

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمار ثليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR THELIDJI LAGHOUAT

FACULTE DES SCIENCES

كلية العلوم

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

قسم البيولوجيا



**Mémoire**

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

*Filière : Science Biologie*

*Option : Microbiologie appliquée*

**THEME**

---

**Recherche de *Bacillus cereus* dans le lait UHT  
partiellement écrémé commercialisé dans la région de  
Laghouat**

---

**Présenté par :** BENAIDJA Nesrine, BOUDERBALA Rania Ikram

**Devant le jury :** CHAIBI Rachid ; BENACEUR Farouk ; CHETATHA Mohamed

**Président :** CHAIBI Rachid

MCA UATL

**Examineur :** BENACEUR Farouk

MCB UATL

**Rapporteur :** CHETATHA Mohamed

MAA UATL

**Soutenu le : 01/05/2019**

## Remerciements

*Nous commençons d'abord par remercier Dieu le Clément, qui nous a*

*Procuré la patience pour aller au bout de notre objectif.*

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de biologie, Facultés des sciences, Université  
Amar Thelidji Laghouat.*

*Toute notre gratitude,*

*A monsieur CHETATHA Mohamed, « MAA », notre encadreur, pour sa patience, sa  
disponibilité et ses judicieux conseils qui ont contribué à alimenter notre réflexion.*

*Hommages respectueux, aux membres du jury :*

*Monsieur CHAIBI Rachid, « MCA » d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de présider ce  
jury*

*Monsieur BENACEUR Farouk, « MCB » d'avoir accepté d'examiner notre travail*

*Sincères remerciements,*

*Nous remercions tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail*



## *Dédicaces*

*Je dédié ce travail à l'âme de ma Mère et ma Grande mère à ma chers familles  
et mes proches amies qui ont été toujours à mes cotés pour me soutenir et me  
donner le courage pour terminer mes études.*

*J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou  
de loin à la réalisation de ce travail*

*Merci infiniment*

*Rania*

A decorative border of black vine leaves and flowers surrounds the text.

## Dédicaces

*J'adresse en premier lieu ma reconnaissance à notre DIEU tout puissant, de m'avoir permis d'en arriver là, car sans lui rien n'est possible.*

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie ce modeste travail.*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde pour moi, Mon Père.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.*

*Mes chères frères et sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité ; Abdelbasset, Manel, Ihssane, Ali.*

*A mes chère amies : Kaouthar ,Narimane,Rania,Asma .*

*Pour notre amitié et tous les bons moments passés et à venir, Pour votre présence, vos bons conseils et nos fous rires partagés Un très grand merci.*

*Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail*

*Nesrine*

## ملخص:

تعتبر البكتريا *Bacillus cereus* المحبة للحرارة و المنتجة للأبواغ من بين الأنواع الرئيسية التي تسبب التغير في الحليب ومنتجات الألبان ؛ وكذلك في تشكيل Biofilms في دوائر التعقيم في صناعة الألبان.

في عملنا هذا ، سلطنا الضوء على تواجد *Bacillus cereus* في حليب UHT في ثلاثة علامات تجارية جزائرية التي يتم تسويقها في مدينة الأغواط.

تم البحث عن السلالات باستخدام طرق فيزيائية وكيميائية و أيضا ميكروبيولوجية باستخدام وسط الزرع PCA و Mossel لتعداد و لانتقاء و عزل السلالات ، أما بالنسبة للوحة api 20 E استخدمناها لتحديد النمط الظاهري.

أظهرت نتائج اللوحة api 20 E أن العصيات التي تم تحديدها تنتمي إلى عدة أنواع مختلفة بما في ذلك :

*Brevibacillus choshinensis centrosporus* , *Brevibacillus sphaericus* *Bacillus fusiformis*,  
*Bacillus badius* , *Bacillus brevis* , *Bacillus cereus* .

الكلمات المفتاحية: صناعة الحليب، الحليب المعقم UHT، Biofilms، *Bacillus cereus* ، الأغواط.

## Résumé :

Les bactéries thermophile sporulée, *Bacillus cereus* est l'un des responsables majeur d'altération du lait et les produits laitiers ; et aussi la formation de Biofilms dans les circuits de stérilisation dans l'industrie laitière.

Dans ce travail nous avons mis en évidence la présence des *Bacillus cereus* dans le lait UHT de 3 marques Algérienne commercialisé dans la région de Laghouat.

La recherche des souches à été réalisé par des méthodes physicochimique et microbiologique utilisant le milieu PCA pour le dénombrement et le milieu Mossel pour la purification et l'isolement, la galerie api 20 E pour l'identification phénotypique.

Les résultats de la galerie API 20 E ont montrés que les bacilles identifiés appartiennent à plusieurs espèces différentes dont *Brevibacillus choshinensis centrosporus* , *Brevibacillus sphaericus* , *Bacillus fusiformis*, *Bacillus badius* , *Bacillus brevis* , *Bacillus cereus* .

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

## **Abstract:**

The spore-forming thermophilic *Bacillus cereus* is the major cause of alteration of milk and dairy products, and also the formation of Biofilms in sterilization circuits of milk.

In this work we searched for the presence of *Bacillus cereus* in the UHT milk of three Algerian brands marketed in Laghouat region.

The research was performed by physicochemical and microbiological methods using PCA for enumeration and Mossel for purification and isolation, api 20 E gallery for phenotypic identification.

The results of these analyzes show that there is a presence of *Brevibacillus choshinensis centrosporus* , *Brevibacillus sphaericus* , *Bacillus fusiformis*, *Bacillus badius* , *Bacillus brevis* , *Bacillus cereus* , *Bacillus cereus* .

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



## **Table des matières**

Dédicace	I
Remerciement	II
Résumé	III
Sommaire	IV
Liste des tableaux	V
Liste des figures	VI
Liste des abréviations	VII
Introduction	01

## **Partie bibliographique**

### Chapitre I : Généralité sur le lait

I - Définition du lait	03
II – La Composition du lait	04
II-1-Composition physicochimique	04
II-1-1 –L’Eau	04
II-1-2-La Matière grasse	04
II-1-3- Les Protéines	04
II-1-4- Les Glucides	05
II-1-5- Les Minéraux	05
II -1-6-Les Enzymes	06
II-1-7- Les Cellules du lait	06
II-I-8-Les Vitamines	07

II-1-9- L'importance du lait	07
II-2-Composition du lait de différentes espèces	09
II-3-Qualité microbiologique	10
II-3-1-La classification des principaux microorganismes du lait selon leur importance	10
II-3-1-1 La flore originelle	10
II-3-1-2 La flore contaminant	11
III- Caractéristiques du lait	11
III-1- Organoleptiques	11
III-2- Propriétés Physico-chimiques	11
III-2-1- Masse volumique et densité du lait	12
III-2-2 – Point de congélation	12
III-2-3- Point d'ébullition	12
III-2-4- Acidité du lait	12
III-2-5- Le pH du lait	12
III-2-6- Aw	12
IV- Les type du lait	12
IV-1- Le lait cru	12
IV-2- Le lait sec (en poudre)	13
IV- 3- Le lait traité thermiquement	13
IV-3-1- Le lait pasteurisés	13
IV-3-2- Les différentes laits stérilisés	14
IV-3-2- 1- Lait stérilisé	14
IV-3-2-2- Lait UHT (Ultra Haute Température	14

IV-3-2-2-1-Le principe du lait UHT	14
IV-3-2-2-2-Procédés de fabrication du lait UHT	15
IV-3-2-2-3- Différents types du lait UHT	17
IV-3-2-2-4- La composition des différents types de lait UHT	17
IV-3-2-2-5 -Avantage du lait UHT	18
Chapitre II : Biofilms	19
I - Définition de Biofilms	19
II- Historique	19
III-Formation de Biofilms	19
IV-Le biofilms en industrie laitière	21
V-Biofilms de <i>Bacillus cereus</i>	22
VI - Caractéristiques des <i>Bacillus</i>	24
VII- <i>Bacillus cereus</i>	25
VII- 1- L'intoxication alimentaire due à <i>Bacillus cereus</i>	27
VII-1-1-Le syndrome diarrhéique	27
VII-1-2- Le syndrome émétique	27

## **Partie expérimentale**

Matériel et méthodes	28
I- Echantillon	28
II- Prélèvements	28
III- Analyse physico-chimique	28
III – 1 : Mesure du pH	28
IV- Analyse organoleptique	29

V - Analyse bactériologique	30
V-1- Etude de la microflore	30
V-2- Préparation des dilutions décimales	30
V – 3 - Ensemencement et dénombrement	31
V-3-1- Inoculation dans la masse	31
V-3-2- Dénombrement, isolement et purification en milieu Mossel	32
V-4- Coloration de Gram	32
V-5- Testes biochimiques	33
V-5-1- Test de Catalase	33
V-5-2- Test Oxydase	33
V-5-3- Galerie API 20E	33
Résultats et discussion	35
I –Résultats	35
II- Discussions	43
Conclusion	45
Références bibliographiques	47
Annexes	58

## **Liste des tableaux**

**Tableau 1** : Composition du lait en générale.

**Tableau 2** : les acides aminés essentiels.

**Tableau 3** : la concentration des principaux minéraux dans le lait .

**Tableau 4** : propriétés du principal nutriment du lait.

**Tableau 5** : Composition chimique moyenne du lait de différentes espèces.

**Tableau 6**: Différents types du lait UHT.

**Tableau 7**: Composition moyenne des différents types de lait UHT en g/l.

**Tableau 8** : les dates des Lots des marques X, Y et Z.

**Tableau 9**: résultat des caractéristiques organoleptiques du lait UHT.

## Liste des figures

**Figure 01** : La teneur moyenne des principales vitamines du lait.

**Figure02** : Diagramme de fabrication du lait stérilisé UHT.

**Figure 03**: Schéma présentant les étapes du développement du biofilms.

**Figure 04** : Equipement laitiers. (A) : tanks de stockage du lait, (B) : système de canalisation (lactoducs), (C) : un échangeur thermique à plaque.

**Figure 05**: Biofilms de *B.cereus* sur acier inoxydable observer par microscope électronique à balayage.

**Figure 06**: Micrographe d'un biofilms de 6 jours formé par *B.cereus* sur une surface en inox.

**Figure 07** : Les différentes formes de *Bacillus cereus* (ATCC 14579) : cellule végétatives à gauche et spores dormantes (corps réfringent) ou spores en germination (corps opaque) à droite sous microscopie optique.

**Figure 08**: Représentation des cycles de vie de *Bacillus cereus*.

**Figure 09** : Mesure de pH du lait UHT par pH mètre (EUTECH instruments LON 510).

**Figure 10** : Analyse organoleptique des 3 marques.

**Figure 11** : Les dilutions préparées.

**Figure12** : Coloration de Gram.

**Figure 13**: La galerie api 20E préparée avant l'incubation.

**Figure 14** : Les mesures du pH de trois marques du quatre lots

**Figure 15** : Les colonies cultives sur milieu PCA

**Figure 16** : Dénombrement des colonies de milieu PCA en UFC/ml

**Figure 17**: Les colonies cultives sur milieu Mossel.

**Figure 18** : Dénombrement des colonies de milieu Mossel en UFC/ml

**Figure 19** : Observation sous microscope optique des frottis (Gx100).

**Figure 20**:Test Catalase.

**Figure 21**: Test Oxydase.

**Figure 22** : Galerie api 20 E après l'incubation et l'ajout des réactifs.

**Figure 23** : le guide de la galerie api 20 E.

## Liste des abréviations

**%** : pourcentage

**<** : Inferieur à

**µm** : micromètre

**ATCC** : Américain type cultur cell

**ATP** : adénosine-triphosphate

**Aw** : l'activité de l'eau

**Ca** : calcium

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone

**DGAL** : Direction Générale de l'Alimentation

**DLC** : date limite de consommation

**g/cm** : gramme par centimètre cube

**g/l** : gramme par litre

**G+C** ; guanine + cytosine

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

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**H** : heure

**HACCP** : Hazard Analysis Critical Control

**J.O.R.A** : Journal Officiel de la République Algérienne

**MG** : matière grasse

**mg/g** : milligramme par gramme

**mg/l** : milligramme par litre

**min** : minute

**ml/j** : millilitre par jour

**Na** : sodium

**Nacl** : chlorure de sodium

**NADP** : nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate

**O<sub>2</sub>** : oxygène

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**P** : phosphore

**PCA** : plate count agar

**pH** : potentiel Hydrogène

**PNNS** : programme national nutrition santé

**Protéine TsaA** : Translocation-dependent antimicrobial spore component

**S** : seconde

**T/an** : tonne par an

**T°** : température

**TIAC** : toxi-infection alimentaire collective

**UFC/ml** : unité faisant colonie par milli litre

**UHT** : ultra haute température

**XVIIe** : 17<sup>e</sup> eme siècle





# **Introduction**

## Introduction

---

### Introduction

Le lait est une denrée ancienne utilisée par l'homme depuis la préhistoire. Il n'a pourtant pas occupé la même place au cours des siècles suivant les pays, la culture et la religion des populations. Le lait constitue l'aliment de base de tous les nouveau-nés appartenant au groupe des mammifères. Il est donc indispensable à la survie du nourrisson (**Lafitedupont, 2011**). Selon l'OMS les analyses de programmation linéaires indiquent que la quantité de lait nécessaire varie de 200 à 400 ml/j (**Dewey et al ., 2004**) ; En effet, il possède une grande valeur nutritionnelle (**Alais et al ., 2003**).

La composition du lait est très complexe, elle regroupe des protéines, des sucres (le lactose principalement), des lipides, des minéraux et des vitamines (**Alais et al ., 2003**).

La dénomination du lait a été définie en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant "le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (**Pougheon et Goursaud ,2001**) .Si jusque Dans les années 1935, ce lait ainsi défini était le lait réellement commercialisé (**R.leseur, N.Melik ; 1990**).

L'Algérie est l'un des plus grands consommateurs de lait en Afrique avec une moyenne annuelle de 110 à 115 litres par habitant, créant ainsi une situation de dépendance vis -à-vis de l'étranger en matière d'approvisionnement en lait (**Chaulet, 1991**).D'après le président de l'Association des producteurs de boissons algériens (Apab), la production locale de lait de vache, qui couvrait 35% de la demande nationale, a baissé pour n'en assurer que 25% .ces 10% de pertes représentent en fait le volume qui n'est pas recensé, puisqu'il poursuit d'autres circuits que celui destiné à la production laitière (**Khriis, 2019**).

La filière lait en Algérie se trouve actuellement dans une phase critique, face à une production locale insuffisante, aggravée par un taux de collecte très faible et une augmentation des prix de la matière première sur les marchés internationaux (**Belhadia et al ., 2009**) ; qui consacre annuellement 18000T/an pour l'importation de poudre de lait (**Bencharif et al ., 1996 ; DilmiBouras, 2008**) ; les origines de ces importations sont issues des pays comme la Hollande et l'Uruguay (**Benali ,2018**).

Le Ministère de l'Agriculture et du développement rural, considère la production laitière comme prioritaire. le lait , qui assure la subsistance de l'homme au début de sa vie

## Introduction

---

n'est pas encore produit en assez grande quantité pour permettre une large satisfaction ( **Belkacem ,Benounnane ,1983**), car le lait est le seul produit de la nature qui soit un aliment complet , son potentiel nutritif est supérieur à celui de tout autre produit consommé par l'homme ( **Ould Ali ,1995**) le problème du lait est en effet un problème national par son importance économique, sociale et politique (**Chaulet ,1991**) .

Parmi les laits de consommation en fonction du taux de matière grasse : le lait entier de 3.5%, demi écrémé 1.5% et écrémé <0.3% et en fonction de traitement thermique : lait cru, pasteurisé et le lait stérilisé (UHT) (**DGAL/PNNS, 2008**).

En industrie laitière, la contamination disséminée à partir des surfaces industrielles est largement reconnue. L'environnement des laiteries est propice au développement des biofilms.

Les bactéries thermorésistantes sporulés du groupe *Bacillus cereus* sont un groupe de contaminants important dans le milieu laitier et sont impliqués dans les problèmes d'altération du lait ainsi que de la limitation de sa durée de vie. *Bacillus cereus* produit plusieurs toxines et est responsable de toxi-infections alimentaires (**Malek, 2013**).L'objectif de notre travail est de rechercher la présence des bactéries sporulées thermophiles de type *Bacillus cereus* dans le lait stérilisé UHT, qui est l'un des indices de formation de biofilms dans l'industrie laitière et peut engendrer la dégradation de la qualité de ce type du lait et diminuer sa durée de conservation .nous avons analysé trois différents marques algériennes du lait UHT partiellement écrémé ,les prélèvement sont apartir des surfaces commerciaux dans le marché local de la région de Laghout.

Existe-il des indices de formation de biofilms dans l'industrie laitière, et est 'ce qu'il y a une présence de *Bacillus cereus* dans le produit fini du lait UHT ?

Ce travail est divisé en trois parties :

- ✚ une partie bibliographiques traitant « le lait et le lait UHT, le biofilms, le biofilms dans l'industrie laitière et le biofilms de *Bacillus cereus* avec leur caractères »
- ✚ une partie expérimentale contient les techniques utilisées pour le dénombrement, l'isolement, la purification et l'identification de *Bacillus*.
- ✚ une partie rend compte les résultats obtenus avec des discussions et en fin une conclusion sur notre travail.



**Partie**  
**bibliographique**



**Chapitre I**  
**Généralité sur le**  
**lait**

## I - Définition du lait

Le lait à toujours été considéré, dans toutes les civilisations, comme un produit noble en raison de son adaptation parfaite au besoin nutritionnel et physiologique du jeune (**Romain et al ., 2001**), et le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères, comme la vache, la chèvre et la brebis ...(**Vignola , 2002**).

Selon la réglementation algérienne, la dénomination « lait » est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale, obtenue par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni sous traction et n'ayant pas été soumis en traitement thermique (**J.O ,1993**).

Le lait s'altère très facilement .ces altérations peuvent être dues a des développements de microorganismes, Parmi ces micro-organismes, il en est d'inoffensifs, d'autre dangereux du point de vue sanitaire (**Larpent, 1997**) ; ou des réactions purement chimiques, telles des oxydations. Des matières premières non vivantes, dans la structure n'est pas cellulaire (**Loncin, 1991**).

Au cours de la traite, du transport et du stockage à la ferme ou à l'usine , Le lait est contaminé par une grande variété de micro-organisme. Une partie seulement d'entre eux peut se multiplier dans le lait si la température est favorable et le milieu propice .il en résulte que la nature de la flore microbienne du lait cru est à la fois complexe et variable d'un échantillon à l'autre et suivant l'âge du lait. Les principales sources de contamination sont les suivantes :

- Fèces et téguments de l'animal : Coliformes, *Bacillus*, *Clostridium*, *Salmonella*.
- Sol : *Streptomyces*, Bactéries sporulées, spores de champignons.
- Litières et aliments : Flore banale, *Lactobacilles*, *Clostridia butyriques*.
- air et eau : Flores diverses
- Equipements de traite et de stockage du lait : Flore lactique, *Microcoques*, *Lactobacilles*, *Chrobacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, Levures
- Manipulateurs : *Staphylocoques* des mains
- Vecteurs divers : insectes en particulier.

## II – La Composition du lait

### II-1-composition physicochimique

Le lait est un aliment complet ; Mélange de : l'eau, Protides, glucides, lipides, sels minéraux et vitamines sont présents à des concentrations différentes.

**Tableau 1 : Composition du lait en générale (Vignola ,2002)**

Constituant majeurs	Variations limites (%)	Valeur moyenne (%)
Eau	85.5-89.5	87.5
Matière grasse	2.4-5.5	3.7
Protéines	2.9-5	3.2
Glucides	3.6-5.5	4.6
Minéraux	0.7-0.9	0.8
Constituants mineurs : enzymes ; vitamine ; pigments ; cellules diverses.		

#### II-1-1 –L'Eau

L'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion elle représente environ 80% du lait (**Goursaud et Boudier, 1985**). Son caractère lui permet de former une solution vraie avec les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines (**Bouvier, 1993**).

#### II-1-2-La Matière grasse

La matière grasse (MG) est présente dans le lait sous forme de globules gras et est essentiellement constitué de triglycérides (98%), de phospholipides (1%) et d'une fraction insaponifiables (1%) (Cholestérol et de  $\beta$  carotène) (**Kuzdzal, 1987**).

La matière grasse représente à elle seul moitié de l'apport énergétique du lait .elle est constituée de 65 % d'acide gras saturé et de 35% d'acide gras insaturé (**Vignola ,2002**).

#### II-1-3- Les Protéines

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes et elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers (**Lankveld ,1995**). Différentes structures et propriétés physicochimiques distinguent les protéines du lait (**Cayot**

et Lorient, 1998). On les classe en deux catégories ; d'une part la caséine (2.7g/l) qui est en suspension colloïdale sous l'action de la présure et d'autre, les protéines du sérum (0.6g/l) qui précipitent sous l'action de la chaleur (Whitney et al., 1976).

Les acides aminés essentiels présents dans le lait sont mesurés en milligramme par un gramme de protéine dans le tableau ci dessous.

**Tableau 2 : Les acides aminés essentiels (Frenote et Vierling, 1997)**

Les acides aminés	mg/g protéine
Histidine	29
Isoleucines	65
Leucine	109
Lysine	83
Méthionine et cystéine	35
Phénylalanine et tyrosine	107
Thréonine	48
Tryptophane	15
Valine	72

#### II-1-4- Les Glucides

Le plus important du lait ; puis qu'il constitue environ 40% des solides totaux .d'autre glucides peuvent être présents en faible quantité comme le glucose et le galactose qui proviendraient de l'hydrolyse du lactose ; en outre, certains glucides peuvent se combiner aux protéines. Ainsi, le lait contient près de 4.8% de lactose (Montreuil, 1971).

#### II-1-5- Les Minéraux

Les minéraux contenus dans le lait, prennent plusieurs formes ; ce sont les plus souvent des sels, des bases et des acides. a cette liste s'ajoutent certains éléments , comme le soufre présent dans les protéines et les oligo-éléments suivants , qui sont présents à faible concentration à l'état de trace : Manganèse , Bore , Fluor , Silicium , Brome , Molybdène , Cobalt , Baryum , Titane , Lithium et probablement certains autres ( Brulé , 1987).

Les minéraux ont un rôle structural et fonctionnel : ils sont souvent impliqués dans le mécanisme physiologiques (régulation nerveuse ou enzymatique, contraction musculaire ...) (Brulé, 1987 ; Guegen, 1979).

**Tableau 3** : La concentration des principaux minéraux dans le lait (Mahaut *et al.*, 2000)

<i>Minéraux</i>	<i>Concentration</i>
Calcium	1.2g/l
Le phosphore	0.9g/l
Le potassium	1.5g/l
Le magnésium	130mg/l
Le chlore	1.2g/l
Le fer	0.07mg/l
Zinc	0.4mg/l
Na	45mg/100g

## II -1-6-Les Enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires spécifiques produits par les cellules vivantes, ils sont des biocatalyseurs, car ils accélèrent les réactions biochimiques (Amiot *et al.*., 2002).

Les enzymes sont des substances élaborées par les micro-organismes pour digérer les éléments du lait, mais qui peuvent être parfois fabriquées par la femelle laitière elle-même (Duquesnel, 1993).

Le lait contient principalement trois groupes d'enzymes : les hydrolases, les déshydrogénases ou oxydases et les oxygénases. Deux principales facteurs qui influent sur l'activité enzymatiques sont le pH et la température (Amiot *et al.*., 2002).

## II-1-7- Les Cellules du lait

Comme tout liquide biologique, le lait même normal, contient des cellules somatiques Provenant de la mamelle ou sang. Parmi ces cellules nous pouvons distinguer :

- Des lymphocytes de type B ou C

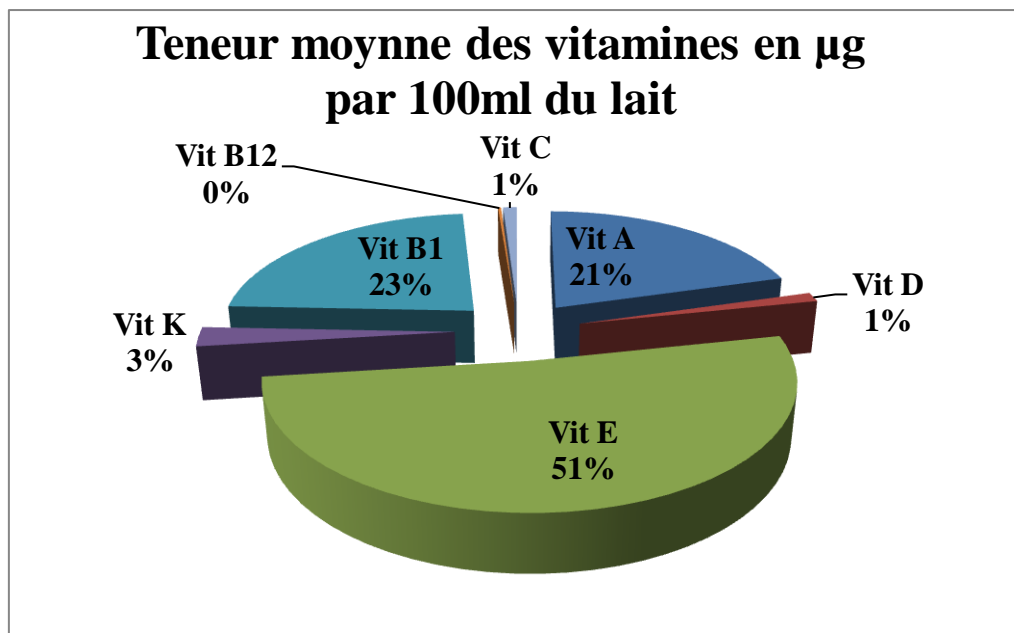
-Des macrophages avec les cellules épithéliales représentent plus des deux tiers des Cellules

Le nombre de ces cellules est modifié en cas d'inflammations (**Larpent, 1997**).

### II-I-8-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 (vitamine de groupe B, Vit C, Vit H, acide folique, niacine, acide pantothénique), se trouvent 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**).



**Figure01:** La teneur moyenne des principales vitamines du lait (**Vignola, 2002**)

### II-1-9- L'importance du lait

Le lait c'est un aliment complet et essentiel de notre alimentation, qui est très riche aux différents nutriments, cette richesse dont une importance de chaque nutriment qui est plus détaillé dans le tableau 4.

Tableau 4 : Propriétés du principal nutriment du lait (Debry, 2001)

Nutriment	Fonction	Intérêt sanitaire
<b>-Minéraux :</b>		
Calcium	-formation de l'os, contraction musculaire, coagulation du sang, régulation d'enzymes.	-Prévention de l'ostéoporose et de fractures, de l'hypertension artérielle, du cancer du colon
Phosphore	-métabolisme énergétique (ATP), coenzyme NADP, phospholipides des membranes cellulaire.	-Développement et maintien de la masse osseuse.
Magnésium	- cofacteur dans plus de 300 réactions métaboliques, transmission de l'influx nerveux	-prévention de troubles du système nerveux : convulsions, hallucinations
Zinc	-constituant de l'insuline et de plus de 200 enzymes engagés dans la croissance, la circulation, l'immunité.	-prévention de l'hypertension artérielle. -croissance, puberté et appétit normaux .défense contre les infections.
<b>-Vitamines :</b>		
Vit. B12	-Cofacteur dans la synthèse des acides nucléiques (avec folate).	-Prévention de l'anémie pernicieuse.
Vit. A	-constituant d'un pigment visuel de la rétine .développement des os, des dents et de la peau	-Prévention contre la cécité, les infections, le dessèchement de la peau et des yeux.
Vit.D	-facteur favorisant le système actif d'absorption intestinale du calcium.	-Prévention de problème de développement osseux.

<b>-Protéines :</b>	Source d'acide aminé essentiel à la synthèse des protéines des parois cellulaires, fibres musculaires, enzymes et hormones.	Prévention contre les retards de croissance .Résistance et défense contre les infections
---------------------	---	--

### II-2-Composition du lait de différentes espèces

Les laits sécrétés par les différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composants: eau, protéines, lactose, matières grasses (lipides) et minérales. Cependant, les proportions respectives de ces composants varient largement d'une espèce à l'autre (**Vignola ,2002**).

**Tableau 5 :** Composition chimique moyenne du lait de différentes espèces (g/L) (**Alves De Oliveira, 2007 .et Vilain , 2010**).

	L'eau	matière sèche	Matière protéique	Lipide(MG)	Lactose	Cendres (MM)	Calcium (Ca)	Phosphore (P)
<b>Vache</b>	<b>900</b>	<b>132</b>	<b>35</b>	<b>38</b>	<b>50</b>	<b>7.2</b>	<b>1.25</b>	<b>0.95</b>
<b>Chèvre</b>	<b>900</b>	<b>115</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>45</b>	<b>8</b>	<b>1.35</b>	<b>1</b>
<b>Brebis</b>	<b>860</b>	<b>185</b>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>45</b>	<b>8.7</b>	<b>1.9</b>	<b>1.5</b>
<b>Buffle</b>	<b>850</b>	<b>174</b>	<b>38</b>	<b>77</b>	<b>48</b>	<b>7.8</b>	<b>1.8</b>	<b>1.8</b>
<b>Jument</b>	<b>925</b>	<b>105</b>	<b>25</b>	<b>16</b>	<b>61</b>	<b>4.5</b>	<b>1</b>	<b>0.6</b>
<b>Femme</b>	<b>905</b>	<b>120</b>	<b>13</b>	<b>39</b>	<b>70</b>	<b>2</b>	<b>0.3</b>	<b>0.15</b>

### II-3-Qualité microbiologique

L'étude de la microbiologie permet de caractériser et ainsi de mieux contrôler les quatre principaux groupes de microorganismes ou microbes présents dans l'environnement alimentaire et laitier «virus, bactérie, moisissure et levure » (**Leclere, 1969**).

### II-3-1-La classification des principaux microorganismes du lait selon leur importance

On répartit les microorganismes du lait, selon leur importance, en deux grandes classes : la flore originelle et la flore contaminants. La flore contaminant est subdivisée en deux sous-classes : la flore d'altération et la flore pathogène (**Plommet, 1987**).

#### II-3-1-1 La flore originelle

Lorsque le lait provient d'un animal sain et qu'il est prélevé dans des conditions aseptiques, il devrait contenir moins de 5000 UFC/ml. La flore originelle du produit laitier se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et d'autres facteurs.

Le lait qui sort du pis de la vache est pratiquement stérile. Les genres dominants de la flore originelle sont principalement des microorganismes mésophiles (**Plommet, 1987**).

#### II-3-1-2 La flore contaminant

La flore contaminant est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation .elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels de gout, d'aromes, d'apparence ou de texture ou qui réduira la durée de conservation des produits.

Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*, les coliformes, soit principalement les genres *Escherichia* et *Enterobacter*, les sporulées telles que *Bacillus sp* et *Clostridium sp* et certaines levures et moisissures.

Et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits laitiers (**Andelot, 1983**).

les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus* , *Brucella sp* , *Bacterium tuberculosis*, *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens* , *Bacillus cereus* , *Yersinia enterocolitica* , *Listeria monocytogenes* , *Escherichia coli* , *Campulobacter jejuni*, *Shigella sonnei* , *Brucella abortis* , *Mycobacterium tuberculosis* ( **Lambien et German, 1961**).

### III- Caractéristiques du lait

#### III-1-Organoleptiques

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en  $\beta$ -carotène. Il a une odeur peu marquée, mais caractéristique. Son goût, variable

Selon les espèces animales, est agréable et douceâtre (**Goursaud ,1985**). Il est deux fois plus visqueux que l'eau (**Veisseyre, 1975**) ; En considérant l'eau dont la viscosité à 20°C est de 1 centipoise, la viscosité du lait à la même température est de 2.1 centipoise (**Brochu ,1984**) et de saveur légèrement sucrée (**Veisseyre, 1975**).

#### III-2- Propriétés Physico-chimiques

Les principales propriétés physicochimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la masse volumique et la densité, le point de congélation, le point d'ébullition et l'acidité.

##### III-2-1-Masse volumique et densité du lait

La masse volumique du lait varie en fonction de la température et du cycle thermique appliqué qui conditionne l'état de cristallisation de la matière grasse (**Croguennec, 2008**).

Le lait, ayant une masse volumique de 0.92 g/cm<sup>3</sup> (**Bauer et al ., 2010**)

##### III-2-2 -Point de congélation

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau puisque la présence de solides solubilités abaisse le point de congélation. Sa valeur moyenne est - 0,555°C.

##### III-2-3- Point d'ébullition

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée.il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100,5°C.

**III-2-4- Acidité du lait**

Le lait démontre une certaine acidité. Cette acidité est due à la présence de protéines (caséines et la lactalbumine), de substance minérales (phosphates, CO<sub>2</sub>) et acides organiques (l'acide citrique).

**III-2-5- le pH du lait**

Le pH d'un lait frais à 20°C se situe entre 6.6 et 6.8 (**Vignola, 2002**).

**III-2-6- Aw**

Le lait c'est un aliment très hydraté, peu concentré en solutés avec une activité d'eau (0.995) (**Frénot et Vierling, 1997**)

**IV- Les différents types du lait****IV-1- 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'assurer une meilleure conservation (**Luquet ,1990**), sa flore est abondante et susceptible d'évoluer rapidement. Il faut donc abaisser sa température à moins de 10°C le plus rapidement possible (**Guiraud ,1998**).

Sa production et sa commercialisation doivent être sévèrement contrôlées en raison des risques qu'il peut encore présenter pour la santé (**Luquet ,1990**).

**IV-2- Le lait sec (en poudre)**

Les poudres de lait sont des produits résultants de l'enlèvement partiel de l'eau du lait (**Hall et Hedrick, 1961**). L'extrait sec d'un lait concentré écrémé se situe entre 35 à 50 % est séché par pulvérisation dans un courant d'air chaud à 140-150 °C, procédé du brouillard ou procédé spray, ou par atomisation .l'eau est évaporée instantanément ; la température de sortie d'eau n'est qu'à environ 90 °C. La poudre est blanche et peu modifiée dans sa composition, en dehors de l'abaissement de quelques vitamines et enzymes et de 4 % d'eau ; le lactose est habituellement à l'état amorphe, qui n'est pas un état stable .en favorisant la cristallisation après le séchage, on améliore la structure particulière de la poudre, cette « poudre instantanée » était obtenue il y a quelques années par légère réhumidification de la poudre

brute et nouveau séchage. Aujourd'hui, on modifie les conditions de travail de la tour d'atomisation.

Le lait sec entier (non écrémé) est un produit assez fragile, du fait surtout de l'oxydation des lipides. Le meilleur moyen de le conserver est le conditionnement sous vide, en récipient hermétiquement clos (**Alais et Linden ; 1994**).

#### **IV- 3- Le lait traité thermiquement**

Selon le degré de traitement thermique qui permet une augmentation de la durée de conservation, on distingue :

-laits pasteurisés

- laits stérilisés (**Luquet ,1990**).

##### **IV-3-1- Le lait pasteurisés**

La pasteurisation est un traitement thermique qui entraîne la destruction de la plupart des formes végétatives de micro-organisme banaux et celle de tous les microorganismes pathogènes. Le lait pasteurisé peut être obtenu de plusieurs façons :

-par pasteurisation à basse température : 30 minutes à 65 °C

- par pasteurisation à haute température : 15 secondes à 72 °C, quelque seconde à 95 °C

Ce lait doit être conservé à une température inférieure à 10 °C, Sa conservation est limitée. (**Guiraud ,1998**).

##### **IV-3-2- Les différentes laits stérilisés**

Selon le procédé de stérilisation, on distingue le lait stérilisé et le lait stérilisé UHT. Définis en 1977.Ces laits doivent être stables jusqu'à la date limite de consommation (**Luquet ,1990**).

###### **IV-3-2- 1- Laits stérilisés**

Le lait es tout d'abord pré-stérilisé (130-140°C/3-4s) après homogénéisation dans le cas des laits contenant de la matière grasse .Puis, il est refroidi à 70-80°C et mis en bouteille (polyéthylène haute densité) pour subir une 2ème stérilisation (115°C /15-20 min) suivi d'un refroidissement rapide. Ces laits présentent des défauts de couleur et de gout dus aux réaction

de Maillard .la DLC est de 150 jours .afin d'éviter l'oxydation des lipides, ces laits sont stockés à l'abri de la lumière ou dans des récipients opaques. sur le plan nutritionnel , on observe des pertes en thiamine, Vitamine B12 et B6 (Mahaut *et al.* , 2000) .

#### IV-3-2-2- Laits UHT (Ultra Haute Température)

Le traitement UHT consiste à chauffer le lait en débit continu à une température d'au moins 135-150°C/1-6 s (Mahaut *et al.* , 2000), puis refroidir à la température ambiante et à l'emballer aseptiquement dans le but :

-D'assurer sa stabilité et sa saveur assez longtemps jusqu'à 90 jours pour satisfaire aux exigences commerciales

- De tués tous les organismes pathogènes et de toutes toxines dans le lait, le traitement UHT pouvant affecter la santé du consommateur, mais Il existe un risque de résistance de spores de certains germes comme *Bacillus*, (Gosta, 1995 ; Vignola, 2002).

##### IV-3-2-2-1-Le principe du lait UHT

On connaît le principe du lait traité à Ultra Haute Température ou UHT depuis plus d'un siècle : déjà en 1893, on avait construit des appareils pouvant traiter le lait à 125°C pendant 6 minutes. en 1909, un système tubulaire à débit continu était en mesure de chauffer le lait à 130-140 °C, mais ce n'est qu'en 1951 qu'il a été possible d'emballer le lait aseptiquement par le procédé Martin Canning. Dix ans plus tard, la compagnie Tétra Pak Processing Systems, de Suède, a mis sur le marché la première emballeuse aseptique commerciale satisfaisante (Vignola, 2002).

##### IV-3-2-2-2-Procédés de fabrication du lait UHT

La préparation du lait UHT se fait en deux étapes : la stérilisation du lait même et son emballage aseptique.

**Stérilisation** : le traitement thermique s'applique selon deux modes : directe et indirect

- Dans le cas du traitement direct (upérisation), la vapeur de qualité alimentaire est injectée dans le lait préchauffé à 80 °C, ou elle se condense en libérant sa chaleur latente d'évaporation (de l'ordre de 2200 KJ/Kg vapeur). La dilution engendrée est corrigée lors du refroidissement par détente du mélange dans une chambre sous vide partiel, ou les condensats sont évaporés.

-Dans le cas du traitement indirect, il n'ya aucun contact entre le lait et la vapeur. Le traitement s'effectue avec des échangeurs plaques ou tubulaires. Le facteur limitant du

procédé concerne l'encrassement progressif du matériel par précipitation de complexes protéines / minéraux sur les parois de l'échangeur, en particulier en phase montante (**Mahaut et al ., 2000**).

**Emballage aseptique** : une fois stérilisé, le lait doit demeurer dans un état d'asepsie totale. Pour ce faire, on peut utiliser un appareil de conditionnement relié directement à une ou plusieurs emballeuses (**Vignola, 2002**). La limite de conservation est imposé pour des problèmes de stabilité physicochimique liés à des phénomènes de précipitation ,floculation et gélification dus à une protéolyse ménagée des caséines par la plasmine résiduelle ou des protéases microbiennes très thermorésistante (**Mahaut et al ., 2000**).

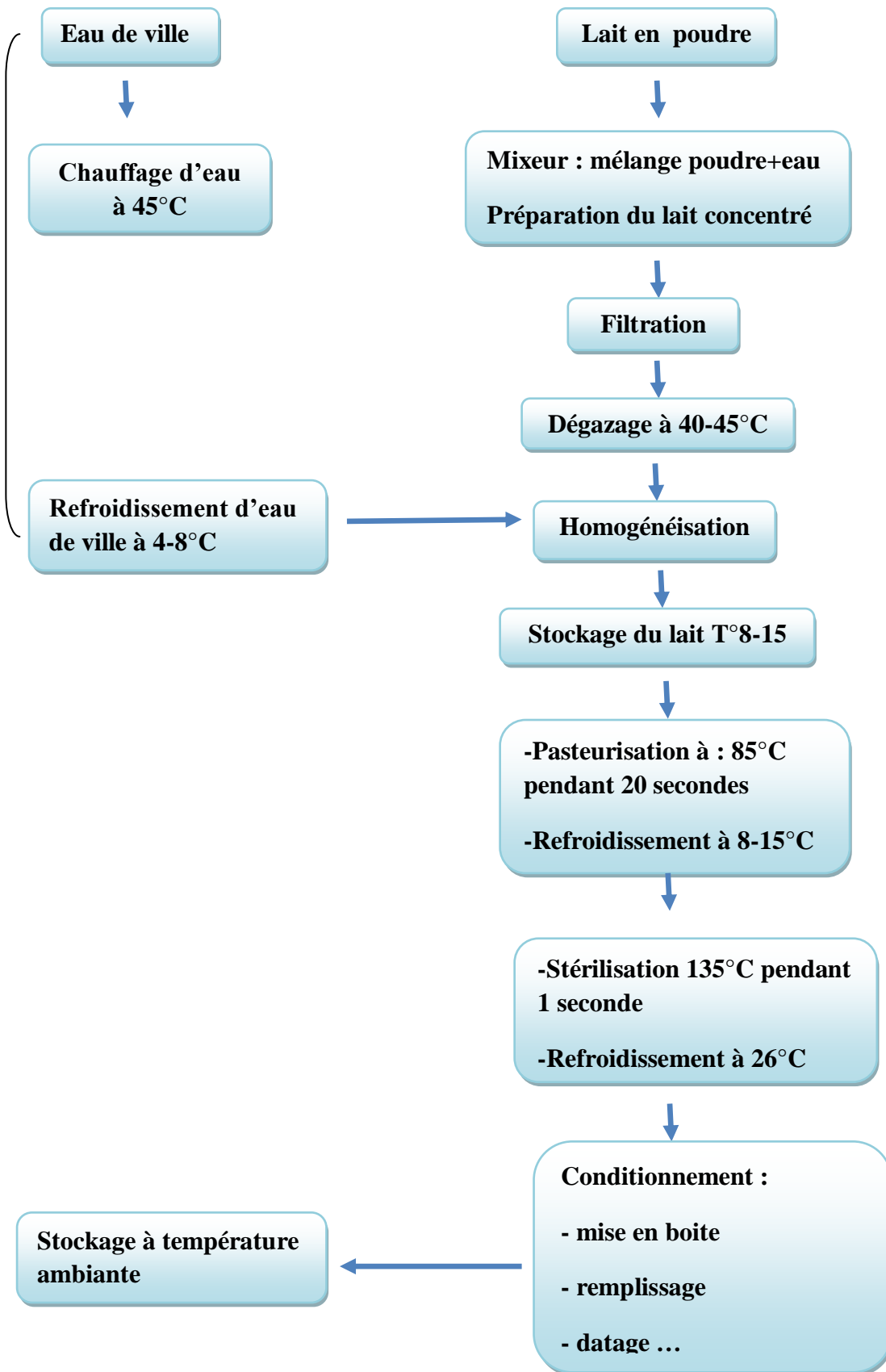


Figure 02: Diagramme de fabrication du lait stérilisé UHT (Veisseyre, 1979)

**IV-3-2-2-3- Différents types du lait UHT**

Le lait de consommation est vendu sous 3 catégories principales : le lait entier, le lait partiellement écrémé et le lait écrémé. La différence entre ces 3 catégories au niveau du taux de matière grasse présente dans le lait est due au fait qu'une partie de la matière grasse a été retirée pour l'amener à une valeur standardisée (**Vignola ,2002**).

**Tableau 6:** Différents types du lait UHT (**J.O.R.A.N°69,2003**)

Lait UHT	Entier	Demi écrémé	Lait UHT écrémé
Teneur en matière grasse (g/l) du lait	28 (minimum)	15 à 20 (minimum)	1,5(ou plus)

**IV-3-2-2-4- La composition des différents types de lait UHT**

La composition de différents types du lait UHT est représentée comme suit

**Tableau 7:** Composition moyenne des différents types de lait UHT en g/l (**Feinberg et al ., 1987**)

Constituants	Lait UHT (g/l)		
	Lait UHT entier	Lait demi écrémé	Lait écrémé
Eau	878	896	910
Extrait sec total	122	164	90
Azote total	5	5	5.2
Protéines	31,9	31,9	32,9
Lipides	35,4	15.4	2
Glucides	44,7	45, 3	45,4

**IV-3-2-2-5 -Avantage du lait UHT**

Le traitement UHT est considéré comme une révolution importante en technologie laitière depuis l'avènement de la pasteurisation. Ce procédé offre, en particulier, le double avantage d'une longue conservation du lait de consommation sans besoin de réfrigération.

La distribution en devient plus économique, puisqu'elle peut être étendue, sur un délai hebdomadaire par exemple, et qu'elle n'est pas sujette à des limites de parcours (**Vignola, 2002**).



# **Chapitre II**

## **Biofilms**

## Chapitre II : Biofilms

### I - Définition de Biofilms

Un biofilms est un ensemble des microorganismes soit de la même espèce soit des espèces différentes qui vivent en symbiose et forment une communauté (**Branger et al ., 2007**), il est plus résistant aux antibiotiques à la dessiccation (**Bouhaemont et al ., 2011**), aux mécanismes de défense de notre système immunitaire (**Briandet et al ., 2012**).

### II- Historique

L'origine de la recherche en microbiologie est souvent associée à l'observation d'Antone Van Leeuwenhoek qui, au XVIIe siècle et grâce à un microscope de son invention, mit en évidence la présence d'organismes microscopiques à la surface de ses dents. (**Roux et Ghigo, 2006**).

Autre dit que : La découverte des biofilms à été faite dans le milieu marin lors de travaux sur les problèmes de détérioration des coques de navires (**Angst, 1923, Henrici, 1933 in Bagge et al ., 2001**).

Le terme de BIOFILMS à été utilisé pour la première fois en 1943 par C.E. Zobell montrant que le nombre de bactéries colonisant les parois d'une bouteille remplie d'eau de mer était supérieur à celui des bactéries dans l'eau (**Costerton et al ., 1978**), mais les outils d'investigation disponible ne permettaient pas de l'observer insitu, or cette étape est indispensable pour comprendre leur formation et leur fonctionnement. L'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser dans les années 1990 va permettre l'observation in situ des biofilms sans modifié leur état.

### III-Formation de Biofilms

Les bactéries peuvent adopter deux mode de vie radicalement différents :

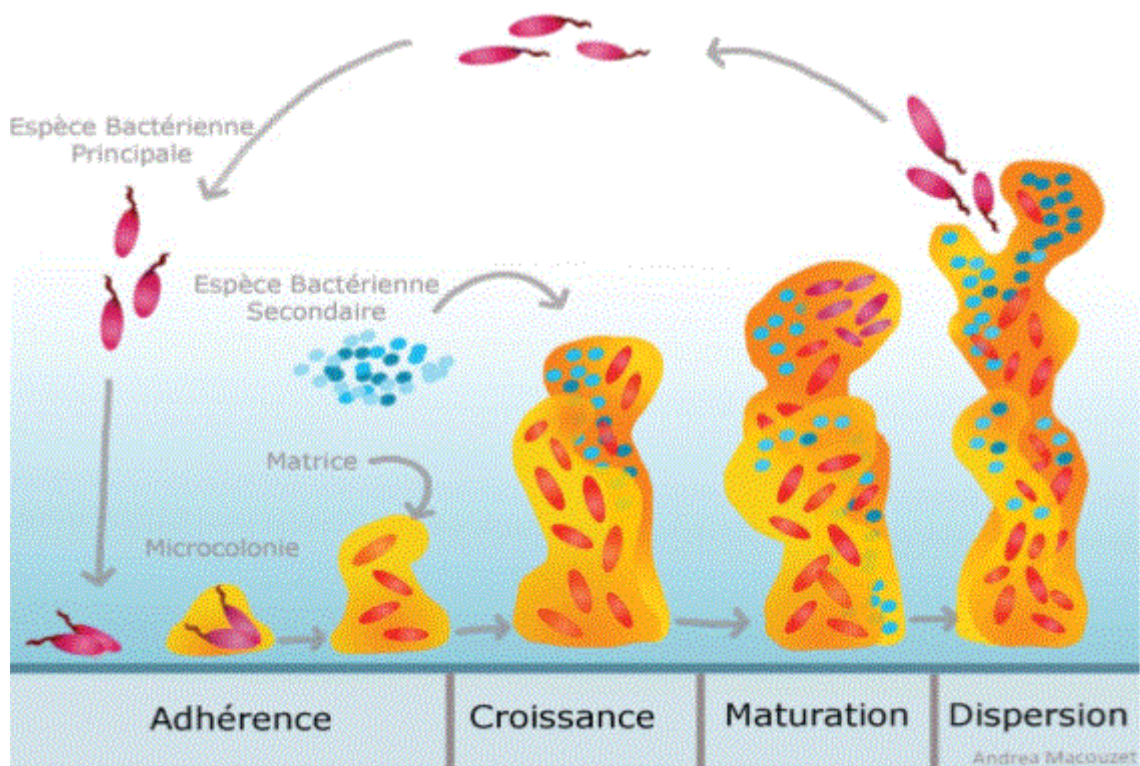
- Soit elles sont à l'état planctonique : isolées et flottent dans le milieu.
- Soit elles sont à l'état sessile: attachée à une surface et vivent en communauté au sein d'un biofilms.

Plus de 90% des micro-organismes vivent ainsi fixés la plus grande partie de leur vie dans leur environnement naturel dès qu'il y a de l'humidité des nutriments et une surface (**Briand et al ., 2012**).

ils peuvent se développer sur tous les supports exposés même occasionnellement, capable d'utiliser de multiples substrats, développe sur n'importe quelle surface (**Branger et al ., 2007**).

La formation d'un biofilms débute par la fixation d'une bactérie libre à une surface. Si, en se multipliant, les bactéries formaient une couche épaisse, elle en viendrait à manquer d'espace, celle qui se trouveraient dans la couche inférieure manqueraient d'élément nutritifs et il y aurait accumulation de déchets toxiques (**Tortora et al ., 2003**). Ce biofilms dégradent les fibres alimentaires, elles synthétisent des micronutriments comme les vitamines, les acides gras et les enzymes (**Erbs ,2014**).

Lors de développement de biofilms, la surface se modifié elle devient collante, gluante, glissante et colorée tout dépendra de la communauté microbienne impliquée et du mucus (matrice) (**Briand et al ., 2012**)



**Figure 03** : Schéma présentant les étapes du développement du biofilms (**Yannick et al ., 2014**)

#### IV-Le biofilms en industrie laitière

Le biofilms en industrie laitière est un réservoir de contaminations microbiennes qui a reçu relativement peu d'attention en industrie laitière (Marchand et al ., 2012). La formation de biofilms peut avoir lieu dans les différents sites de la chaîne de transformation du lait (Parkar et al ., 2004). 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). Le développement de biofilms sur les équipements laitiers est très rapide (8-12 h), avec des nombres de bactéries souvent supérieurs à  $10^6$  bactérie/cm<sup>2</sup> (Bremer et al ., 2009). Le risque de transfert de ces bactéries au lait qui circule dans les lactoducs est grand, ce qui implique la contamination microbienne des produits laitiers transformés et la diminution de leur sécurité et durée de vie (Malek, 2013).

La présence de biofilms au sein de ces dépôts, c'est-à-dire d'appauvrissement en oxygène ou la diminution locale du pH.

L'espèce bactérienne majoritaire dans les circuits de l'industrie laitière est *Bacillus cereus* (Guezennec ,2017).



**Figure 04** : Equipement laitiers. (A) : tanks de stockage du lait, (B) : système de canalisation (lactoducs), (C) : un échangeur thermique à plaque (Malek, 2013).

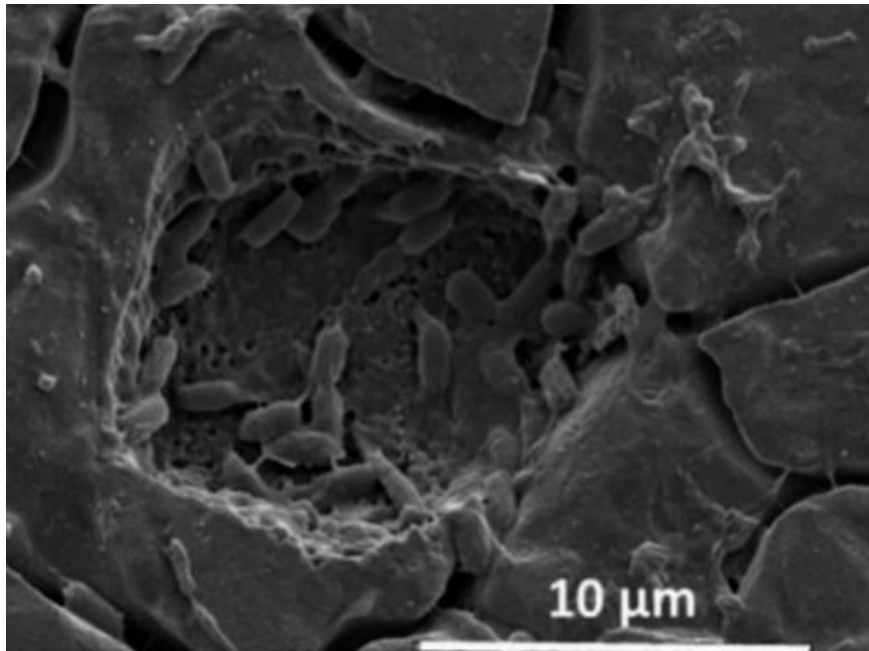
### V-Biofilms de *Bacillus cereus*

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).

Dans l'industrie laitière, *Bacillus cereus* représente plus de 12% de la flore microbienne constitutive de biofilms (Sharma et Anand, 2002). Les biofilms de *B. cereus* sont formés quand les spores sont présentes dans le lait cru et survivent à la pasteurisation. Elles adhèrent alors aux surfaces d'acier inoxydable, et germent quand et où les conditions sont favorables (Flint et al ., 2001).

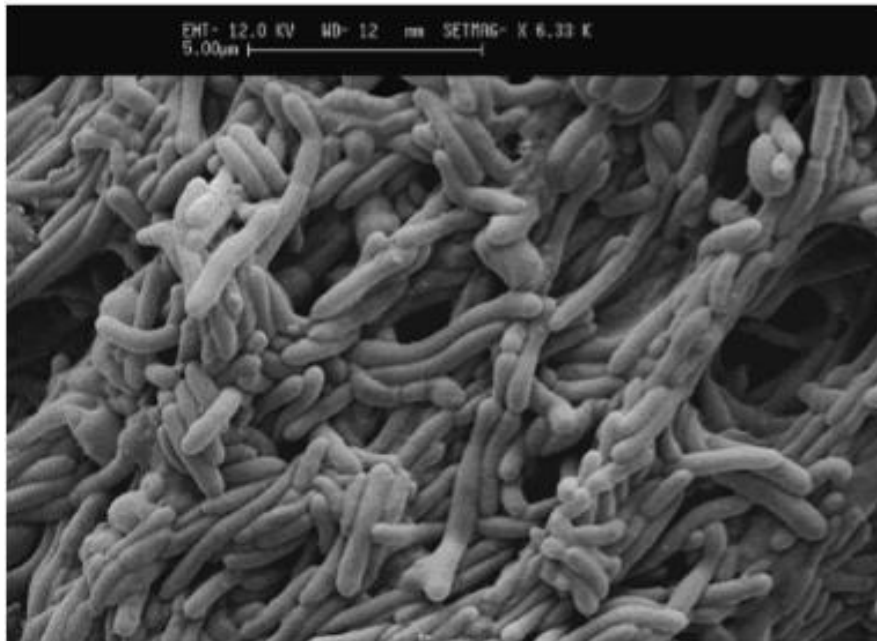
Les caractéristiques hydrophobes des spores de *B. cereus* ont comme conséquence l'adhérence sur des surfaces des matériaux fréquemment utilisés en industrie agroalimentaire comme l'acier inoxydable (Faille et al ., 2001 ; Lelievre et al ., 2001; Peng et al ., 2001; Faille et al ., 2002 ; Tauveron et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



**Figure05:** Biofilms de *B.cereus* sur acier inoxydable observés par microscope électronique à balayage (Bello-fontaine et al., 2016).

L'exposition des suspensions de spores à un traitement thermique peut être la cause d'une augmentation de l'hydrophobicité de la spore jouant ainsi un rôle dans l'adhérence de ces spores sur des surfaces (Wiencek et al., 1990). La figure (6) montre la micrographie d'un biofilm de 6 jours formé par *B.cereus* sur une surface en acier inoxydable (Simões et al., 2010).



**Figure 06:** micrographe d'un biofilms de 6 jours formé par *B.cereus* sur une surface en inox (Simões et al ., 2010)

**A l'échelle moléculaire :** TasA est une protéine responsable de la formation de biofilms de *Bacillus cereus* qui secrété, localisé dans la matrice d'exo polysaccharide sa fonction est inconnue mais elle est requise dans l'architecture de biofilms.

TasA possède chez *Bacillus cereus* deux orthologues présents au même locus chromosomique : l'un est la camélysine codé par le gène calY ce dernier est transcrit au moment de la formation de biofilms, l'autre est codé par le gène BC 1279 qui exprimé constitutivement (Candela et al ., 2008).

## VI - Caractéristiques des *Bacillus*

En termes de classification « officielle », les *Bacillus* appartiennent au Domaine des *Eubactéries*, du Phylum de *Firmicutes* (Dromigny, 2008), la Famille des *Bacillaceae*, l'Ordre des *Bacillales*, Classe de *Bacilli*. du point de vue de la classification liée aux schémas d'identification (Bergey 's determinative bacteriology), ils sont inclus dans le groupe 18 qui concerne les coques et bacilles, sporulés, Gram+ (*Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*).

Les *Bacillus* c'est un genre bactérien particulièrement hétérogène (Dromigny, 2008), ce sont des bacilles a Gram positif, généralement mobiles certain espèce sont hyper flagellée,

aptes à la sporulation. La spore ne prend pas la coloration de Gram, elle est sphérique ou ovale, déformante ou non selon les espèces (**Guiraud,2004**)

Ainsi le taux de guanine et cytosine (%G+C) des espèces de genre *Bacillus*, varie sur une échelle de 40% (**Madigan et Martinko ,2007**).

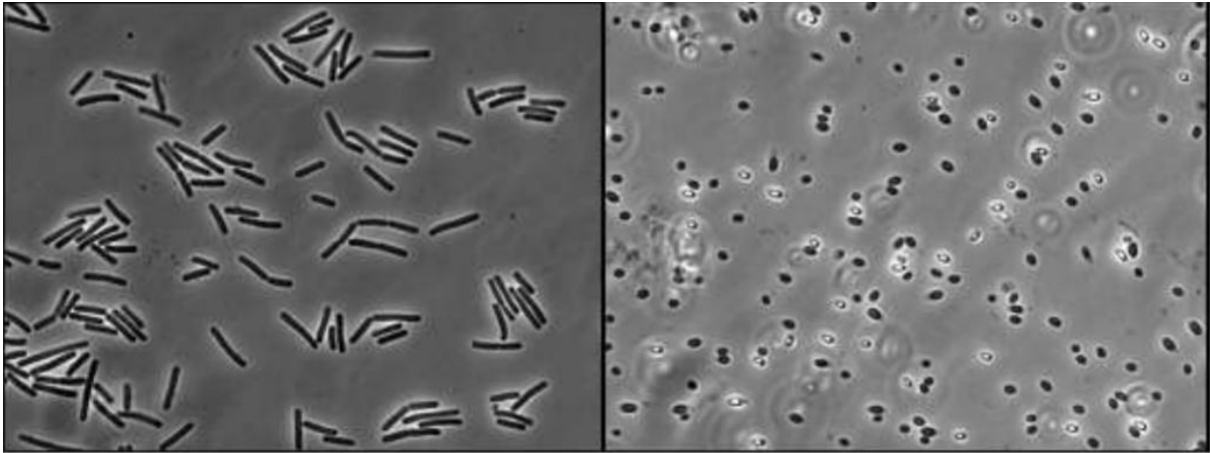
Plusieurs espèces de *Bacillus* produisent des antibiotiques (bacitracine, gramicine, polymyxine) parmi les pathogènes *B. anthracis*, *B. thurengiensis* et *B. sphaericus* (**Lecointre et le Guyader, 2001**) ; Et d'autres qui causent des infections alimentaires sont *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* et aussi *Bacillus cereus* (**Federighi, 2005**).

### VI I-*Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* fut isolé pour la première fois par Frankland en 1887 au Royaume-Uni, à partir de l'air d'une étable. Cette souche dénommée ATCC14579 est considérée comme la souche type de *Bacillus cereus* (**Hauge ,1955**), puis a été incluse en 1980 dans les **Approved Lists of Bacteriological Names** et aussi appelé *Bacillus cereus sensu stricto* fait partie morphologiquement et de part sa phylogénie à un groupe de bactéries que l'on nomme :Groupe *B.cereus* ou *B cereus sensu lato* (**Laouami,2012**); selon l'**Institut National de Veille Sanitaire (INVS)** a classé *B.cereus* comme étant la quatrième cause de TIAC (**INVS ,2009**).

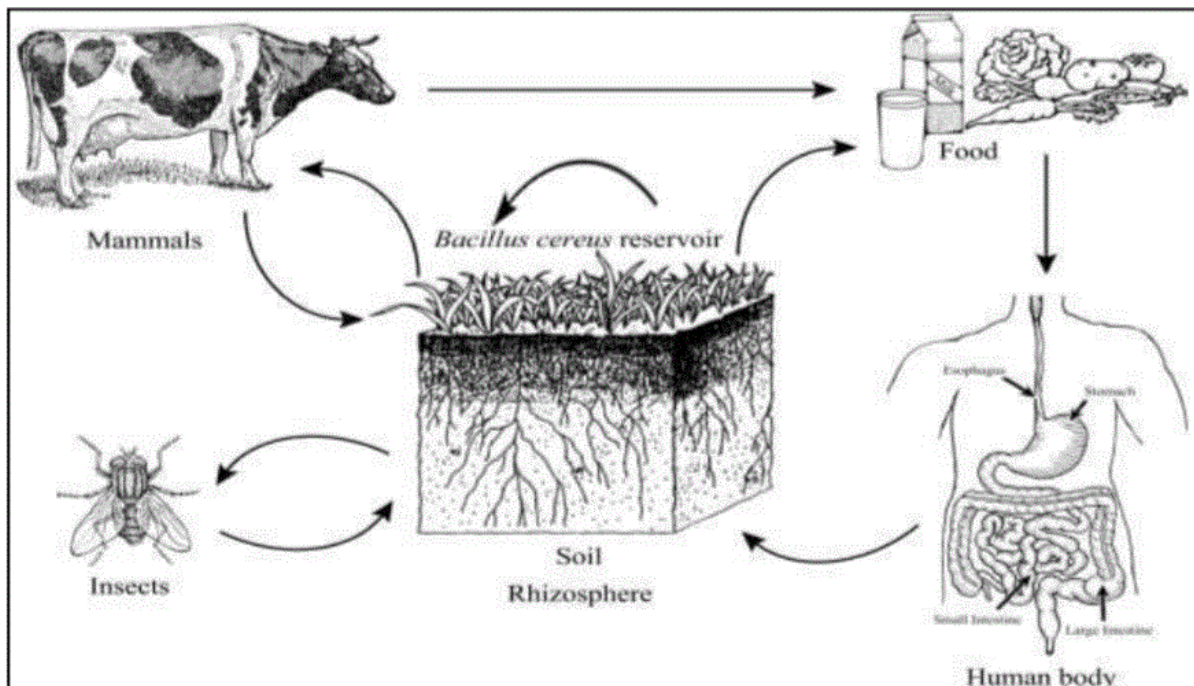
L'observation au microscope d'une culture de *Bacillus cereus* met en évidence des bacilles de grande taille (3 à 5 µm de diamètre), généralement disposés en chaînes. (**Federighi, 2005**). Les spores sont non déformantes et apparaissent en position centrale (**Madigan ,2007**), avec une longueur de 1.55 µm et un diamètre de 0.9 µm. Les spores sont donc des éléments de très petites dimensions ce qui leur donnera la capacité de contaminer les denrées alimentaires (**Dromigny, 2008**). C'est une bactérie aéro-anaérobie thermophile la plupart des souches se cultivent jusqu'à 55°C, mais certaines souches peuvent se développer à 6 °C.

Elle est lécithinase (+) (**Guiraud ,2004**), une activité catalase(+), oxydase(-). *Bacillus cereus* se développe à 7% de Na Cl et au pH optimal de croissance compris entre 6 à 7 (**Dromigny, 2008**) avec une activité d'eau (*A<sub>w</sub>*) minimale de 0.92 (**Branger , 2007**), La nisine peut avoir une activité inhibitrice sur *Bacillus cereus* (**Dromigny,2008**).



**Figure 07:** les différentes formes de *Bacillus cereus* (ATCC 14579) : cellule végétatives à gauche et spores dormantes ; spores en germination à droite sous microscopie optique (Laoumi ,2012)

Elle est toxigène à des concentrations de  $10^4$  à  $10^5$  spores /g du produit alimentaire (Salustiano et al. ,2009). Causé des vomissements, douleur abdominale, nausées après 1-7 heures d'incubation et de diarrhée après une incubation de 8-16 heures (Singleton ,1999).



**Figure 08:** représentation des cycles de vie de *Bacillus cereus* (Mols et Abee, 2011)

## VII- 1- l'intoxication alimentaire due à *Bacillus cereus*

L'association possible de *Bacillus cereus* à des cas d'intoxication alimentaires est connue depuis fort longtemps. *Bacillus cereus* est en fait l'agent de deux types de syndromes d'intoxications alimentaire : un syndrome dit diarrhéique et un syndrome dit émétique.

### VII-1-1-Le syndrome diarrhéique

L'intoxication par ingestion directe de toxine suppose la consommation d'aliment portant une forte population de *Bacillus cereus* , le premier symptôme consiste généralement en une diarrhée abondante , accompagnée de douleur et de crampes abdominales qui apparaissent de 8 à 16h après l'ingestion de l'aliment contaminé et plus rarement , de vomissements et de fièvre . Les symptômes disparaissent en viron 12h après (**Federighi ,2005**).

### VII-1-2- le syndrome émétique

Les intoxications surviennent à la suite de l'ingestion d'aliments contenant la toxine préformée. La période d'incubation est très courte (de 1 à 5h). Le malade est en suite pris de nausées et de vomissements, accompagnés de crampes, de douleur abdominales, et de diarrhée pour environ un tiers des cas. Aucun traitement médical n'est généralement requis, à l'exception de rares cas mortels ou la toxine émétique avait provoquée une déficience hépatique ou cardiaque (**Federighi ,2005**).



# **Partie expérimentale**



# **Matériel et méthodes**

## I - Echantillon

Dans notre travail nous avons analysé trois différentes marques algériennes du lait stérilisé UHT partiellement écrémé nommée comme suite (X, Y et Z). D'après chaque marque nous avons prélevé 4 lots de différents date chaque lot contient 3 briques (Echantillon) de volume de 1 litre.

Les échantillons sont analysés par des méthodes physico-chimique et bactériologique au niveau de laboratoire pédagogique département de Biologie de l'université d'Amar TELIDJI.

## II - Prélèvements

Pour chaque lot, nous avons prélevé 9 échantillons (3 échantillons de chaque marque). Les prélèvements des 3 marques ont été réalisés à différente date. .

**Tableau 8** : les dates des Lots des marques X, Y et Z

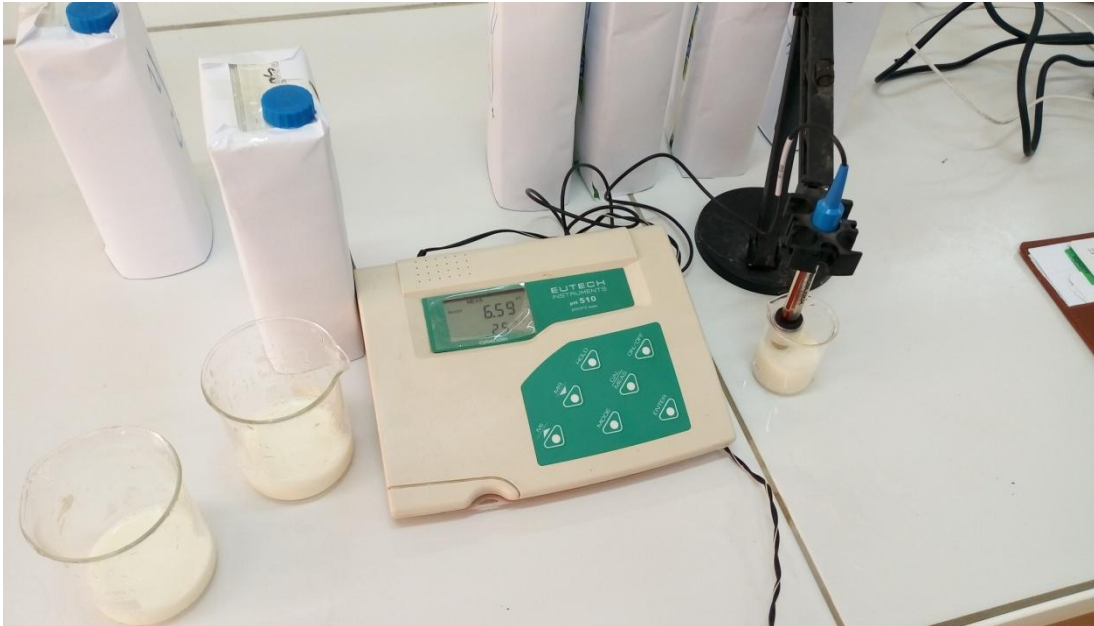
Lots	échantillons	Date de fabrication	Date de péremption	Date de prélèvement
<b>Lot 1</b>	X	06/11/2018	03/02/2019	23/12/2018
	Y	11/11/2018	08/02/2019	23/12/2018
	Z	10/11/2018	08/02/2019	23/12/2018
<b>Lot 2</b>	X	17/12/2018	16/03/2019	28/01/2019
	Y	11/11/2018	8/02/2019	28/01/2019
	Z	27/12/2018	27/03/2019	28/01/2019
<b>Lot 3</b>	X	07/01/2019	06/04/2019	03/02/2019
	Y	26/12/2018	26/03/2019	03/02/2019
	Z	17/01/2019	17/04/2019	03/02/2019
<b>Lot 4</b>	X	02/04/2019	30/06/2019	21/04/2019
	Y	18/03/2019	15/06/2019	21/04/2019
	Z	07/02/2019	08/05/2019	21/04/2019

## III- Analyse physico-chimique

### III– 1 : Mesure du pH :

A l'aide d'un pH mètre de paillasse type (EUTECH instruments Lon 510) nous avons mesuré le pH des différents échantillons de lait

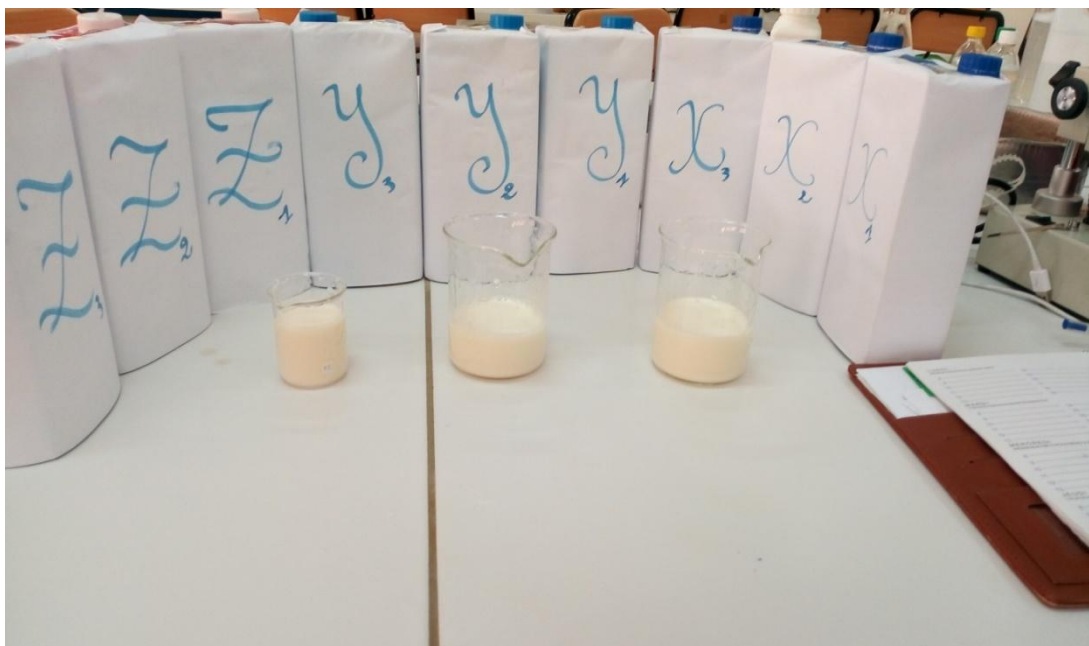
Nous avons fait l'analyse en 3 prises d'essai pour chaque échantillon



**Figure 09:** Mesure de pH du lait UHT par pH mètre (EUTECH instruments Lon 510)

#### IV-Analyse organoleptique

Nous avons composé des jurys de 3 sujets (étudiants) pour comparer la couleur, le gout et la texture de chaque lot de 3 marque, on met une quantité de chaque échantillon dans des béchers, et nous avons enregistré leur opinion dans un tableau.



**Figure 10:** Analyse organoleptique des trois marques

## V - Analyse bactériologique

### V-1- Etude de la microflore

Dans notre étude de la microflore nous avons utilisé le milieu PCA ; est un milieu standard utilisé pour le dénombrement des micro-organismes aérobie se développant à 30°C dans les produits alimentaires (Delarras, 2007) ; et le milieu Mossel qu'il s'agit principalement de rechercher, d'isoler ou de dénombrer *Bacillus cereus* dans les contrôles de produits alimentaires. Il a été conçu par Mossel et al. en 1967 pour la détection, l'isolement et le dénombrement des formes végétatives et des spores du *Bacillus cereus* dans toutes sortes de denrées alimentaires (Delarras, 2007).

### V-2- Préparation des dilutions décimales

Les dilutions sont nécessaires dans le cas de produits contenant un nombre élevé de micro-organismes (Guiraud, 2004) sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques. On remplit les tubes par 9 ml d'eau peptoné. On prélève 1 ml du lait à l'aide d'une pipette après vortexer soigneusement pour détacher les germes et on la porte dans le premier tube de dilution ( $10^{-1}$ ). On homogénéise par aspiration le contenu de ce tube ( $10^{-1}$ ) et on ensemence le tube ( $10^{-2}$ ) puis le tube de ( $10^{-3}$ ) ; en changeant à chaque fois de pipette.



Figure 11 : Les dilutions préparées

### V – 3 - Ensemencement et dénombrement

#### V-3-1- Inoculation dans la masse

Dans cette technique ,1 ml de chaque dilution est placé dans des boites de Pétri ; on prépare 2 boites de Pétri pour chaque dilution. En utilisant une pipette propre que l'on peut réutiliser si on effectue les prélèvements en partant du tube le plus dilué et en remontant vers le plus concentré.

Ensuite 10 à 15 ml de milieu PCA en surfusion (45°C) sont coulés dans la boite et mélangés uniformément avec l'inoculum par un lent mouvement oscillatoire en huit .les colonies peuvent se développer en surface et en profondeur .ce type de numération convient parfaitement aux germes aéro-anaérobies, en coulant une nouvelle couche de 5 ml de milieu sur la couche précédente solidifiée (**Guiraud ,1998**). Incuber les boites inoculées à 30 °C pendant 24-48 h.

### V-3-2-Dénombrement, Isolement et purification sur milieu Mossel

La méthode courante pour isoler une souche unique est d'inoculer la culture sur des boîtes en l'étalant (Nicklin *et al.*, 2000).

Dans des conditions stériles, La purification des souches à été réalisée par écouvillonnage sur le milieu Mossel ; nous avonsensemencé les dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ . Il faut prendre soin de ne pas rayer la gélose, Incuber les boîtes de Pétri a  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 48-72h.

**Les résultats sont exprimés en nombre d'UFC/ml**

### V-4 Identification

#### V-4-1 Coloration de Gram

- la préparation est étalée en couche mince, séchée et fixée (Lambin et German ,1969)
- Recouvrir de violet de gentiane phénique : laisser agir une minute.
- Verser sur la lame quelque goutte de Lugol pendant une minute
- Ajouter quelque goutte de l'alcool pour décolorer les germes et laisser agir 30 secondes
- Recolorer les germes par l'ajout des gouttes de fuchsine pendant une minute

**Rincer la lame entre chaque étape de coloration par l'eau distillée**



**Figure 12 : Coloration de Gram**

## V-5- Testes biochimiques

### V-5-1- Test de Catalase

La catalase est une enzyme de détoxification de stress oxydatif qui dégrade le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en  $O_2$  gazeux (Carip, 2008). Dans ce test à l'aide d'une once de platine, une colonie isolée est prélevée d'une gélose (milieu Mossel) et déposée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame en verre (Prescott et al., 2003).

### V-5-2- Test Oxydase

L'oxydase est une enzyme faisant partie de la chaîne respiratoire. Elle permet d'oxyder un réactif incolore en un produit coloré violet. Dans ce test simple, un prélèvement bactérien est mis au contact d'une pastille imprégnée de réactif (Carip, 2008).

### V-5-3- Galerie api 20E

L'identification d'une espèce bactérienne fait appel à un ensemble de milieux, de réactifs et de techniques standardisées qu'on appelle galeries. Celles-ci exploitent les caractéristiques biochimiques et physiologiques des bactéries, par la mise en évidence d'enzymes spécifiques ou de produits du métabolisme (Carip, 2008).

La galerie API 20 permet l'identification des caractères biochimiques principaux. Cette galerie ne donne que l'appartenance au groupe *Bacillus cereus* (Dromigny, 2007).

C'est un système simplifié et standardisé, qui comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés permettant d'effectuer 22 tests biochimiques. Des suspensions bactériennes (mises dans 9 ml de l'eau peptonée stérile) sont prélevées à partir des cultures de 18 heures de chaque souche et inoculées dans les micro-tubes de la plaque API 20 E. Les plaques sont incubées pendant 24h à 37 °C. Les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Camille, 2007).

**Nous avons utilisé le milieu PCA pour conserver et garder une souche jeune lors de la préparation de suspension, de la galerie API 20 E *Bacillus* (identification via l'API 20 E).**



Figure13 : la galerie Api 20E préparée avant l'incubation

A decorative graphic of a scroll with a black outline and grey shading on the top and bottom edges, framing the text.

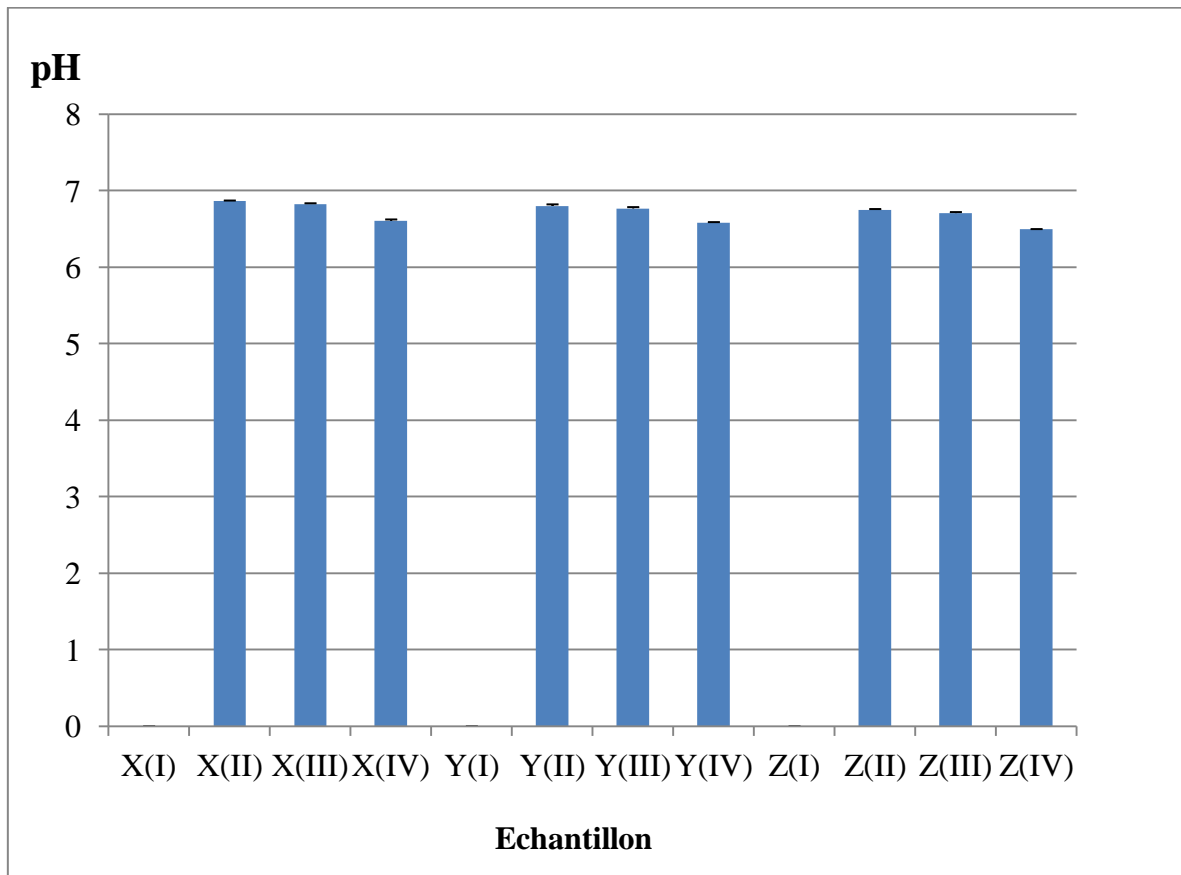
# **Résultats et Discussion**

# Résultats et Discussion

## I-Résultats

### I-1 -Les résultats du test physico-chimique du lait UHT

Au but de comparer le pH du lait de 3 marques aux différents lots nous avons obtenu les résultats dans la figure suivante :



**Figure14:** Les mesures du pH de trois marques de quatre lots

Cette figure représente le pH des lots à analysées de trois marques du lait UHT ; le pH de premier lot n'a pas été mesuré.

Le pH est légèrement acide allant 6.4 à 6.8, on remarque qu'il n'ya pas une grande différence de valeur de pH entre les trois marques

Les valeurs les plus faibles sont présentées dans le IV<sup>eme</sup> lot

### I-2-Principaux caractéristiques organoleptiques du lait UHT

Les tests de caractéristiques organoleptiques des 3 marques du lait UHT est sites dans le tableau suivant

## Résultats et Discussion

Ces tests n'ont pas été réalisés sur le premier (I) lot

**Tableau 9:** Résultat des caractéristiques organoleptiques du lait UHT

	Lot											
	Lot1			Lot2			Lot3			Lot4		
Marque	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z
<b>Couleur</b>	-	-	-	Blanc nacré	Blanc jaunâtre	Blanc nacré	Blanc nacré	Blanc	Blanc nacré	Blanc nacré	Blanc nacré	Blanc jaunâtre
<b>Gout</b>	-	-	-	Gout peu sucré	Gout sucré	Gout Caramélisé	Gout peu sucré	Gout sucré	Gout Caramélisé	Gout peu sucré	Gout sucré	Gout Caramélisé
<b>Texture</b>	-	-	-	Léger	Léger	Peu léger	léger	léger	Peu léger	Léger	Léger	Peu léger

### I-3-Analyse de la flore bactérienne

Nous avons utilisé l'équation suivante pour mesurer les résultats

$$N = \sum C / n \times d$$

$\Sigma C$ : La somme de colonies comptées dans toutes les boîtes retenues

$n$ : nombre de boîte

$d$ : la dilution

#### I-3-1-Dénombrement sur milieu PCA

Après 48h d'incubation nous avons observé des petites colonies lenticulaires avec une couleur blanchâtre

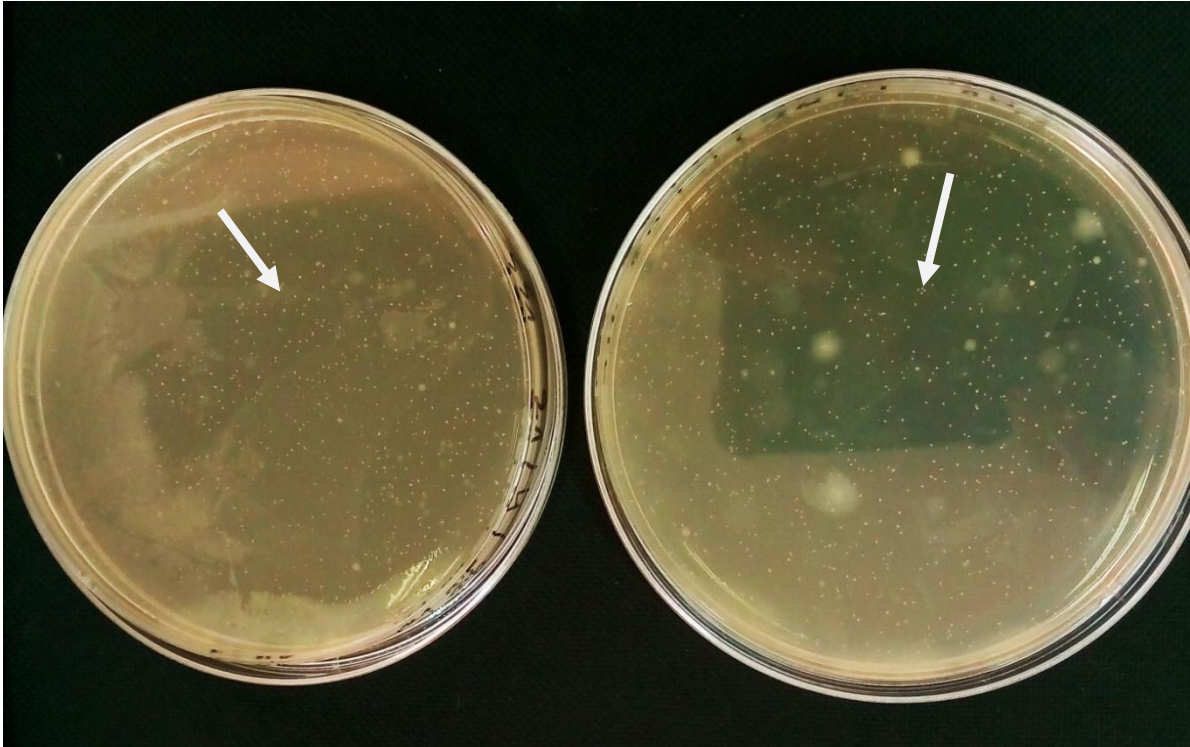


Figure 15 : Les colonies cultivées sur milieu PCA

Le dénombrement de ces colonies est résumé dans l’histogramme suivant :

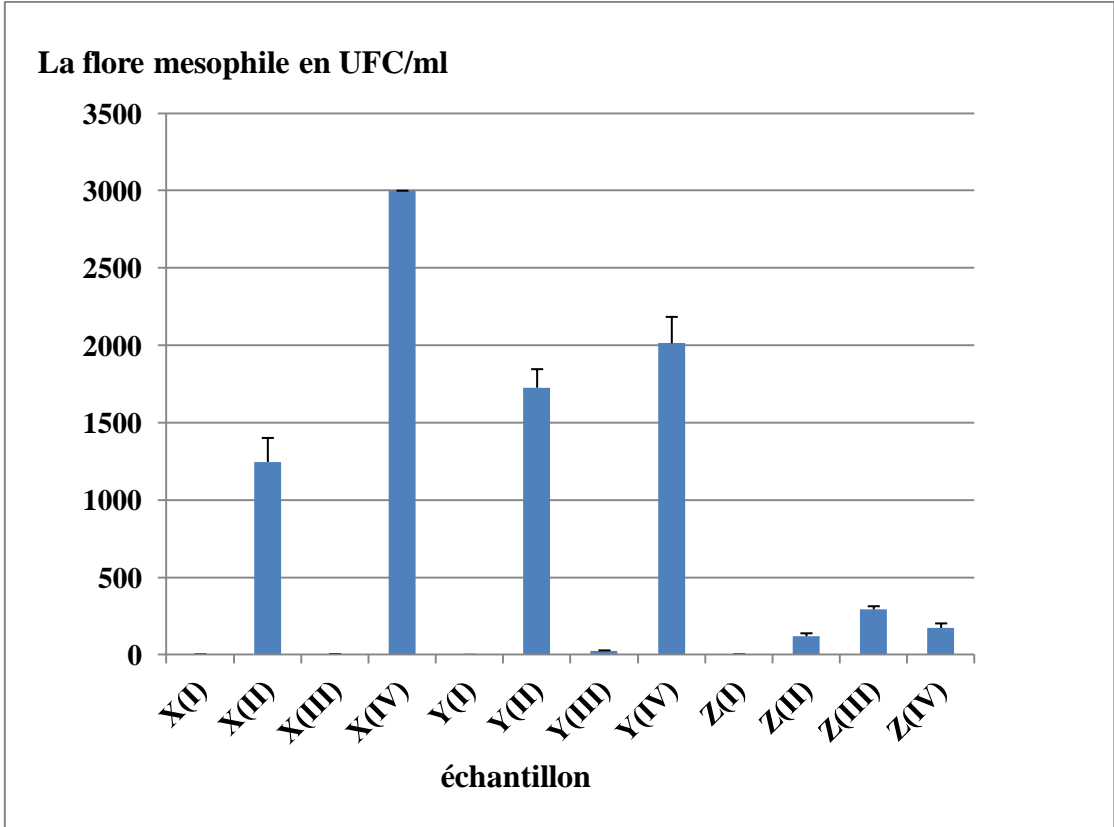


Figure 16: Dénombrement des colonies des quatre lots en UFC/ml

## Résultats et Discussion

---

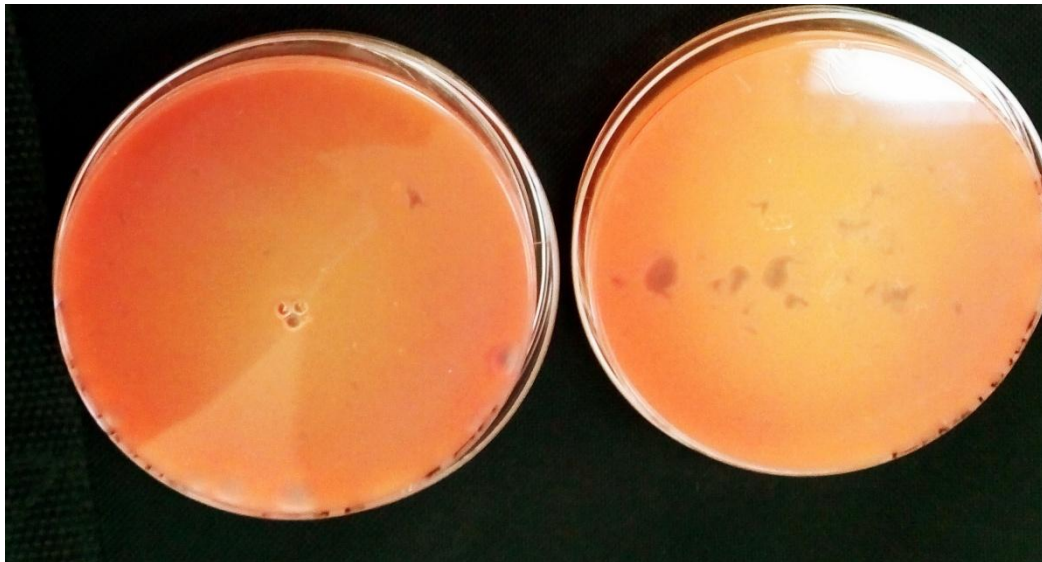
On remarque des moyennes différents dans les 4 lots des marques (X,Y,Z) ; les résultats sont variés entre 0 jusqu'à 3000 UFC/ml .

La flore mésophile la plus élevée c'est au niveau d'échantillon X(IV) par contre dans l'échantillon Y(I) la flore est presque nulle.

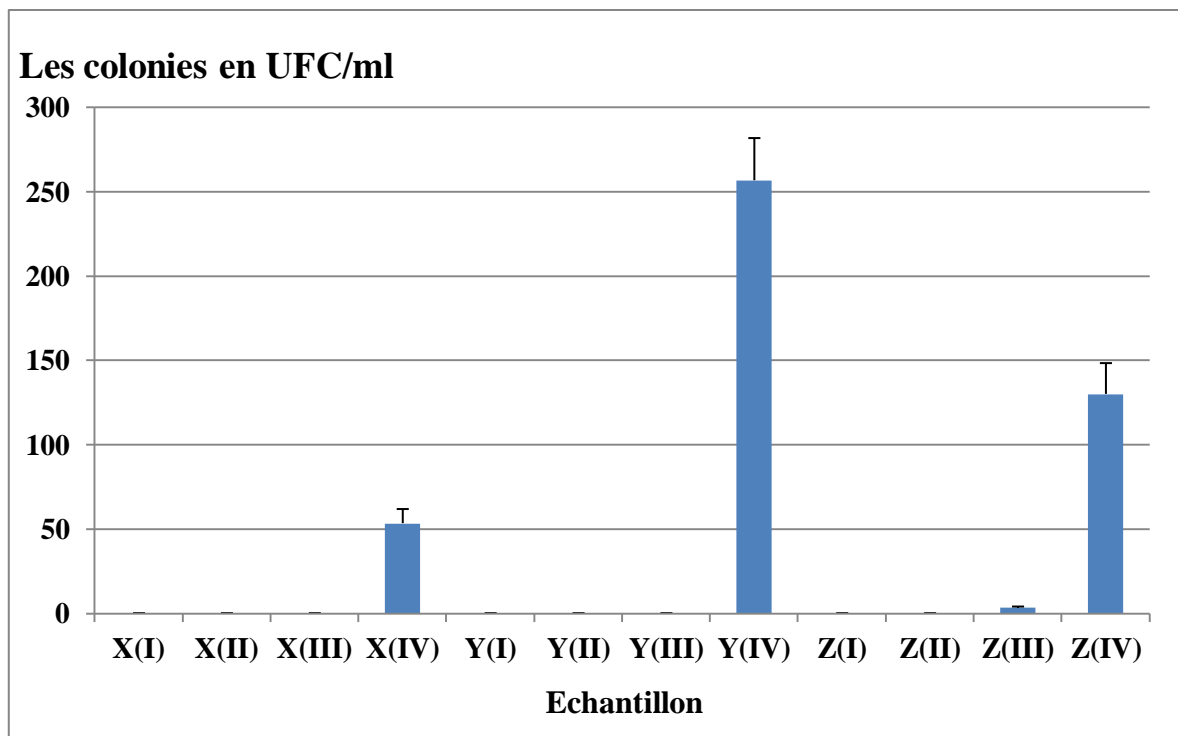
### I-3-2 Résultat sur milieu Mossel

Les résultats remarqués sur milieu Mossel après une incubation de 48h à 30°C :

- Un virage de couleur du milieu du rouge vers le jaune.
- Les colonies du couleur roses entouré avec un halo blanc .



**Figure 17 :** Les colonies cultivées sur milieu Mossel



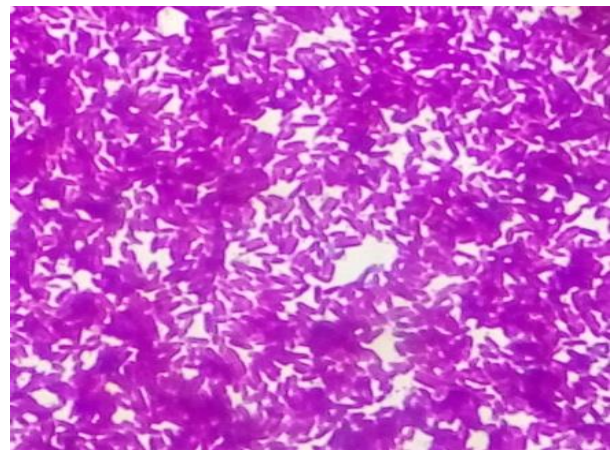
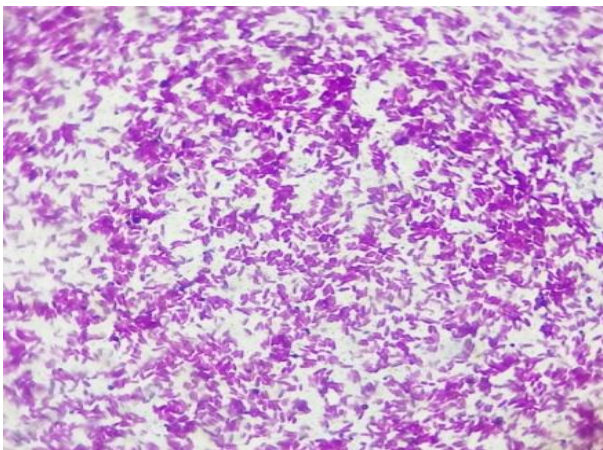
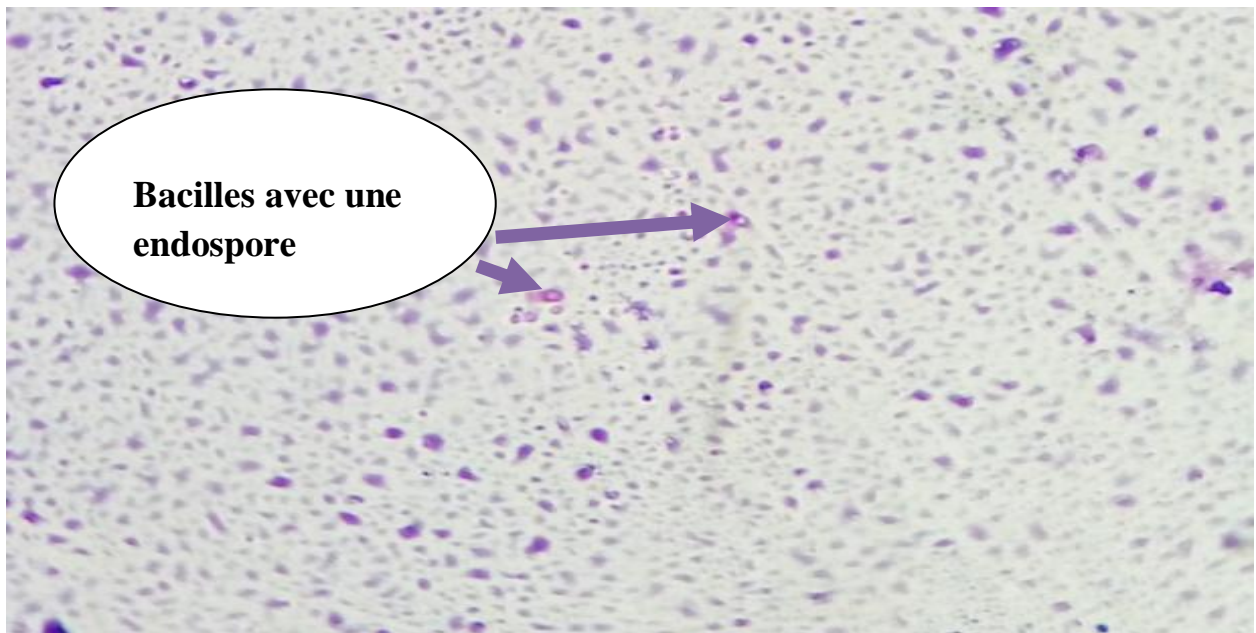
**Figure 18:** Dénombrement des colonies des quatre lots en UFC/ml sur milieu Mossel

Selon les résultats, nous avons remarques que le lot (IV) de différentes marques est le plus contaminé par rapport aux autres lots avec des valeurs allant 53 UFC/ml à 256 UFC/ml ; la valeur la plus faible dans la marque Z de lot (III) .

### I-4- Identification de la flore

#### I-4-1- Coloration de Gram et Observation microscopique

Après la coloration de Gram, nous avons passé à l'observation microscopique à grossissements (Gx100) avec l'huile à immersion. On observer des bacilles Gram positif en paire, en chainettes et en amas et des bacilles avec une endospore.



**Figure 19 :** Observation sous microscope optique des frottis (Gx100)

### **I-4-2 Testes biochimiques**

#### **I-4-2-1- Test Catalase**

On met en contact notre colonie pure sur une goutte de l'eau oxygéné on observe dégagement de gaz (Production d' $O_2$ ) provenant de la dégradation de  $H_2O_2$ .



**Figure 20:** Test Catalase

### I-4-2-2-Test Oxydase

La mise au contact des colonies bactériennes avec la pastille imprégnée de réactif ne donne aucune virage du couleur de la pastille



**Figure21 :** Test Oxydase

### I-4-3Galerie api 20 E

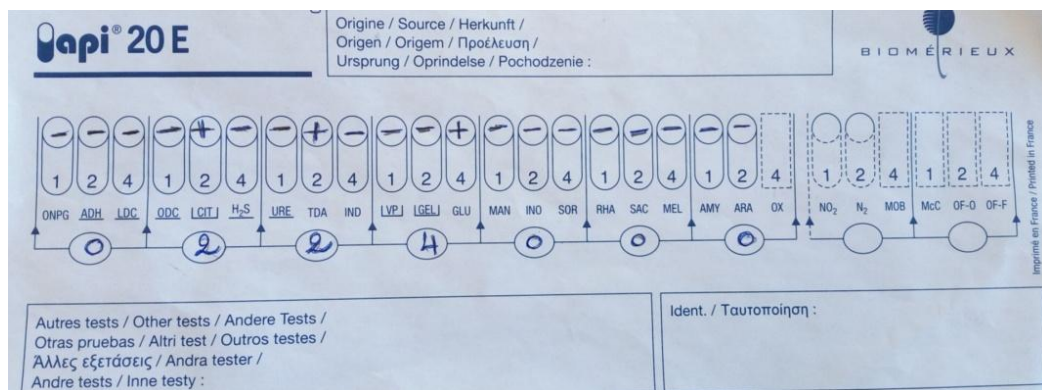
Après une incubation de 24h, nous avons ajoutés des réactifs (TDA réactif, JAMES, VP1 et VP2) dans leur microtubes approprié selon le protocole de la galerie

## Résultats et Discussion



**Figure 22:** Galerie api 20 E après l'incubation et l'ajout des réactifs

Nous avons remplies les cases dans le guide selon les changements du couleur dans les microtubes ; après l'insertion du code obtenu dans logiciel Apiweb.



**Figure 23:** Le guide de la Galerie api 20E

**Les souches identifiées sont :**

1/- *Brevibacillus choshinensis/ centrosporus/ brevis* avec 77.3% ( excellent identification ) et aussi *Brevibacillus sphaericus/ fusiformis / badius* de 18.2% ( mauvaise identification )

2/- *Brevibacillus choshinensis/ centrosporus/ brevis* avec 66% ( très bonne identification ) et aussi *Bacillus sphaericus / fusiformis / badius* de 26% ( bonne identification )

3/ - *Bacillus sphaericus// fusiformis/ badius* avec une probabilité de 56.5% ( très bonne identification ) et aussi *Brevibacillus choshinensis/ centrosporus / brevis* avec une probabilité de 42.8% ( bonne identification ).

4/- *Bacillus cereus* avec une probabilité de 54.2% (très bonne identification ) et aussi *Bacillus cereus* avec une probabilité de 37.5% ( bonne identification ).

# Résultats et Discussion

---

## II- Discussion

Les résultats des analyses physico-chimiques (pH) effectuées sur les trois marques du lait stérilisé UHT partiellement écrémé montrent que, le pH est au voisinage à la neutralité, ce qui permet une longue conservation du produit, en sauvegardant ces qualités organoleptiques et sa valeur nutritionnelle. Le pH nous renseigne beaucoup plus sur la stabilité du lait **(Mathieu, 1998)**.

Concernant les résultats organoleptiques, il existe une différence de goût entre les trois marques du lait UHT accompagné d'un goût légèrement caramélisé à un goût sucré, qui peuvent être expliqués par le traitement thermique.

Cette étude a permis l'isolement de 11 souches à partir de ce type de lait, en se basant sur leurs approches morphologique, microscopique et biochimique.

Les résultats qu'on a obtenus sur milieu PCA indiquent une charge de flore mésophile qui varie entre 0 jusqu'à 3000 UFC/ml. Selon **Guirod et Rosec, 2004**, la flore totale aérobie mésophile est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banaux de contamination capables de se multiplier en présence d'oxygène à une température de 25 à 40 C°.

En ce qui concerne la flore thermorésistante, les résultats du dénombrement obtenus varient entre 53 UFC/ml à 256 UFC/ml. Et le virage de couleur due à la dégradation de protéine trouvé dans le jaune d'œuf lécithine (lécithinase positif).

Des approches différentes mais complémentaires, des tests biochimiques ont été utilisées pour l'identification des souches. Ainsi, l'utilisation de la coloration de Gram combinée à une observation microscopique suivie par une identification phénotypique on montré que la plupart des isolats sont des bacilles à Gram positif, capable de former des spores avec un catalase positive et oxydase négative.

Ces caractéristiques représentent les traits typiques des espèces appartenant au genre *Bacillus* selon **(Bergey's manual of systematic biology)**.

Pour une identification phénotypique ont utilisé la galerie api 20 E *Bacillus* – identification via l'api 20E, les résultats de cette test montre que les isolats appartiennent au genre *Bacillus* de différents espèces :

## Résultats et Discussion

---

1/- *Brevibacillus choshinensis/ centrosporus/ brevis* avec 77.3% ( excellent identification ) et aussi *Brevibacillus sphaericus/ fusiformis / badius* de 18.2% ( mauvaise identification )

2/- *Brevibacillus choshinensis/ centrosporus/ brevis* avec 66% ( très bonne identification ) et aussi *Bacillus sphaericus / fusiformis / badius* de 26% ( bonne identification )

3/ - *Bacillus sphaericus// fusiformis/ badius* avec une probabilité de 56.5% ( très bonne identification ) et aussi *Brevibacillus choshinensis/ centrosporus / brevis* avec une probabilité de 42.8% ( bonne identification ).

4/- *Bacillus cereus* avec une probabilité de 54.2% (très bonne identification ) et aussi *Bacillus cereus* avec une probabilité de 37.5% ( bonne identification ).

Selon le journal officiel de la république Algérienne N° 35 Les limites microbiologiques de la présence des germes aerobies à 30°C est <100UFC/1ml ; alors que les germes aerobies dénombrés dans le milieu PCA sont supérieure à 300UFC/ml dans les marques analyses,

Dans le lait UHT (ultra haute température), les spores présentes sont activées par ce choc thermique (**Chen et al., 2003**).

Les spores de *Bacillus cereus* sont capables de résister à de fortes températures et donc aux principales méthodes de stérilisation de l'industrie agroalimentaire.

Malgré que Les bacilles thermophiles ne sont pas tellement pathogènes (cause des maladies dangereuses), mais elles peuvent être la cause d'altération du lait donc ce sont des indicateurs de l'hygiène du processus et des bonnes pratiques de fabrications (**Burgess et al., 2010**).

Si nous avons le droit d'accepter la présence de spores survivantes, non capables de proliférer dans le lait au cours d'une incubation par exemple, nous avons aussi le devoir d'en limiter le nombre, et cela sera d'autant plus facile que, dans la pratique courante, ce nombre est déjà précisément et naturellement, très limité (de l'ordre de 1 spore par ml ou même beaucoup moins) (**Franklin, 1958**).

Les bactériologistes français qui se sont penchés sur ce problème, ont estimé qu'une limite supérieure fixée à **5 spores revivifiables par ml de lait stérilisé**, était raisonnable et devait très largement couvrir tous les cas normaux, donc il n'y a aucun risque que ces

## Résultats et Discussion

---

quelques spores soient le résultat de la prolifération, au cours des incubations, de germes ayant résisté à la stérilisation (**Bottazzi, 1966**).

Le but de traitement de stérilisation du lait à une température 135à 150°C est de tués tous les micro-organismes pathogènes dans le lait et assurer sa stabilité et maintenir la santé du consommateur, mais la présence de micro-organismes nuisibles ou de leurs toxines reste possible. Or, elle est indésirable et aucune définition contrôlable ne saurait postuler leur absence.



# Conclusion

# Conclusion

---

## Conclusion

Le lait est un aliment complexe d'une grande richesse nutritionnelle ; Il apporte protéines, lipides, glucides, minéraux, vitamines, enzymes...

Il est indispensable à la survie de tous les mammifères, dont l'Homme. En effet, il est le seul aliment du nouveau-né.

Le lait de chaque mammifère est différent puisqu'adapté à l'alimentation de ses propres petits. Malgré cette évidence, l'Homme se nourrit du lait de différents mammifères : vache, chèvre, brebis, jument...

La date limite de consommation du lait est très courte car il s'altère facilement soit par des conditions externes, soit par la présence des micro-organismes ; donc pour augmenter sa durée de conservation le lait est traité thermiquement par la pasteurisation ou par la stérilisation

Dans les industries alimentaires, les biofilms sont une source de contamination qui impacte la qualité hygiénique et sanitaire des aliments transformés, avec des conséquences sur leur durée de vie et la santé du consommateur ,donc La filière lait reste l'une des filières les plus compliquées dans le volet agricole et comme source de matière première de grande nécessité. Elle touche en effet le secteur économique, l'agriculture, l'industrie, le commerce, la santé .

Dans le cadre de ce travail qui est au but de la rechercher du *Bacillus cereus* dans le lait UHT les résultats obtenus montrent qu'il y a une présence des espèces du genre *Bacillus* avec des différentes probabilités :

Qui sont des espèces indicatrices de formation de BIOFILMS dans les circuits de stérilisation du lait UHT.

On peut conclure que pour réussir la filière lait en Algérie , il faut mieux penser à un environnement favorable au développement de cette filière, dans le but d'améliorer les conditions économiques et sociales de tous les intervenants actifs dans cette sensible filière . Finalement, sensibiliser les différents partenaires dans l'industrie laitière pour former le personnel , et de respecter les conditions d'hygiènes strictes durant le procédés de fabrication du lait comme produit fini en lui assurant une qualité conforme , saine et loyale et mettre en place le système HACCP et de l'appliquer rigoureusement , car l'exigence de la qualité

## Conclusion

---

représente une donnée incontournable dans la biosécurité alimentaire et par conséquent un élément de base pour le développement de la filière lait en Algérie .

Il faut que l'état Algérienne utilise des sources du lait cru on encourageant les producteurs de notre pays pour assurer la satisfaction de secteur industrielle et aussi la population et ce libérer l'importation de lait en poudre qui est l'un des facteurs responsable de formation de Biofilms.



# **Références bibliographiques**

## Référence bibliographique

---

### A

**Adrian,J.(1987).**Valeur alimentaire du lait. La maison rustique.Paris

**Alais,C., et Linden,G .(1994).** Biochimie alimentaire 3 émé édition .Edition Masson .Paris.

**Alais,C., Linden,G .,Miclo,L. (2003)** 5émé édition .Edition Dunod . Paris.

**Alves de Oliveira L, (2007).**Composition chimique du lait, [en ligne], Cours de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

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

**Andelot,P . (1983).** Le contrôle laitier facteur d'amélioration technique .Rev lait. France.

**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. 28: 145–155.

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

### B

**Bauer,WJ.,Badoud,R .,Loliger,J.,Eturnaud,A .(2010).** science en technologie des aliments, pricipes de chemie des constituants et de technologie des procedes presses.Polytechniques et univairsitaires Romandes.Italie.

**Belhadia,M., Saadoud,M ., Yakhlef,H ., Bourdouze,A . (2009).** La production laitière bovine en Algérie : capacité de production et typologie des exploitations des plaines du moyen Cheliff. Revue Nature et technologie n°1.

**Belkacem-Benounnane,A .(1983).** Production et commercialisation du lait et produit laitier en Algérie. Institut d'étude de développement économique et social. Algérie.

## Référence bibliographique

---

- Bellon-fontaine,MN., Benezech,T.,Boutroux,K., Hermon,C.(2016).**Science et technique agroalimentaires, conception hygiénique de matériel et nettoyage, désinfection pour une meilleure sécurité en industrie agroalimentaire. Edition Tec et Doc Lavoisier .Paris.
- Benali,A.(2018).**L'ONIL les algériens consomment annuellement 55 litres de lait. Algérie eco . Algérie.
- Bencharif,A ., Chaulet,C .,Chehat,F .,Kaci,M., Sahli,Z. (1996).** La filière blé en Algérie . Edition Karthala.Paris.
- Beneden,F.(2012).** Lait entier UHT, ecremé, homogénéisé, pasteurisé...comment s'y retrouver .Federation romande des consommateurs le pouvoir d'agir.
- Bermer,PJ., Seal,B., Flint,S.,Palmer,J.(2009).**Biofilms in dairy processing *in* :Fratamico. Edition PM,AnnousBA,Gunther NW.IV.Biofilm in the food and beverage industrie Oxford,Cambredge,Newdelhi,Wooddead.
- Bottazzi,V. (1966).** Scienza Tee. latt. casear, p. 133
- Bouharmont ,J., Masson ,P,L.,VanHove,C. (2011)**Biologie 2<sup>ème</sup> édition. Rdition deboeck. Bruxelles.
- Bouvier,C.(1993).** Le lait , la nature et les hommes. Edition Explora, Presse Pocket.Paris
- Branger,A ., Roustel,S . (2007).** Alimentation , securité et controles microbiologiques . Edition Educagri. France .
- Branger,A.,Richer,MM., Roustel,S.(2007).**Microbiochimie et alimentation. Edition Educagri Paris .
- 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, p 396–431.

## Référence bibliographique

---

- Briandet,R.,Fechner,L.,Naitali,M.,Dreanno,C (2012)** .Biofilms quand les microbes s'organisent. Edition Quae. France.
- Brochu,E., Dumais,R., Julien,JP.(1984)**. Science et technologie du lait : principes et application.université Laval.
- 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.
- Brooks,JD., Filnt,SH.(2008)**. Biofilms in the food industry :problems and potential solutions. Internationl journal of food and science technology .vol43(12) :2163-2176.
- Brulé,G.(1987)**. Les mineraux.in Cepil(1987). Le lait matiere pemiere de l'industrie laitiere.Cepil-INRA. Paris
- Burgess,SA., Lindsay,D., et Steve,HF.(2010)**.Thermophilic bacilli and thier iportance in dairy processing.International journal of food microbiology 144.2 :215225

## C

- Camille, D. (2007)**. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : aliments, produits cosmétiques, eaux, produits .Tec et Doc Lavoisier .Paris .
- Candel,T., Gilois,N., Nielsen., Leroux,C ., Buisson,C., Aymerich,S., Lereclus,D., Gohar,M .(2008)**. Biofilms approches expérimentales et moléculaires, formation des biofilms chez *Basillus cereus* .réseau national biofilms .Dourdan.
- Carip,C. (2008)**. Microbiologie hygiène, bases microbiologiques de la diététique. Edition Tec et Doc Lavoisier, et EMINTER .Paris.
- Cayot,P., Lorient,D. (1998)**. Structures et tecno fonctions des proteines du lait.Edition Tec et Doc Lavoiseir .Paris

## Référence bibliographique

---

**Chalet,C .(1991).**Agriculture et nourriture dans les reformes algériennes : un espace pour les paysans. Revue Tier Monde.

**Chen,L.,Daniel,RM .,et Coolbear,T.(2003).**Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk pouders.International dairy journal 13.255-275

**Croguennec,T., Jeantet,R., Brulet,G.(2008).**Fondement physicochimiques de la technologie laitiere.Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.

### D

**Debry,G.(2001).** Lait nutrition et santé .Edition Tec et Doc Lavoiseir. Paris.

**Delarras,C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d’analyses ou de contrôle sanitaire .Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.

**Dewey,KJ.,Cohen ,RJ. ,Rollins,NC.(2004).** Feeding of non-breastfed children 6-24 monthes of age in developing contries,Food Nutr Bull.25 :377-35

**DGAL/PNNS.(2008).** La consommation de produits laitiers en France, contribution aux apports lipidiques .Edition ATLA .France.

**DilmiBouras,A . (2008).** Filière lait exemple de l’Algérie .FSASB,UHB.Chlef.

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

**Duquesel,R(1993).**Etude de la qualité bactériologique du lait et de fromages de chèvres en région centre chez des transformateurs fermiers ou industriels en 1989-1990.Med. Toulouse.

### E

**Erbs,Y. (2014).** Genocide alimentaire causes et solutions .Edition IPDC.France.

### F

**Faille C., Fontaine F., Bénézech T.( 2001).** Potential occurrence of adhering living

## Référence bibliographique

---

- Bacillus spores in milk product processing lines. J. Appl. Microbiol. 90:892-900.
- Faille C., Jullien C., Fontaine F., Bellon-Fontaine M.N., Slomianny C., Bénézech T. (2002).** Adhesion of Bacillus spores and Escherichia coli cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. Can. J. Microbiol. 48: 728-738. 81
- Federighi, M. (2005).** Bactériologie alimentaire, compendium d'hygiène des aliments 2<sup>ème</sup> édition. Edition Economica. Paris.
- Feinberg M, Favier JP. (1987).** ireland répertoire générale des aliments: table de composition des produits laitiers. Ed : Tec et doc. Lavoisier, Paris, P: 35
- Flint S., Palmer J., Bloemen K., Brooks J., Crawford R. (2001).** The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. J. Appl. Microbiol. 90:151–157.
- Franklin, JG. (1958).** - J. Appl. Bact., 21, p. 47
- Frenot, M., et Vierling, E. (1997).** Biochimie des aliments diététique du sujet bien portant. Edition doin, crdp . Strasbourg.
- G**
- Galentier, M., Bernard, B. (2005).** En pratique : connaissance et place du lait et des produits laitiers dans une alimentation équilibrée . Vol40 n°1. Paris.
- Gaursaud, J. (1985).** Composition et propriétés physicochimiques dans lait et produits laitiers vache, brebis, chevre. Tom1. Edition Tec et Doc. Paris.
- Giffel M. C., Wagendorp A., Herrewegh A., Driehuis F. (2002).** Bacterial spores in silage and raw milk. Antonie Van Leeuwenhoek .81:625–630. 286
- Gosta B. (1995).** Les composants du traitement du lait. Le lait en poudre : manuel de transformation du lait. Ed. Tetra Pack processing system AB. Sweden

## Référence bibliographique

---

**Goursaud,J ., Boudier,IF.(1985).**Composition et propriétés physicochimique, lait et produits laitiers. Tom I . Edition Lavoisier .Paris

**Gueguen,L.(1979).**Apports minéraux par le lait et less produits laitiers .Cah natur.Diet

**Guezennec, J. (2017).** Biodégradation des matériaux, quels risques pour la santé et l'environnement .Edition Quae. France.

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

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

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

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

## H

**Hall,CW ., Hedrick,TI.(1961).** The lanufacture of instant milk powder.Dairy. Eng

**Hauge ,S.(1955).**Food poisonning caused by aerobic spore-forming Bacilli .Journal of Applied bacteriology 18 591-595.

## I

**Institut National de Veille Sanitaire(INVS) .(2009).** Metabolisme et toxinogenese de

*Bacillus cereus* : roles de l'enzyme fermentaire LdhA et du regulateur redox Rex. These de doctoret . université d'Avignon et des pays de vaucluse,UMR A 408, sécurité et qualité des produits d'origine vegetale .INRA.Avignon.

## J

**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.

## Référence bibliographique

---

**Jeantet,R., Roignant ,M., et Brulé,G. (2000).**Génie des procédés appliqué a l'industrie laitier. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.

**Jouvej ,L ., Rohmen,PH .(1993).** La méthode HACCP. Contexte et principes d'utilisation- C.T-Infon°1.

### 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. 10:31–41.

**Khris,B. (2019) .** Significative baisse de la production de lait .Journal Liberté .Algérie.

**Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. (2000).** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes Infect. 2:189–198.

**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.

**Kuzdzal,S.(1987).** La matière grasse –le lait matière première de l'industrie laitiere.INRA

### L

**Lafite DuPond,A .(2011).**Les différents laits et leurs complexité, les protéines du lait de vache : aspect nutritionnel et allergie alimentaire. Thèse de Doctorat en pharmacie.Periegueux .France.

**Lambien,S .,German,A .(1961).**Precis de microbiologie . Edition Masson et Gie .Paris.

**Lambin,S., et German,A . (1969).** Precis de microbiologie .Tom I .Edition Masson et C<sup>ie</sup> .Saint Germain .Paris.

**Langoise,P.(2013).** Le lait. Edition Digitized. Lyon.

**Lankveld,JMG.(1995).**Protein standaridized milk products, composition and

## Référence bibliographique

---

properties.IDF.Brussels 70-85

**Larpent, J, P. (1997)** . Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire .Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.

**Larsen H. D., Jorgensen K.( 1999)**. Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. Int. J. Food Microbiol. 46:173–176.

**Lcointre,G.,Le Guyader,H.(2001)**.Classification phylogenetique du vivant 2<sup>ème</sup> édition. Edition Belin. Paris.

**Leclerc,H.(1969)**.Microbiologie. Edition Doin . paris.

**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. 24: 359– 379.

**Loncin,M.(1991)**.Genie industriel alimentaire, aspect fondamentaux .Edition Masson . Paris.

**Luquet,F,M.(1990)**.Laits et produits laitiers Vache, Brebis, chèvre-transformation et technologie. Edition Tec et Doc. Paris.

## M

**Madigan,M.,et Martinko,J.(2007)**.Brock biologie des microorganismes 11<sup>ème</sup> édition. Edition PeaRson education .France .

**Mahaut,M., Jeantet,R .,Brulé,G., et Schuck,P.(2000)**.les produits industriels laitiers. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.

**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.

## Référence bibliographique

---

**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.

**Marchand,SL., DeBlock,V., Janghe,A ., Coorevits,M., Heyndrickx,L .,Herman.**

(2012).Biofilm formation in milk production and processing environnments influence on milk quality and safty comprehensive .Revioux in food science and food safety11 :133-147.

**Mathieu. (1998) .** initiation à la physico-chimique du lait .Edition. Tec et Doc .Lavoisier. Paris.

**Mols,M., et Abee,T .(2011).***Bacillus cereus* responses to acid stress. Environmental micribiology 13 :2835-2843.

**Montreuil,J.(1971).**La maternisation des laits .Etat actuel de la question. Ann.Nutr Alim.25,A1-A73

## N

**Nicklin,J ., Graeme-Cook,K., Pget ,T ., Killington ,R . (2000).** Microbiologie .Edition Berti. Paris.

**Normand,B .,Pébere,N .,Richard,C .,Wary,M .(2004).**Prevention et lutte contre la corrosion, une approche scientifique et technique .Edition YTBM,UTC,CRS,CEFRACOR .Italie.

## O

**Oulad Ali,O .(1995).**Evaluation de la qualité physicochimique et microbiologique du lait

## Référence bibliographique

---

pasteurisé partiellement écrémé fabriqué par l'OROLAIT. Unité « elemir ».Tizi-Mascara.Istitut des sciences agronomiques. Centre universitaire de Mascara .

### P

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

**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.* 65: 105–111

**Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C.( 2002).** Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* 77: 11–18.

**Plommet,M .(1987).** La traite et les infections de la mamelle, un nature alim20.

**Prescotte,L., Harley,J ., Klein,DA.(2003).** Microbiologie 2émé édition française . Edition De boeck .Paris.

### R

**Romain ,J ., Mechel ,R ., Brulé,G.(2001).**Genie des procedes appliqué à l'industrie laitiere. Edition Tec et Doc, Paris.

**Roux,A .,Ghigo,JM. (2006).** Les biofilms bacteriens. Edition Bull,Acad,Vet.France.

**Ryu J. H., Beuchat L. R.( 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.* 68: 2614–2622.

### S

**Salustiano V.C., N.J. Andrade, J.I. Ribeiro Junior, P.E. Fernandes; J.P. Lopes P.C.**

## Référence bibliographique

---

- Bernardes J.G. Portugal. (2010).** Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedures used in dairy plants. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62 (6).
- Sharma M., Anand S. K.( 2002).** Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy industry – a case. *Food Control.* 13: 469–477.
- Simões M., Simões L.C., Vieira M.J.(2010).** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* 43:573–583.
- Singleton,P.(1999).***Bactériologie 4<sup>ème</sup> édition .Edition Dunod .Paris .*
- SolustianoVC.,Andrade,NJ.,RibeiroJunior,JL.,Fernandes,PE.,Lopes,JP., Bernard,PC., Portugal,JG.(2010).**Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedure used in dairy plants .*Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.*62(6).

## 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.* 110: 254–262.
- Tortora,GJ., Fanke,BR.,Case,C.,Martin,L .(2003).**introduction a la microbiologie . Edition EPI .Canada.

## V

- Veisseyre,R.( 1979).**Technologie du lait :constitution,recolte,traitement,et transformation du lait..Edition Maison Rustique,Flammarion .Paris
- Veisseyre,R.(1975).**Technologie du lait :constitution, récolte, traitement et transformation.

## Référence bibliographique

---

Edition La maison Rustique. Paris.

**Vignola,C,L.(2002).**science et technologie du lait ,transformation du lait. Edition Presses internationales Polytechnique. Canada.

**Vilain,AC.(2010).** Qu'est ce que le lait . Edition Elsevier Masson SAS. France.

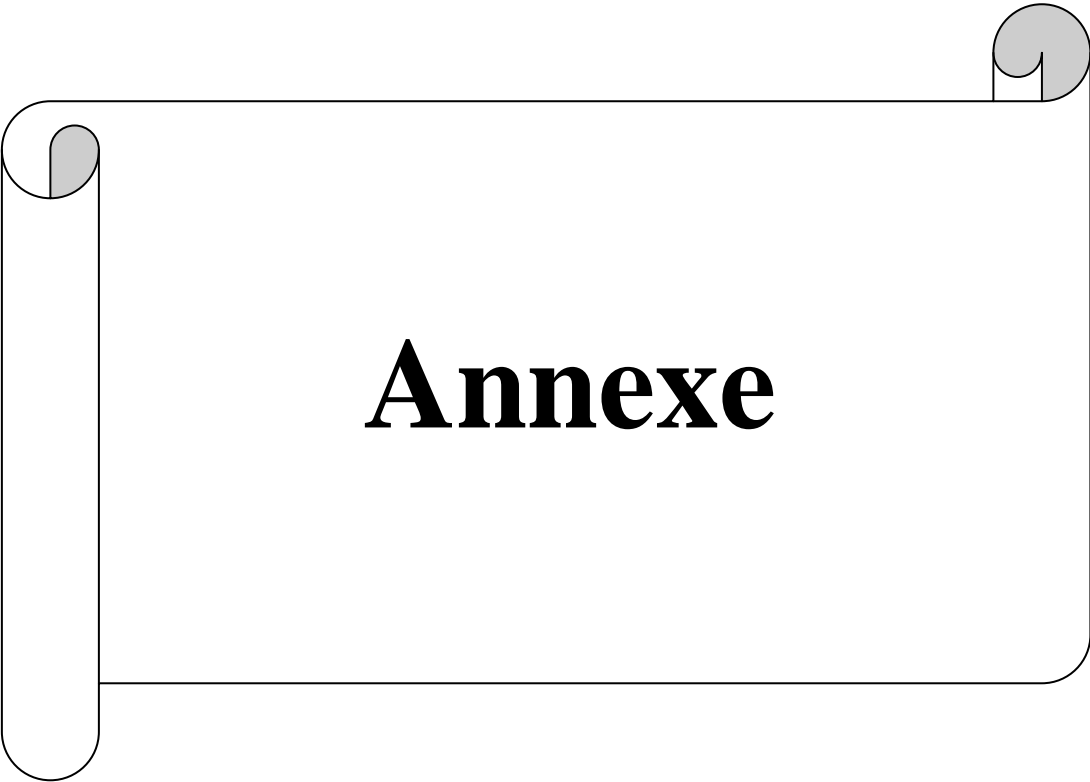
### W

**Whitney,R., Brunner,J., Ebner,K .(1976).** Nomenclature of the proteins of cow's milk : fowth revision.J.dairy Sci

**Wiencek K. M., Klapes N. A., Foegeding P. M. (1990).** Hydrophobicity of Bacillus and Clostridium Spores. Appl. Environ. Microbiol. P: 2600-2605.

### Y

**Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H.(2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. Can. J. Veterinary. Res. 78:110116.



**Annexe**

## Annexe

### I- Milieu PCA

23.5g de poudre de plat count agar un litre d'eau distillée

### II-Milieu Mossel

Dans un litre d'eau distillée ajouter :

Extrait de viande	1g
Peptone	10g
Mannitol	10g
Chlorure de sodium	10g
Rouge de phénol	25mg
Agar	15 g

pH 7.2 autoclaver 15 minutes à 120 °c , dans une température de 45 °c ajouter 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 B à 0.1 % .répartir en boîtes de pétri (**Guiraud ,2003**)

### III- Les colorants utilisés :

Violet de gentiane phénique

Lugol

Fuschine