

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

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

Recherche des indicateurs de Biofilms dans le lait pasteurisé commercialisé dans la région de Laghouat

Présenté par :

BENBRIKA Fatima Zohra, BAROUD Souhila

Devant le jury composé de :

Président : Mr. CHAIBI Rachid. Maitre de conférences A. U.A.T.L.

Examineur : Mr. BENACEUR Farouk .Maitre de conférence B. U.A.T.L.

Rapporteur : Mr. CHETATHA Mohamed. Maitre assistant A. U.A.T.L.

Soutenu publiquement le : 02/06/ 2019

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

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

Recherche des indicateurs de Biofilms dans le lait pasteurisé commercialisé dans la région de Laghouat

Présenté par :

BENBRIKA Fatima Zohra, BAROUD Souhila

Devant le jury composé de :

Président: Mr. CHAIBI Rachid. Maitre de conférences A. U.A.T.L

Examineur: Mr. BENACEUR Farouk .Maitre de conférences B. U.A.T.L

Rapporteur : Mr. CHETATHA Mohamed. Maitre assistant A. U.A.T.L

Soutenu publiquement le : 02/06/2019.

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à

A mes très chers parents,

Il me tient énormément à cur de vous dire MERCI .Merci pour votre amour et votre soutien sans faille depuis toujours, si j'en suis arrivée là aujourd'hui c'est grâce a vous.

A mon cher frère Nasreddine et mes chères sœurs Djamila et Amani,

Pour leurs appuis, leurs encouragements permanents, et leurs soutiens moraux.

A ma chère binôme BAROUD Souhila,

Pour sa entent et sa sympathie

A toute ma famille et toutes mes amies

A toute la promotion « Microbiologie appliquée 2018-2019 »

En particulier DAAMACHE Ikhlasse.

BENBRIKA Fatima Zohra.

Je dédie ce modeste travail à....

Mes chers parents : vous présentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi .vos prières et vos bénédictions m'ont été un grand secours pour mener les biens de mes études.

Mes grands parents qui ont accompagné mon cursus par leurs prières.

Mes chers sœurs Imane,Ikhllass ,Isra et **Mes chers frères** Nadir et Diah el dine qui mon encouragé et m'ont donnés la force d'aller jusqu'au bout, qu'Allah les protègent .

Ma chère binôme BENBRIKA Fatima Zohra pour m'avoir écouté délirer pendant des heures sur mes travaux.

Toute ma famille et mes amies Sirine,Hiba,Fatima et Iklasse .

Toute la promotion de microbiologie appliquée 2018-2019.

Avec tout ma reconnaissance.

BAROUD Souhila..

A decorative border of blue floral motifs surrounds the page. The motifs are arranged in a repeating pattern along the top, bottom, and sides, creating a frame for the text.

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH le tout puissant qui nous a donné le courage, la volante et la patience pour faire ce travail.

Nous tenons tout d'abord à remercier Mr CHETATHA Mohamed maitre assistant A à l'université de Laghouat, notre Encadreur, pour son aide, ses conseils, son encouragement et sa Disponibilité dans ce projet. Et nous le remercions vivement pour sa gentillesse.

A notre Jury de Mémoire, qu'il ne soit ainsi permis de vous remercier très Sincèrement pour avoir Spontanément accepté de Juger ce Travail et d'en être la rapporteur et tenons à vous assurer de notre considération la plus respectueuse.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre Gratitude et nos remerciements pour toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à tous nos enseignants de département de Biologie de l'Université d'Amar TELIDJI – Laghouat.

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Sommaire	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction	
Historique	

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralité sur le lait

I - Définition du lait	01
II - Composition chimique du lait	01
II - 1 Eau	02
II - 2 Matière grasses	03
II - 3 Protéines	03
II - 4 Lactose	03
II - 5 Minéraux	03
II - 6 Vitamines	04
II - 7 Enzymes	05
III - Caractères physico –chimiques du lait	05
III - 1 La masse volumique	06

III - 2 Densité.....	06
III - 3 Point de congélation.....	06
III - 4 Point d'ébullition.....	06
III - 5 Le potentiel d'hydrogène.....	06
III - 6 L'acidité du lait.....	06
IV - Qualité organoleptique du lait.....	07
IV - 1 La couleur.....	07
IV - 2 L'odeur.....	07
IV - 3 La viscosité.....	07
IV - 4 La saveur.....	08
V - Flore microbienne du lait.....	08
V - 1 La flore originelle.....	08
V - 2 La flore de contamination.....	08
VI - Production industriels du lait.....	09
VI - 1 Lait cru.....	09
VI - 2 Lait traites par la chaleur.....	09
VI - 3 Lait concentres.....	09
VI - 4 Lait en poudre.....	10
VI - 5 Lait reconstitué.....	10
VI - 6 Lait recombinant.....	10

VII - Industriels laitiers.....	10
VIII – Pasteurisation.....	10
VIII - 1 Objectifs et définition.....	10
VIII - 2 Les différents types de traitement du pasteurisation.....	11
VIII - 3 Procédés de pasteurisation.....	11

Chapitre II : Biofilms

I – Définition.....	12
II - Les étapes de formation du biofilms.....	12
III - Différents types du biofilms.....	14
IV - Biofilms dans l’industrie agro-alimentaire.....	14
IV - 1 Biofilms en l’industrie laitière.....	15
IV - 1 - 1 Les germes en causes.....	15
IV -1 -1 -1Généralité sur les Bacillus.....	16
IV- 1 - 1 -1 -1 Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	18
IV- 1 - 1 -1 - 2 Les intoxication alimentaires dues à <i>Bacillus cereus</i>	18
IV - 1 - 1 - 1 – 3 Biofilms de <i>Bacillus cereus</i>	18

Partie expérimentale

I : Matériels et méthodes

I – Echantillonnage.....	20
II – Prélèvements.....	20

III - Analyse physique	21
III -1 Détermination du pH	21
IV - Analyse microbiologiques	21
IV - 1 Préparation des dilutions décimales	21
IV - 2 Ensemencement et dénombrement	23
IV - 2 - 1 Dénombrement de la flore aérobie mésophile total	23
IV - 2 - 2 Dénombrement des Coliformes thermo tolérant	23
IV - 2 - 3 Dénombrement des Coliformes totaux	23
IV - 2 - 4 Dénombrement sur milieu MOSSEL	24
V - Analyses biochimiques	24
V - 1 Test catalase	24
V - 2 Test oxydase	24
V - 3 Galerie API 20 E Bacillus –identification via l’API 20 E	24
VI - Coloration de Gram	25
 II : Résultats	
I - Résultat physique	26
II - Résultats microbiologique	26
III - Isolement des bactéries	29
IV - Identification phénotypique des souches	29

Discussion	33
Conclusion	34
Références bibliographique	35
Annexes	

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Composition moyenne du lait selon les espèces (g/l)	02
Tableau 2 : Composition lipidique du lait	03
Tableau 3 : Teneur moyenne des principales vitamines du lait cru	05
Tableau 4 : Acidité naturelle du lait ; apport des différents constituants	07
Tableau 5 : Flore originelle du lait cru	08
Tableau 6 : Taxons de la famille des Bacillaceae appartenant au genre Bacillus	17
Tableau 7 : Caractéristiques de lait X (ouest).....	20
Tableau 8 : Caractéristiques de lait Y (centre du sud)	20
Tableau 9 : Caractéristiques de lait Z (Est)	21
Tableau 10 : Résumé les origines des souches isolées	29
Tableau 11 : Les résultats des testes biochimiques des souches	31
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des biotypes	32

Liste des figures :

Figure 1: Composition minérale du lait de vache (g/l)	04
Figure 2 : Diagramme de fabrication du lait pasteurisé.....	11
Figure3 : Composition du biofilms.....,	12
Figure 4 : Etapes de formation et de la dispersion d'un biofilms bactérien	13
Figure 5 : Micrographes électroniques à balayage des exemples de biofilms	14
Figure 6 : Micrographe d'un biofilms de 6 jours forme par <i>Bacillus cereus</i> sur une surface en inox.....	15
Figure 7 : Biofilms déjà structure par les cellules végétatives de <i>B.cereus</i> sur une surface en acier inoxydables	19
Figure 8 : Technique de préparation des dilutions successives et d'ensemencement....	22
Figure 9 : Photo de la galerie API 20 E des trois souches avant l'incubation	25
Figure 10 : La techniques de coloration de Gram	25
Figure 11 : pH des échantillons du lait	26
Figure 12 : FAMT des échantillons du lait	27
Figure 13 : Coliformes totaux des échantillons du lait	27
Figure 14 : Coliformes fécaux des échantillons du lait	28
Figure 15 : Contamination des échantillons par <i>Bacillus</i>	28
Figure 16 : Aspect des colonies sur le GN	29
Figure 17 : Photo prise au microscope optique (G X100).....	30
Figure 18 : Une souche bactérienne de la catalase positive	30

Figure 19 : Une souche bactérienne d'une oxydase négative	30
Figure 20 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 1.....	31
Figure 21 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 2.....	31

Liste des abréviations

% : Pour Cent.

°C : Degré Celsius.

µg : microgramme.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

an : Année.

API 20 E : Analytical Profil Index.

C : Cytosine.

EPS : Extra cellular Polymeric Substance.

FAO : Food and Agriculture Organization.

FIL : Fédération International Laitière.

FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale.

g : Gramme.

G : Guanine.

GN : Gélose Nutritive.

h : Heure.

HTST : High Temperature Short Time.

ISO : International Organization for Standardization.

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne.

Kg : kilogramme.

l : Litre.

m : Mètre.

MG : Matière Grasse.

mg : Milligramme.

MGLA : Matière Grasse Laitière Anhydre.

min : Minute.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

N° : Numéro.

NF : Norme Française.

OX : Oxydase.

PCA : Plat Count Agar.

pH : potentiel d'hydrogène.

TSE : Tryptone Sel. Eau.

UFC : Unité Formant Colonie.

UHT : Ultra Haut Température.

V : Volume.

VRBL : Violet Red Bile Lactose.

α : Alpha.

β : Béta.

ρ : la masse volumique.

ملخص :

الحليب المبستر المصنوع من الحليب النقي أو الحليب المعاد تصنيعه هو الحليب المعالج حرارياً الذي يدمر أكثر من 90% من البكتيريا الضارة في الحليب و من المعروف إن بكتيريا Sporiform التابعة لمجموعة *Bacillus cereus* تسبب مشاكل تدهور الغذاء و / أو الصحة بسبب قدرتها على تكوين biofilms و مقاومة البسترة في صناعة الألبان. أجريت هذه الدراسة للبحث عن *Bacillus cereus* في الحليب المبستر الذي يتم تسويقه في السوق المحلية، و تم اخذ ثلاثة أنواع من العينات للتحليل. بشكل عام، لم يتم تلوث سوى عينتين (X و Y) مع *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* et *Bacillus lichinoformis*).

الكلمات المفتاحية: صناعة الألبان – الحليب المبستر- biofilms - *Bacillus cereus*.

Résume :

Le lait pasteurisé fabriqué à partir de lait cru ou de lait reconstitué , est un lait qui à subi un traitement thermique qui détruit plus de 90 % de la flore contenu dans le lait Les bactéries sporiformes appartenant au groupe *Bacillus cereus* sont reconnues pour causer des problèmes de détérioration des aliments et/ou des problèmes sanitaires en raison de leur capacité à former des biofilms et à résister à la pasteurisation pratiquée dans les industries laitière . Cette étude à été réalisée dans le but de rechercher et dénombrer les *Bacillus cereus* dans le lait pasteurisé commercialisé dans le marché local, trois types d'échantillons ont été prélevées pour les analyses . Dans l'ensemble seuls deux échantillons (X et Y) sont contaminé par les *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* et *Bacillus lichinoformis*).

Mots clé : Industrie laitière - Lait pasteurisé – biofilms – *Bacillus cereus*.

Abstract :

Pasteurized milk made from raw milk or reconstituted milk is heat-treated milk that destroys more than 90% of the flora in the milk Sporiform bacteria belonging to the *Bacillus cereus* group are known to cause problèms détérioration of food and / or health problems due to their ability to form bifilms and resist pasteurization in the dairy industry. This study was conducted to search and count *Bacillus cereus* in pasteurized milk marketed in the local market, three types of samples were taken for analysis. Overall only two samples (X and Y) are contaminated with *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* and *Bacillus lichinoformis*).

Keywords : Dairy industry - Pasteurized milk - biofilms - *Bacillus cereus*.

Introduction

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec une consommation moyenne est passé de 41L /habitant par an à 110L/ habitant par an durant la période 1963-2010 **(FAO., 2007)**.

Le lait est un substrat très riche fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment presque complet protides, glucides, lipides, sels minéraux et vitamines sont présents à des concentrations tout à fait satisfaisantes pour la croissance et la multiplication cellulaire **(Bourgois et Larpent ., 1996)**.

Les microorganismes du lait sont répartis selon leur importance, en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore contaminant, cette dernière est subdivisée en deux sous classes : la flore d'altération et la flore pathogène **(Vignola., 2002)**.

Un problème majeur en termes de qualité, de technologie et potentiellement de santé public. Les biofilms peuvent se former sur différents types de surface et particulièrement sur l'acier inoxydable qui composent la majorité des équipements de transformation laitière.

L'objectif de notre travail est de dénombrer et rechercher des *Bacillus cereus* dans le lait pasteurisé commercialisé dans le marché local.

Existe – il des indices de biofilms dans les différents prélèvements du lait pasteurisé ?

Ce mémoire s'articule en deux parties. la première consiste en une synthèse bibliographique dans laquelle des informations sur lait, la pasteurisation et biofilms en l'industrie laitière.

La deuxième partie est consacrée à la méthodologie adoptée pour réaliser la partie expérimentale, Les résultats, discussions, et conclusion.

Depuis Antone Van Leeuwenhok , l'inventeur des premiers microscopes ,qui observa dès le XVIIe siècle des « animalcules »à la surface de ses dents (**Birandet et al .2012**). En 1933, Arthur Henrici était décrit une procédure pour étudier la répartition des bactéries dans les habitats d'eau douce, consistant à immerger pendant un certain temps des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement (**Henrici. ,1936**). Le terme de biofilms à été utilisé pour la première fois en 1943 par Claude Zobell (**Branger et al :2007**) qui montre que dans un récipient rempli de liquide , les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celle en suspension (**Roux et Ghigo,2006**).Enfin ,dans les années 1980 le microbiologiste William Costerton propose le terme de biofilms,pour désigner les communautés microbiennes se développant sur les surfaces (**Briandit et al. , 2012**).

Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Généralité sur le lait

I - Définition du lait :

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes : « le lait est 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 » (**Larpent., 1997**).

Selon le journal officiel de la République Démocratique Algérienne, la dénomination « Lait » est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale, obtenu par une ou plusieurs traites mammaires normale, sans aucune addition ni soustraction et n'ayant pas été soumis à un traitement (**Arrêté de 18/08/1993, décret du 27/10/1993**).

D'après le codex alimentarius le lait est la sécrétion mammaire normal d'animaux de traite obtenu à partir d'une ou de plusieurs traites , sans rien y ajouter ou en soustraire , destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur (**CODEX STAN 206-1999**).

II - Composition chimique du lait :

Le lait est un aliment complet qui garantie un apport non négligeable en protéines, lipides, sels minéraux notamment, en calcium, phosphore et en vitamines (**Watier., 1992**). La composition des laits varient selon les espèces. Le tableau 1 présent la composition moyenne du lait selon les espèces.

Tableau 1: Composition moyenne du lait selon les espèces (g/l) (Vilain ., 2010).

	Eau	lipides	Protéines			Glucides (lactose)	Matières minérales
			Totales	Caséine	Albumine		
Lait maternel	905	35	12-14	10-12	4-6	65-70	3
Vache	900	35-40	30-35	27-30	3-4	45-50	8-10
Chèvre	900	40-45	35-40	30-35	6-8	40-45	8-10
Brebis	860	70-75	55-60	45-50	8-10	45-50	10-12
Jument	925	10-15	20-22	10-12	7-10	60-65	3-5
Bufflonne	850	70-75	45-50	35-40	8-10	45-50	8-10
Anesse	925	10-15	20-22	10-12	9-10	60-65	4-5
Renne	675	160-200	100-105	80-85	18-20	25-50	15-20

II - 1- Eau :

l'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion (Vignola., 2002) Elle contient en solution du lactose des sels minéraux et des vitamines hydrosolubles, on y trouve également en suspension des lipides, de la caséine ainsi que certains sels minéraux tel que le phosphate de calcium et le phosphate de magnésium (Charles , 1991).

II - 2 - Matière grasses :

La matière grasse (MG) est présente dans le lait sous forme de globules gras de diamètre de 0.1 à 10.10⁻⁶ m (Jeantet et al ., 2008) ,elle est composé principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β-carotène (Vignola. ,2002).

Tableau 2 : Composition lipidique du lait (Vignola., 2002).

Constituants	Proportions de lipides du lait (%)
Triglycérides	98
Phospholipides	1
Fraction insaponifiable	1

II - 3 - Protéines :

Tous les laits de mammifères ont la même composition protéique de base : Les caséines représentent 82 % des protéines du lait de vache ; les 18 % restants sont constitués par la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, la sérumalbumine et par un grand nombre de protéines diverses (enzymes, immunoglobulines, lactoferrine bovine. . .) (Vilain ., 2010).

II - 4 - Lactose :

Le lactose est le glucide, ou l'hydrate de carbone, le plus important du lait puisqu'il constitue environ 40% des solides totaux, d'autres glucides peuvent être présents en faible quantité, comme le glucose et le galactose qui proviendraient de l'hydrolyse du lactose (Vignola ., 2002).

II - 5 - Minéraux :

Les minéraux, entièrement apportés par notre alimentation ont un rôle structural et fonctionnel .ils sont souvent impliqués dans des mécanismes physiologiques (régulation nerveuse ou enzymatique, contraction musculaire, etc.)(Jeantet et al . ,2008).

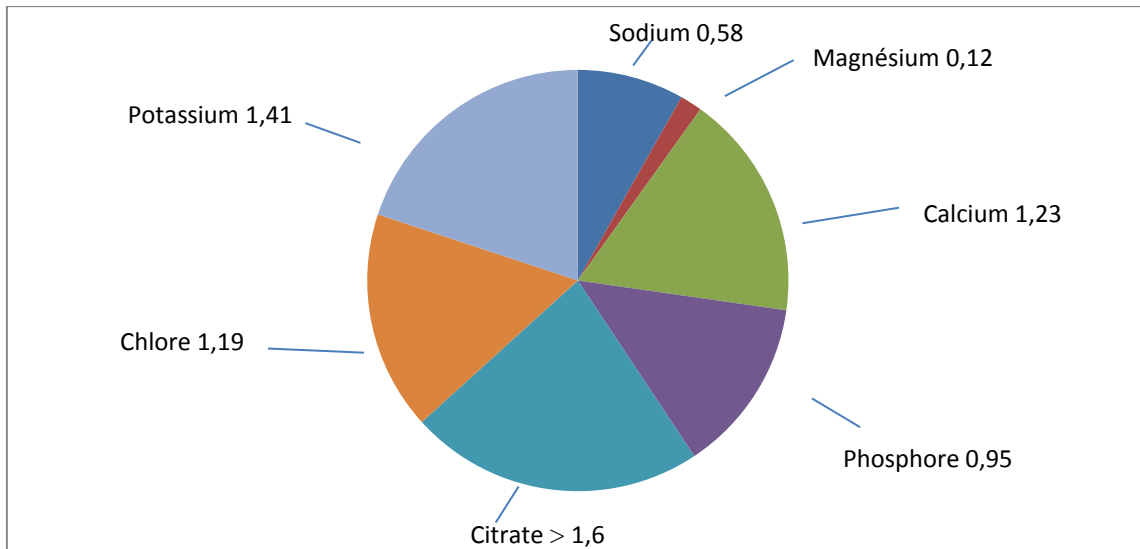


Figure 1 : Composition minérale du lait de vache (g/l) (Jeantet et al . ,2008).

II - 6 - 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 (Vignola, 2002). On distingue d'une part les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) en quantité constantes, et d'autre part les vitamines liposolubles (A, D, E et K) en quantité variables dépendant de facteurs exogènes (race, alimentation, radiation solaires, etc.)(Jeantet et al . , 2008). Le tableau 3 présente les principales vitamines du lait et leur teneur moyenne.

Tableau 3 : Teneur moyenne des principales vitamines du lait cru (Vignola., 2002).

Vitamines	Teneur moyenne
Vitamines liposolubles :	
Vitamine A (+ carotènes)	40 µg/100ml
Vitamine D	2.4 µg/100ml
Vitamine E	100 µg/100ml
Vitamine K	5 µg/100ml
Vitamines hydrosolubles :	
Vitamine C (acide ascorbique)	2 mg/100ml
Vitamine B1 (thiamine)	45 µg/100ml
Vitamine B2 (riboflavine)	175 µg/100ml
Vitamine B6 (pyridoxine)	50 µg/100ml
Vitamine B12 (cyanocobalamine)	0.45 µg/100ml
Niacine et niacinamide	90 µg/100ml
Acide pantothénique	350 µg/100ml
Acide folique	5.5 µg/100ml
Vitamine H (biotine)	3.5 µg/100ml

II - 7 - Enzymes :

Dans le lait, selon certaines auteurs, on dénombre près de 60 activités enzymatique, beaucoup de ces enzymes n'y sont qu'à l'état de traces (Multon ., 1991). D'après Vignola (2002) le lait contient principalement trois groupes d'enzymes : les hydrolases, les déshydrogénases (ou oxydases) et les oxygénases.

III - Caractères physico-chimiques du lait :

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. (Vignola, 2002) .

III - 1 - La masse volumique :

La masse volumique du lait est le rapport de sa masse sur son volume $\rho = m / v$. Elle est d'environ 1030 kg.m^{-3} à 20°C (Croguennec et al ., 2008).

III - 2 - Densité :

D'après Vignola (2002), la densité du lait de vache à 15°C varie de 1.028 à 1.035 pour une moyenne de 1.032. chacun des constituantes agit sur la densité du lait.

III - 3 - Point de congélation :

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau puisque la présence des solides solubilisés abaisse le point de congélation (Vignola ., 2002), le point de congélation du lait varie entre $-0,52$ et $-0,56^\circ\text{C}$ (pour une moyenne de $-0,54^\circ\text{C}$). Toute variation supérieure à $-0,52^\circ\text{C}$ indique une addition d'eau au lait (Riel .,1985).

III - 4 -Point d'ébullition :

Selon Riel (1985), le point d'ébullition de l'eau est de 100°C et celui du lait de $100,5^\circ\text{C}$. Cette propriété physique diminue avec la pression (Vignola ., 2002).

III - 5 - Le potentiel d'hydrogène (pH) :

Le pH du lait frais à 20°C varie entre 6,6 et 6,8. Plutôt proche de 6,6 immédiatement après la traite .il augmente légèrement dans les heures suivantes par diminution de la quantité de dioxyde de carbone dissout dans la phase aqueuse du lait (Croduennec et al ., 2008).

III – 6 – L'acidité du lait :

Dès sa sortie du pis de la vache, le lait démontre une certaine acidité. Cette acidité est due principalement à la présence de protéines, surtout les caséines et la lactalbumine, de substances minérales telles que les phosphates et le CO_2 , et d'acides organiques, le plus souvent l'acide citrique .Elle varie entre 0,13 et 0,17% d'équivalent d'acide lactique (Vignola .,2002). Le tableau 5 résume l'importance des constituantes dans l'acidité naturelle du lait.

Tableau 4 : Acidité naturelle du lait ; apport des différents constituants (**Vignola., 2002**).

Constituants	Acidité (% d'équivalent d'acide lactique)
Caséines	0,05 à 0,08
Phosphates	0,05 à 0,07
Lactalbumine	0,01
CO ₂	0,01 à 0,02
Acide citrique	0,01

IV - Qualité organoleptique du lait :

L'examen de la consistance et de la couleur, de l'odeur et de la saveur du lait cru peut apporter certain indication sur la qualité de produit (**Guiraud ., 2003**).

IV- 1 - La couleur :

Le lait est de couleur blanc mat, qui est due en grande partie à la matière grasse, aux pigments de carotène (la vache transforme le B- carotène en vitamine A qui passe directement dans le lait) (**Fredot ., 2005**) .

IV- 2 - L'odeur :

Selon **Vierling (2003)**, l'odeur est caractéristique le lait du fait de la matière grasse qu'il contient fixe des odeurs animales .Elles sont liées à l'ambiance de la traite, à l'alimentation (les fourrages à base d'ensilage favorisent la flore butyrique, le lait prend alors une forte odeur), à la conservation (l'acidification du lait à l'aide de l'acide lactique lui donne une odeur aigrelette).

IV- 3 - La viscosité :

Le lait est de viscosité variable en fonction de l'espèce animal (**Sina ., 1992**) . D'après **kopaczewski., (1948)** la viscosité du lait de vache est constant. De plus le lait est isovisqueux avec le sérum du même animal. Notons cependant que la chauffe du lait jusqu'à 60°C abaisse sa viscosité, tandis que celle au delà de 70°C l'augmente ; il s'agit

naturellement de mesures effectuées sur du lait refroidi à 20°C. La viscosité du lait dépend également du degré de dispersion des matières grasses.

IV-4 – La saveur :

La saveur du lait normal frais est agréable. Celle du lait acidifié est fraîche et un peu piquante. Les laits chauffés (pasteurisé, bouillis ou stérilisés) ont un peu de goût légèrement différent de celui du lait cru. Les laits de détention et de mammites ont une saveur salée plus ou moins accentuée. Il en est en parfois de même du colostrum. L'alimentation des vaches laitières à l'aide de certaines plantes de fourrages ensilés, etc. Peut transmettre au lait des saveurs anormales en particulier un goût amer. La saveur amère peut aussi apparaître dans le lait par suite de la pullulation de certaines germes d'origine extra-mammaire (Thieulin et Vuillaume., 1967).

V-Flore microbienne du lait :

V – 1 - La Flore originelle :

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 5000 germes/ml) il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoque, *Streptocoque lactiques* et Lactobacilles (Larpent., 1997).

Tableau 5: Flore originelle du lait cru (Vignola ., 2002).

Microorganismes	Pourcentage
<i>Micrococcus sp.</i>	30-90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus ou Lactococcus</i>	< 10
Gram négatif	< 10

V – 2 - La flore de contamination :

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 (*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)

qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produit, Et d'une flore pathogène (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella sp*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* et certains moisissures) capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produit laitiers (Vignola 2002 ;Guiraud., 2003).

VI - Production industriels du lait :

Une large gamme de laits de consommation, différent par leur composition et leur qualité nutritionnelle, est apparue sur le marché afin de satisfaire la demande du consommateur (Jeantet et al ., 2002).

VI- 1 - Lait cru :

C'est un produits intéressant sur le plan de la nutrition puisqu'il n'a subit aucun traitement d'assainissement lui permettant d'assurer une meilleur conservation ,sa production et sa commercialisation devant être sévèrement contrôlées en raison des risques qu'il peut encore présenté pour la santé (Luquet. , 1990).

VI - 2 - Lait traités par la chaleur :

les traitement industriels peuvent consister en une modification de composition (lait écrémé ou lait demi écrémé par opposition au lait entier) et en un traitement thermique destiné à élimination les éventuels germes pathogènes à prévenir l'altération rapide et spontanée du lait (Guiraud., 2003), selon l'intensité des traitements thermiques, en distingue : les laits pasteurisés, et les laits de longue conservation(ou UHT) (Mahaut et al ., 2000).

VI - 3 - Laits concentrés :

Les laits concentrés sont des produits dont la concentration en solides de lait est environ le double de celle du lait frais, il se présente sous deux formes : les laits concentrés sucrés (est le produit d'une concentration partielle du lait suivie d'une addition de sucre) et les laits évaporés (est le produit d'une concentration du lait par évaporation suivie d'une stérilisation à la chaleur) (Vignola ., 2002).

VI - 4 - Laites en poudre :

Constitués essentiellement de matières sèche de lait et d'une très faible quantité d'eau (de 2 à 4 %), ils sont commercialisés sous la forme de poudre de lait entier (26% de MG), partiellement écrémé (17% de MG) et écrémé (moins de 1.5% de MG) (**Dupin et al ., 1992**).

VI - 5 - Lait reconstitué :

Le lait obtenu par addition d'eau à la poudre de lait, en quantité nécessaire pour rétablir le rapport approprié entre l'eau et les matières sèches (**CODEX STAN 206-1999**).

VI - 6 -Laites recombinant :

Le recombinant est obtenu par mélange d'eau, de matière grasse et de lait en poudre écrémé extra grade tirant moins de 1.25 de matières grasses (**JORA N° 069-1993**).

VII - Industriels laitiers :

L'industrie laitière produit une large gamme d'aliments périssables (lait et crème) et semi-périssables (cheese, beurre et yaourt) et d'ingrédients alimentaires (lait en poudre, concentrés de protéine de lactosérum et caséinates) (**Flinet et al ., 2015**).

VIII - Pasteurisation :

VIII - 1 – Objectifs et définition :

D'après **Pascal (2011)**, La pasteurisation est une technique utilisée très fréquemment en agro-alimentaire, l'objectif est d'allonger de façon significative la durée de conservation des aliments. Est un traitement thermique à des températures comprises entre 60 et 100°C ayant pour but de détruire la totalité des microorganismes pathogènes non sporulés et de détruire significativement la flore végétative présent dans un produit. En s'efforçant de ne pas affecter notamment la structure physique du lait, sa constitution, son équilibre chimique, ses enzymes et ses vitamines (**JORA N°69 1993**).

C'est un procédé de conservation limité pour lequel le produit doit être conditionné hermétiquement (avec ou sans atmosphère modifiée ou sous vide) et réfrigéré (le produit pasteurisé peut être en effet conservé à +4°C de quelques jours à quelques semaines) (**Pascal ., 2011**).

VIII - 2 - Les différents types de Traitement de pasteurisation :

Selon **Loliger et al (2010)**, en fonction du couple températures /temps employé on peut distinguer trois types de pasteurisation :

- En batch ,62-65°C pendant 30 min.
- La pasteurisation haute (HTST) 71-74°C durant 15 -40 seconds.
- Le flash pasteurisation 85-90°C pendant 1-4 seconds.

VIII - 3 - Procédés de pasteurisation :

La pasteurisation est une opération unitaire mise en œuvre dans l'industrialisation de multiples procédés, la fabrication du lait pasteurisé peut être obtenu à partir de lait naturel provenant d'élevage ou de poudre de lait importée suivant le système ci-dessous (**Pascal., 2011**). La figure 2 résume les étapes d'un procédé d'obtention de lait pasteurisé.

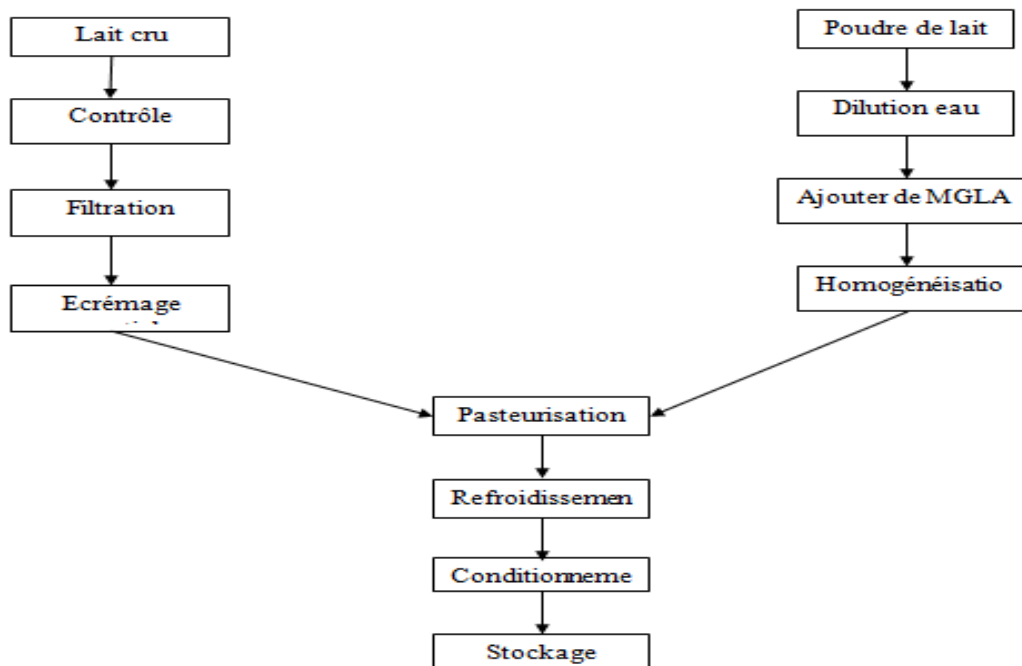


Figure 2 : Diagramme de fabrication du lait pasteurisé (**M'boya et al ., 2001**).

Chapitre II:

Biofilms

I - Définition du biofilms :

Un biofilms est un ensemble de microorganismes, soit de la même espèce, soit d'espèces différents, qui vivent en symbiose et forment une communauté (Branger et al ., 2007) ,caractérisée par son adhésion à une surface solide et par la production d'une matrice qui entoure les cellules bactériennes et comprend des polysaccharides extracellulaires (EPS), des protéines et de l'ADN (Marchand et al ., 2012).

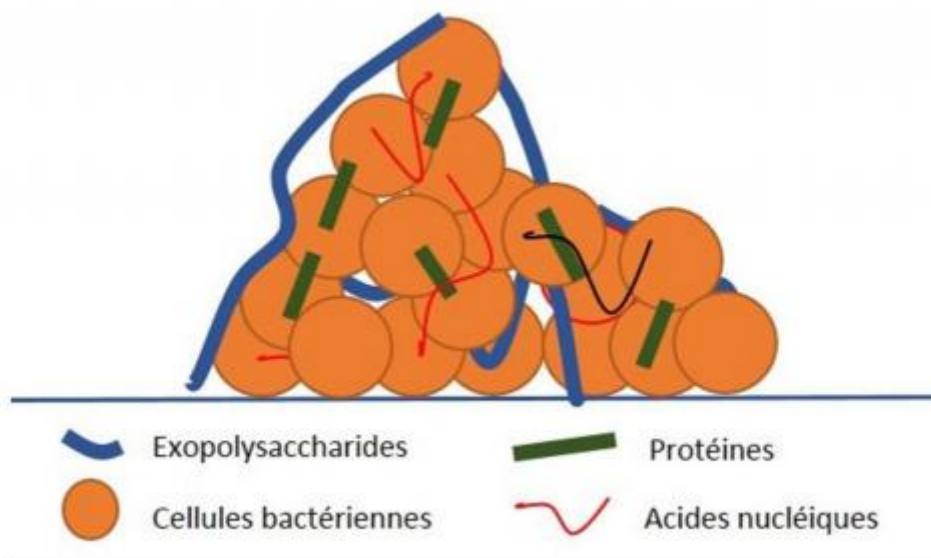


Figure 3 : Composition du biofilms (Jacques et al ., 2016).

II - Les étapes de formation du biofilms :

D'après Jacques et al (2010) ; Karunakaran et Biggs., (2011) ; Hathroubi et al (2014), la formation du biofilms suivent également un schéma similaire pour toutes les bactéries (Figure 4). On différencie en général cinq étapes :

- 1- **Attachement réversibles** : initialement, les bactéries planctoniques, c'est-à-dire libres, doivent adhérer à une surface biotique ou abiotique.
- 2- **Attachement irréversibles** : Cette étape requiert généralement la présence de molécules ou de structures particulières à la surface de la bactérie (fimbriae, flagelle).

- 3- **la formation de micro-colonies** : par la multiplication et l'agglutination les cellules bactériennes.
- 4- **la maturation du biofilms** : les bactéries s'attachent alors les unes aux autres par l'entremise de leurs protéines de surface, et synthétisent un exopolysaccharide et d'autres constituants de la matrice polymérique.une fois la matrice bien en place, le biofilm est considéré mature.
- 5- **Le détachement et la dispersion du biofilms** : le détachement des cellules peut être initié par différents facteurs : la dégradation enzymatique du substrat ou de la matrice polymérique, des perturbations mécaniques ou par un phénomène mieux connu sous le nom de quorum sensing (est un mécanisme de communication bactérienne utilisent des signaux moléculaire), il permet la communication entre les bactéries au sein du biofilms, ce qui même ultimement à leur dispersion sous une forme planctonique.

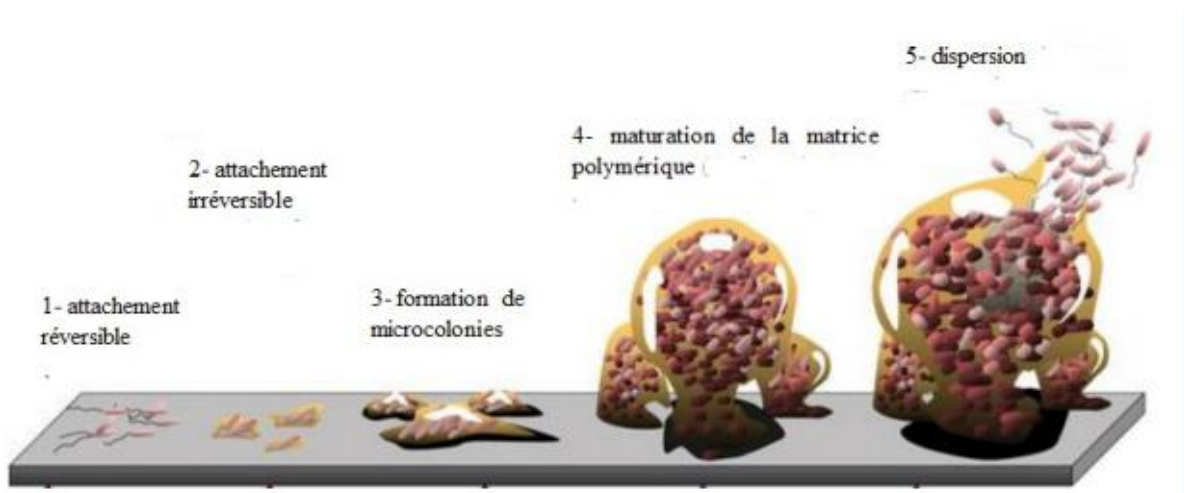


Figure 4 : Etapes de formation et de la dispersion d'un biofilms bactérien (Monroe .,2007) .

III - Différents type de biofilms :

Les biofilms sont présent dans les milieux aqueux ou exposé à l'humidité .ils peuvent se développé sur tous les supports exposé, même occasionnellement, à de l'eau et éléments nutritifs .En effet les microorganismes sont capable d'utiliser des multiples substrats. Ils se développent sur n'import quel type de surface naturelle ou artificielle, qu'elle soit minérale (roche, interface air-liquide ...) ou organique (peau, tube digestive des animaux, racines et feuilles des plants), industrielle (canalisation, surface alimentaires, coques des navires) ou médicales (prothèses, cathéters, valves cardiaques) (**Branger et al ., 2007**).

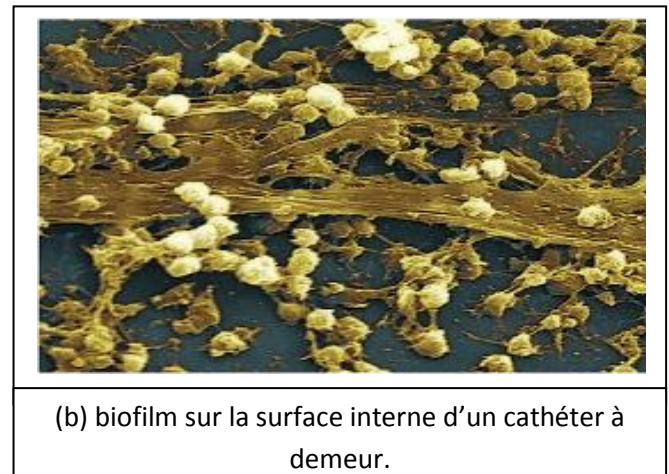
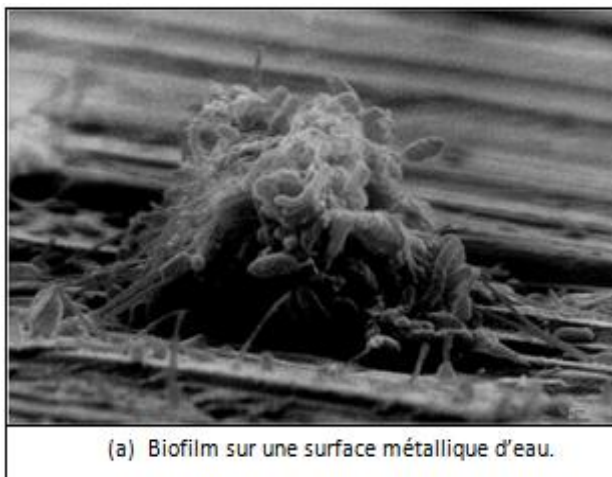


Figure 5 : Micrographies électronique à balayage des exemples de biofilms : (a) biofilm sur une surface métallique provenant d'un système d'eau industrielle (**Donlan et Costerton ., 2002**) ; (b) biofilm de *Staphylococcus aureus* sur la surface interne d'un cathéter à demeure (**Coyette et al ., 2018**).

IV - Biofilms dans l'industrie agro-alimentaire :

L'industrie alimentaire est considérée comme faisant partie du domaine de la santé publique plutôt que du domaine de la médecine vétérinaire (**Jacques et al ., 2010**) . La contamination bactérienne, la détérioration du produit et la propagation d'agent pathogène d'origine alimentaire en raison de la formation de biofilm sont des problèmes récurrents dans de nombreuses industries alimentaires (**Poulsen ., 1999 ; Parkar et al ., 2004**) , les biofilms peuvent se développer directement sur les aliments ou sur des surfaces en contact

avec les aliments, par un large éventail d'organismes différents (**Krogsgard et al ., 2016 ; Fratamico et al ., 2009**).

IV -1 - Biofilms en l'industrie laitière :

Les biofilms sont devenus un problème majeur dans l'industrie laitière et sont désormais reconnus comme des sources potentielles de contamination par des microorganismes nuisibles ou des germes pathogènes susceptibles de nuire à la sécurité, à la stabilité, à la qualité et à la valeur des produits fabriqués par l'industrie laitière (**Bremer et al ., 2006 ; Flint et al ., 2015 ; Banyko et Vylételeva ., 2008**) , Le lait et les produits laitiers peuvent abriter une variété de microorganismes et peuvent être d'importantes sources d'agents pathogènes d'origine alimentaire (**Jacques et al ., 2010**) car le biofilm microbienne est un important réservoir de contamination microbienne qui a reçu relativement peu d'attention dans l'industrie laitière (**Marchand et al ., 2012**).

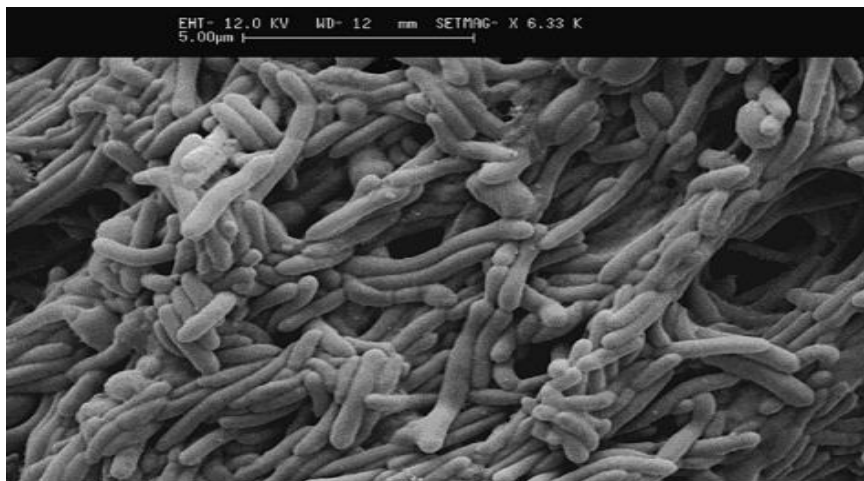


Figure 6 : Micrographie d'un biofilm de 6 jours formé par *Bacillus cereus* sur une surface en inox (**Simoes et al ., 2010**).

IV – 1 – 1 Les germes en causes :

D'après **Guezennec (2017) ; Gopal et al 2015** , les bactéries normalement présentes dans l'industrie laitière (ligne de pasteurisation) sont les bactéries sporulées formant des spores telles que celles des genres *Sporosarcina*, *Paenisporosarcina* , *Brevibacillus* ,*Paenibacillus* , *Geobacillus* ,*Bacillus* et des espèces : *E. coli* ,*Shigella sp* , *Staphylococcus aureus* , car elles sont capables de survivre à la pasteurisation industrielle et de former des biofilms dans des tuyaux et des équipements en acier inoxydable . Avec *Streptococcus*

thermophilus qui a été découvert attaché aux échangeurs de chaleur dans les équipements de traitement du lait (Poulsen., 1999).

IV- 1- 1- 1 Généralités sur les Bacillus :

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie du domaine des bactéries ou eubactéries et du phylum des firmicutes aussi dénommées bactéries à bas G+C % (Dromigny., 2008), Ce sont des bacilles à coloration Gram positive, catalase positive à spore terminale, subterminale ou centrale. Ils sont aéro-anaérobie facultatif ou parfois aérobies strict ; les *Bacillus* sont des bactéries ubiquitaires .certains sont pathogène (Larpent., 1997).

Beaucoup d'espèces peuvent en fait être classées dans différents groupes taxonomiques. Les taxons du genre *Bacillus* sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 6: Taxons de la famille des Bacillaceae appartenant au genre *Bacillus* (Larpent., 2000).

<i>Bacillus agaradhaerens</i>	<i>Bacillus lentus</i>
<i>Bacillus alcalophilus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus marinus</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus marismortii</i>
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Bacillus azotoformans</i>	<i>Bacillus methanolicus</i>
<i>Bacillus badius</i>	<i>Bacillus moiavensis</i>
<i>Bacillus benzoevorans</i>	<i>Bacillus mycoides</i>
<i>Bacillus carboniphilus</i>	<i>Bacillus naganoensis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus niacini</i>
<i>Bacillus chinensis</i>	<i>Bacillus oleroonius</i>
<i>Bacillus chitinolyticus</i>	<i>Bacillus pallidis</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus posteurii</i>
<i>Bacillus clarkii</i>	<i>Bacillus popilliae</i>
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus pseudalcaliphilus</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus pseudofirmus</i>
<i>Bacillus cohnii</i>	<i>Bacillus pseudomycoies</i>
<i>Bacillus curdlhanolyticus</i>	<i>Bacillus psychrophilus</i>
<i>Bacillus dipsosauri</i>	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>
<i>Bacillus ehimensis</i>	<i>Bacillus pulvifaciens</i>
<i>Bacillus fastidiosus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus firmus</i>	<i>Bacillus schlegelii</i>
<i>Bacillus flexus</i>	<i>Bacillus silvestris</i>
<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus simplex</i>
<i>Bacillus galactophilus</i>	<i>Bacillus smithii</i>
<i>Bacillus gibsonii</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
<i>Bacillus globisporus</i>	<i>Bacillus sporothermodurans</i>
<i>Bacillus globisporus subsp .globisporus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus glucanolyticus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus halmapatius</i>	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>
<i>Bacillus haloalkaliphilus</i>	<i>Bacillus thermocatentilatus</i>
<i>Bacillus halodenitrificans</i>	<i>Bacillus thermocloacae</i>
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>
<i>Bacillus halophilus</i>	<i>Bacillus thermoleovorans</i>
<i>Bacillus horikoshii</i>	<i>Bacillus thermosphaericus</i>
<i>Bacillus infernus</i>	<i>Bacillus thermoruber</i>
<i>Bacillus insolitus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bacillus kaustophilus</i>	<i>Bacillus tusciae</i>
<i>Bacillus kobensis</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Bacillus laevolacticus</i>	<i>Bacillus vedderi</i>
<i>Bacillus lentimorbus</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>

IV- 1- 1- 1- 1 Le groupe *Bacillus cereus* :

L'espèce *cereus* vient de l'adjectif latin *cereus* (qui ressemble à la cire) à cause des colonies que *Bacillus cereus* forme sur les géloses (**Dromigny ., 2008**), est un bâtonnet sporulé , aéro-anaérobie thermophile (mais certaines souches peuvent se développer à 6°C) présente une flagellation péritricheuse et lécithinase positive, il est présent dans le sol ,sur l'herbe dans les aliments du bétail laitier (**Larsen ., 1999 ; Guiraud ., 2003 ; Majed et al ., 2016 ; Dréan et al 2015**) , *B. cereus* utilise la stratégie de formation des spores pour survivre dans des conditions difficiles (**Hayrapetyan et al ., 2016**) ; qui sont résistants à de nombreux traitements thermiques utilisés dans l'industrie alimentaire, tels que la pasteurisation (**Tauveron et al ., 2006**).

IV- 1- 1- 1- 2 Les intoxications alimentaires dues à *Bacillus cereus* :

Bacillus cereus est une bactérie pathogène formant des endospores , que l'on trouve fréquemment dans les produits laitiers ainsi que dans des produits tels que les spaghettis, les épices et les légumes , les viandes, les plats cuisinés, souvent le riz cuit à l'avance , impliquée dans les toxi-infections liées à une multiplication excessive dans l'aliment (de 10^4 à 10^7 germes par g), (**Guiraud ., 2003 ; Klavenes et al ., 2002**).

B.cereus est en fait l'agent de deux types de syndrome d'intoxication alimentaire : un syndrome dit diarrhéique dans lequel la toxine est produite dans la lumière intestinale ,après la colonisation du tube digestif du consommateur par *Bacillus cereus* .ce syndrome apparaît après une période d'incubation longue de 8 à 16 heures et un syndrome dit émétique ,dans lequel la toxine émétique préformée et thermostable est produite dans l'aliment contaminé leur période d'incubation de moins d'une heure à six heures (**Federighi., 2005 ; Dromigny ., 2012**).

IV -1- 1- 1- 3 Biofilm de *Bacillus cereus* :

Les espèces du groupe *Bacillus cereus* ont la capacité de former facilement des biofilms sur diverses surfaces, y compris le plastique, le sol, la laine de verre et l'acier inoxydable (**Fratamico et al ., 2009 ; Silva et al ., 2018**).

Dans l'industrie laitière , les microorganismes du groupe *B. cereus* comptent parmi les agents de dégradation les plus importants de la chaîne de production du lait (**Silva et al ., 2018**) , *B. cereus* est un contaminant commun de divers produits laitiers et leur croissance

limite considérablement la durée de conservation du lait pasteurisé (**Christiansson et al.,1999 ; Cui et al ., 2016**) ,ils ont trouvée en quantités élevées dans le lait pasteurisé avec un taux de contamination élevé résulter de la présence de spores dans le lait cru après le processus de stérilisation (**Svensson et al ., 2002 ; Oosthuizen et al ., 2002 ; Gao et al ., 2018**) .

Une contamination post-pasteurisation peut résulter de l'adhérence de spores de *Bacillus* vivants dans les chaînes de transformation de produits laitiers (**Banyko et Vylételeva ., 2008**).

Les spores de *B. cereus* survivent à la pasteurisation et aux températures UHT et ainsi se retrouvent dans les produits laitiers finaux (**Banyko et Vylételeva ., 2008**), elles peuvent adhérer aux surfaces de la section régénératrice du pasteurisateur, où elles peuvent germer rapidement dans le lait lorsqu'elles sont activées par la chaleur, elles peuvent former des biofilms extrêmement difficiles à éliminer .Cela pourrait conduire à une contamination du lait (**Svensson et al ., 2002**).

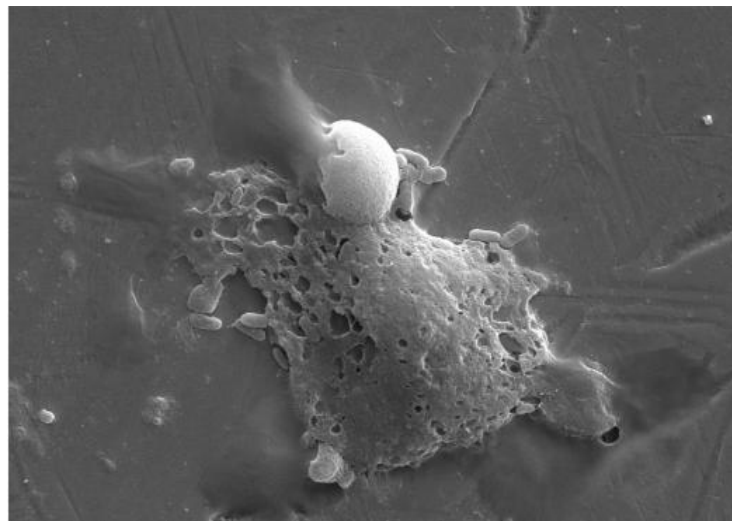


Figure 7 : Biofilms déjà structuré par les cellules végétatives de *B. cereus* sur une surface en acier inoxydable (**Silva et al ., 2018**).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I - Echantillonnage :

Cette étude apportée sur deux marques de lait conditionné pasteurisé partiellement écrémé et la troisième marque de lait conditionné pasteurisé entier ; produit par trois laiteries de différente région dans l'Algérie :

- La laiterie X situé à l'ouest d'Alger.
- La laiterie Y localisée dans centre du sud d'Alger.
- La laiterie Z situé à l'est d'Alger.

Les échantillons sont acheminés au laboratoire sous froid, dans une glacière iso thermique pour ne pas influencer la flore bactérienne existante. L'analyse bactériologique à été réalisé au laboratoire pédagogique de l'université d'Amar TELIDJI.

II - Prélèvements :

Pour chaque laiterie, nous avons prélevé neuf échantillons. Les prélèvements ont été réalisé a défèrent date chez différentes vendeur.

Les tableaux suivant présentent les caractéristiques des laits pasteurisés prélevé.

Tableau 7: Caractéristiques de lait X (ouest).

Lot	Date de prélèvement	Date de la fabrication	Date de péremption
I	23/12/2018	22/12/2018	28/12/2018
II	28/01/2019	26/01/2019	01/02/2019
III	11/02/2019	/	/

Tableau 8 : Caractéristiques de lait Y (centre du sud) :

Lot	Date de prélèvement	Date de la fabrication	Date de péremption
I	23/12/2018	18/12/2018	24/12/2018
II	28/01/2019	/	/
III	02/02/2019	/	/

Tableau 9 : Caractéristiques de lait Z (est) :

Lot	Date de prélèvement	Date de la fabrication	Date de péremption
I	23/12/2019	21/12/2018	26/12/2018
II	02/02/2019	01/02/2019	06/02/2019
III	09/02/2019	08/02/2019	13/02/2019

III - Analyse physique :

III – 1 - Détermination du pH :

Mètre une quantité d'échantillon du lait dans une bécher et faire la mesure à l'aide d'un pH mètre.

NB : la mesure du pH et le résultat de la moyenne de trois essaie successifs de chaque échantillon.

Nous avons oublié de mesurer premier lot des trois échantillons.

IV - Analyse microbiologique :

IV – 1 - Préparation des dilutions décimales :

Les délutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptique, les pipettes conseillées sont à écoulement totale. On prépare autant de tube qu'il y a de dilutions à effectuer en prenant des tubes stériles dans lesquels on pipette aseptiquement 9ml de liquide diluant (TSE). Après l'avoir homogénéisée soigneusement, on prélève 1ml dans la suspension de départ à l'aide d'une pipette de 1ml et on le porte dans le premier tube de dilution (10^{-1}). La pipette ne doit entrer en contact ni avec les parois des tubes, ni avec le liquide diluant .Avec une nouvelle pipette de 1ml, on homogénéise à l'aide d'un vortex le contenu de ce tube 10^{-1} et on ensemence le tube (10^{-2}) et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-3} (Guiraud et Rosec ., 2004).

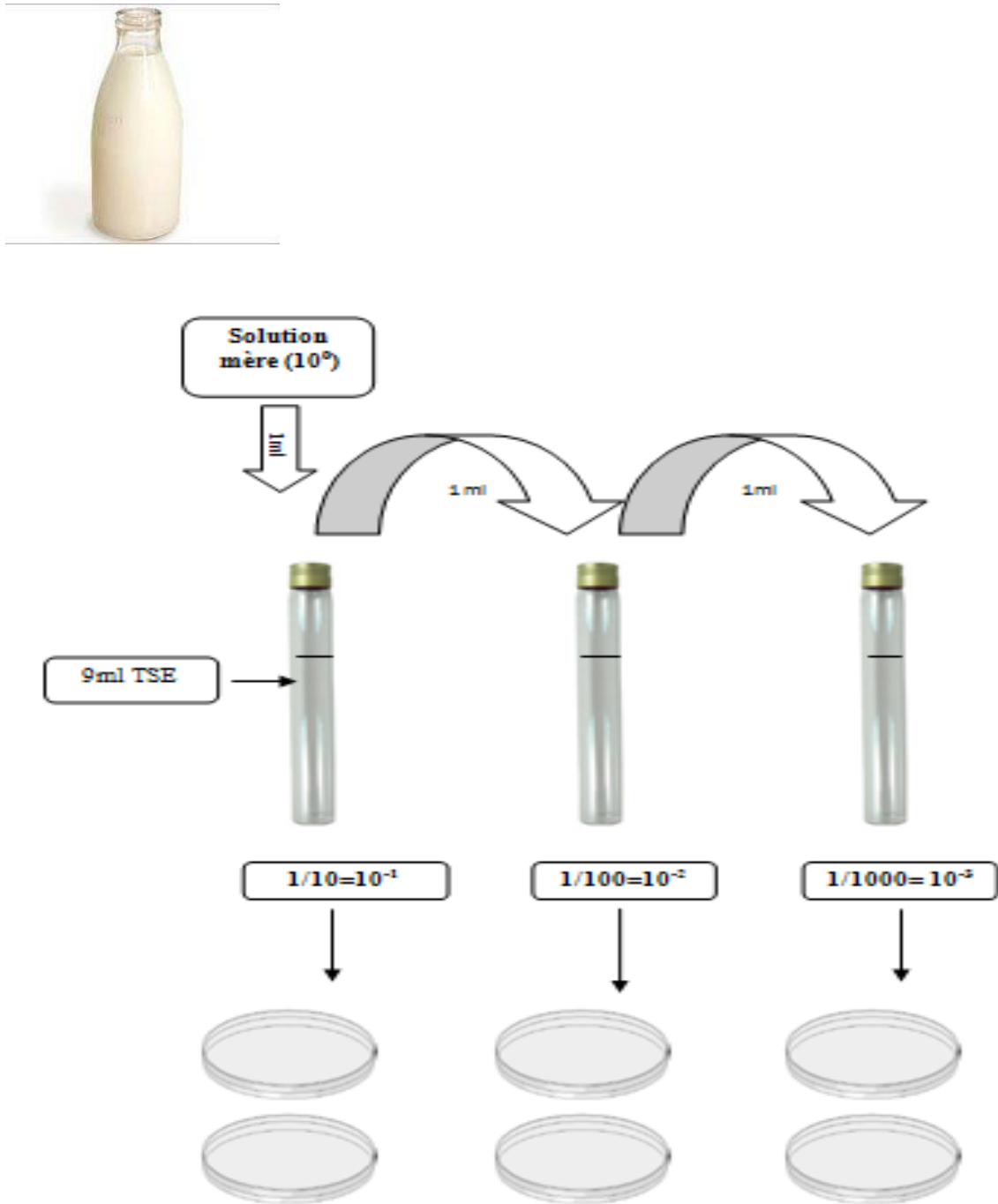


Figure 8 : Technique de préparation des dilutions successives et d'ensemencement.

IV - 2 - Ensemencement et dénombrement :

IV - 2 - 1 - Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale(FAMT) :

Cette flore appelée aussi FAMR (flore aérobie mésophile revivifiable) est un bon indicateur de la qualité générale et de la stabilité des produits ainsi que de la qualité des installations.

Les ensemencements de la FAMT son réalisé en placent 1ml de chaque dilution décimale (allant de 10^{-1} à 10^{-3}) dans une boîte de pétrie vide et stérile, puis en ajoutant le milieu gélosé plat count agar (PCA) préalablement fondue est refroidie à 47°C .que l'on mélange ensuite soigneusement. Deux boîte de pétrie sont ensemencé par dilution et après solidification du milieu de culture les boîte sont incubées à 30°C pendant 72h (**Guiraud ., 1998**).

IV - 2 - 2 - Dénombrement des coliformes thermo tolérant :

La numération des coliformes thermo tolérant (fécaux) représente quant à elle, un bon indice de contamination, à partir des matières fécale de l'homme et des animaux d'où son appellation de « flore indicatrice de contamination fécale ». Ces bactéries sont souvent associées à des entérobactéries pathogène comme *Salmonella* et *Shigella* (**Dupin et al ., 1992**).

L'inoculation se fait par la technique de la double couche, le milieu utilisée la gélose lactosée biliée au cristal violet et rouge neutre (VRBL). La technique à été normalisé par l'AFNOR (NF-V-08-015),on place 1ml de dilution au centre de la boîte vide et l'on ajoute le milieu stérile en surfusion, après solidification du mélange inoculum-milieu, une deuxième couche du milieu VRBL doivent être ajouté, pour le dénombrement des coliformes fécaux, les boîtes sont incubé à 44°C pendant 24h, la lecture consiste à dénombré les colonies rouge, violette d'un diamètre d'au moins 0,5mm .(**Bourgeois et Leveau ., 1991**).

IV - 2 - 3 - Dénombrement des coliformes totaux :

La numération des coliformes et surtout réalisé dans le cadre de l'analyse de l'eau ,de sel et des aliments transformé (produit pasteurisé) ou elle permet de mettre en évidence un défaut de process ou de mauvaise condition de fabrication (recontamination), leur

numération s'effectuait sur le même milieu que les coliforme fécaux mais après 24h d'incubation à 37°C (Guiraud et Rosec., 2004).

IV - 2 – 4 – Dénombrement sur milieu MOSSEL :

A l'aide d'une pipette stérile, porter 0,1ml de dilution (10^{-1}) à la surface d'une plaque de milieu de MOSSEL. Etaler l'inoculum grâce à l'étaleur à la surface de milieu le plus rapidement possible, et sans toucher les parois de la boîte. Répéter l'opération pour la deuxième dilution (10^{-2}). Laisser les boîtes pendant environ 15min à la température de laboratoire pour permettre à l'inoculum de pénétrer la gélose. Pour la méthode de référence NF ISO7932 (directives générale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* – méthode par comptage des colonies à 30°C), deux boîtes par dilution doivent êtreensemencées. Mettre en incubation pendant 18 à 24h à l'étuve à 30°C (Larpent., 1997).

V - Analyse biochimique :

V - 1 - Test catalase :

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobie strict et anaérobies facultatif elle décompose l'eau oxygénée formé, en eau et en oxygène qui se dégage. Pour recherche cette enzyme prendre une lame porte – objet propre. Déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée et émulsionner un peu de la colonie de la culture obtenu sur gélose (Narang., 2008).

V - 2 - Test oxydase :

Déposer sur une lame porte-objet propre un disque OX et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile. Prélevé une partie de la colonie à étudié à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile et étaler sur le disque (Delarras., 2014).

V - 3 - Galerie API 20E :

L'identification de *Bacillus cereus* repose sur des tests d'identification simples mais qui ne sont pas toujours discriminants. La galerie API 20E permet l'identification des caractères biochimiques principaux, mais tous les taxons ne sont pas identifiables (Dromigny., 2008).

Pour l'identification, trois souches sont choisies et soumises à une détermination du biotype par galerie API 20 E *Bacillus* –identification via l'API 20 E. La galerie est

inoculée selon les directives du guide pour API 20 E, puis incubée à 37 °C pendant 24h à 48h.

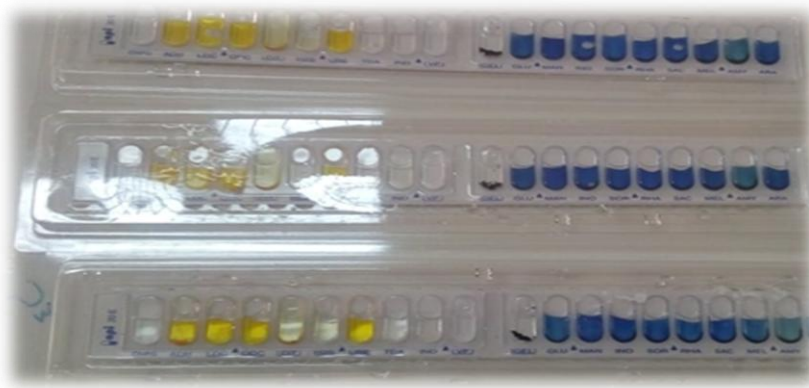


Figure 9 : Photo de la galerie API 20 E des trois souches avant l'incubation.

VI - Coloration de Gram :

Selon **Coyette et al (2018)** La méthode de coloration de Gram est une méthode caractéristique de coloration permettant de diviser les bactéries en deux classes : les Gram négatives et les Gram positives. La technique de coloration de Gram est illustrée dans la figure 10.

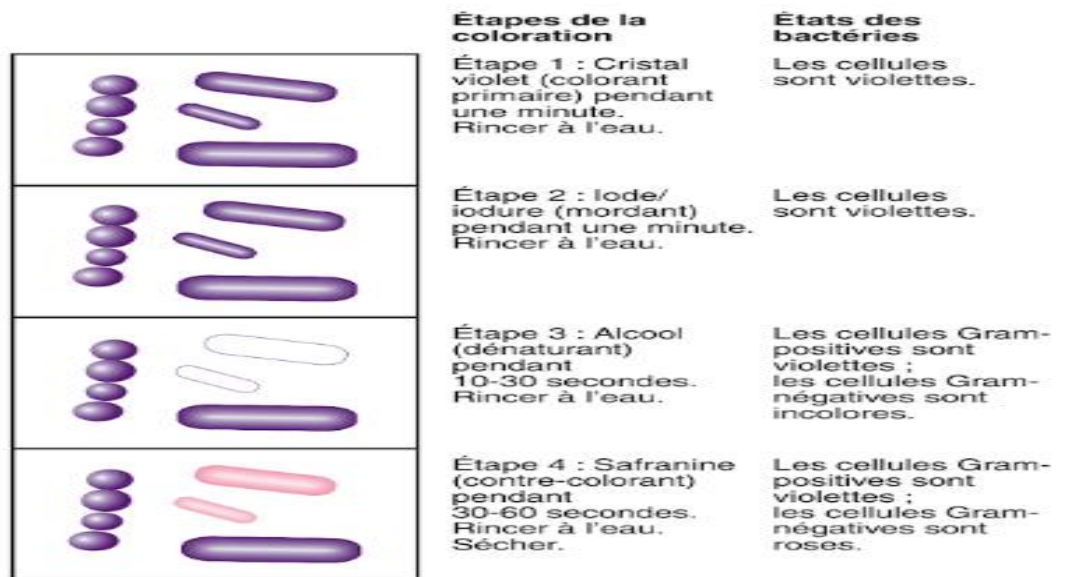


Figure 10: La technique de coloration de Gram (**Coyette et al ., 2018**).

Résultats

I- Résultat physique :

I - 1 Mesure du pH :

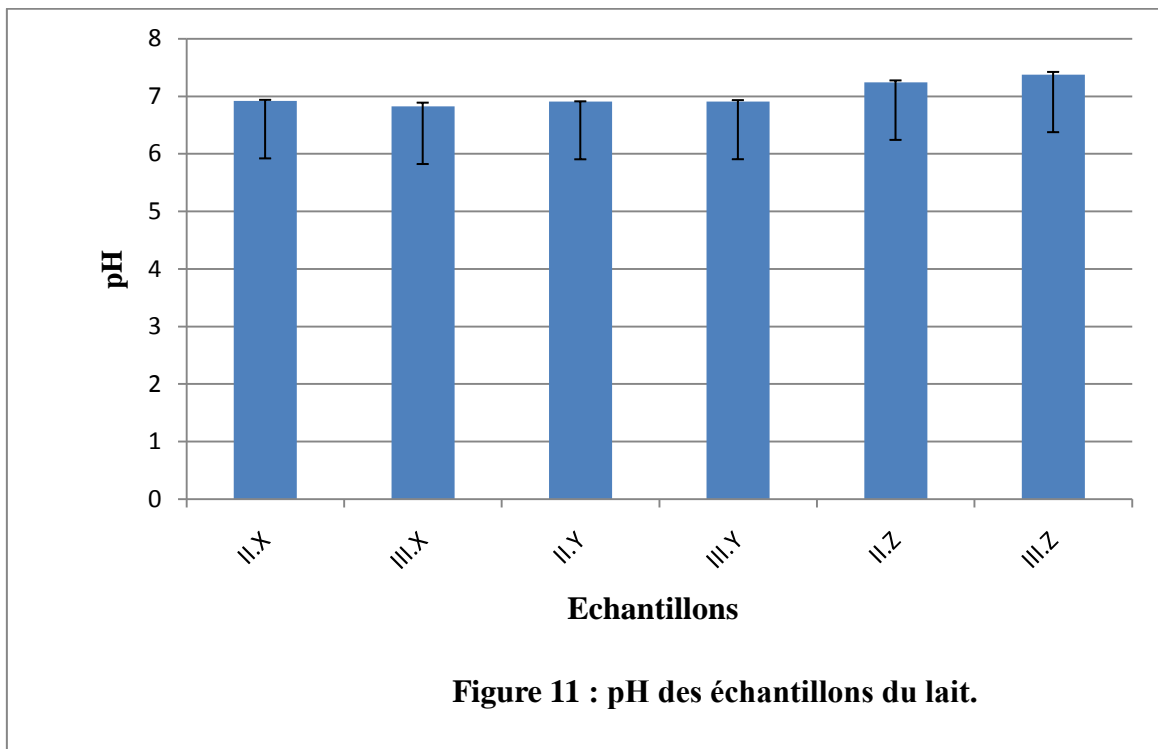


Figure 11 : pH des échantillons du lait.

La mesure du pH des différents échantillons du lait montrent une neutralité pour tous les échantillons .

II- Résultats microbiologiques :

II-1-Évaluation de la contamination des laits par FAMT :

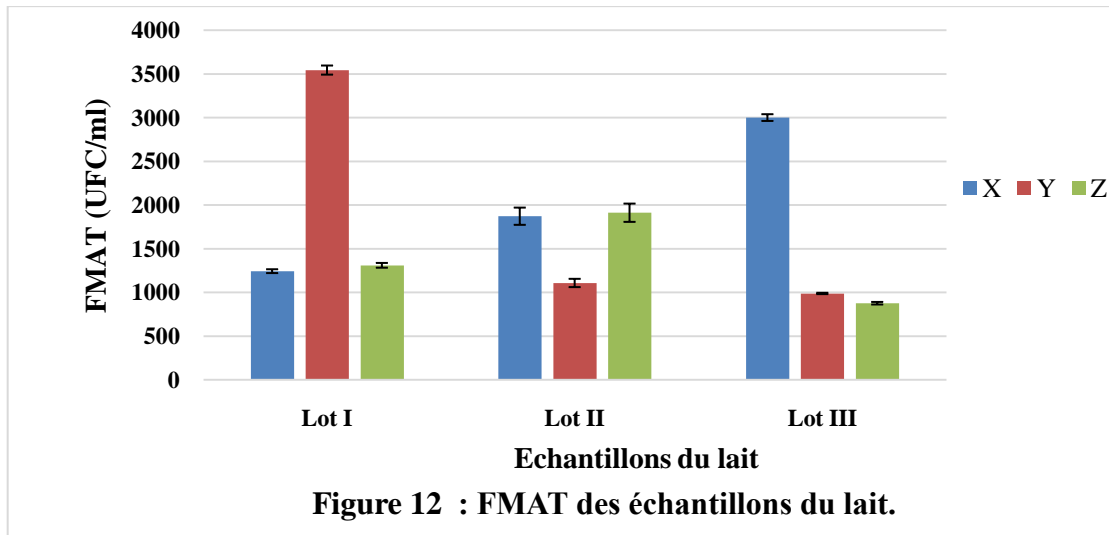
La norme FIL 100A préconise l’exploitation et l’expression des résultats de la manière suivante :

- On retient les boites contenant de 10 à 300 colonies ;
- On calcule le nombre de micro-organismes par ml à l’aide de la formule suivante :

$$N = \sum c / (n1 + 0,1 n2) d$$

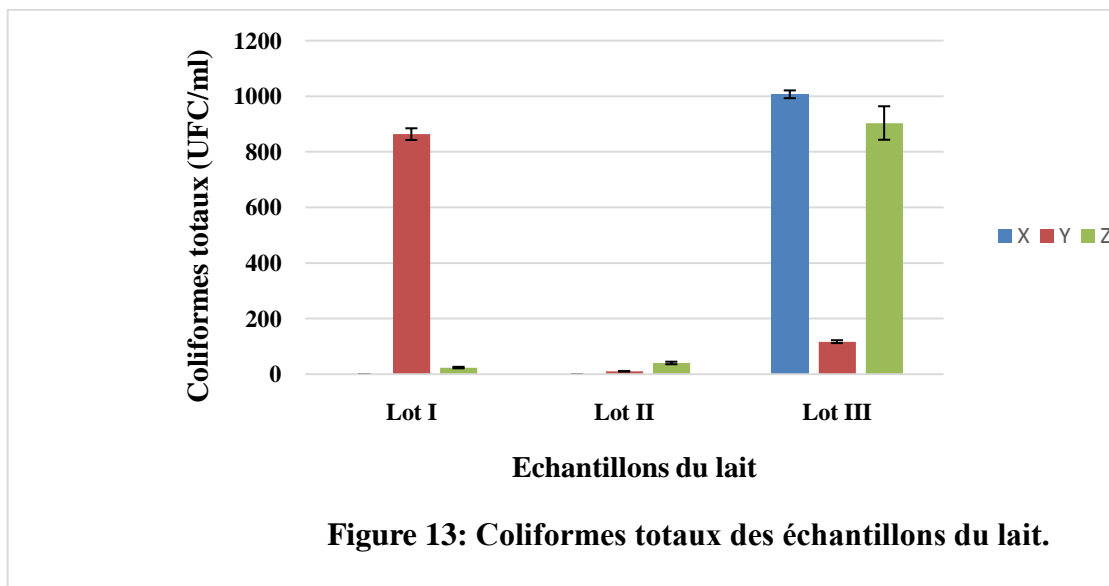
Où **c** est le nombre de colonies comptées par boite, **n1** est le nombre de boites comptées dans la première dilution, **n2** est le nombre de boites comptées dans la deuxième dilution et **d** le facteur de dilution à partir duquel les premières comptages ont été obtenus (Guiraud ., 2003). Les dénombrements sont exprimés en UFC/ml.

Les résultats du dénombrement de la flore aérobie mésophile totale des différents échantillons sont représentés dans la figure 12.



Les valeurs enregistrés sont situés entre $1,24 \cdot 10^3$ et $3 \cdot 10^3$ UFC/ml pour le lait X ; entre $9,88 \cdot 10^2$ et $3,54 \cdot 10^3$ UFC/ml pour le lait Y et pour le lait Z entre $8,76 \cdot 10^2$ et $1,91 \cdot 10^3$ UFC/ml.

II-2- Evaluation de la contamination des laits par les coliformes totaux :



Le lait X (lot III) est le plus contaminé par les coliformes totaux avec une valeur moyenne de $1 \cdot 10^3$ UFC/ml, et l'absence de la contamination dans les deux premiers lots, alors que le lait Y Présent une contamination élevé dans le premier lot par rapport aux autres lots avec une moyenne de $8,63 \cdot 10^2$ UFC/ml, et pour le lait Z il est contaminé par cette flore avec une moyenne $9,03 \cdot 10^2$ UFC/ml dans le lot III.

II-3-Evaluation de la contamination des laits par les coliformes fécaux :

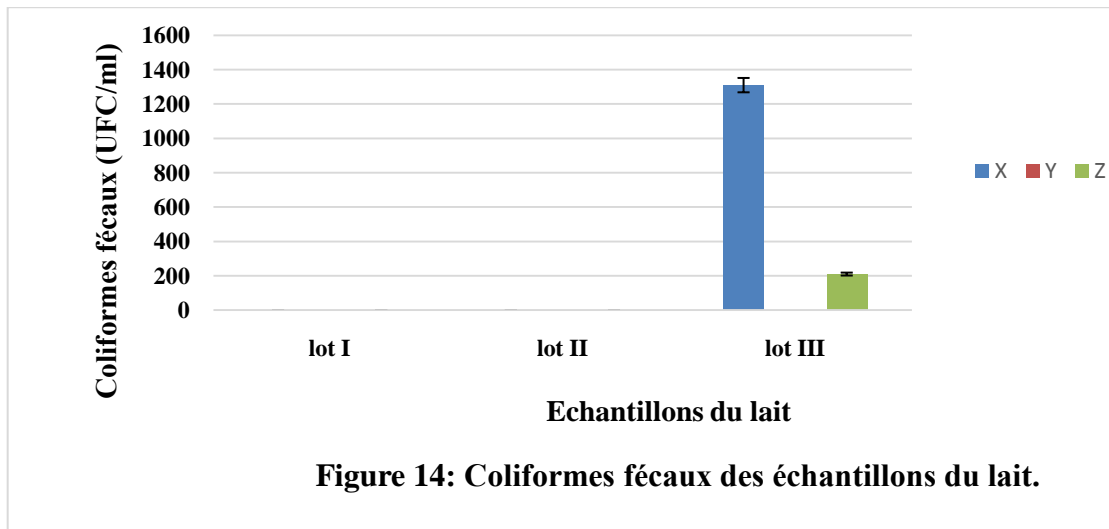


Figure 14: Coliformes fécaux des échantillons du lait.

Nous avons enregistré l'absence des coliformes fécaux pour les trois laits (X, Y et Z) dans les deux premiers lots (I et II). Alors que dans le troisième lot le lait X est le plus contaminé par les coliformes fécaux avec une valeur moyenne de $1,31.10^3$ UFC/ml suivi par le lait pasteurisé Z dont la moyenne en coliformes fécaux est $2,10.10^2$ UFC/ml, et aucune contamination enregistré pour le lait Y.

II-4-Evaluation de la contamination des laits par les Bacillus :

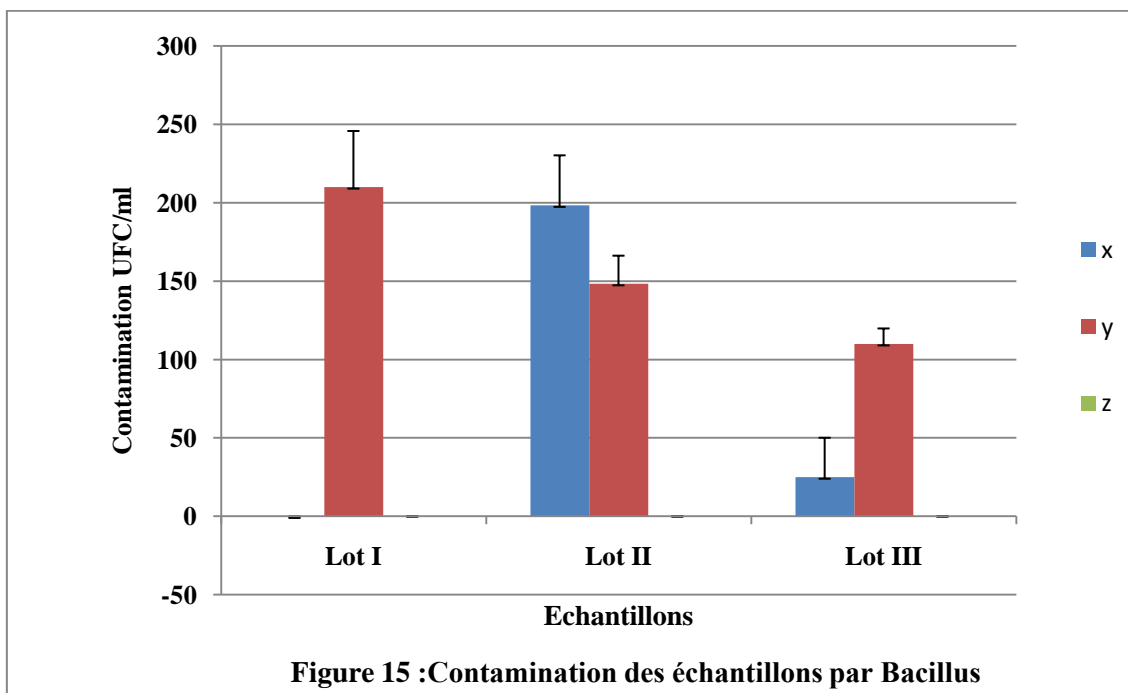


Figure 15 :Contamination des échantillons par Bacillus

La contamination la plus élevée a été retrouvée dans le lait Y (Lot I) avec 210 UFC/ml, suivie de lait X et aucune contamination enregistré pour le lait Z.

III- Isolement des bactéries :

Les trois souches ont été isolées sur le milieu GN, qui est un milieu de culture ordinaire permet le développement les germes non exigeants .C'est une gélose non sélective.

➤ **Origine des souches :**

Tableau 10 : Résume les origines des souches isolées

Souches	origines	Date de prélèvements
S1	Y	19-02-2019
S2	X	
S3	X	

IV- Identification phénotypiques des souches :

IV- 1- Caractéristiques morphologiques des souches :

IV- 1- 1 - Aspect macroscopiques :

L'aspect macroscopiques des souches à montré leur capacité de former des colonies sur le milieu GN (figure 16) : des colonies blanchâtre.

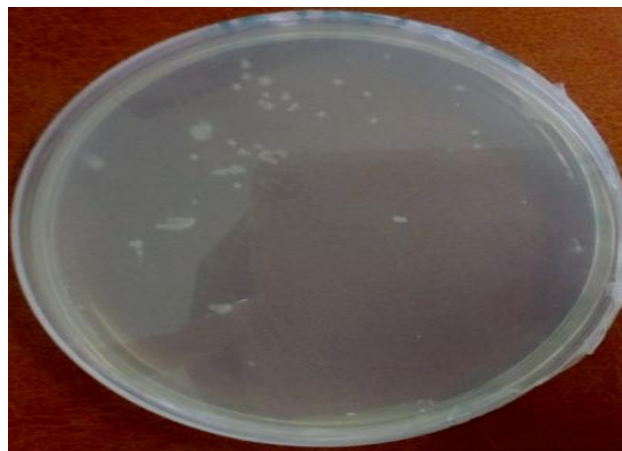


Figure 16 : Aspect des colonies sur le GN.

IV- 1- 2 -Aspect microscopiques :

✚ Coloration de Gram :

Les examens microscopiques réalisé après coloration de Gram, ont révélé l'absence totale des bactéries Gram (-). Toutes les bactéries observées se montraient sous la forme de bacilles Gram (+) (figure 17).

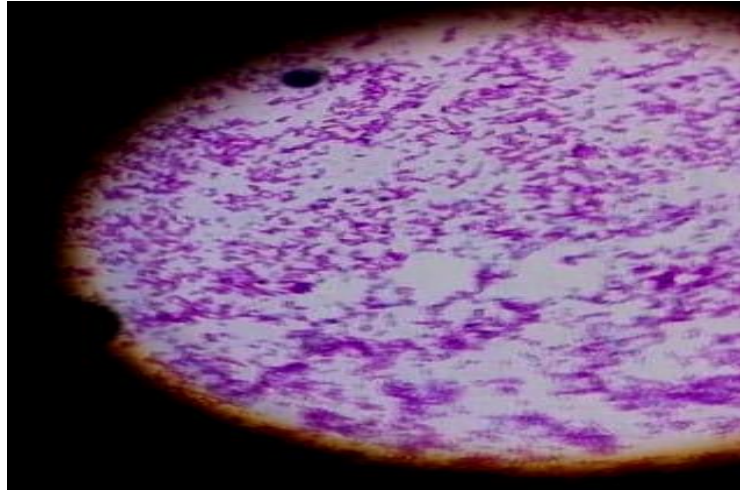


Figure 17 : Photo prise au microscope optique ($G \times 100$).

IV-2 -Caractères biochimiques des souches :

IV-2-1- Test de catalase :

Toutes les souches étudiées sont catalase positive, ce qui se traduit par l'apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène (figure 18).

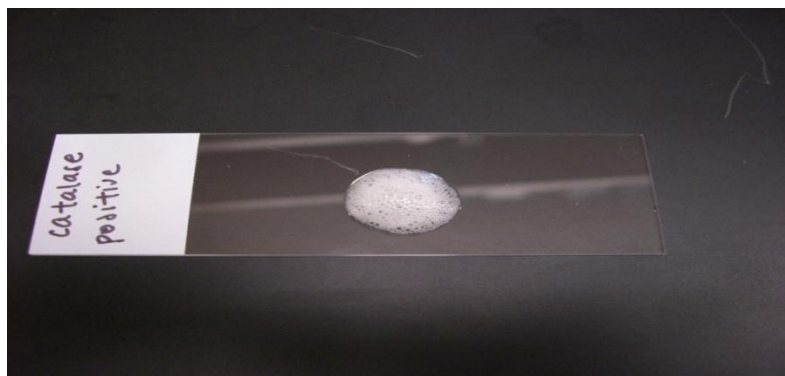


Figure 18 : Une souche bactérienne de la catalase positive.

IV-2-2- Test oxydase :

Toutes les souches étudiées sont oxydase négative, c'est-à-dire les disques d'oxydase reste incolore : il n'y a pas eu de réaction, les trois souches ne possèdent pas l'enzyme.



Figure 19 : Une souche bactérienne d'une oxydase négative.

IV-2-3- Système API 20 E :

L'identification biochimique a été réalisée par l'étude des 20 caractères de la galerie API 20 E Bacillus - identification via l'API 20 E. Tableau 11 représenté les résultats des testes biochimiques des souches.

Tableau 11 : Les résultats des testes biochimiques des souches.

Souche	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
S1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
S2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-
S3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-

D'après les résultats du tableau 11, on peut conclure que les 3 souches répartissent dans deux biotypes comprennent 2 souches pour le premier et une seule souche pour le deuxième.

Les deux souches **S2**, **S3** possèdent la même profile biochimique sont classé dans le biotype 1 et la souche **S1** est classé dans le biotype 2.



Figure 20 : Photos de la galerie API 20E du biotype 1.



Figure 21 : Photo de la galerie API 20 E du biotype 2.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des biotypes.

Biotypes	Nombres des souches	Code	Orientation dans l'logiciel
Biotype1	S2, S3	1004121	<i>Bacillus cereus</i> 73%
Biotype2	S1	7007573	<i>Bacillus coagulans</i> 65% <i>Bacillus licheniformis</i> 33 ,7%

Discussion

Selon **Alias (1984)**, le pH n'est pas une valeur constante et peut varier selon le cycle de lactation et sous l'influence de l'alimentation, les valeurs obtenues du pH se situent entre 6,82 et 6,92 pour le lait X, entre 6,90 et 6,91 pour le lait Y, et pour le lait Z un pH compris entre 7,24 et 7,37, ces valeurs indiquent que les échantillons du lait X, Y et Z ont un pH neutre.

Groupe France agricole, 2009 montré que le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT) est un indicateur pertinent pour évaluer le degré de contamination du lait. Nos résultats indiquent une charge FAMT qui varie entre $2,76.10^2$ et $3,54.10^3$ UFC/ml, ces résultats répondent aux normes recommandées par le **JORA N°35 1998 ($\leq 3.10^4$ UFC/ml)**. En ce qui concerne les coliformes totaux, les résultats qu'on a trouvé varient entre $0,01.10^3$ et 10^3 UFC/ml ont dépassé le seuil recommandé par le **JORA N°35 1998 (10 UFC/ml)** ; et nous avons remarqué l'absence totale des coliformes fécaux dans les deux premiers lots ce qui est conforme à la norme de **JORA N°35 1998 (Absence)** donc la qualité de ces lots est considérée comme satisfaisante ; par contre nous avons trouvé des coliformes fécaux dans la troisième lot avec une valeur moyenne de $1,31.10^3$ UFC/ml pour le lait X et $2,10.10^2$ UFC/ml pour le lait Z, ces valeurs ont dépassé le seuil recommandé par le **JORA N°35 1998 (Absence)**, c'est-à-dire la qualité des laits X et Z est considérée comme inacceptable ; et aucune contamination enregistrée pour le lait Y, donc ce lait est considéré comme satisfaisant.

Dans notre étude, nous avons noté la présence de trois espèces de *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* et *Bacillus lichinoformis*) dans les échantillons analysés X et Y, nos résultats rejoignent ceux de **Salustiano et al 2009** qui ont trouvé, douze isolats de lait pasteurisé et 30 isolats des surfaces des équipements de post-pasteurisation d'une unité de traitement de produits laitiers ont été caractérisés comme étant *Bacillus cereus*.

Conclusion

En constatons dans le marché national qu'il y a plusieurs types de lait pasteurisé pour satisfaire aux besoins des consommateurs qui doivent répondre à des critères de qualité.

A travers cette étude, les recherches de dénombrement des indicateurs de biofilms dans différents types de lait pasteurisé. Dans les 27 échantillons de lait pasteurisé provenant de trois localités : ouest (9 échantillon), centre du sud (9 échantillon) et l'est (9 échantillon).

Les résultats microbiologiques sont très variables avec des moyennes de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale ($2,03 \cdot 10^3$ UFC/ml) pour le lait X, ($1,87 \cdot 10^3$ UFC/ml) pour le lait Y et pour le lait Z ($1,36 \cdot 10^3$ UFC/ml). Les échantillons sont également contaminés par les coliformes totaux avec des moyennes respectives de ($3,35 \cdot 10^2$ UFC/ml) pour le lait X, ($3,29 \cdot 10^2$ UFC/ml) pour le lait Y et ($3,22 \cdot 10^2$ UFC/ml) pour le lait Z, et par les coliformes fécaux avec des moyennes de ($7,4 \cdot 10^1$ UFC/ml) pour le lait X, ($8,6 \cdot 10^1$ UFC/ml) pour le lait Y, et l'absence de contamination fécale pour le lait Z.

Les espèces de *Bacillus* sont présentes dans les échantillons de lait X et Y cela est peut-être due à la mauvaise hygiène au niveau des circuits de pasteurisation ce qui indique l'installation de biofilms à l'intérieur des systèmes de pasteurisation.

Afin d'éliminer la formation de biofilms dans le lait pasteurisé, on recommande :

- ❖ L'application du système HACCP.
- ❖ D'utiliser d'autres méthodes de nettoyage et d'utiliser d'autres détergents efficaces pour se débarrasser de biofilms.
- ❖ D'installer le matériel de pasteurisation de bonne qualité.
- ❖ D'influer des contrôles quotidiens sur la matière première ou bien d'avoir des sources de lait cru.

Références

A

- **AFNOR NF-V-08-015.** Microbiologie alimentaire directives générales pour le dénombrement des coliformes_ méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C.
- **Alias,C.(1984).**Sciences du lait ,principes des techniques laitiers .Edition SEPAIC.Paris.pp441.

B

- **Banyko,J et Vyletelova,M.(2008).**Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk,pasteurized milk and joghurt letters in applied microbiology 48,318-323.
- **Bourgeois,C.M.,Levea,j-y.(1991).**Le contrôle microbiologique T3.Tec et DOC Lavoisier.p250.
- **Branger,A.,Richer .M.,Roustel.S.(2007).**Microbiochimie et alimentation.Edition Educagri.p131.
- **Bremer,P.J.,Fillery,S.,Mcquillan,A.J.(2006).**Laboratory scale Clean- In –Place (CIP) studies on the effectiveness of the different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. International Journal of Food Microbiology. 106,254-262.
- **Briandet.R.,Fecher.L.,Naitali.M.,Dreano.C.(2012).**Biofilms quand les microbes s'organisent.Editions Quae.p19.

C

- **Charles,B.(1991).**Introduction à l'étude du lait. Centre internationale pour l'élevage en Afrique.p05.
- **Chillet, P. (2011).**Pasteurisation. Édition sceren CNNDP-CRDP .p33.
- **Christiansson,A.,Bertilsson,J.,Svensson ,B.(1999).***Bacillus cereus* spores in raw milk :factors affecting the contamination of milk during the grazing period.Journal Dairy Sci.82,305-314.
- **Codex alimentarius ; 2011.**Lait et produits laitiers.FAO et OMS. Rome .Ed 2 ,p1.
- **Coyette,J.,Joseleau,j.P.,Perraud,R.(2018).**Microbiologie de Prescott.Edition de Boeck supérieur.p33.
- **Croguennec.T.,Jeantet.R.,Brulé.G.(2008).**Fondements Physicochimiques de la Technologie Laitière.Editions Tec et Doc- Lavoisier.Paris.p06
- **Cui,Y.,Liu,X.,Dietrich,R.,Martelbauer,E.,Gao,J.,Ding,S.,Zhu,K.(2016).**Characterization of *Bacillus cereus* Isolates From Local Dairy Farms in China.FEMS Microbiology Letters,363(12),1-6.

D

- **Delarras, C. (2014).** Pratique en Microbiologie de Laboratoire-Recherche de Bactéries et de Levures et Moisissures. Tec et Doc –Lavoisier. Paris. pp 114.
- **Donlan, R.M and Costerton, J.W (2002).** Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews .15 ,167-193 .
- **Drean, P., Mcauley, C.M., Moore, S.C. , Fegan, N., Fox, E.M. (2015).** Characterization of the Spore-Forming *Bacillus cereus* sensu lato Group and *Clostridium perfringens* Bacteria Isolated From the Australian Dairy Farm Environment. BMC Microbiology, 15(32), 1-10.
- **Dromigny, E. (2008).** Bacillus cereus. Edition Tec et Doc - Lavoisier. Paris. p01 ,07 , 331 .
- **Dromigny, E. (2012).** Les Critères Microbiologiques des Denrées Alimentaire. Édition Tec et Doc-Lavoisier. Paris. p241
- **Dupin, H et Cup, JI. (1992).** Alimentation et Nutrition Humaines. Edition ESF .p860.

F

- **Faille, C., Bénézech, T. , Midelet Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G. (2014).** Sporulation of Bacillus spp within biofilm : a potential source of contamination in food processing environments. Food Microbiology. 40 ,64-74.
- **Faille, C., Fontaine, F., Bénézech, T. (2001).** Potential Occurrence of Adhering Living Bacillus Spores In Milk Product Processing Lines. Journal of Applied Microbiology, 90, 892-900.
- **FAO 2007.** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine [http : //WWW.FAO.Org/ docorp.T4280F.htm](http://WWW.FAO.Org/docorp.T4280F.htm).
- **Flint, S., knight, G., Brooks, J., Hoog Teh, K. (2015).** Biofilms In The Dairy Industry. Wiley Blackwett SDT. p02
- **Fratamico, M. , Bassam, A. , Gunther I.V.N. (2009).** Biofilms In The Food and Beverage Industries. Edition CRC. p212.
- **Fredot, E. (2005).** Connaissance des Aliments –Bases Alimentaires et Nutritionnelles de la Diététique . Tec et Doc -Lavoisier. Paris. pp397.

G

- **Gao, T. , Ding, Y., Wu, Q., Wang, J., Zhang, J., Yu, S., Yu, P., Liu, C., Kong, L., Feng, Z., Chen, M., Wu, S., Zeng, H., Wu, H. (2018).** Prevalence , Virulence Genes Antimicrobial Susceptibility and Genetic Diversity of *Bacillus cereus* Isolated From Pasteurized Milk in China. Frontiers in Microbiology, 9(533), 1-11.

- **Gopal,N.,Hill,C.,Ross,P.R.,Beresford,T.P.,Fenelon,M.A. ,Cotter.P.D.(2015).**The Prevalence and Control of Bacillus and Related Spore-Forming Bacteria in The Dairy Industry.Frontiers in Microbiology,6(1418),1-18.
- **Groupe France agricole.(2009).**Traité des vaches laitières(matériels-installation-entretien.ÉDITION France agricole.p410.
- **Guérzennec.J.(2017).**Biodégradation des Matériaux.Éditions Quae.p80
- **Guiraud ,J.P et Rosec,J.P.(2004).**Pratiques des Normes en Microbiologie Alimentaire. Édition AFNOR.Paris.pp 210.
- **Guiraud ,J.P.(1998).**Microbiologie Des Principaux Produits Alimentaire ;In : « Microbiologie Alimentaire ,Techniques de Laboratoire ».Édition DUNOD.Paris.pp 147
- **Guiraud, J.P. (2003).**Microbiologie Alimentaire. Édition DUNOD .Paris .pp95, 138.

H

- **Hathroubi,S.,Tremblay,Y.D.N. ,Jacques,M.(2014).**Les Biofilms Bactériens :leur Importance en Santé Animale et en Santé Publique.The Canadian Journal of Veterinary Research.78,110-116.
- **Hayrapetyan,H.,Abee,T.,Groot,M.N.(2016).**Spore Dynamics and Spore Heat Resistance in Wet and Dry Biofilms of *Bacillus cereus*.Food Control.60,493-499.
- **Henrici,A.T.(1936).**Studies of Fresh Water Bacteria .Journal .Bacteriol, 32(3) ,265-280.

J

- **Jacques,M.,Aragon,V.,Tremblay,Y.D.N.(2010).**Biofilm Formation In Bacterial Pathogens of Veterinary Importance.Animals Health Research Reviews.11(2),97-121.
- **Jeanet ,R.,Croguennec.T.,Cérard.B.(2008).**Les Produits Laitiers. Édition Tec et Doc. Lavoisier.Paris.p06.
- **JORA N°069 1993 .**Arrêté interministériel de 27 Octobre 1993, Relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation .
- **JORA N°35 1998.**Arrêté interministériel de 23 Juillet 1994, Relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires.

K

- **Karunakaran,E., et Biggs,C.A.(2011).**Mechanisms of *Bacillus cereus* Biofilm Formation :an Investigation of the Physicochemical Characteristics of Cell Surfaces And Extracellular Proteins.Applied Microbial And cell Physiology.89,1161-1175.

- **Klavenes,A.,Stalheim,T.,Sjovold,O.,Josefsen,K.,Granum,P.E.(2002)** .Attachment of *Bacillus cereus* Spores With and Without Appendages to Stainless Steel Surfaces.Institution of Chimiical Engineers.80 ,312- 318 .
- **Kopaczewski,W.(1948)**.Etude Physico-Chimique Du Lait.Le Lait,INRA Edition,28(273-274), 114-141.

L

- **Laresn, H .D., Jorgensen,k.(1999)** .Growth of *Bacillus cereus* In Pasteurized Milk
- **Larpent ,J.P.(1997)**.Microbiologie Alimentaire -Technique de laboratoire. fermentés et fermentation alimentaire) Tome 2 . Edition Tec et Doc- Lavoisier .Paris.p704.
- **Larpent .J.P.(2000)**.Introduction à la Nouvelle Classification Bactérienne :les Principaux Groupes Bactériennes.Edition Tec et Doc- lavoisier.Paris.p180
- **Loliger.J .,Badoud ,R.,Bauer,WJ .,Etournaud.A .(2010)**.Science et technologie des aliments .Edition presses polytechniques et universitaires romandes.P82.
- **Luquet,F.M .(1990)** .Lait et Produit Laitiers.Edition Tec et Doc - Lavoisier.Paris .p116.

M

- **M'Boya, J.C., Broutin, C., Dudez, P. (2001)**.Le lait Pasteurisé.Agridoc « réseau d'information et de Documentation Financé Par Le Ministère Français des Affaires Etrangères ».p3.
- **Mahaut,M. ,Jeantet,R .,Schuck ,P .,Croguennec .T.,Brulé,G .(2000)**.Les Produit Industriels Laitiers .Edition Tec et Doc.Paris .p02 ,07,09,10.
- **Majed, R.,Faille,C.,Kallassy,M. ,Gohar ,M.(2016)**.*Bacillus cereus* Biofilms –Same,Only Different.Frontiers in Microbiology.7,1-16.
- **Monroe, D. (2007)**.Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms.PLOS Biology5.11, 307-310.
- **Multon , J .L.(1981)**. Technique D'analyse et De Contrôle Dans Les Industries Agro-alimentaire.EditionTec et Doc.Paris.pp145.

N

- **Narang,S.P.(2008)**.Food Mirobiology Méthods of Enumération .APH Publishing.pp71.
- **NF ISO 7932**. Microbiologie Des Aliments Directives Générale Pour le Dénombrement de Bacillus cereus-Méthode Par Comptage Des Colonies à 30°C.

O

- **Oosthuizen,M.C.,Steyn,B.,Theron,J.,Cosette,P.,Lindsay,D.,Holy,A.V.,Brozel,V.S.(2002).**Proteomic Analysis Reveals Differential Protein Expression by *Bacillus cereus* During Biofilm Formation.*Applied and Environmental Microbiology*.68(6),2770-2780.

P

- **Parkar,S.G.,Flint,S.H.,Brooks,J.D.(2004)** .Evaluation of The Effect of Cleaning Regimes on Biofilms of Thermophilic *Bacillus* on Stainless Steel.*Journal of applied microbiology*. 96,110-116.

R

- **Riel.R.(1985).**Dairy Science And Technology :Principles And Applications.Edition La Fondation de Technologie Laitiere Du QUEBEC INC.Canada,pp 6-7.
- **Roux,A.,et Chigo,G.M.(2006).**Les Biofilms Bactériens. Académie Vétérinaire de France .Tome 159-N°3 ,261-268.

S

- **Salustiano,V.C.,Andrade,N.J.,Soares,N.F.F.,Lima,J.C.,Bernardes,P.C.,Luiz,L.M.P.,Fernandes,P.E.(2009).**Contamination of Milk With *Bacillus cereus* By Post-Pasteurization Surface Exposure as Evaluated by Automated Ribotyping.*Food Control*,20,439-442.
- **Silva,H.O.,Lima,J.A.S,Aguilar,C.E.G.,Rossi,G.A.M.,Mathias,L.A.,Vidal,A.M.C.(2018)**).Efficiency of Different Disinfectants on *Bacillus cereus* Sensu Stricto Biofilms on Stainless –Steel Surfaces in Contact With Milk.*Frontiers in Microbiology* .9,1- 11.
- **Simoës,M.,Simoës,L.C.,Vieira,M.J.(2010)** .A review of Current and Emergent Biofilm Control Strategies.*LWT-food Sci-Technol*,43.573-583.
- **Sina,L.(1992).**Control de Qualité du Lait et Des Produits Laitiers Fabriquer Par Le SOCA.Thèse de Doctorat,Université Cheikh Anta Diop de DAKAR ,Sinigal,p6.
- **Svensson,B.,Eneroth,A.,Brendehaug,J.,Molin,G.,Christiansson,A.(2000).**Involvement of a Pasteurizer In The Contamination Of Milk by *Bacillus cereus* In A Commercial Dairy Plant.*Journal of Dairy Research*.67,455-460.

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.International Journal of Food Microbiology.110 ,254 –262.
- **Thieulin,G et Vuillaume,R(1967)**.Element Pratiques D'analyse et D'inspection Du Lait De Droduit Laitiers Et Des œufs.Revue Générale Des Questions Laitières 48 Avenue,Président Wilson,Paris.pp 71-73.

V

- **Vierling,E.(2003)**.Aliments Et Boissons : Filières Et Produits,2^{ème} édition .Doin Editeurs Centre Régional De La Documentation Pédagogique D'aquitaine .pp270.
- **Vignola ,C.L.(2002)**.Science Et Technologie Du Lait. Édition Presses International Polytechnique .p03, 04,21, 25, 26, 28,29.
- **Vilain, A.C. (2010)**.Qu'est ce que le lait ? What's Milk ?.Revue Française d'Allergologie, 50,124-127.

W

- **Watier,B.(1992)**.Vitamines Et Technologie Alimentaire In (Aspects Nutritionnels Des Constituants Des Aliments Influence Des Technologies).Edition Tec et Doc -lavoisier.Paris .p197.

Annexes

Annexe 1 :

Tableau : résultats des trois essayes et les moyennes du mesure de pH des différents échantillons du lait.

Echantillons	Sous échantillons	pH	pH moyenne	Ecart-type
II.X	1	6,92	6,9211111111111111	0,01
	2	6,91		
	3	6,93		
II.Y	1	6,91	6,905555555555556	0,007
	2	6,90		
	3	6,90		
II.Z	1	7,25	7,242222222222222	0,03
	2	7,23		
	3	7,24		
III.X	1	6,89	6,823333333333333	0,06
	2	6,81		
	3	6,71		
III.Y	1	6,89	6,906666666666667	0,02
	2	6,90		
	3	6,92		
III.Z	1	7,40	7,376666666666667	0,04
	2	7,39		
	3	7,34		

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

Echantillons	UFC/ml .10³ Dilution (10⁻¹)	UFC/ml .10³ Dilution (10⁻²)	UFC/ml .10³ Dilution (10⁻³)
I.X	1 ,24	5,21	24,66
II.X	1,87	12 ,88	111,16
III.X	3	22,03	153,16
I.Y	3,54	7,01	306,66
II.Y	1,10	7 ,25	51,66
III.Y	9,88	12,46	78,16
I.Z	1, 31	9,45	76,66
II.Z	1 ,91	8,80	95
III.Z	0,87	8,33	52 ,333

Tableau : résultats des trois essais de dénombrement des coliformes totaux sur le milieu VRBL des différents échantillons du lait.

Echantillons	UFC/ml .10³ Dilution (10⁻¹)	UFC/ml .10³ Dilution (10⁻²)	UFC/ml .10³ Dilution (10⁻³)
I.X	0	0	0
II.X	0	0	0
III.X	1	7 ,96	42,66
I.Y	0,86	6,50	52
II.Y	0,01	0	0
III.Y	0,11	1,50	5
I.Z	0,02	3 ,33	0
II.Z	0,04	0	0
III.Z	0,90	7,03	10

Tableau : résultats des trois essais de dénombrement des coliformes fécaux sur le milieu VRBL des différents échantillons du lait.

Echantillons	UFC/ml .10 ³ Dilution (10 ⁻¹)	UFC/ml .10 ³ Dilution (10 ⁻²)	UFC/ml .10 ³ Dilution (10 ⁻³)
I.X	0	0	0
II.X	0	0	0
III.X	1 ,31	9,53	62 , 33
I.Y	0	0	0
II.Y	0	0	0
III.Y	0	0	0
I.Z	0	0	0
II.Z	0	0	0
III.Z	0,21	0 ,66	0

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

Echantillons	UFC/ml.10 ³ Dilution 10 ⁻¹	UFC/ml.10 ³ Dilution 10 ⁻²
I.X	0	/
II.X	0,19	2,81
III.X	0,2	0 ,61
I.Y	0 ,21	/
II.Y	0,14	1,48
III.Y	0 ,11	0,41
I.Z	0	/
II.Z	0	0
III.Z	0	0

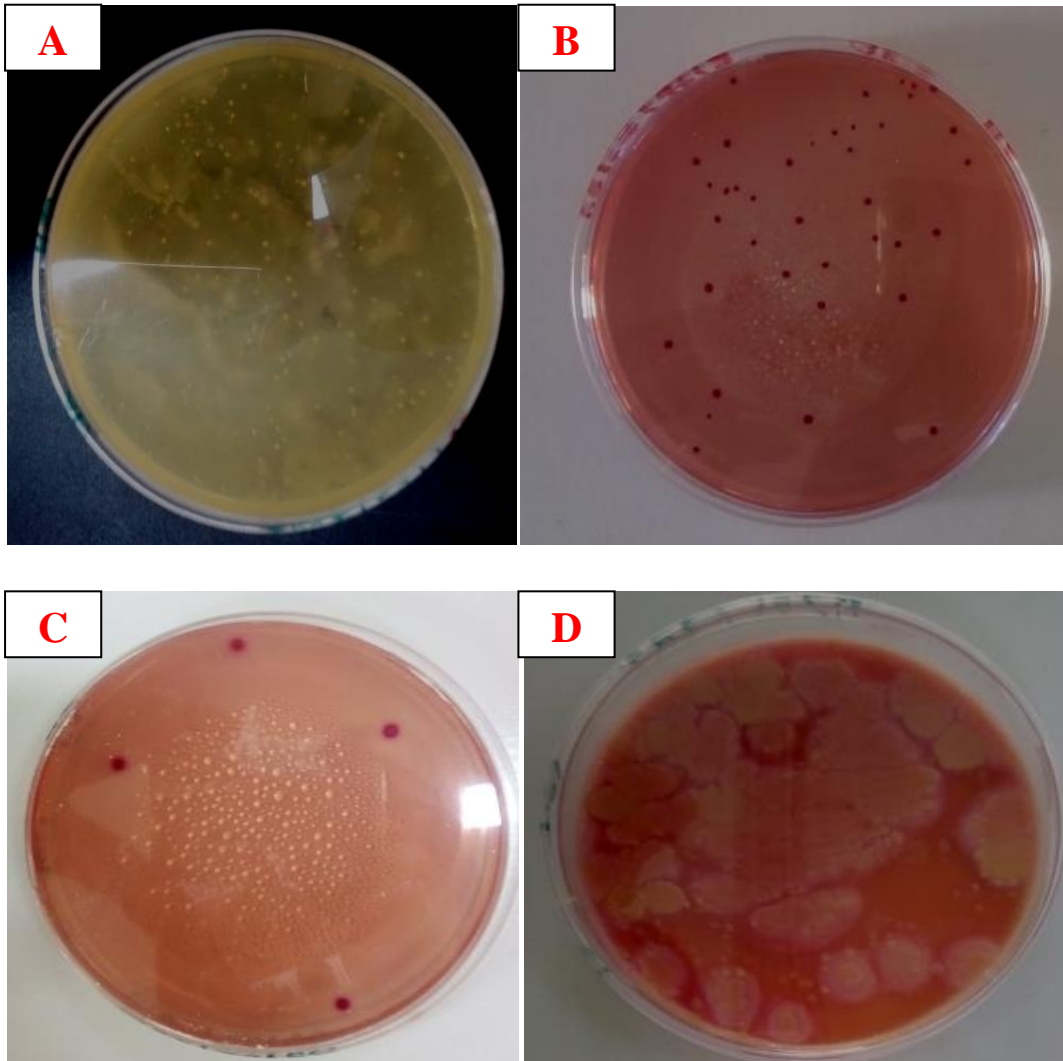
Résultats des colonies :

Figure : Photos de différents types de colonies

(A) colonies de la FMAT sur milieu PCA ;(B) colonies des coliformes totaux sur milieu VRBL ;(C) colonies des coliformes fécaux sur milieu VRBL et (D) colonies de Bacillus sur milieu Mossel.

Annexe 2 :

I-Matériels et produits utilisé

I-1.Matériels :

I-1.1 Appareillage :

- Plaque chauffante agit tante « Bio cote »
- Bain mari « MEMMERT »
- Autoclave
- Etuve (30 ; 37 ; 44 °C)
- Vortex « IKA »
- Bec benzène
- Balance « KERN PLS 360-3 »
- Compteur de colonies « BIOBLOCK »

I-1.2 Verrerie et petits matériels :

- Erlenmeyer « VWR brand » 200ml
- Pipettes pasteur « ISOLAB » 3ml
- Béchers
- Spatule
- Tubes à essai
- Flacons en verre de 250ml
- Entonnoir
- Boîtes de petri « STAIRWY » (Dia 90mm×15mm)
- Anse de platine
- Ecouvillon stérile

I-2. Produits :

I-2.1 Milieux de culture :

- ✓ La gélose PCA
- ✓ La gélose VRBL
- ✓ Milieu MOSSEL
- ✓ La gélose GN
- ✓ Diluant TSE

I-2.2 Réactives et produits chimiques :

Réactive :

- ✓ Kovacs
- ✓ VP1 + VP2
- ✓ TDA

Désinfectants :

- ✓ Eau de javel
- ✓ alcool

II – Composition des milieux de culture :

Gélose PCA :

Tryptone	5g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1g
Agar bactériologique	14 g
pH	7

Préparation : dissoudre 23.5g dans un litre d'eau distillé ; autoclaver pendant 15min à 121°C.

✚ Gélose VRBL :

Peptone	7g
Extrait de levure	3g
Sels biliaires	1,5g
Lactose	10g
Chlorure de sodium	5g
Rouge neutre	0.03g
Cristal violet	0.002g
Gélose	14g
Eau distillé	1000ml
pH	7,4

Préparation : dissoudre 40.5g dans un litre d'eau distillé ; autoclaver pendant 15min à 121°C.

✚ Milieu MOSSEL :

Extrait de viande	1g
Peptone	10g
Mannitol	10g
Chlorure de sodium	10g
Rouge de phénol	0,025g
Gélose	15g
Eau distillé	1000ml
pH	7,2

Autoclaver 15min à 120°C .ajouter à 900ml de milieu de base en surfusion ,100ml d'une émulsion stérile de jaune d'œuf à 20% et 10ml d'une solution de sulfate de poly myxine à 0.1%.

Gélose nutritive :

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Gélose	15g
Eau distillé	1000ml
pH	7,4

Tryptone –Sel Eau (TSE) :

Tryptone	1g
Chlorure de sodium	8.5g
Eau distillé	1000ml
pH	7

ملخص :

الحليب المبستر المصنوع من الحليب النقي أو الحليب المعاد تصنيعه هو الحليب المعالج حراريا الذي يدمر أكثر من 90% من البكتيريا الضارة في الحليب و من المعروف إن بكتيريا Sporiform التابعة لمجموعة *Bacillus cereus* تسبب مشاكل تدهور الغذاء و / أو الصحة بسبب قدرتها على تكوين biofilms و مقاومة البسترة في صناعة الألبان. أجريت هذه الدراسة للبحث عن *Bacillus cereus* في الحليب المبستر الذي يتم تسويقه في السوق المحلية، و تم اخذ ثلاثة أنواع من العينات للتحليل. بشكل عام، لم يتم تلوث سوى عيّنتين (X و Y) مع *Bacillus cereus* , *Bacillus coagulans* et *Bacillus lichinoformis* .

الكلمات المفتاحية: صناعة الألبان – الحليب المبستو- Biofilms - *Bacillus cereus* .

Résume :

Le lait pasteurisé fabriqué à partir de lait cru ou de lait reconstitué , est un lait qui à subi un traitement thermique qui détruit plus de 90 % de la flore contenu dans le lait Les bactéries sporiformes appartenant au groupe *Bacillus cereus* sont reconnues pour causer des problèmes de détérioration des aliments et/ou des problèmes sanitaires en raison de leur capacité à former des biofilms et à résister à la pasteurisation pratiquée dans les industries laitière . Cette étude à été réalisée dans le but de rechercher et dénombrer les *Bacillus cereus* dans le lait pasteurisé commercialisé dans le marché local, trois types d'échantillons ont été prélevées pour les analyses . Dans l'ensemble seuls deux échantillons (X et Y) sont contaminé par les *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus* , *Bacillus coagulans* et *Bacillus lichinoformis*).

Mots clé : Industrie laitière - Lait pasteurisé – Biofilms – *Bacillus cereus*.

Abstract :

Pasteurized milk made from raw milk or reconstituted milk is heat-treated milk that destroys more than 90% of the flora in the milk Sporiform bacteria belonging to the *Bacillus cereus* group are known to cause problems détérioration of food and / or health problems due to their ability to form bifilms and resist pasteurization in the dairy industry. This study was conducted to search and count *Bacillus cereus* in pasteurized milk marketed in the local market, three types of samples were taken for analysis. Overall only two samples (X and Y) are contaminated with *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* and *Bacillus lichinoformis*).

Keywords : Dairy industry - Pasteurized milk - Biofilms - *Bacillus cereus*.