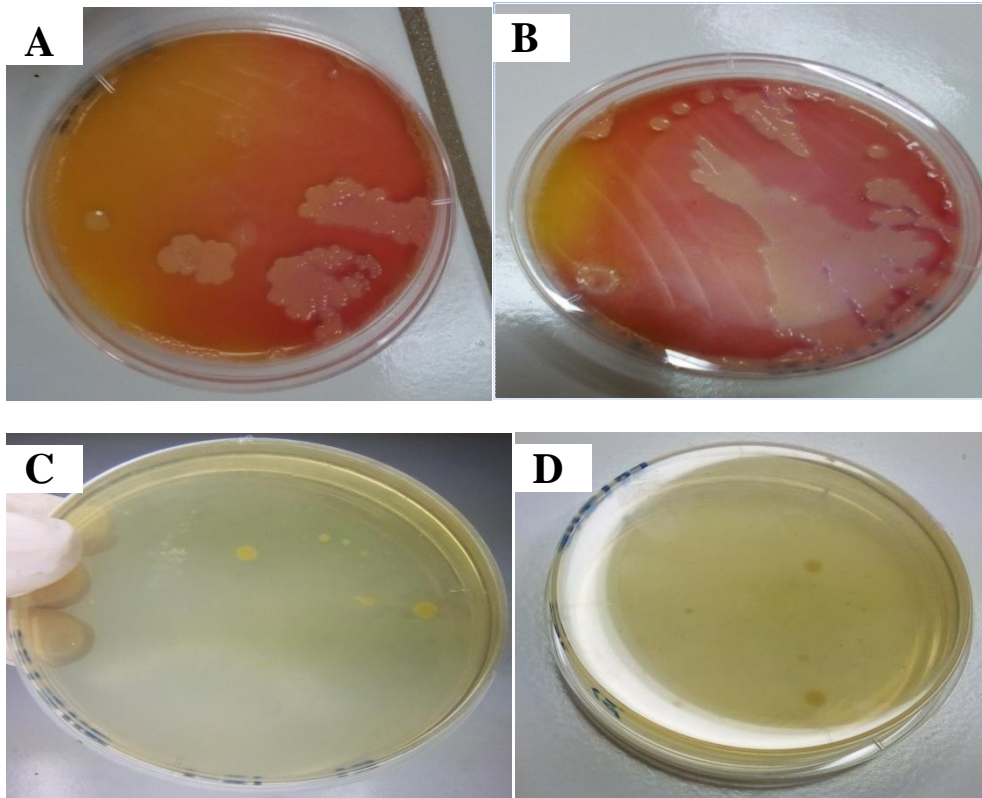


Figure : photo de différent types de colonie

(A) et (B) colonies de Bacillus sur milieu Mossel.

(C) et (D) colonies de la FMAT sur milieu PCA.

ANNEXE I

Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires

1- Laits et produits laitiers

Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc (1)/g ou ufc/ml)	
		n	c	m	M
Lait cru	Germes aérobies à 30 °C	5	2	3.10 ⁵	3.10 ⁶
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	Coliformes thermotolérants	5	2	5.10 ²	5.10 ³
	Salmonella	5	0	Absence dans 25 ml	
	Antibiotiques	1	—	Absence dans 1 ml	
	Listeria monocytogenes	5	0	100	
Lait pasteurisé et autres produits laitiers liquides pasteurisés	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10 ⁴	10 ⁵
	Enterobacteriaceae	5	0	10	
	Salmonella	5	0	Absence dans 25 ml	
Lait UHT et lait stérilisé	Germes aérobies à 30 °C	5	0	10/0.1ml	
Lait en poudre et lactosérum en poudre	Enterobacteriaceae	5	2	10	10 ²
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10	10 ²
	Salmonella	5	0	Absence dans 25 g	
Fromages au lait cru	Escherichia coli	5	2	10 ⁴	10 ⁵
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 ³	10 ⁴
	Salmonella	5	0	Absence dans 25 g	
	Listeria monocytogenes	5	0	100	
Fromages à base de lait ayant subi un traitement thermique moins fort que la pasteurisation et fromages affinés à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation	Escherichia coli	5	2	10 ²	10 ³
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 ²	10 ³
	Salmonella	5	0	Absence dans 25 g	
	Listeria monocytogenes	5	0	100	
Fromages à pâte molle non affinés (fromages frais) à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation	Escherichia coli	5	2	10 ²	10 ³
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10	10 ²
	Salmonella	5	0	Absence dans 25 g	
	Listeria monocytogenes	5	0	100	
Crème au lait cru	Escherichia coli	5	2	10 ²	10 ³
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 ³	10 ⁴
	Salmonella	5	0	Absence dans 25 g	
	Listeria monocytogenes	5	0	100	