

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Telidji
Laghouat
Faculté des science
Département de Biologie



Projet de Fin d'Etudes

**Pour l'obtention du diplôme de Master en : Microbiologie
Appliquée**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème :

*Survival and Biofilm Formation of Psychrotolerant
Bacteria under Variable Temperature and pH in Dairy
Products: Implications for Food Safety*

Présenté par :

- NOUAI Chaima
- MIHOUBI Fatma zohra
- RAHMOUNE Aya

Devant le jury composé de :

- **Présidente** Dr. El houiti Fatiha
- **Examineur** Dr. Messaoudi Omar
- **Encadrant** Dr. Benamar Ibrahim

Année Universitaire : 2024/2025

Résumé

Cette étude appliquée vise à évaluer la présence de la flore psychrophile et psychrotrophe dans trois produits laitiers couramment consommés en Algérie : le lait pasteurisé, le yaourt nature et le fromage frais, tout en explorant leurs caractéristiques physiologiques et enzymatiques susceptibles d'influencer la qualité et la sécurité de ces produits pendant le stockage à froid. Le travail repose sur l'isolement et l'identification de ces micro-organismes, l'évaluation de leur activité enzymatique (amylase, lipase, protéase), ainsi que leur capacité à former des biofilms, en parallèle avec l'estimation de leur impact sur la durée de conservation du lait à l'aide d'outils de prédiction microbiologique.

Au total, 27 échantillons (9 de chaque type de produit) ont été collectés sur les marchés locaux de Laghouat, en Algérie. Après incubation à $4 \pm 1^\circ\text{C}$, les souches isolées ont été purifiées et soumises à diverses analyses microbiologiques et biochimiques, notamment la coloration de Gram, la mobilité, le test TSI et la fermentation du mannitol. L'activité enzymatique a été évaluée sur des milieux spécifiques, et la capacité à produire des biofilms a été mesurée à l'aide de plaques en PVC.

Les résultats ont montré que plusieurs souches présentaient une activité enzymatique notable à froid et une capacité variable à former des biofilms, soulignant leur rôle dans l'altération des produits laitiers et la réduction de leur durée de conservation, même à basse température. L'étude montre que la température et le pH influencent fortement la stabilité du lait pasteurisé. *Pseudomonas* se développe rapidement à froid, causant une altération dès 4°C , tandis que *Bacillus* devient critique au-delà de 8°C en raison de la germination de ses spores. L'acidification à pH 6.0 réduit leur activité, suggérant des stratégies de contrôle ciblées : refroidissement rapide pour *Pseudomonas* et acidification modérée pour *Bacillus*. L'étude recommande de renforcer les systèmes de surveillance dans les unités de production laitière et d'adopter des mesures de prévention ciblées pour limiter l'impact de cette flore.

Mots-clés :

Flore psychrophile, produits laitiers, activité enzymatique, biofilms, stockage à froid, prédiction microbiologique.

Abstract

This applied study aims to assess the presence of psychrophilic and psychrotrophic flora in three commonly consumed dairy products in Algeria—pasteurized milk, plain yogurt, and fresh cheese—and to explore their physiological and enzymatic characteristics that may affect product quality and safety during cold storage. The research involved isolating and identifying cold-tolerant microorganisms from these products, evaluating their enzymatic activity (amylase, lipase, and protease) at different temperatures, and investigating their ability to form biofilms, while also estimating their impact on milk shelf life through microbial prediction tools.

To achieve these goals, 27 samples (9 from each product type) were collected from local markets in Laghouat, Algeria. After incubation at $4 \pm 1^\circ\text{C}$, isolates were purified and subjected to a series of microbiological and biochemical tests, including Gram staining, motility, triple sugar iron (TSI), and mannitol fermentation. Enzymatic activity was assessed using specific differential media, and biofilm-forming potential was evaluated using PVC microplate assays.

The results revealed that several strains exhibited notable cold-active enzymatic activity and variable abilities to form biofilms, suggesting their significant role in accelerating spoilage and reducing shelf life even under refrigeration conditions. This study shows that temperature and pH significantly affect pasteurized milk stability. *Pseudomonas* grows rapidly even at 4°C , while *Bacillus* becomes critical above 8°C due to spore germination. Acidifying milk to pH 6.0 reduces their activity, supporting targeted control strategies: rapid cooling for *Pseudomonas* and moderate acidification for *Bacillus*. Based on these findings, the study highlights the need for improved monitoring systems in dairy production environments and encourages the adoption of targeted hygienic and preservation strategies to limit the impact of these microorganisms.

Keywords:

Psychrophilic flora, dairy products, enzymatic activity, biofilms, cold storage, microbial shelf-life prediction.

الملخص

تهدف هذه الدراسة التطبيقية إلى تقييم وجود البكتيريا البردية (المحبة للبرودة والمتحملة للبرودة) في ثلاثة منتجات لبنية شائعة في السوق المحلي، وهي الحليب المبستر، الياغورت الطبيعي، والجبن الطازج، وتحليل خصائصها الفيزيولوجية والإنزيمية التي قد تؤثر على جودة وسلامة هذه المنتجات أثناء التخزين البارد. تم تنفيذ العمل انطلاقاً من الكشف عن هذه الكائنات الدقيقة في المنتجات المذكورة وعزلها، ثم توصيفها من حيث نشاطها الإنزيمي (أميلاز، ليباز، بروتياز) في درجات حرارة مختلفة وقدرتها على تشكيل الأغشية الحيوية (biofilms)، مع تقدير تأثير وجودها على العمر التخزيني للحليب باستخدام أدوات النمذجة و التنبؤ الميكروبيولوجي.

لتحقيق هذه الأهداف، تم جمع 27 عينة (9 عينات من كل منتج) من الأسواق المحلية بمدينة الأغواط، الجزائر. خضعت العينات لتحاليل دقيقة بعد الحضانة في ظروف تبريد عند $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ، حيث تم عزل السلالات وتنقيتها ثم توصيفها باستخدام تقنيات مجهرية (صبغة غرام)، واختبارات حيوية كاختبار الحركة، TSI، وتخمير Mannitol. كما تم تقييم نشاطها الإنزيمي باستخدام أوساط خاصة، واختبار قدرتها على تكوين البيوفيلم باستعمال ألواح PVC.

كشفت النتائج أن عدداً مهماً من السلالات أظهر نشاطاً إنزيمياً واضحاً تحت ظروف البرودة، إلى جانب قدرة متفاوتة على إنتاج الأغشية الحيوية، ما يشير إلى دور هذه الكائنات في تسريع تدهور المنتجات اللبنية وتقليص مدة صلاحيتها حتى في ظروف التبريد. تُظهر هذه الدراسة التأثير المشترك لدرجة الحرارة ودرجة الحموضة على استقرار الحليب المبستر. أظهرت *Pseudomonas* قدرة عالية على النمو عند درجات حرارة منخفضة (من 4 درجات مئوية)، مما يساهم في تلف الحليب بشكل مبكر. أما *Bacillus*، فتصبح أكثر نشاطاً فوق 8 درجات مئوية نتيجة تحوّل الأبواغ إلى خلايا نشطة. كما أدى خفض درجة الحموضة إلى 6.0 إلى إطالة مدة الحفظ بشكل واضح. توصي الدراسة باستراتيجيات تحكم مختلفة: التبريد السريع لمواجهة البكتيريا الزائفة، والتحميض المعتدل للحد من نمو العسويات توصي الدراسة بأهمية تحسين نظم التخزين والمراقبة الدقيقة لهذه البكتيريا في وحدات الإنتاج الغذائية.

الكلمات المفتاحية:

الفلورا البردية، منتجات الألبان، النشاط الإنزيمي، الأغشية الحيوية، الحفظ البارد، التنبؤ الميكروبيولوجي.

Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions ALLAH, le Tout-Puissant, de nous avoir guidés tout au long de notre vie, au fil de toutes ces années d'études, et de nous avoir donné la foi et la volonté nécessaires pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier tout d'abord notre enseignant, Monsieur Benamar Ibrahim, pour sa patience, sa confiance, ses remarques et ses conseils, ainsi que pour sa disponibilité et sa bienveillance.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude.

Un grand merci s'adresse également à Mr Messaoudi d'avoir accepté de présider le jury de ce travail, et Mme Elhouiti d'avoir accepté de l'examiner.

Nous tenons également à remercier chaleureusement les membres du laboratoire, en particulier Mademoiselle Zegrir Anfal, Mademoiselle Ghommid Sirine et Monsieur Benamor Mohamed Samer Jehid, pour leur aide précieuse, leur soutien technique et leur bonne humeur qui ont rendu notre travail plus agréable.

Enfin, nous exprimons notre reconnaissance à Madame Sersaq Talya pour son assistance et sa gentillesse.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui nous ont accompagnées et soutenues tout au long de la réalisation de notre mémoire.

اهداء

ما سلكنا البدايات الا بتسييره و ما بلغنا النهايات الا بتوفيقه و ما حققنا الغايات الا بفضلہ

فالحمد لله الذي وفقني لتتمين هذه الخطوة في مسيرتنا الدراسية

"الى من بلغ الرسالة و ادى الامانة" سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم

الى إخوتنا الصامدين في فلسطين الأبية، وفي غزة العزة، حيث البطولة تكتب بالدم والصبر، نُهدي دعواتنا الصادقة وأرواحنا المتضامنة.
أتم في القلب والضمير، وما النصر إلا وعد الله القريب

الى والديّ الكريمين،

مصدر فخري، وسندي بعد الله، وقرّة عيني وجنة قلبي

قدوتي في الحياة، وسبب ما وصلت إليه اليوم

الى خالتي الغالية،

رحلت عن الدنيا، لكن حبك، وابتسامتك، وطيبة قلبك ما زالت ترافقتي.

رحمك الله، وجعل الجنة دارك ومأواك

. الى اخوتي الاعزاء بلال . رايح . زهرة . نسيمه و بناتي اخي سيرين فرحتنا الاولى ورغد سر سعادتني اتم السند و الدعم

حفظكم الله ورعاكم.

الى صديقتي فاطمة الزهراء و اية الدين جعلوا هذه الرحلة أكثر متعة و اقل صعوبة

شكرا لكل الذكريات الجميلة التي صنعناها معا

{ فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا }

بعد كل تعبٍ وسهر، جاء اليسر بحمد الله. وبدعمكم وتشجيعكم، أهديك ثمرة جهدي المتواضعة، عرفانا بجميلكم، وتقديرا لعطائكم

شيء



إهداء

بكل الحب والامتنان، أهدي هذا العمل لوالديّ الحبيبين، اللذين كانا دائماً مصدر قوتي وتشجيعي، وأدعو الله أن يحفظهما ويرزقهما الصحة والعافية.

إلى أخواتي الغاليات خولة، سلمى، هالة، وأولادهن من إيمان إلى فردوس، وإلى إخوتي عبد الله وعاصم جنود الخفاء وسندي في كل خطوة لكم مني كل الشكر والتقدير.

وإلى زميلتي وصديقتي شيماء وأية، شكراً على كل لحظة تعاون وضحك ومثابرة، كنتم خير رفقة في هذا العمل.

فاطمة الزهراء

إهداء

الحمد لله أولاً وخيراً، على توفيقه وكرمه، وعلى القوة والصبر التي منحني إياها في كل خطوة. وأشهد أن لا إله إلا الله، وأسلم وأصلي على

سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم، المعلم القدوة ونور الهداية

لبي أبي الطيب، أحسنت تزييتي وورعيت مشاعري، وجعلتني في بيت قلبك مكرمة

ولبي وهي الجميلة، يا قلباً لا يكف، وصبراً لا ينفد، ووعاءً يسندني، وكل الخير، هذا نجا حكماً وشكراً لكما من أعماق القلب على كل وعم

ومحبة وتضحيات لا تعد ولا تحصى

لبي إخوتي عبد الرحيم وسندس وصغيري عبد الووود، أتمم رفقاء الدرب وشركاء الفرح، وجودكم هو العون الذي أرتكز عليه

ولبي صديقتي الأقرب، وعاء، التي وقفت بجانبني بصدق ووفاء، ممتنة لوجودك الدائم

ولبي شيماء وفاطمة الزهراء، شكراً لقلوبكما النقية ولمشاركتكما لحظاتي الجميلة

وأسأل الله أن يجعل هذا التخرج بديعة طوبى مبارك، يحمل لي الخير والنور فيما هو قادم، ويجعله ثمرة تعب من لا يضع أجر من

وحسن عملاً

آية

Liste des abréviations

FIL : Fédération Internationale Laitière

CSP : Protéines de choc froid

CSD : Domaine de choc froid

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

AFP : Protéines antigél

TH : Hystérésis thermique

IRI : Inhibition la recristallisation de la glace

SS : Acier inoxydable

MEB : Microscopie électronique à balayage

MEC : Matrice extracellulaire polymérique

pH : Potentiel d'Hydrogène

ECM : Matrice extra-cellulaire

MAP : Emballage atmosphérique modifié

UHT : Ultra haute température

HPP : Traitement à haute pression

AMP : Peptides antimicrobiens

LO : Lactase oxydase

HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Points

BPH : Bonnes Pratiques d'Hygiène

CCP : Déterminer les points critiques pour la maîtrise

ISO : International organization for standardization

FSSC : Food Safety System Certification

IFS : International Food Standard

BRC: British Retail Consortium

DLC : Date limite de consommation

Table des matières

Résumé
Introduction	1
1. Le lait et les produits laitiers	4
1.1 Généralités sur le lait	4
1.2. Composition du Lait.....	4
2. Les principaux produits à base de lait	5
2.1 Yaourt.....	5
2.2 Fromages	5
3 La microbiologie du lait.....	6
3.1 Caractéristiques microbiologiques	6
3.1.1 Flore indigène	6
3.1.2 Flore originelle.....	6
3.1.2.1. Bactéries lactiques.....	7
3.1.3 Flore de contamination	7
3.2 Psychrotrophes	7
4 Mécanismes d'adaptation au froid.	10
4.1. Les protéines de choc froid.....	10
4.2. La fluidité membranaire.....	11
4.3 Les protéines antigél.....	12
4.4. Les enzymes actives au froid	13
a) Les lipases	13
b) Les protéases	14
c) Les α -amylases	15
5. La virulence des bactéries psychrotrophes.....	17
5.1. La capacité de production de biofilms pour l'industrie laitière.....	17
5.1.1. Définitions des biofilms	17
5.1.2. Mécanisme de formation du biofilm.....	18
5.1.3. Facteurs influençant la formation de biofilm	19
5.1.4. Rôle du biofilm sur les microorganismes	19
5.2. Résistance aux antibiotiques	20
5.3. Production des métabolites toxiques	20
6. Détérioration.....	21
6.1. Causes de la détérioration du lait et des produits laitiers	21

6.1.1-Contamination croisée	22
6.1.1.1. Équipement et environnement	22
6.1.1.2. Pratiques de manipulation	22
6.1.2 Traitements thermiques retardés.....	22
6.2 Formes de détérioration microbienne	23
7 .Stratégies de Contrôle des Bactéries Psychrotrophes dans le Lait ..	27
7.1 Système de management de la sécurité sanitaire.....	28
7.1.1 Outils de management de la sécurité sanitaire destinés aux professionnel	28
7.1.1.1 Les Bonnes pratiques d'hygiène (BPH).....	28
7.1.1.2 HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point).....	29
7.1.1.3 ISO 22000	30
7.1.1.4 FSSC 22000	30
7.1.1.5 IFS et BRC	30
7.2 Evaluation des risques	30
7.2.1 Identification des dangers.....	31
7.2.2 Caractérisation du danger	31
7.2.3 Evaluation de l'exposition.....	31
7.2.4 Caractérisation du risque	32
Matériel et méthodes.....	33
1.Collecte des échantillons	33
2.Etude physico-chimiques	33
2.1 Mesure de pH	33
2.2 Mesure de température.....	34
3.Isolement et purification des bactéries psychrophiles / psychrotrophes	34
4.Identification des isolats.....	35
4.1 Examen macroscopique.....	35
4.2 Examen microscopique par coloration de Gram.....	36
5.Identification biochimique	37
5.1 Fermentation de Mannitol et mobilité.....	37
5.2 Le milieu TSI	37
5.3 Le test catalase.....	38
5.4 Les plaque API 20 ^E	38
6.Activités enzymatiques.....	39
7. Évaluation de la capacité des isolats à former un biofilm.....	39

7.1. Origine des souches.....	39
7.2. Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par les microplaques de titration à 96 puits en Polychlorure de Vinyle (PVC).....	40
7.2.1. Principe de la technique.....	40
7.2.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	40
7.2.3. Protocole de la caractérisation de la formation de biofilm par les microplaques de titration.....	40
7.3. Lecture.....	41
8. Analyse statistique et modélisation de la durée de conservation.....	41
Résultats et discussion	44
1.Détection et identification des isolats.....	44
1.1 Identification macroscopique.....	45
1.2 Identification microscopique	46
1.3 Identification biochimique	47
1.3.1 Milieu mannitol mobilité.....	46
1.3.2 Milieu TSI.....	51
1.3.3 Le Test catalase	52
1.3.4 Les plaques API 20 E.....	54
2.Dépistage de la production d'enzymes extracellulaires.....	61
3.Évaluation de la formation de biofilm	64
4. Influence de la température sur la durée de conservation du lait.....	65
5. Impact du pH sur la durée de conservation (Température = 4°C).....	66
6. Interaction température-pH et implications pratiques.....	68
Conclusion et perspectives.....	69
Annexes	81
Références.....	72

Liste des figures

Figure 1 : Profils de croissance typiques selon la température pour les bactéries psychrophiles, psychrotrophes, mésophiles et thermophiles (Knight, 2015).	8
Figure 2 : L'activité de l'ARNm avec et sans les Csp à 16-23°C (Higuchi et al., 2020).	10
Figure 3 : Amélioration de la fluidité membranaire par des queues d'hydrocarbures insaturés(Battistuzzi et al., 2004).	11
Figure 4 : Diversité structurale des protéines antigel bactériennes: (G) la structure du MpAFP de <i>Ma-rinomonas primoryensis</i> ; (J) la structure du FfIBP de <i>Flavobacterium frigidis</i> PS I; et (K) la structure du ColAFP de <i>Colwellia</i> sp.souche SLW05 (Kim et coll., 2020).	12
Figure 5 : Modèle 3D de lipase GDSL (Kumar et al., 2020).	15
Figure 6 : (a) Structure de la protéase alcaline active à froid (Apr-BO1) (Farooq et al., 2021).	15
Figure 7 : Structure de l' α -amylase (Monteiro De Souza, 2010).	16
Figure 8 : Microscopie électronique à balayage (MEB) biofilm de <i>L. monocytogenes</i> Rayé sur la surface du couvercle inférieur du lait (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).	17
Figure 9 : Phases au cours des quelles les bactéries forment des biofilms dans le lactosérum laitier système de traitement (Hebishy et al., 2024).	19
Figure 10 : Types de détérioration du lait et des produits laitiers(Saha et al., 2024).	21
Figure 11 : Sources de contamination microbienne du lait à la ferme laitière (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).	25
Figure 12 : La mesure du PH du fromage, du yaourt et du lait (photographie prise au laboratoire).	33
Figure 13 : La mesure de la température du fromage, du yaourt et du lait (photographie prise au laboratoire).	34
Figure 14 : préparation de solution mère (photographie prise au laboratoire).	35
Figure 15 : Isolement des souches bactériennes sur les milieux de culture GN (photographie prise au laboratoire).	35
Figure 16 : purification des souches bactériennes sur le milieu GN (photographie prise au laboratoire).	35
Figure 17 : Les étapes de la méthode de coloration de gram (photographie prise au laboratoire).	37
Figure 18 : Ensemencement des tubes Mannitol-mobilité (photographie prise au laboratoire).	38
Figure 19 : Ensemencement des tubes TSI (photographie prise au laboratoire).	38
Figure 20 : La détection des souches bactériennes à l'aide de la galerie API 20 E(photographie prise au laboratoire).	39
Figure 21 : Ensemencement des boîtes de l'activité enzymatique (photographie prise au laboratoire).	40
Figure 22 : Les microplaques de titration (photographie prise au laboratoire).	42
Figure 23 : L'examen macroscopique nous montre la diversité bactérienne dans les échantillons du lait, du fromage et du yaourt (photographie prise au laboratoire).	45
Figure 24 : classification des bactéries psychrotrophes dans l'ensemble des prélèvements liés à leur résultat de la coloration de Gram.	46
Figure 25 : classification des bactéries psychrotrophes dans l'ensemble des prélèvements liés à leur forme microscopique après coloration de Gram..	46

Figure 26 : Diversité phénotypique significative observée parmi les souches bactériennes, notamment en ce qui concerne leur mobilité et leur capacité à fermenter le mannitol.	49
Figure 27 : Profils métaboliques variés observés chez les souches bactériennes isolées, révélés par le test sur milieu TSI.	51
Figure 28 : Profil biochimique obtenu à l'aide de la galerie API 20 E pour l'identification de souches bactériennes isolées du lait cru et de produits laitiers.	54
Figure 29 : Diversité des activités hydrolytiques extracellulaires (Amylases , protéases, lécithinases, lipases) illustrée par la formation de zones claires autour des colonies de bactéries isolées du lait cru et de produits laitiers.	55
Figure 30 : Absence d'activités hydrolytiques extracellulaires (Amylases,protéases, lécithinases, lipases), mise en évidence par l'absence de halos autour des colonies bactériennes isolées du lait cru et de produits laitiers.	55
Figure 31 : Répartition relative (%) de la production enzymatique des différentes souches bactériennes psychrophiles (croissance à 4 °C), psychrotrophes incubées à 4 °C et psychrotrophes incubées à 37 °C pour quatre types d'enzymes : protéases, lécithinases, lip	56
Figure 32 : profil enzymatique des souches .	57
Figure 33 : classification des bactéries psychrotrophes testées liés à leur capacité de former des biofilms à 37°C pendant 96h.	62
Figure 34 : classification des bactéries psychrotrophes testées liés à leur capacité de former des biofilms à une température comprise entre 4 et 7 °C pendant 96h.	63
Figure 35 : Impact de la température sur la durée de conservation du lait.	65
Figure 36 : : Impact du pH sur la durée de conservation du lait.	66
Figure 37 : Influence de la température et pH sur la croissance des bactéries psychrotrophes dans le lait.	67
Figure 38 : Évaluation du risque d'altération microbienne en fonction de la température et du pH chez Bacillus psychrotrophes et Pseudomonas.	67
Figure 39 : Impact combiné de la température et du pH sur la durée de conservation du lait.	68

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition générale du lait de vache (Pougheon & Goursaud, 2001).	4
Tableau 2 : La composition de la flore originelle du lait cru (Vignola, 2002)	6
Tableau 3 : Bactéries psychrotrophes trouvées dans le lait cru de vache (Sørhaug et Stepaniak, 1997)	8
Tableau 4 : Types de détérioration microbienne dans le lait et les produits laitiers (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).	23
Tableau 5 : Microorganismes pathogènes associés au lait cru et aux maladies qu'ils causent (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024)	25
Tableau 6 : Identification préliminaire des souches isolées à l'aide des galeries API 20	56



Introduction

La consommation de lait connaît une hausse significative à l'échelle mondiale, d'environ +1,7 % par an au cours des dix dernières années (Vettoretti Alice, 2024). Le secteur du lait et des produits laitiers est une composante essentielle de l'industrie agroalimentaire, ayant généré un chiffre d'affaires mondial dépassant les 871 milliards de dollars en 2021. Les produits laitiers comprennent tous les articles issus de l'industrie laitière, qui transforme le yaourt, le fromage, la crème glacée, le beurre, ainsi que le lait en poudre. En outre, la demande en lait et en produits laitiers a fortement progressé au cours des dernières décennies, principalement en raison de l'augmentation de la population. En conséquence, l'offre a élargi ses parts de marché (Maxime Gautier, 2023). D'après les statistiques divulguées par la Fédération internationale du lait, la production mondiale de lait a atteint 864 millions de tonnes en 2018. Une proportion significative de ce volume, soit 704 Mt (81 %), était composée de lait de vache. Le lait de bufflonne représentait 126 millions de tonnes, soit 15 %, tandis que les 4 % restants provenaient du lait de chèvre, de brebis et d'autres espèces (Ricardo Vargas, 2020). Selon l'OCDE/FAO (2019), la production mondiale de lait devrait connaître une hausse annuelle de 1,7 % pour atteindre 981 millions de tonnes d'ici 2028. Cette croissance est plus rapide que celle de la majorité des autres produits agricoles fondamentaux.

Le lait est une source importante de nutrition grâce à sa grande valeur nutritive (Shagun Sachan et al., 2022). Sa composition riche le classe comme un excellent milieu de croissance pour les microorganismes, à condition que la température soit appropriée. S'il est produit de manière non hygiénique et manipulé avec négligence, le lait peut être contaminé très facilement (Shagun Sachan et al., 2022). Une fois sécrété par la mamelle, il peut être exposé à diverses sources de contamination, notamment l'air, le sol, l'eau, les équipements, la peau des animaux et même les êtres humains. Un élément crucial influençant la sûreté du lait est l'hygiène lors de la traite qui, si elle n'est pas optimale, entraîne une dégradation prématurée du produit (Owusu-Kwarteng et al., 2020). Cependant, la présence possible de pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. ou *Escherichia coli* représente un risque sanitaire majeur (ICMSF, 2011). La maîtrise de la microbiologie du lait repose sur un contrôle rigoureux des conditions d'hygiène lors de la traite, du transport et du stockage, ainsi que sur l'application de traitements thermiques adaptés, notamment la pasteurisation, qui permet de réduire significativement la charge microbienne tout en préservant les qualités nutritionnelles du lait (FAO/OMS, 2019).

En termes de qualité microbiologique du lait, la présence élevée de bactéries mésophiles est souvent le signe d'un traitement thermique inefficace ou d'une contamination post-traitement. Ces bactéries, qui se développent à des températures modérées (20–45 °C), sont couramment utilisées comme indicateurs d'hygiène et d'efficacité du procédé de pasteurisation. D'un autre côté, les bactéries psychrophiles, capables de se multiplier à basse température (0–15 °C), représentent une menace importante durant la conservation du lait réfrigéré. Leur activité enzymatique peut altérer les propriétés organoleptiques du lait (goût, texture, odeur), même à des charges microbiennes faibles. Malgré cela, les données scientifiques spécifiques sur le comportement des bactéries psychrophiles dans le lait restent limitées, ce qui rend leur impact sur la qualité difficile à évaluer avec précision. Il est donc essentiel de mieux comprendre leur rôle potentiel pour garantir à la fois la sécurité alimentaire et la stabilité technologique du lait (Vasavada, 2003).

Connu dans la littérature, de nombreuses bactéries psychrophiles et psychrotrophes présentent une activité enzymatique significative, ce qui influence la qualité et la sécurité des produits laitiers. Ces micro-organismes, capables de se développer à basse température, peuvent produire des enzymes telles que des protéases et des lipases qui dégradent les protéines et les lipides du lait, entraînant des altérations organoleptiques et une réduction de la durée de conservation (Jay et al., 2005). De plus, certaines de ces bactéries peuvent être thermorésistantes, c'est-à-dire capables de provoquer des altérations même après des traitements thermiques classiques, ce qui complique la maîtrise microbiologique du lait frais et des produits dérivés (ICMSF, 2011). La détection et la caractérisation enzymatique de ces bactéries psychrotrophes sont donc essentielles pour assurer un contrôle rigoureux, notamment grâce aux avancées en microbiologie moléculaire qui permettent une identification rapide et précise des contaminants (Quigley et al., 2013). Cette vigilance est cruciale pour garantir la sécurité sanitaire des produits laitiers, en particulier face à la demande croissante et aux exigences élevées des consommateurs (Vettoretti, 2024).

L'objectif principal de notre travail vise à mettre en évidence la flore psychrophile, très peu étudiée en Algérie et à l'échelle mondiale, en se concentrant sur son étude dans le lait, le fromage frais et le yaourt. Le premier objectif vise la détection de ces microorganismes pour identification. Le deuxième objectif s'intéresse également à la caractérisation de cette flore sur son pouvoir enzymatique et sur sa capacité à former des biofilms, afin de mieux comprendre ses mécanismes d'adaptation d'une part, et évaluer son impact possible sur la qualité et la

sécurité des produits laitiers d'autre part. Le dernier objectif est d'estimer l'impact de la flore psychrophile sur la durée de vie du lait selon les conditions enregistrées et observées, grâce à l'application des outils de la microbiologie prévisionnelle.

Ce travail s'articule selon une démarche rigoureuse respectant les règles scientifiques. Il débute par une synthèse bibliographique permettant de situer le cadre théorique et d'identifier les problématiques. La partie suivante présente le matériel et les méthodes, avec une description détaillée des protocoles expérimentaux mis en œuvre. Les résultats obtenus sont ensuite exposés de manière précise et objective. Enfin, ces résultats sont discutés, ce qui ouvre des perspectives pour des travaux futurs proches et complémentaires.



**Recherche
bibliographique**

1. Le lait et les produits laitiers

1.1 Généralités sur le lait

Le lait représente le premier aliment que nous consommons dès notre naissance. Il a une importance cruciale dans notre alimentation quotidienne, étant souvent consommé sous forme de lait de consommation, de divers produits laitiers, ou encore intégré dans de nombreuses préparations alimentaires comme les conserves, les glaces et les plats cuisinés. Grâce à sa composition équilibrée en nutriments essentiels, incluant des protéines, des lipides, des minéraux et des glucides, ainsi qu'à sa richesse en protéines animales de qualité (Cayot & Lorient, 1998).

Le lait est un aliment extrêmement riche sur le plan nutritionnel, fournissant une alimentation quasi complète. Il est composé de protéines contenant des acides aminés essentiels et de minéraux importants, présents en quantités adaptées pour favoriser la croissance et la division cellulaire. En termes de calories, un litre de lait offre environ 2720 kJ. Le lait est reconnu comme l'un des rares aliments complets, intégrant près de 55 nutriments essentiels. Cela lui confère une haute densité nutritionnelle, caractérisée par : Une excellente source de calcium, un bon apport en vitamines, une source significative de protéines, des lipides et une richesse en phosphore (Jeantet, Brulé, & Delaplace, 2011).

1.2. Composition du Lait

Le tableau 1, présente la composition générale du lait de vache, qui peut varier en fonction de plusieurs facteurs liés aux animaux. Les principaux éléments constitutifs du lait, classés par ordre croissant (Tableau n°01) (Pougheon & Goursaud, 2001).

Tableau 1 :

Composition générale du lait de vache (Pougheon & Goursaud, 2001).

Constituant majeur	Variations limites (%)	Valeur moyenne (%)
Eau	85,5- 89,5	87.5
Matière grasse	2,4- 5,5	3,7
Protéines	2,9- 5,0	3,2
Glucides	3,6- 5,5	4,6
Minéraux	0,7- 0,9	0,8

2. Les principaux produits à base de lait

2.1 Yaourt

Le yaourt est classé parmi les laits fermentés, qui se forment grâce à l'action de bactéries lactiques thermophiles. Selon la Fédération Internationale Laitière (FIL), le yaourt est produit par la fermentation de deux types spécifiques de bactéries : *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèce *bulgaricus* (un bacille gram positif, immobile et asporulé, avec une température optimale de croissance autour de 42°C) et *Streptococcus thermophilus* (un cocci gram positif, anaérobie facultatif, résistant à des températures allant jusqu'à 60°C pendant 30 minutes). Ces bactéries doivent être inoculées en même temps et doivent rester vivantes dans le produit final. (ANONYME, 1995, Ministère de l'Économie et des Finances, 2009, Tamime & Deeth, 1980).

Les noms utilisés pour désigner le yaourt varient selon les langues, les plus fréquents étant "yoghurt", "yogourt" et "yaourt". La FIL précise que le produit doit contenir au minimum 10^7 bactéries vivantes par gramme de lait jusqu'à la date limite de consommation. La flore lactique doit rester viable durant toute la durée de conservation du yaourt.

2.2 Fromages

Selon le Codex Alimentarius, le fromage est un produit laitier qui peut être mûr ou non et qui se décline en différentes textures, de molle à dure. La coagulation du lait, qu'il soit sous forme de lait entier, de lait écrémé, de crème ou de babeurre, est cruciale pour l'obtention du fromage. Cette coagulation peut être obtenue en utilisant de la présure ou d'autres coagulants, suivi d'un égouttage du lactosérum (Codex Alimentarius, 2006). La production de fromage repose sur l'agrégation des protéines du lait (caséine principalement), qui piègent d'autres composants. Ce processus aboutit à la formation d'une masse de caillé qui est ensuite moulée. C'est à ce stade que se produit l'élimination de la phase liquide constituée d'eau et de substances solubles. Les principales étapes de fabrication comprennent la coagulation du lait pour former un gel de caséine, puis l'égouttage, la déshydratation partielle de ce gel pour obtenir du caillé, et enfin l'ajout de sel. Le fromage frais passe uniquement par ces étapes, tandis que le fromage affiné passe également par le processus d'affinage (Luquet, 1990).

3. La microbiologie du lait

3.1 Caractéristiques microbiologiques

Le lait, même lorsqu'il est obtenu dans des conditions d'hygiène rigoureuses, contient une multitude de micro-organismes. Ces micro-organismes prospèrent particulièrement en raison de la température élevée du lait ainsi que de sa richesse en eau et en glucides (Fredot, 2016).

Les micro-organismes présents dans le lait se divisent en plusieurs catégories principales selon leur importance :

3.1.1 Flore indigène

La flore indigène du lait cru est constituée des micro-organismes naturellement présents dans le lait juste après la traite, avec une charge microbienne faible, souvent inférieure à 10^3 ufc/ml. Elle est principalement composée de bactéries saprophytes comme *Micrococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*, qui jouent un rôle protecteur en limitant la prolifération des bactéries pathogènes grâce à des agents inhibiteurs naturels tels que les lacténines. Cette flore est essentielle pour la qualité microbiologique du lait et pour la fabrication de certains produits laitiers. En revanche, la contamination post-traite par des micro-organismes extérieurs peut altérer cette qualité (Amiot et al., 2002 ; Vignola, 2002).

3.1.2 Flore originelle

Cette flore comprend tous les micro-organismes présents dans le lait dès sa sortie du pis. Les principaux types de micro-organismes sont généralement des mésophiles (Vignola, 2002). Voici un aperçu de la composition de la flore originelle du lait cru :

Tableau 02 : La composition de la 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
<i>Gram négatif</i>	<10

3.1.2.1. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent un groupe de micro-organismes bénéfiques qui produisent de l'acide lactique comme produit final de leur fermentation. Elles jouent un rôle crucial dans la transformation du lait (Vignola, 2002).

3.1.3 Flore de contamination

La flore de contamination est subdivisée en deux catégories : la flore altérante, qui peut provoquer des défauts sensoriels et diminuer la durée de conservation des produits laitiers, et la flore pathogène, qui peut poser des risques pour la santé des consommateurs (Vignola, 2002).

3.2 Psychrotrophes

Le terme psychrotrophes, également connu sous le nom de psychrotolérants, désigne des micro-organismes capables de se développer à des températures basses, bien que leurs températures optimales de croissance se situent généralement au-dessus de 15 °C, avec des maximas autour de 20 °C (Moyer, 2007).

Le mot psychrophile, dérivé du grec, où psychros signifie "froid" et philos signifie "aimant" (synonyme : cryophiles), a été introduit pour la première fois par Schmidt-Nielsen en 1902 (Ingraham & Stokes, 1959). Malgré leur appellation d'« aimant du froid », la majorité de ces micro-organismes se développe mieux à des températures supérieures à 20 °C, sans dépasser 30 °C. Ils devraient donc être considérés comme tolérants au froid plutôt que véritablement « amoureux du froid ».

Pendant longtemps, les bactéries tolérantes au froid étaient classées en deux groupes :

- Psychrotrophes : organismes capables de croître dans une plage de 0 à 30 °C.
- Psychrophiles : organismes qui se développent entre 1 et 20 °C, avec une température optimale autour de 16 °C.

Cependant, cette distinction n'est plus utilisée, et toutes les bactéries tolérantes au froid sont désormais regroupées sous le terme psychrophiles (Moyer, 2007).

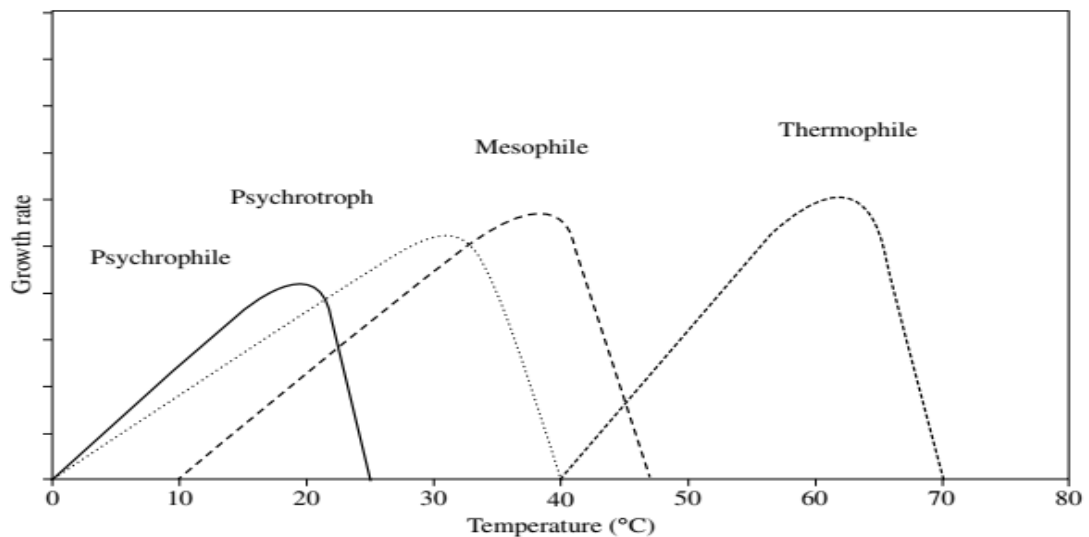


Figure 1 : Profils de croissance typiques selon la température pour les bactéries psychrophiles, psychrotrophes, mésophiles et thermophiles (Knight, 2015).

Les psychrotrophes constituent moins de 10 % de la flore microbienne initiale du lait cru. Toutefois, lors d'un stockage à basse température, leur proportion peut atteindre 70 à 90 % de

la population microbienne totale (Cousin, 1982; Sørhaug et Stepaniak, 1997). Selon Sørhaug et Stepaniak (1997), les bactéries psychrotrophes présentes dans le lait cru de vache comprennent des genres à Gram négatif et à Gram positif, comme indiqué dans le tableau n°03.

Tableau 03 :

Bactéries psychrotrophes trouvées dans le lait cru de vache (Sørhaug et Stepaniak, 1997)

Genres à Gram négatif	Genres à Gram positif
<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Serratia</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Micro-bacterium</i>

La présence et la prolifération des psychrotrophes peuvent entraîner l'altération du lait (Beales, 2004). Parmi les psychrotrophes, les *Pseudomonas spp.* sont les plus répandus dans le lait cru réfrigéré. Leur prévalence est due à leur grande diversité génétique, leur flexibilité métabolique et leur capacité d'adaptation au froid, facilitée par la composition lipidique de leurs membranes cellulaires, qui est riche en acides gras insaturés (Özer et Yaman, 2014).

4. Mécanismes d'adaptation au froid

4.1. Les protéines de choc froid

Les bactéries psychrotrophes et psychrophiles ont la capacité de se développer à des températures très basses. La croissance psychrotrophique peut entraîner des modifications qualitatives et quantitatives dans la production de protéines à basse température, notamment une augmentation du taux de synthèse de certaines protéines en réponse au stress du froid appelées protéines de choc froid (Csp) (Whyte & Inniss', 1992 ; Keto-Timonen et al., 2016). Les protéines Csp sont de petite taille et ont un unique domaine de liaison aux acides nucléiques, connu sous le nom de domaine de choc froid (CSD) (Heinemann & Roske, 2021 ; Keto-Timonen et al., 2016 ; Nakaminami et al., 2006). Le CSD comprend deux motifs de liaison aux acides nucléiques, les ribonucléoprotéines 1 et 2, qui favorisent l'attachement à l'ARN et à l'ADN ciblés (Keto-Timonen et al., 2016). Le lien entre les Csp bactériennes et la réponse au

stress de basse température est étroitement lié au comportement de l'ARN dans ces conditions. Le froid peut induire une terminaison anticipée de la transcription en modifiant la structure secondaire de l'ARN. Il a été établi que la CspA, la CspC et la CspE exercent une activité d'anti-termination transcriptionnelle (Nakaminami et al., 2006) en bloquant la création de structures en épingle à cheveux, qui peuvent servir de sites pour terminer ou interrompre la transcription de l'ARN cible à des températures basses (Keto-Timonen et al., 2016). Les Csp agissent comme des chaperons d'ARN en perturbant les structures secondaires de l'ARN cible à une température basse, permettant ainsi à la forme simple brin de l'ARN cible de persister. Suite à la réaction initiale au choc de froid, la production de Csp diminue tandis que celle d'autres protéines s'accroissent. Cela permet aux cellules de croître à des températures réduites, bien que cela se fasse à une vitesse plus lente. Il a été prouvé que les Csp favorisent la résistance au stress osmotique, oxydatif, nutritif, au pH et à l'éthanol (Keto-Timonen et al., 2016).

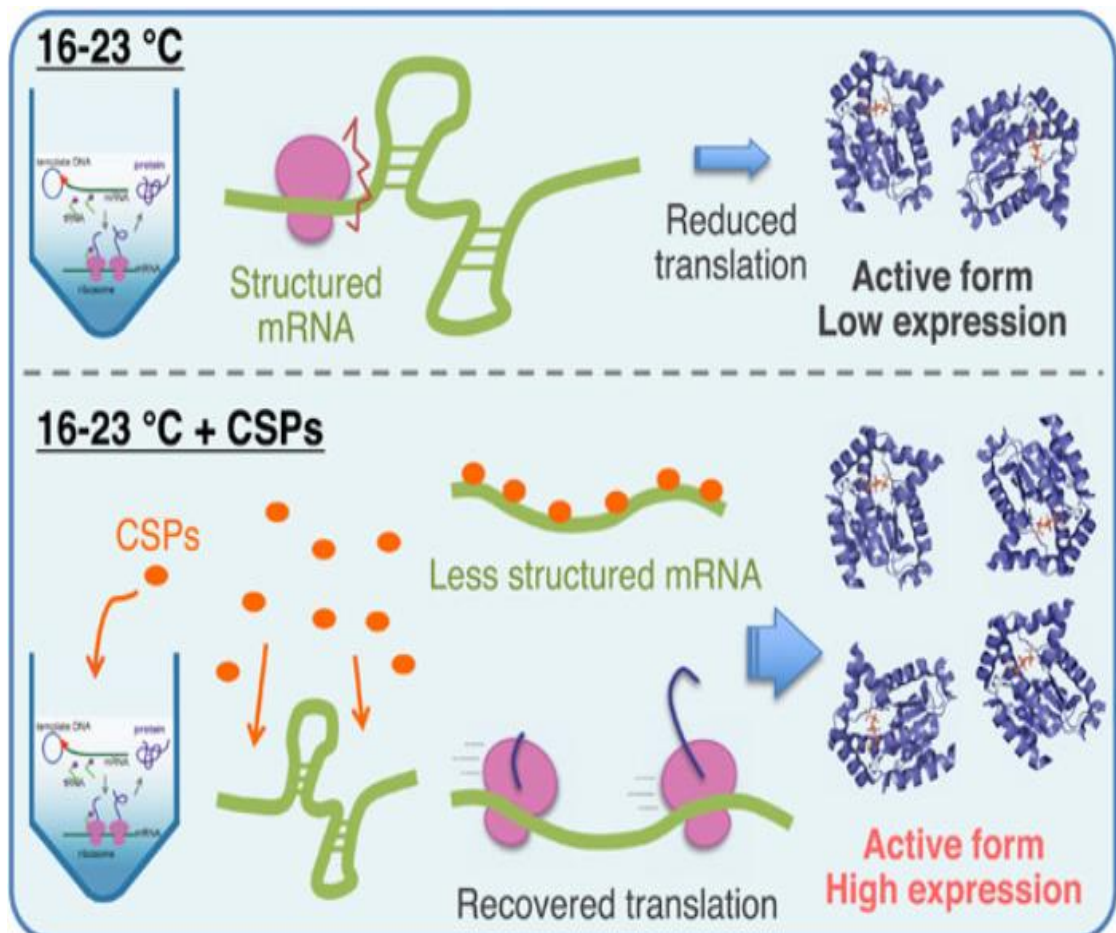


Figure 2. L'activité de l'ARNm avec et sans les Csp à 16-23°C (Higuchi et al., 2020).

4.2. La fluidité membranaire

La cellule contrôle la fluidité de la membrane dans des conditions de congélation parce que les membranes se rigidifient à basse température. Ce phénomène stimule un capteur membranaire qui déclenche une réponse, entraînant une augmentation de l'expression des gènes responsables de la régulation de la fluidité membranaire afin de maintenir le transport des métabolites à travers la membrane. Ce processus s'effectue par des altérations des chaînes acyles grasses des lipides qui contribuent à préserver une fluidité optimale de la membrane. Les enzymes transforment les acides gras saturés en acides gras insaturés, encouragent la hausse du ratio de chaînes acyles insaturées, la diminution de la longueur des chaînes acyles et l'accroissement des acides gras méthyl-ramifiés (Hamdan, 2018). La membrane est stabilisée et sa fluidité est maintenue grâce à la présence d'acides gras insaturés (Leekumjorn et al., 2009).

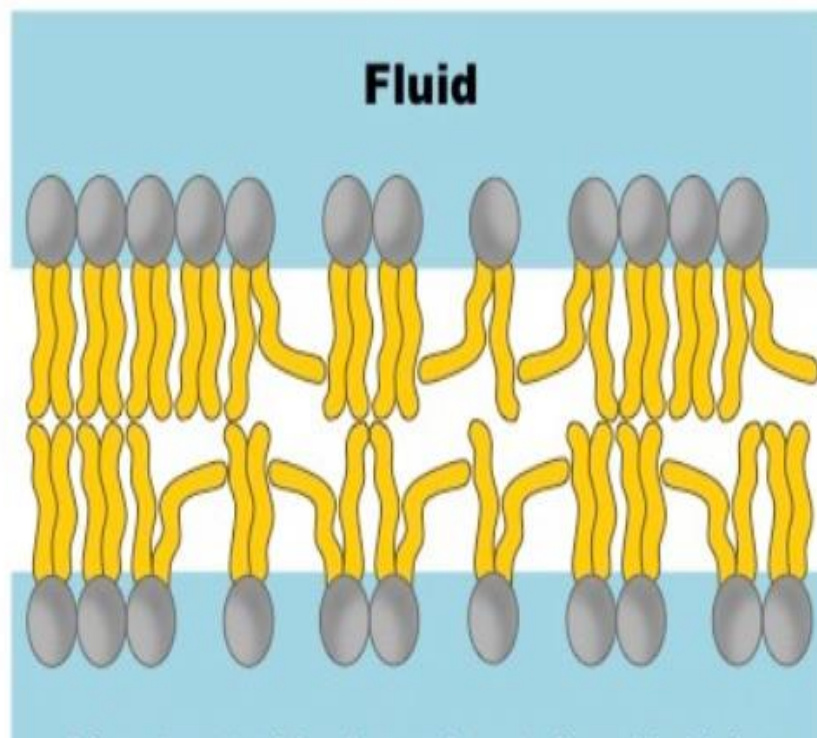


Figure 3. Amélioration de la fluidité membranaire par des queues d'hydrocarbures insaturés (Battistuzzi et al., 2004).

4.3 Les protéines antigel

Les protéines antigel (AFP) sont des protéines de la famille des IBP, qui agissent à basse température (Gharib et al., 2022 ; Rahman et al., 2024). Ces protéines sont capables de réguler la formation des cristaux de glace, empêchant ainsi la création de grands cristaux de glace à l'intérieur des cellules, ce qui évite d'endommager les organites cellulaires ou de provoquer une

mort cellulaire (Białkowska et al., 2020). Les protéines antigel (AFP) sont des glycopeptides et des peptides spécifiques. Ces peptides et protéines ont une affinité de liaison à la glace et ont la capacité de diminuer le point de congélation d'une solution de manière non colligative tout en affectant négativement son point de fusion, un phénomène désigné sous l'appellation d'hystérésis thermique (TH) (Eskandari et al., 2020). La seconde fonction des AFP consiste à inhiber la recristallisation de la glace (IRI), ce qui empêche les organites et cellules d'être endommagés par les gros cristaux de glace formés pendant la décongélation (Białkowska et al., 2020)

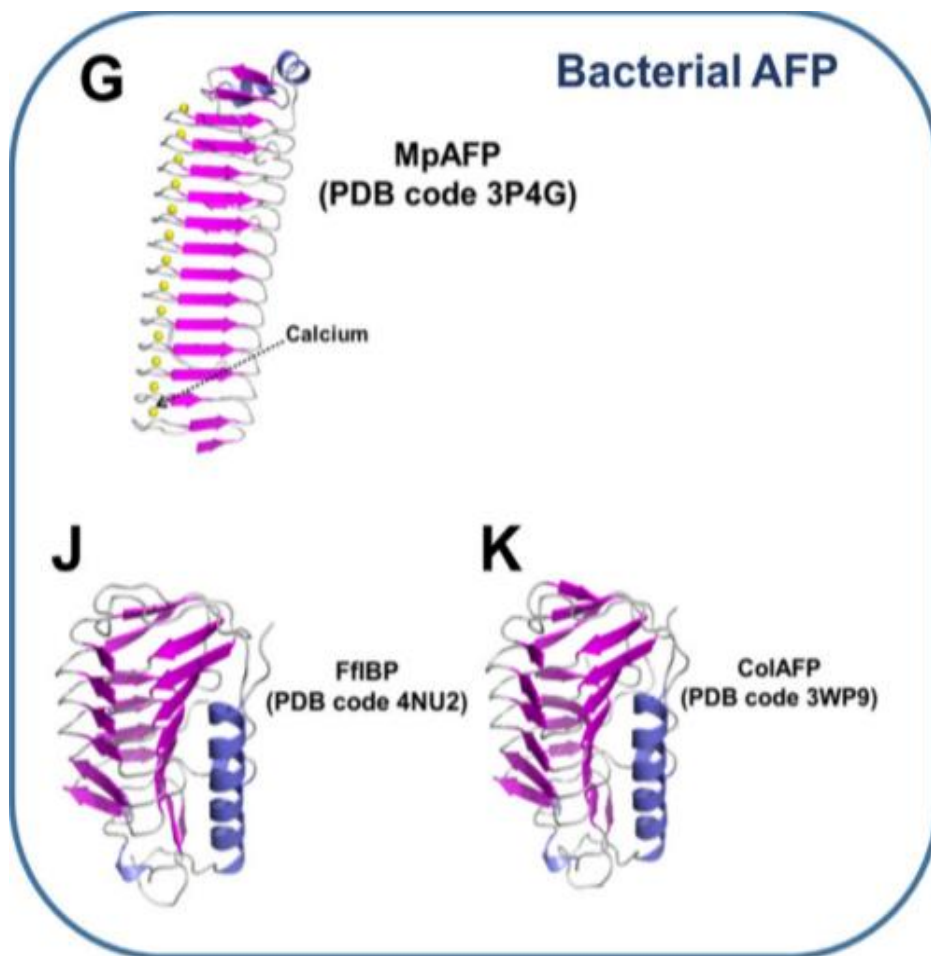


Figure 4. Diversité structurale des protéines antigel bactériennes: (G) la structure du MpAFP de *Marinomonas primoryensis*; (J) la structure du FfIBP de *Flavobacterium frigidum* PS I; et (K) la structure du ColAFP de *Colwellia* sp. souche SLW05 (Kim et coll., 2017).

4.4. Les enzymes actives au froid

Les enzymes actives au froid jouent un rôle prépondérant dans l'adaptation physiologique des organismes psychrotrophes aux basses températures (Kumar et al., 2020). L'industrie alimentaire accorde une attention particulière aux propriétés d'inactivation thermique des enzymes actives à basse température, car cela permet de prévenir toute altération des éléments thermosensibles présents dans les aliments, tout en garantissant la sécurité et la qualité des produits alimentaires (Shaheen et al., 2020). Il existe plusieurs types d'enzymes actives au froid, notamment les lipases, les protéases et les alpha-amylases.

a) Les lipases

Les lipases actives au froid sont des enzymes lipolytiques provenant de micro-organismes vivant dans des conditions de froid. Ces enzymes, spécifiquement conçues pour fonctionner à basse température, se caractérisent par une efficacité catalytique qui surpasse celle des lipases mésophiles ou thermophiles (Shaheen et al., 2020). Bien que répandues dans la flore et la faune terrestres, les lipases abondent particulièrement dans le monde microbien. Les lipases d'origine microbienne offrent une stabilité accrue par rapport à leurs homologues végétales et animales, tout en simplifiant la production à grande échelle, avec une sécurité renforcée et des coûts réduits (Dey et al., 2014). Ces lipases constituent un groupe de biocatalyseurs de premier plan, classifiés comme triacylglycérol hydrolases (EC : 3.1.1.3) (Kumar et al., 2020). Leur action consiste à décomposer les graisses par hydrolyse des liaisons ester carboxylique présentes dans les acylglycérols, libérant ainsi des acides gras et du glycérol (Rashid et al., 2001). Elles se révèlent particulièrement performantes sur les substrats insolubles dans l'eau (Kumar et al., 2020).



Figure 5. Modèle 3D de lipase GDSL (Kumar et al., 2020).

b) Les protéases

Les protéases sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent l'hydrolyse complète des protéines en acides aminés (Kasana, 2010) en dégradant les liaisons peptidiques, ce qui permet la décomposition des protéines. On utilise des micro-organismes résistant à des températures basses comme fournisseur de protéases actives à froid (Al-Ghanayem & Joseph, 2020). Les protéases provenant de micro-organismes psychrotrophes présentent une taille allant de 24 kDa à 115 kDa. Selon les micro-organismes psychrotrophes dont elles ont été extraites, celles-ci démontrent une activité sur un éventail de températures et de pH. Pour leur activité, ces protéases se plaisent généralement dans une fourchette de température allant de 25 à 50°C. Les protéases sont omniprésentes chez les animaux, les plantes et les micro-organismes. Toutefois, les micro-organismes représentent les producteurs les plus puissants de protéases et constituent la source privilégiée d'enzymes en raison de leur croissance rapide, de l'espace limité requis pour leur culture et de leur facilité de manipulation génétique (Kasana, 2010).

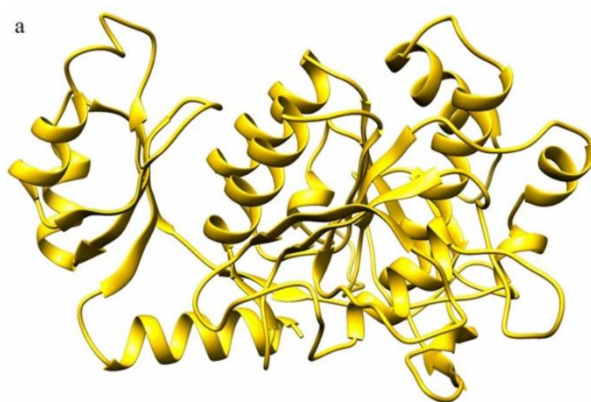


Figure 6. (a) Structure de la protéase alcaline active à froid (Apr-BO1) (Farooq et al., 2021).

c) Les α -amylases

Les α -amylases (endo-1,4- α -D-glucane glucohydrolase, EC 3.2.1.1) appartiennent à la classe des hydrolases enzymatiques, où elles coupent de façon aléatoire les liaisons 1,4- α -D-glucosidiques entre les unités de glucose voisines dans la structure linéaire de l'amylose de l'amidon (Kuddus et al., 2011), transformant ainsi cette chaîne en polymères composés d'unités

glucose (Monteiro De Souza, 2010). La plupart des α -amylases sont des métallo-enzymes qui nécessitent des ions calcium pour leur activité, leur stabilité et leur intégrité structurale. Elles appartiennent à la famille 13 du groupe des enzymes glycosides hydrolases.

Le groupe des α -amylases représente la plus vaste famille de glycosides hydrolases, transférases et isomérase, englobant près de 30 variantes enzymatiques distinctes. De nombreuses enzymes ont la capacité d'interagir avec l'amidon. On peut classer ces enzymes principalement en quatre catégories : les endoamylases, les exoamylases, les enzymes débranchantes et les transférases (Kuddus et al., 2011).

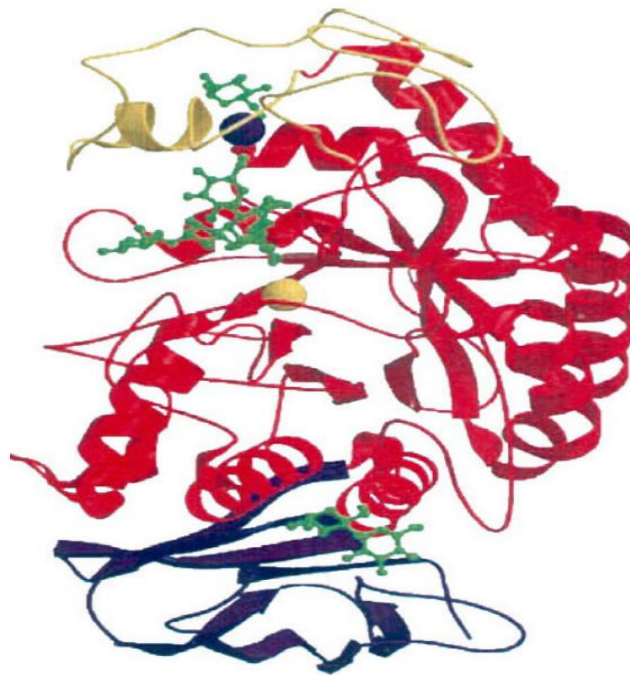


Figure 7. Structure de l' α -amylase (Monteiro De Souza, 2010).

5. La virulence des bactéries psychrotrophes

5.1. La capacité de production de biofilms pour l'industrie laitière

Les biofilms posent des défis importants à l'industrie laitière, principalement en raison de leur impact sur la sécurité alimentaire et l'efficacité des processus de production. La capacité des bactéries à former rapidement des biofilms sur des surfaces couramment utilisées, telles que l'acier inoxydable (SS), le plastique, le caoutchouc et le polypropylène, est particulièrement problématique. Les bactéries présentes dans les biofilms sont souvent plus résistantes aux agents de nettoyage et de désinfection, ce qui complique leur élimination.

La contamination par biofilm peut entraîner des problèmes tels que la détérioration des produits laitiers, une réduction de la durée de conservation et même des risques de maladies d'origine alimentaire si les biofilms hébergent des pathogènes. De plus, la formation de biofilms sur les équipements réduit l'efficacité des processus thermiques, ralentit les flux dans les conduits et peut entraîner une corrosion accrue de l'équipement, augmentant ainsi les coûts de maintenance et les risques d'interruption de la production (Hebishy et al., 2024).

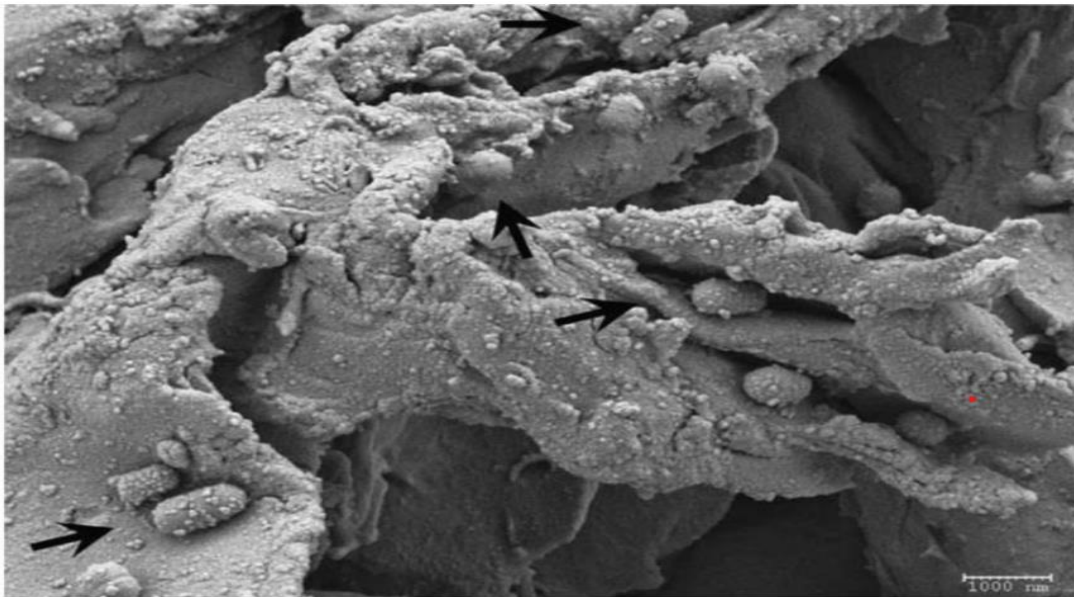


Figure 8. Microscopie électronique à balayage (MEB) biofilm de *L. monocytogenes* Rayé sur la surface du couvercle inférieur du lait (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

5.1.1. Définitions des biofilms

Un biofilm est une communauté structurée de microorganismes, principalement des bactéries, qui adhèrent de manière irréversible aux surfaces et entre eux, tout en étant enfermés dans une matrice extracellulaire polymérique (MEC) qu'ils produisent eux-mêmes. Cette matrice, composée principalement d'eau, de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et de lipides, représente la majeure partie de la masse du biofilm. Elle joue un rôle crucial dans l'intégrité du biofilm, sa protection et la communication entre les cellules (Hebishy et al., 2024; (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

5.1.2. Mécanisme de formation du biofilm

La formation d'un biofilm suit généralement quatre étapes distinctes :

a. Adhérence : Les bactéries s'attachent initialement de manière réversible à une surface biotique (comme les cellules animales ou végétales) ou abiotique (comme le sol, les métaux ou

les équipements industriels). Cette étape dépend souvent de structures spécifiques à la surface des bactéries, telles que les fimbriae ou les flagelles.

b. Production de la matrice extracellulaire : Les cellules bactériennes produisent une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques, ce qui rend leur attachement à la surface irréversible. Cette matrice protège les bactéries et consolide la structure du biofilm.

c. Maturation : Le biofilm continue à se développer en une structure complexe. Les bactéries se multiplient, formant des microcolonies, et le biofilm acquiert des propriétés qui varient selon les régions, avec des gènes différents exprimés par les bactéries en fonction de leur emplacement dans le biofilm. Cette étape est cruciale pour la formation d'une architecture tridimensionnelle robuste.

d. Dispersion : À la dernière étape, des cellules ou des amas de cellules bactériennes se détachent du biofilm mature et peuvent coloniser de nouvelles surfaces. La dispersion est influencée par divers facteurs, tels que des forces mécaniques (comme le cisaillement), l'activité enzymatique qui dégrade la matrice ou le substrat (comme l'hyaluronidase) et des modifications dans l'environnement des nutriments. Ce processus facilite la transmission des bactéries et la propagation des infections (Donlan, 2002; Hall-Stoodley, et al, 2004; Flemming et al., 2016).

Ces étapes sont régulées par des signaux environnementaux et par un phénomène appelé "quorum sensing," qui permet aux bactéries de coordonner leurs actions en fonction de la densité cellulaire.

La composition et les propriétés des biofilms varient en fonction des espèces microbiennes, des facteurs environnementaux et des caractéristiques de surface telles que le matériau, la texture et l'hydrophobie. Ces communautés sont souvent polymicrobiennes et posent des défis importants dans des industries comme la production alimentaire, où elles sont difficiles à éliminer, même avec des efforts rigoureux de nettoyage et d'assainissement (Tremblay et al., 2014; Hebishy et al., 2024).

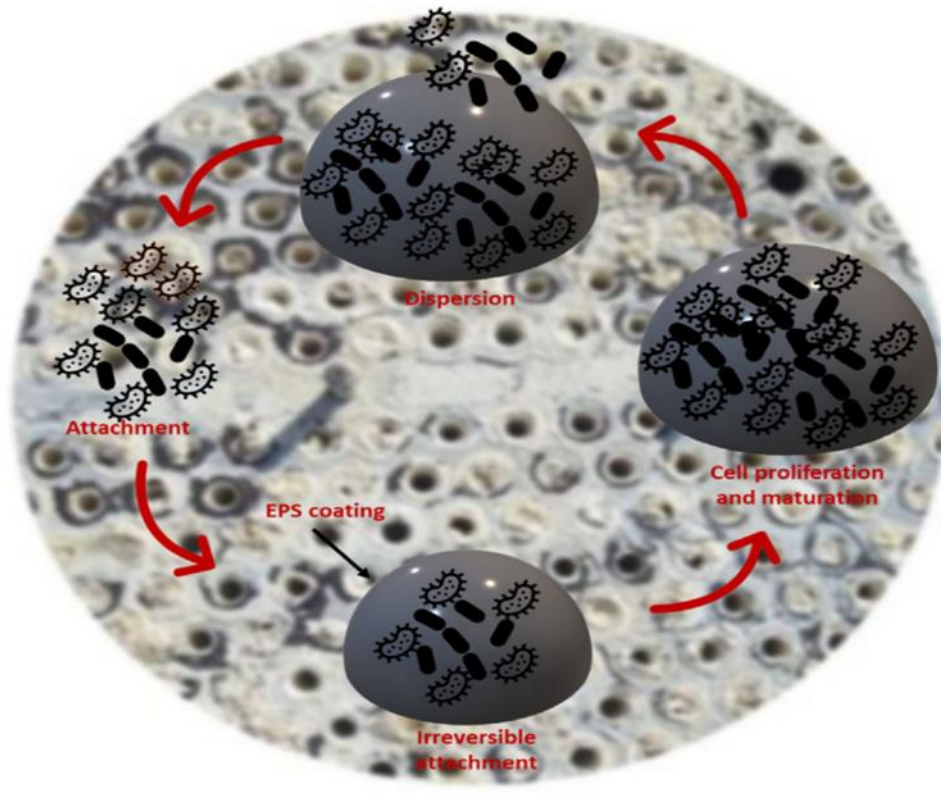


Figure 9. Phases au cours des quelles les bactéries forment des biofilms dans le lactosérum laitier système de traitement (Hebishy et al., 2024).

5.1.3. Facteurs influençant la formation de biofilm

Les facteurs clés influençant la formation de biofilm comprennent à la fois des variables internes telles que l'activité de l'eau, la disponibilité des nutriments, le pH et la présence d'antimicrobiens, et des facteurs externes tels que le matériau de surface, la douceur et le débit des fluides. L'ECM protège les microorganismes du biofilm des menaces externes, telles que les produits chimiques et le stress physique, et favorise la dormance métabolique, permettant la survie dans des environnements hostiles (Hebishy et al., 2024; Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

5.1.4. Rôle du biofilm sur les microorganismes

Les microorganismes vivant dans les biofilms bénéficient de plusieurs avantages par rapport à leurs homologues planctoniques (nage libre), c'est pourquoi ils préfèrent souvent le mode de vie du biofilm. Certains de ces avantages clés incluent : une tolérance et protection antimicrobiennes améliorées, une diminution du risque de dessiccation, un échange efficace de nutriments et de matériel génétique (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

5.2. Résistance aux antibiotiques

Dans le lait cru, des bactéries psychrotrophes, principalement des *Pseudomonas*, se développent durant la réfrigération et provoquent des défauts de qualité comme des altérations de saveur et la dégradation des émulsions. Des études antérieures ont montré que les bactéries psychrotrophes isolées du lait cru et des produits laitiers, présentent souvent une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques particulièrement contre les β -lactamines, comme l'oxacilline et la pénicilline G, ainsi que contre la vancomycine et d'autres antibiotiques comme le ticarcilline/acide clavulanique et le quinupristine-dalfopristine.

En résumé, les bactéries psychrotrophes du lait cru montrent une résistance variable selon les antibiotiques et les espèces, les *Pseudomonas* étant particulièrement résistants aux β -lactamines et à la vancomycine, tandis que certaines *entérobactéries* résistent à la tétracycline et à la nitrofurantoïne. Ces résultats soulignent l'importance de surveiller la résistance aux antibiotiques dans les bactéries associées aux aliments pour éviter la propagation de ces résistances (Decimo et al., 2016).

5.3. Production des métabolites toxiques

Les bactéries psychrotrophes, bien qu'adaptées aux températures basses, peuvent produire des toxines nuisibles pour l'humain (Gounot, A. M. 1986). Parmi ces toxines, on distingue les exotoxines et les endotoxines (Jay, J. M., Loessner, M. J., et al 2005).

6. Détérioration

La détérioration fait référence au processus par lequel les aliments deviennent impropres à la consommation humaine en raison d'altérations de leur texture, de leur couleur, de leur odeur ou de leur saveur. Ces changements peuvent résulter de réactions chimiques, telles que l'oxydation ou l'activité enzymatique, ou de processus microbiologiques, tels que la croissance de bactéries, de levures et de moisissures. Les aliments avariés perdent généralement leur valeur nutritive et peuvent présenter des risques pour la santé s'ils sont consommés (Saha et al., 2024; Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

La composition complexe du lait et sa teneur élevée en eau créent un environnement idéal pour la croissance et la propagation de bactéries nocives. La détérioration peut résulter de facteurs primaires et secondaires, tels que: agents physiques, réactions chimiques ou une activité microbienne (Figure 10).

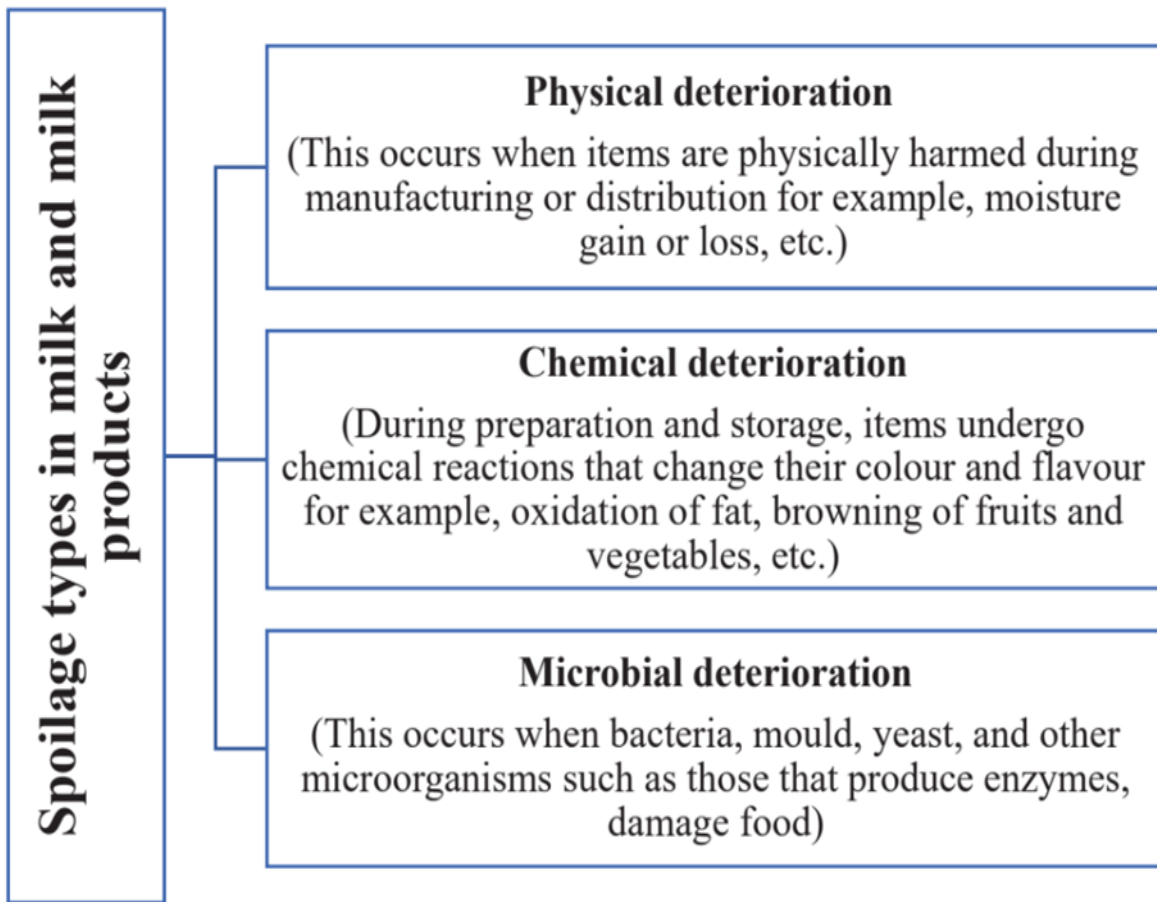


Figure 10. Types de détérioration du lait et des produits laitiers(Saha et al., 2024).

6.1. Causes de la détérioration du lait et des produits laitiers

Le lait et les produits laitiers peuvent se gâter en raison de plusieurs facteurs découlant de la contamination à divers stades de la production et de la manipulation. La détérioration est principalement causée par:

6.1.1-Contamination croisée

La contamination croisée dans les environnements de production alimentaire, notamment dans la manipulation du lait, peut entraîner de graves risques pour la sécurité des produits. Elle peut se produire à différents niveaux :

6.1.1.1. Équipement et environnement : Un nettoyage insuffisant des équipements de manutention, des réservoirs de stockage et des conduits peut favoriser l'accumulation de

biofilms. Ces biofilms abritent souvent des micro-organismes de détérioration qui peuvent facilement être transférés au produit, compromettant sa qualité et sa sécurité. Une mauvaise désinfection peut permettre la persistance de bactéries pathogènes ou de détérioration dans les systèmes de production.

6.1.1.2. Pratiques de manipulation : Les travailleurs peuvent également être une source de contamination croisée si des pratiques d'hygiène strictes ne sont pas respectées. De même, une ventilation inadéquate peut favoriser la dissémination de particules aérosol porteurs de micro-organismes. Enfin, le mélange de différents lots de production sans mesures de séparation adéquates peut également introduire des contaminants indésirables, augmentant le risque de propagation de bactéries nocives.

Pour prévenir ces risques, il est essentiel de mettre en œuvre des protocoles stricts de nettoyage, de désinfection, ainsi que des mesures d'hygiène rigoureuses et un contrôle des processus de ventilation et de manipulation des aliments (Calahorrano-Moreno et al., 2022; Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

6.1.2 Traitements thermiques retardés

Lorsqu'il y a un retard prolongé entre la traite, le transport et la pasteurisation du lait, les bactéries présentes ont davantage de temps pour se multiplier, ce qui augmente le risque de détérioration avant que le produit n'arrive au consommateur. Le lait cru se conserve généralement moins longtemps que le lait pasteurisé et doit être consommé dans les 24 à 48 heures suivant la traite (Dash et al., 2022; Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

La pasteurisation est un processus thermique crucial qui consiste à chauffer le lait à une température définie pendant une durée spécifique pour éliminer les micro-organismes pathogènes et prolonger la durée de conservation du lait. Pour limiter les risques de contamination et de détérioration, il est essentiel de réduire au minimum le temps écoulé entre la traite et la pasteurisation. Des pratiques efficaces de collecte, de transport et de stockage du lait, ainsi qu'une pasteurisation rapide, sont indispensables pour garantir la qualité et la sécurité du lait destiné à la consommation (Dash et al., 2022; Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

6.2 Formes de détérioration microbienne

La détérioration microbiologique du lait et des produits laitiers peut se manifester de différentes manières, selon le type de micro-organisme impliqué. Les indicateurs les plus courants de détérioration comprennent l'approvisionnement, la production de gaz, l'acidification, la décoloration, le ropiness et le développement de mauvais arômes. Vous

trouvez ci-dessous une ventilation des types de détérioration et de leurs microorganismes responsables:

Tableau 4 : Types de détérioration microbienne dans le lait et les produits laitiers (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

Nature of spoilage	Sign of spoilage	Causative organism
Natural souring or curdling	Sour milk, Curd formation	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp
Gas production	Explosion of curd	<i>Clostridium</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., Coliform
Ropiness/Sliminess	Rope like structure	<i>Alcaligenes</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp.
Proteolysis	Putrid off-flavours bitterness in UHT processing	Alcaligenes, Flavobacterium, Bacillus, Micrococcus, <i>Pseudomonas</i> spp.
Sweet curdling	pH becomes alkaline and leads to curd formation	<i>Bacillus</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp.
Lipolysis	Rancid flavour Off flavours	<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.
Bitty cream	Cooked flavour in sterilised milk	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoids</i>
Off-flavours	Malty flavour Fruity flavour Musty potato flavour Phenolic flavour Medicinal flavour Acid flavour	<i>Streptococcus lactis</i> var. <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Pseudomonas muciodolens</i> <i>Maltigenes</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Enterobacter aerogens</i> <i>Streptococcus lactis</i>
Discolouration	Blue colour Yellow colour Red colour Brown colour Grey colour	<i>Pseudomonas syncyanea</i> <i>Pseudomonas synxantha</i> <i>Micrococcus roseus</i> <i>Pseudomonas putreficans</i> <i>Clostridium</i> spp

Ce tableau catégorise les types de détérioration courants dans le lait et les produits laitiers, ainsi que les microorganismes responsables de chaque forme. La surveillance de ces

signes et le maintien d'une hygiène adéquate peuvent prévenir la contamination microbienne et prolonger la durée de conservation du lait et des produits laitiers (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

Tableau 5. Microorganismes pathogènes associés au lait cru et aux maladies qu'ils causent (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024)

Enterobacteriaceae <i>Escherichia coli</i> , including 0157:H7 Salmonella <i>Yersinia enterocolitica</i> (psychrotrophic)	Gastroenteritis, hemolytic uremic syndrome Gastroenteritis, typhoid fever Gastroenteritis
Other Gram-negative bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i> (psychrotrophic) Brucella spp. <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gastroenteritis Brucellosis Gastroenteritis Gastroenteritis
Gram-positive spore-formers <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium botulinum</i> (Type E is psychrotrophic)	Gastroenteritis Anthrax Gastroenteritis Botulism
Gram-positive cocci <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Emetic intoxication Sore throat Scarlet fever/sore throat Pharyngitis, nephritic sequelae
Miscellaneous Gram-positive bacteria Corynebacterium spp. <i>Listeria monocytogenes</i>	Diphtheria Listeriosis Tuberculosis
<i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Tuberculosis Johne's disease
Rickettsia <i>Coxiella burnetii</i>	Q fever

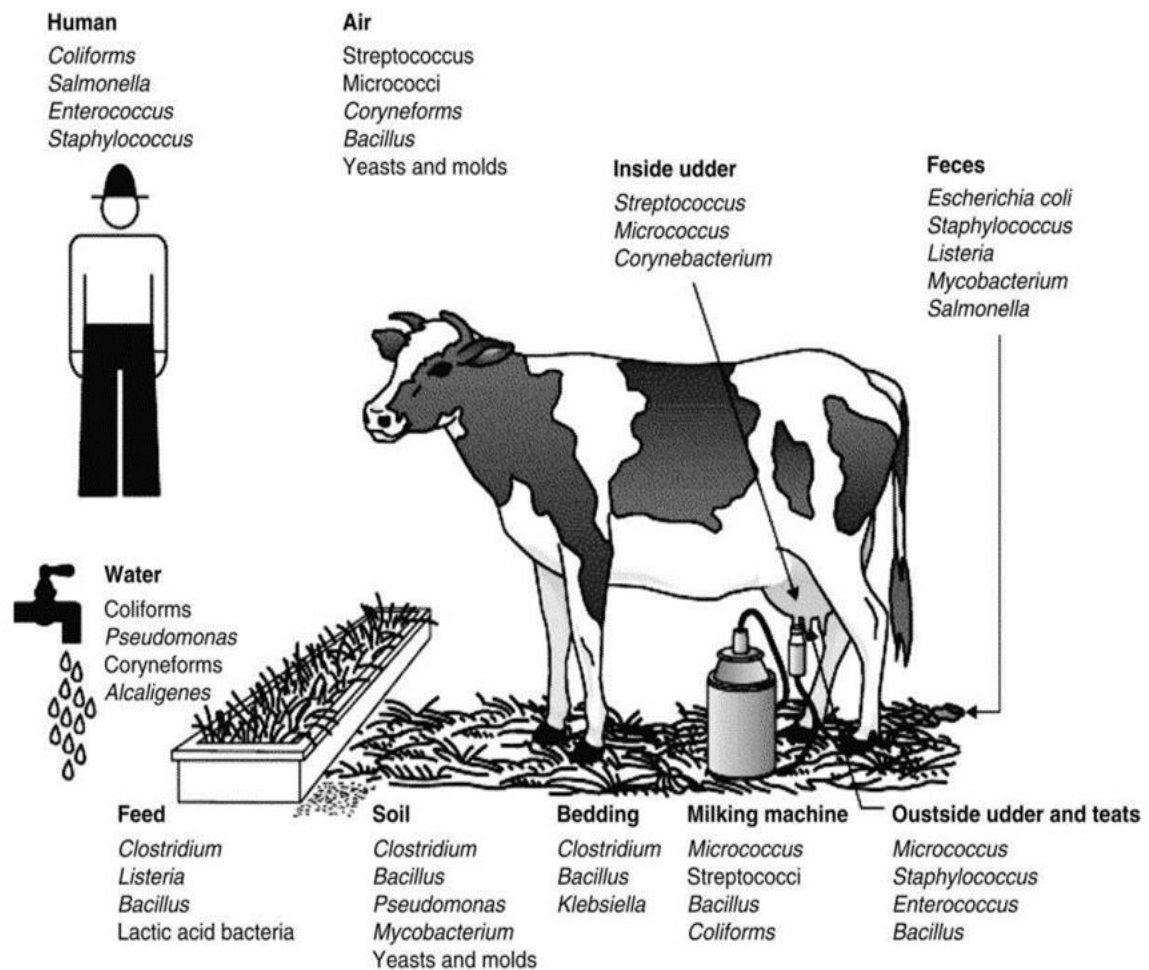


Figure 11. Sources de contamination microbienne du lait à la ferme laitière (Bouchenitfa, Y. (n.d.).2023-2024).

7.Stratégies de Contrôle des Bactéries Psychrotrophes dans le Lait

Les stratégies de contrôle des bactéries psychrotrophes dans le lait se concentrent sur plusieurs méthodes clés pour réduire la contamination microbienne et la détérioration des produits laitiers. Voici un résumé détaillé des stratégies:

a. Contrôle de la température: Un pré-refroidissement et une pré-thermalisation rapides, combinés à des températures de stockage appropriées, sont essentiels pour inhiber la croissance microbienne. Préchauffer le lait cru à 72°C pendant 15 secondes, puis le refroidir à 2°C peut préserver la qualité du lait jusqu'à 5 jours.

b. Emballage atmosphérique modifié (MAP): L'emballage avec de l'azote et de dioxyde de carbone peut inhiber la croissance microbienne et réduire la détérioration induite par l'oxygène, en particulier par les bactéries aérobies comme *Pseudomonas*. Cela prolonge la durée de conservation des produits laitiers, y compris le lait UHT, et réduit la dégradation enzymatique.

c. Hygiène: De bonnes pratiques d'hygiène pendant la traite et l'assainissement de l'équipement sont essentielles pour réduire la contamination bactérienne. Une désinfection adéquate des systèmes de traite, un nettoyage régulier des cuves et une hygiène des mamelles aident à réduire le nombre de bactéries et à prévenir les défauts des produits laitiers causés par des bactéries psychrotrophes.

d. Préservation Physique:Le traitement à haute pression (HPP) est une méthode alternative à la pasteurisation. En appliquant des pressions comprises entre 300 et 700 Mpa, cette technique inactive les bactéries sans dommage thermique, préservant le goût, la couleur et les nutriments du lait. Le HPP est prometteur pour prolonger la durée de conservation du lait tout en conservant sa valeur nutritive.

e. Conservateurs Naturels: Les conservateurs naturels dérivés du lait comme la lactoperoxydase, la lactoferrine et les peptides antimicrobiens (AMP) gagnent en popularité en raison de leurs propriétés antimicrobiennes. Ces composés naturels inhibent la croissance microbienne par divers mécanismes, améliorant la stabilité et la durée de conservation des produits laitiers tout en répondant à la demande des consommateurs pour des étiquettes plus propres.

f. Enzymes Microbiennes: Des enzymes comme la lactase oxydase (LO) peuvent aider à contrôler les microorganismes d'altération. En produisant de l'acide lactobionique et du peroxyde d'hydrogène, LO active le système lactoperoxydase, réduisant la croissance bactérienne et empêchant la gélification du lait, maintenant ainsi la qualité du produit sur de longues périodes de stockage, en particulier dans le lait UHT.

En combinant ces approches, l'industrie laitière peut contrôler efficacement la croissance des bactéries psychrotrophes, préserver la qualité des produits et réduire les pertes économiques.(Yalew et al., 2024).

7.1 Système de management de la sécurité sanitaire

Le système de management de la sécurité sanitaire des aliments est encadré par plusieurs législations nationales et internationales pour garantir la protection des consommateurs contre les risques liés à la consommation de denrées alimentaires. En vertu de la loi n°09-03 du 25 février 2009, toute personne impliquée dans la chaîne d'approvisionnement des aliments doit s'assurer du respect des normes d'hygiène et de salubrité à toutes les étapes, incluant la production, la transformation, le stockage, et la distribution des denrées alimentaires.

Le décret exécutif n°17-140 du 11 avril 2017 précise les conditions d'hygiène nécessaires et impose la mise en place de systèmes basés sur les principes de l'Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP). Ce système vise à identifier, évaluer et maîtriser les dangers biologiques, chimiques ou physiques qui pourraient compromettre la sécurité alimentaire. L'adoption de cette méthode est obligatoire pour les établissements dont l'activité est liée à la production ou manipulation des aliments d'origine animale, conformément au décret n°10-90 de 2010.

Parallèlement, le règlement européen N°852/2004 impose aux opérateurs du secteur alimentaire de mettre en œuvre un système basé sur l'analyse des risques et le contrôle des points critiques, tout en respectant les Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH), pour garantir la sécurité sanitaire tout au long de la chaîne alimentaire.

7.1.1 Outils de management de la sécurité sanitaire destinés aux professionnels

7.1.1.1 Les Bonnes pratiques d'hygiène (BPH)

Les BPH sont des pratiques fondamentales visant à garantir la sécurité et la salubrité des denrées alimentaires. Elles reposent sur des normes réglementaires qui définissent les exigences de base pour les opérations de traitement alimentaire, telles que le contrôle des niveaux de chlore dans l'eau potable et les colonies aérobies sur les surfaces de travail. Le Codex Alimentarius fournit un cadre de référence pour ces pratiques, en particulier pour l'hygiène du lait et des produits laitiers (FAO/OMS, 2003).

7.1.1.2 HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)

L'acronyme HACCP correspond à (Hazard Analysis Critical Control Point). En français, on le traduit par « analyses des dangers et des points critiques pour leur maîtrise ». Cet outil permet de mettre en place un système qui vise à lutter et à prévenir les dangers pouvant nuire à la sécurité du consommateur. Ce système est accepté internationalement comme le système de choix pour la gestion de la sécurité alimentaire pour réduire la prévalence de maladies d'origine

alimentaire (Bas et al., 2007) en identifiant les risques tout au long du processus de production et d'établir des mesures préventives (Featherstone, 2015 ; Garayoa et al., 2011). Selon le Codex alimentarius, le système HACCP repose sur sept principes qui sont :

- Analyser des dangers ou risques,
- Déterminer des CCP,
- Fixer le ou les seuils critiques,
- Mise en place d'un système de surveillance des mesures de maîtrises des dangers CCP,
- Déterminer les actions correctives,
- Appliquer des procédures de vérifications,
- Constituer un dossier.

7.1.1.3 ISO 22000

L'ISO 22000 est une norme internationale qui définit les exigences pour un système de management de la sécurité des denrées alimentaires. Elle s'applique à tous les organismes de la chaîne alimentaire, quelle que soit leur taille, et garantit que les produits sont sûrs au moment de leur consommation. Cette norme permet de démontrer la maîtrise des dangers liés à la sécurité alimentaire et peut être mise en œuvre en utilisant des ressources internes ou externes (ISO 22000:2018).

7.1.1.4 FSSC 22000

La FSSC 22000 est une norme de sécurité alimentaire reconnue par la Global Food Safety Initiative (GFSI). Basée sur l'ISO 22000, elle inclut des exigences supplémentaires définies par le FSSC et des programmes prérequis spécifiques au secteur, tels que l'ISO/TS 22002-1. Ce programme fournit un cadre de certification couvrant toute la chaîne d'approvisionnement alimentaire, aidant les exploitants à garantir la conformité aux règles de sécurité et aux législations en vigueur (ISO/TS 22002-1, 2009).

7.1.1.5 IFS et BRC

L'International Food Standard (IFS) et le British Retail Consortium (BRC) sont des référentiels privés utilisés pour certifier la sécurité des produits alimentaires. L'IFS, d'origine franco-allemande, et le BRC, d'origine anglo-saxonne, sont des outils de la Global Food Safety Initiative destinés à garantir que les fournisseurs répondent aux exigences des détaillants en

matière de sécurité alimentaire. Ces référentiels permettent la réalisation d'audits qui analysent les dangers et garantissent la conformité des entreprises aux normes de sécurité.

Ces normes et outils fournissent aux professionnels de l'industrie alimentaire les moyens nécessaires pour prévenir les risques et garantir la sécurité sanitaire des produits alimentaires tout au long de la chaîne de production (BRC, 2012).

7.2 Evaluation des risques

La méthodologie d'évaluation quantitative du risque microbiologique comme outil d'évaluation des risques liés aux denrées alimentaires est à l'heure actuelle en plein développement. L'évaluation du risque est une technique qui est utilisée pour estimer la probabilité d'occurrence d'un danger et la sévérité de l'effet adverse (EFSA, 2020 ; Khalid et al., 2020). L'ensemble est fondé sur une base de données scientifique collectée à tous les niveaux du processus de la production à la consommation du produit. A partir d'une modélisation mathématique, elle définit les paramètres et les niveaux d'interventions pour minimiser ou réduire le risque auquel est soumis le consommateur. Le Codex Alimentarius définit une méthodologie de base pour mener une analyse du risque microbiologique. Elle comprend quatre étapes à savoir (i) identification des dangers, (ii) caractérisation du danger, (iii) évaluation de l'exposition (iv) caractérisation du risque (FAO, 1999).

7.2.1 Identification des dangers

L'identification du danger consiste en l'identification d'un agent biologique (micro-organismes (MO) ou toxines), chimique ou physique présent dans un aliment ou dans un groupe d'aliments causant un effet adverse sur la santé humaine (aliment, environnement, animal, sol) lorsque les conditions lui sont optimales (FAO, 1999).

7.2.2 Caractérisation du danger

La caractérisation du danger est une évaluation qualitative et ou quantitative de la nature de l'effet adverse en relation avec l'agent pathogène présent dans l'aliment. Cette étape caractérise la nature, la sévérité et la durée du danger. Elle doit être détaillée et toutes les variables bien documentées (FAO, 1999). La sévérité de la maladie est liée à l'interaction de trois facteurs : l'hôte, l'aliment et l'agent pathogène. Lorsque toutes les données sont disponibles, une évaluation dose-réponse peut être menée. L'objectif du modèle dose-réponse est de déterminer la relation entre la magnitude de l'exposition (dose) au pathogène et la sévérité de la réponse. Il y a quatre réponses possibles à considérer : la probabilité de l'infection (après

ingestion), la probabilité de la maladie (morbidité), la probabilité des séquelles et la probabilité de la mortalité (FAO, 1999 ; Coleman et Marks, 1999 ; Buchanan et al., 2000).

7.2.3 Evaluation de l'exposition

L'évaluation de l'exposition est une évaluation qualitative et/ou quantitative de la présence d'agents biologiques, chimiques et physiques dans un aliment qui correspond à l'exposition du consommateur. Cette étape doit décrire les différentes possibilités par lesquelles un agent pathogène entre dans la chaîne alimentaire au niveau de la production, de la distribution jusqu'à la consommation (FAO, 1999). Les modèles décrivent le comportement de l'agent pathogène à travers toute la chaîne de la production jusqu'à la consommation pour estimer le niveau d'exposition. Les effets de chaque étape sur la croissance du microorganisme sont pris en compte pour quantifier deux paramètres importants : La prévalence ainsi que la concentration du pathogène sur toute la filière de production jusqu'au consommateur. Tous les facteurs augmentant ou réduisant le nombre de MO sont analysés (type d'animaux, influence des saisons, contamination des animaux par le cuir au cours du transport, facteurs de contamination des carcasses, du conditionnement et de la température de stockage des viandes) (Coleman et Marks, 1999 ; FAO/WHO,2008). Lorsque les informations à un niveau donné sont manquantes ou insuffisantes, des modèles de microbiologie prédictive sont utilisés pour simuler la croissance ou la survie des MO dans des conditions les plus proches de la réalité. Ces modèles simulent la croissance et le déclin en fonction des différents paramètres environnementaux (température, pH, Activité hydrique). Des informations sur les habitudes alimentaires, la nature et le type de population sont aussi nécessaires pour caractériser l'exposition (FAO/WHO,2008 ; Lammerding et Fazil, 2000).

7.2.4 Caractérisation du risque

La caractérisation du risque est le résultat des trois premières étapes. C'est l'étape finale de l'évaluation du risque. Toutes les variables auront été analysées pour estimer la sévérité de l'infection pour une population donnée. La réponse peut être qualitative (faible, moyenne, élevée) ou quantitative permettant une estimation du nombre de personnes atteintes (FAO/WHO, 1999). Au niveau quantitatif, les modèles intègrent deux notions celle de l'incertitude lorsque les données sont manquantes et celle de la variabilité quand les données ne sont pas constantes. Toutes les valeurs sont intégrées et analysées grâce à des simulations de Monte Carlo. Cette méthode permet d'obtenir à différents points, une estimation complète des différentes possibilités du risque. Le moindre changement à un niveau donné nécessitera une réévaluation du risque (Buchanan et al., 2000 ; Lammerding et Fazil, 2000).



Matériels & Méthodes

1. Collecte des échantillons

Au total, 27 échantillons de produits laitiers (9 échantillons de lait entier pasteurisé, 9 de yogourt nature et 9 de fromage frais) ont été collectés aléatoirement dans différentes épiceries du marché local de Laghouat, en Algérie, sur une période de deux semaines, du 16 au 27 février, puis transportés immédiatement au laboratoire de microbiologie. Ces échantillons ont été prélevés de manière à simuler les conditions d'achat des consommateurs. Les analyses ont été effectuées dans les 24 heures suivant l'acquisition des échantillons. **Nous avons** suivi le protocole de détection ISO 17410 :2001.

2. Etude physico-chimiques

2.1 Mesure de pH

Pour la mesure du pH du yaourt nature, du fromage frais et du lait pasteurisé, un pH-mètre électronique équipé d'électrodes spécifiques est utilisé. Avant chaque série de mesures, l'appareil est étalonné avec des solutions tampons standards (pH 4, 7 et 9) afin d'assurer la fiabilité des résultats (Université de Tlemcen, s.d.). La méthode consiste à prélever des échantillons homogènes de yaourt, fromage frais et lait pasteurisé à température ambiante.



Figure 12 : La mesure du PH du fromage, du yaourt et du lait (photographie prise au laboratoire).

2.2 Mesure de température :

Pour la mesure de la température du yaourt nature, du fromage frais et du lait pasteurisé, un thermomètre électronique avec une sonde adaptée à chaque type d'échantillon est utilisé (Testo, 2025). Le matériel comprend un thermomètre numérique équipé d'une sonde à immersion pour le lait, permettant une lecture rapide et précise dans le liquide, tandis qu'une

sonde à pointe fine en acier inoxydable est employée pour pénétrer efficacement dans la texture dense du fromage frais sans l'endommager. Pour le yaourt, une sonde à immersion avec une surface adaptée aux semi-solides assure une mesure directe et fiable (Hanna Instruments, 2025). Avant chaque série de mesures, l'appareil est calibré avec des étalons de température afin d'assurer la précision des résultats (Omega Engineering, s.d.).

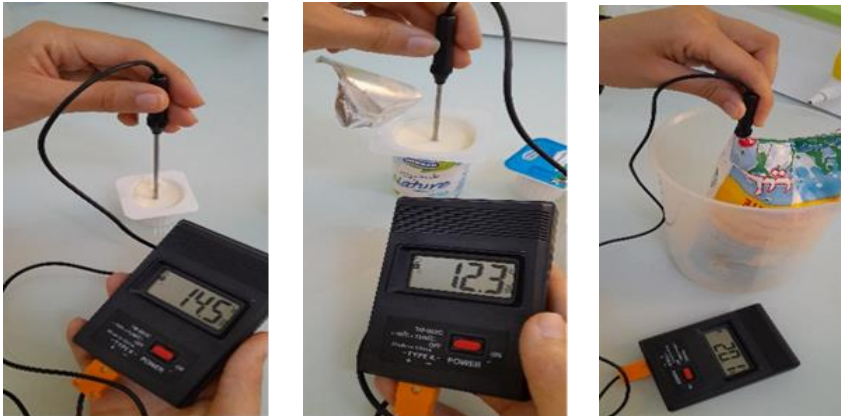


Figure 13 : La mesure de la température du fromage, du yaourt et du lait (photographie prise au laboratoire).

3. Isolement et purification des bactéries psychrophiles / psychrotrophes

L'objectif de cette étape est de détecter les germes psychrophiles et psychrotrophes présents dans le lait, le yaourt et le fromage nature. Pour ce faire, une série de dilutions décimales a été réalisée : 1 ml de lait entier pasteurisé est prélevé à l'aide d'une micropipette et introduit dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Ce processus est répété trois fois (avant de mélanger le contenu, immédiatement après le mélange, et après un certain temps de repos). Pour le yaourt et le fromage nature, 1 g d'échantillon est introduit dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Ensuite, les flacons sont homogénéisés à l'aide d'un agitateur Vortex afin d'assurer une bonne dispersion des germes.



Figure 14 : préparation de solution mère (photographie prise au laboratoire).

100µl des dilutions 10^{-1} ou 10^{-3} est prélevée pour ensemercer des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive, selon la technique des quadrants, dans le cadre de la détection. L'incubation se fait au réfrigérateur, à une température comprise entre 4 et 7 °C, pendant 7 à 10 jours.



Figure 15 : Isolement des souches bactériennes sur les milieux de culture GN (photographie prise au laboratoire).

L'étape suivante consiste en la purification des colonies isolées. Plusieurs repiquages successifs sont effectués, alternant entre milieux solides et liquides, à deux températures distinctes, 37 °C et entre 4 et 7 °C, afin de purifier les souches et de différencier les bactéries psychrotrophes des bactéries psychrophiles. Le repiquage se poursuit jusqu'à l'obtention d'une culture uniforme, où toutes les colonies apparaissent semblables et conformes au type de bactéries visé initialement.



Figure N° 16 : purification des souches bactériennes sur le milieu GN (photographie prise au laboratoire).

4. Identification des isolats

4.1 Examen macroscopique

Les colonies de psychrophiles et psychrotrophes isolées à partir du lait, du yaourt et du fromage nature présentent une grande diversité morphologique. Ces morphologies sont

observées après une incubation de 7 à 10 jours pour les psychrophiles et d'environ 24 heures pour les psychrotrophes.

4.2 Examen microscopique par coloration de Gram

Après fixation des bactéries sur le frottis, la coloration de Gram a été réalisée selon le protocole suivant : le frottis a d'abord été recouvert de violet de gentiane pendant une minute, puis rincé à l'eau distillée. Ensuite, le Lugol a été appliqué pendant une minute avant un nouveau rinçage à l'eau distillée. La décoloration a été effectuée avec de l'éthanol pendant 30 secondes, suivie d'un rinçage immédiat à l'eau. Enfin, la fuchsine a été ajoutée pendant une minute, puis la lame a été rincée à l'eau distillée et séchée. L'observation au microscope s'est faite à l'objectif 100 en immersion. À l'issue de cette coloration, les bactéries Gram positif apparaissent en violet foncé, tandis que les bactéries Gram négatif se colorent en rose.

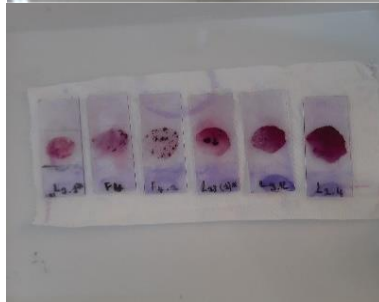
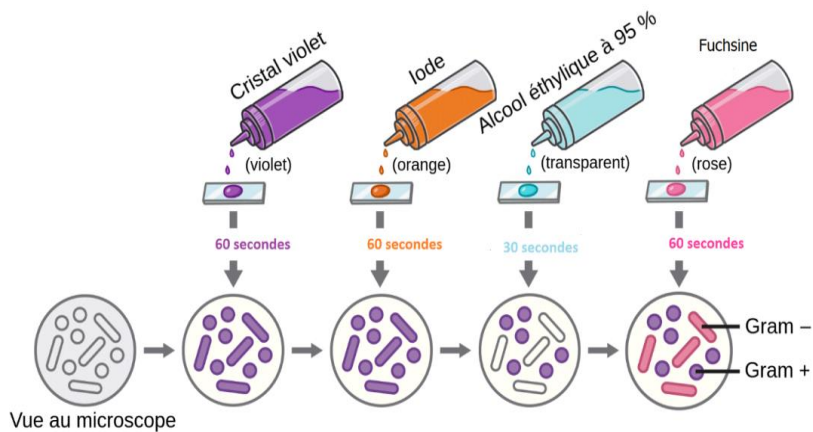


Figure 17 : Les étapes de la méthode de coloration de gram (photographie prise au laboratoire).

5. Identification biochimique

5.1 Fermentation de Mannitol et mobilité

Pour évaluer la capacité des bactéries à fermenter le Mannitol et leur mobilité, on utilise le milieu Mannitol-mobilité, un milieu semi-solide de couleur rouge. Après préparation, on verse entre 7 et 10 ml de ce milieu dans des tubes, puis on ensemence chaque tube par une piqûre centrale. La lecture des résultats s'effectue après une incubation au froid. Si le milieu change de couleur et devient jaune, la souche est dite Mannitol positive (mannitol +). Pour la mobilité, on observe la présence de traces indiquant un déplacement des bactéries.



Figure 18 : Ensemencement des tubes Mannitol-mobilité (photographie prise au laboratoire).

5.2 Le milieu TSI

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron agar) est un milieu de culture solide utilisé principalement pour l'évaluation de la fermentation de trois sucres (glucose, lactose et saccharose), de la production de gaz et de la production de sulfure d'hydrogène (H_2S). Pour ensemencer ce milieu, la présence d'une pente et d'un culot est nécessaire. L'ensemencement se fait par stries sur la pente, puis par piqûre au fond du tube. La lecture des résultats s'effectue après une incubation à température basse.

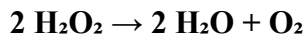


Figure 19 : Ensemencement des tubes TSI (photographie prise au laboratoire).

5.3 Le test catalase

La catalase est une enzyme tétramérique, composée de quatre chaînes polypeptidiques, jouant un rôle clé dans le métabolisme bactérien. Elle est couramment utilisée en microbiologie pour différencier certaines espèces bactériennes, notamment en distinguant les bactéries anaérobies par son absence.

Cette enzyme catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène moléculaire (O_2), selon la réaction suivante :



Pour réaliser le test catalase, une goutte de peroxyde d'hydrogène est déposée sur une lame de verre, puis mise en contact avec une colonie bactérienne fraîche. La présence de bulles d'oxygène (effervescence) indique une réaction positive, caractéristique d'une souche catalase positive (catalase +). En l'absence de formation de bulles, la souche est considérée catalase négative (catalase -).

5.4 Les plaques API 20E

Pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non exigeants, nous avons utilisé les galeries API 20E, un système standardisé comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés. Les microtubes contiennent des substrats déshydratés qui sont reconstitués par l'inoculation d'une suspension bactérienne. Après incubation, les réactions métaboliques provoquent des changements de couleur spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs. La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture, ou d'un logiciel d'identification (BioMérieux, Fiche technique API 20 E, 2010), permettant ainsi l'identification de l'espèce bactérienne et la détermination du biotype.



Figure 20 : La détection des souches bactériennes à l'aide de la **galerie API 20 E**(photographie prise au laboratoire).

6.Activités enzymatiques

Nous avons choisi d'évaluer l'activité enzymatique de l'amylase, de la protéase, de la lipase et de la lécithinase en utilisant le milieu GN, auquel on ajoute un substrat spécifique pour chaque activité. Avant la stérilisation, on ajoute l'amidon pour l'activité de l'amylase et la caséine pour l'activité de la protéase. Après la stérilisation, on ajoute le Tween 80 pour l'activité de la lipase et le jaune d'œuf pour l'activité de la lécithinase.

L'ensemencement se fait par une série de stries à l'aide d'un écouvillon, afin de former une bande au centre de la boîte. L'incubation est réalisée à deux températures différentes : entre 4 et 7 °C pour les souches psychrophiles et psychrotrophes, ainsi qu'à 37 °C uniquement pour les souches psychrotrophes.

Pour la lecture des résultats, si la bactérie est capable de dégrader le substrat, une zone claire apparaît autour des colonies. Dans le cas particulier de l'amylase, on ajoute du lugol sur la surface de la boîte pour confirmer son activité.

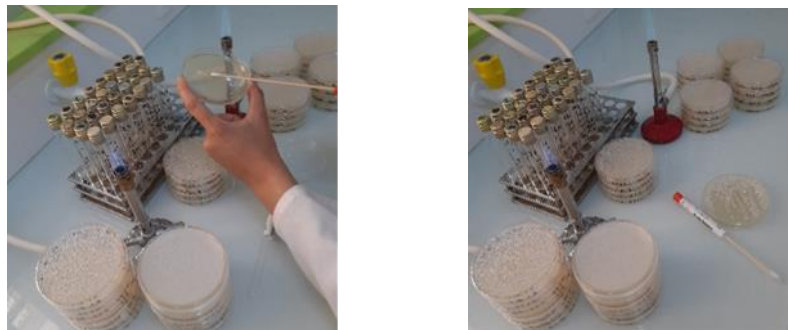


Figure 21: Ensemencement des boîtes de l'activité enzymatique (photographie prise au laboratoire).

7. Évaluation de la capacité des isolats à former un biofilm

7.1. Origine des souches

Dans cette étude, 32 souches bactériennes ont été évaluées pour leur capacité à former des biofilms. Parmi elles, 26 sont des bactéries psychrotrophes, tandis que les 6 restantes sont des bactéries psychrophiles. Ces souches ont été isolées à partir de différents produits laitiers, notamment du lait pasteurisé, du yaourt et du fromage nature. L'ensemble des expérimentations a été réalisé au Laboratoire de ENS de Laghouat.

7.2. Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par les microplaques de titration à 96 puits en Polychlorure de Vinyle (PVC)

7.2.1. Principe de la technique

La technique des microplaques de titration au cristal violet, mise au point par O'Toole et Kolter, (1998) est utilisée pour étudier la capacité des souches à former le biofilm. Il s'agit d'une technique colorimétrique basée sur le principe que le cristal violet se lie de manière proportionnelle à la biomasse du biofilm (Niu et Gilbert, 2004). En effet, cette technique permet de visualiser les cellules qui s'attachent à la surface du PVC et se colorent en pourpre avec le cristal violet, alors que les surfaces abiotiques ne sont pas colorées (Pratt et Kolter, 1998).

7.2.2. Préparation de la suspension bactérienne

Pour préparer une suspension bactérienne, une colonie isolée est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et introduite dans 5 mL de bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth). Les tubes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 24 heures pour les souches psychrotrophes. Pour les souches psychrophiles (et certaines psychrotrophes à croissance lente à basse température), l'incubation est réalisée entre 4 et 7 °C pendant 72 heures.

7.2.3. Protocole de la caractérisation de la formation de biofilm par les microplaques de titration

Chaque puits d'une microplaque de titration est rempli avec 200 µL de bouillon cœur-cerveau (BHIB) contenant 10 µL de culture bactérienne. Chaque souche est répartie dans cinq puits, tandis que les puits témoins ne contiennent que le BHIB. Les plaques sont ensuite incubées pendant 96 heures à 37 °C et entre 4 et 7 °C. Après incubation, les cultures sont

éliminées et les puits sont lavés trois fois à l'eau distillée afin de retirer les cellules non adhérentes, puis laissés à sécher à l'air libre pendant 15 minutes. Chaque puits est ensuite rempli avec 250 μL de cristal violet à 1 % et incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés plusieurs fois à l'eau distillée, puis de nouveau séchés à l'air libre pendant 15 minutes. Enfin, 200 μL d'acide acétique à 33 % sont ajoutés dans chaque puits et laissés en contact pendant 30 minutes pour solubiliser le colorant fixé.

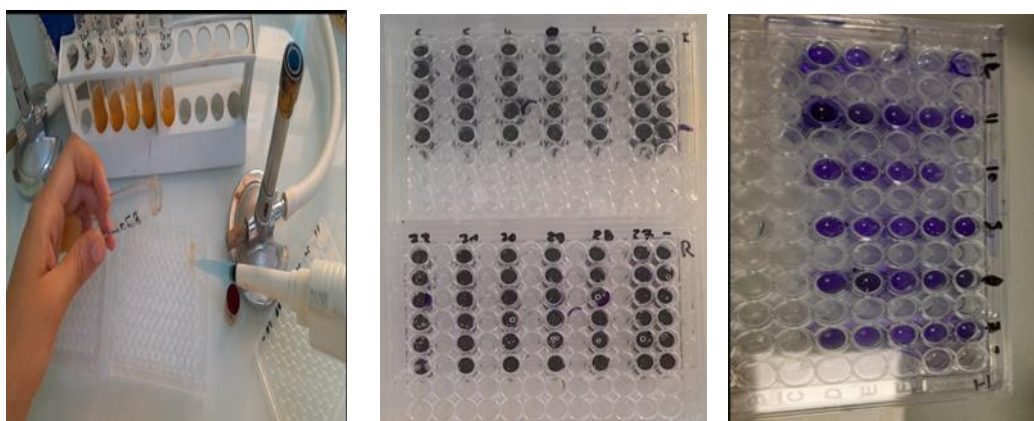


Figure 22 : Les microplaques de titration (photographie prise au laboratoire).

7.3. Lecture

La densité optique est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaque. Les souches sont alors classées comme suit (Stepanovic et al., 2000) :

- $DO \leq DO_{\text{Témoin}}$: souche non formatrice de biofilm .
- $DO_{\text{Témoin}} < DO \leq 2x DO_{\text{Témoin}}$: souche faiblement formatrice de biofilm.
- $2x DO_{\text{Témoin}} < DO \leq 4x DO_{\text{Témoin}}$: souche à capacité modérée .
- $DO > 4x DO_{\text{Témoin}}$: souche fortement formatrice du biofilm.

Pour chaque souche, cette technique a été réalisée en duplicate

8. Analyse statistique et modélisation de la durée de conservation

La modélisation de la durée de conservation du lait réfrigéré, en lien avec la croissance des bactéries psychrophiles, repose sur une combinaison de données expérimentales et de simulation stochastique. Les paramètres de croissance et d'inactivation de *Pseudomonas* et

Bacillus ont été établis à partir de données expérimentales sur leur résistance thermique et leur dynamique de population. En cas de données manquantes, des compléments ont été extraits d'articles scientifiques publiés (PubMed, Scopus, 2010–2025) et ajustés avec l'aide d'experts.

Les expériences ont été conduites au moins en double, et les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Les analyses statistiques initiales ont été réalisées avec GraphPad Prism 8.0.2 et Excel 2021.

La modélisation de la durée de conservation a été effectuée sous R (version 4.4.3), en utilisant RStudio. Le package « mc2d » a permis d'exécuter des simulations de type Monte Carlo (1000 itérations) pour estimer l'incertitude, tandis que « tidyverse » a servi à l'organisation et l'analyse des données. Une analyse de sensibilité a été réalisée sur les paramètres incertains à partir de distributions de variabilité, répétée 1000 fois, ce qui a permis d'obtenir une distribution d'incertitude des indices de sensibilité. Des scénarios hypothétiques ("what-if") ont été explorés pour tester l'impact de différentes stratégies (comme la variation de T°C et pH) sur la durée de conservation. Cette approche permet d'évaluer de manière flexible le comportement microbien et l'efficacité potentielle des interventions selon le niveau de contamination.



**Résultats &
Discussion**

1. Détection et identification des isolats

Lors de cette recherche, nous avons mené des analyses microbiologiques sur le lait, le yaourt et le fromage nature, vendus dans la ville de Laghouat, afin de détecter les bactéries psychrotrophes et psychrophiles par une approche phénotypique classique, par l'isolement sur milieu solide, suivi d'une caractérisation morphologique et biochimique, qui est une méthode fondamentale largement utilisée en microbiologie laitière pour connaître la diversité bactérienne du lait (Yalew et Pang, 2024).

À partir de 27 échantillons différents, comprenant du lait pasteurisé, du yaourt et du fromage nature, 12 d'entre eux étaient positifs (44,44 %), ce qui a permis d'isoler 46 souches bactériennes. La majeure partie des échantillons positifs concernait le lait pasteurisé, avec des résultats négatifs variables selon le type d'échantillon et le jour du prélèvement.

La faible présence de micro-organismes dans le yaourt et le fromage nature s'explique par leur acidité élevée et leur pH bas (le pH du yaourt est de 4,14 et celui du fromage nature de 4,25), ce qui entrave la survie des micro-organismes détériorants et pathogènes (Rabêlo et al., 2021).

L'absence d'isolats dans 55,56 % des échantillons ($n = 15/27$) reflète un taux non négligeable d'isolats inconnus, ce qui s'explique en partie par le faible recours aux outils moléculaires pour l'identification des bactéries cultivables du lait pasteurisé (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007 ; réf. 1, 7). Par ailleurs, les communautés microbiennes du lait cru présentent une diversité taxonomique d'une complexité telle qu'elle dépasse les capacités de résolution des méthodes de culture traditionnelles. À ce titre, le séquençage à haut débit de la région hypervariable de l'ARNr 16S est devenu un outil central pour l'exploration des microbiotes laitiers, en permettant une caractérisation fine, inclusive et non biaisée des bactéries présentes, qu'elles soient cultivables ou non (Xue Qin, Jingqi Cheng et al., 2024).

1.1 Identification macroscopique

Une grande diversité a été observée parmi les 46 souches bactériennes isolées et purifiées à partir des échantillons, en termes de couleur, de taille et d'aspect (figure n°28). Certaines colonies sont jaunes, jaune-marron, marron, blanches ou blanc jaunâtre. D'autres colonies sont grandes ou petites, avec des bordures régulières ou irrégulières, et présentent un aspect brillant, lisse, bombé ou non. Cette diversité est cohérente avec l'étude menée par Yang et al. (2020), qui a également constaté une grande variété parmi les colonies isolées. Les colonies jaunes peuvent être un indice de la présence du genre *Pseudomonas* spp., selon l'étude

d'Atia et al. (2023), surtout si les souches sont des bacilles à Gram négatif, ce qui concorde avec certains de nos résultats. Les colonies blanc jaunâtre peuvent indiquer la présence du genre *Lactococcus* spp., selon l'étude de Taye et al. (2021).

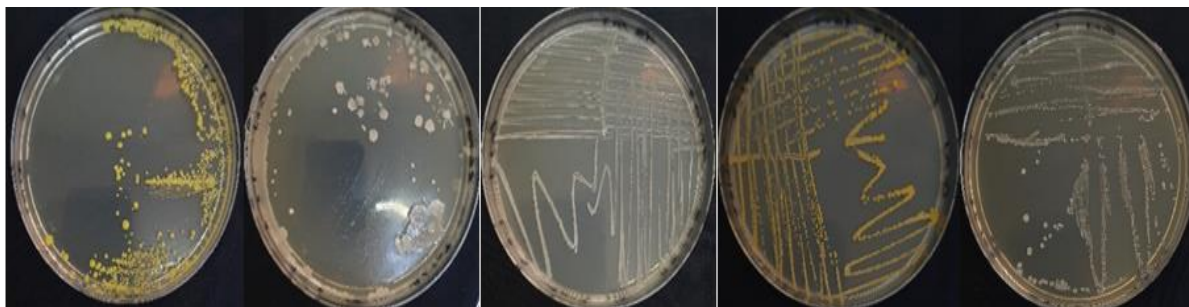


Figure 23 : L'examen macroscopique nous montre la diversité bactérienne dans les échantillons du lait, du fromage et du yaourt (photographie prise au laboratoire).

Cette importante diversité provient du fait que le lait et les produits laitiers constituent des écosystèmes complexes (Ferrocino et al., 2022). En raison de leur forte activité d'eau (a_w) (Oh & Lee, 2024) et leur valeur nutritive (Laslo & György, 2018; Oh & Lee, 2024), notamment leur forte concentration en protéines et en lipides, les produits laitiers offrent un milieu propice à la prolifération de divers microorganismes (Laslo & György, 2018).

Dans le lait, les communautés microbiennes peuvent présenter une grande complexité et regrouper plusieurs espèces bactériennes issues de multiples sources de contamination, comme la surface extérieure de la mamelle, le matériel de traite, l'air, l'eau, les aliments, l'herbe et même la terre. Certains de ces micro-organismes sont essentiels dans le secteur laitier, surtout pour les produits fermentés. Cependant, d'autres peuvent endommager ou compromettre la sécurité des produits laitiers (Silva et al., 2023).

1.2 Identification microscopique

La coloration de Gram dans notre étude montre que la fraction majoritaire des souches sont Gram positifs ($n=36/46$), soit une proportion de 78,26 % (figure n°29). Concernant leurs formes, 71,74 % d'entre elles ($n=23$) sont des cocci et 28,26% ($n=13$) sont des bacilles. Les 10 autres souches 21,73% sont des Gram négatifs et elles sont toutes des bacilles (figure n°30).

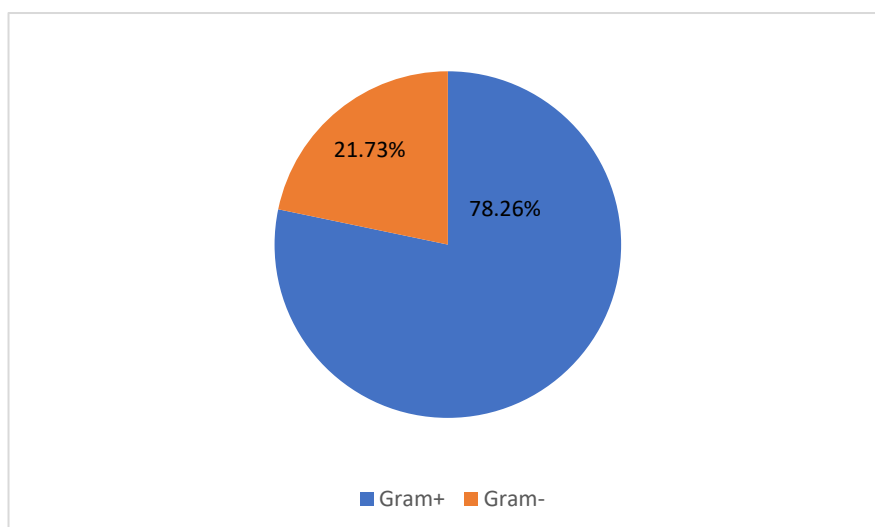


Figure 24 : classification des bactéries psychrotrophes dans l'ensemble des prélèvements liés à leur résultat de la coloration de Gram.

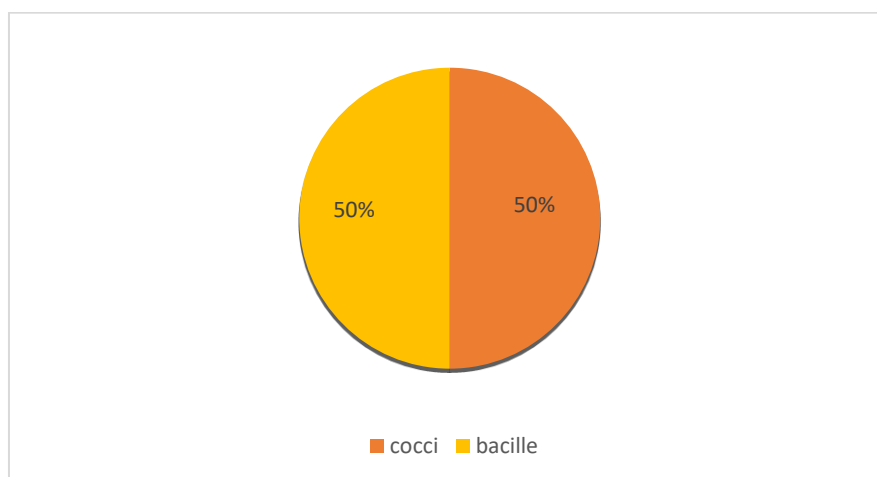


Figure 25: classification des bactéries psychrotrophes dans l'ensemble des prélèvements liés à leur forme microscopique après coloration de Gram..

Contrairement à de nombreuses études, telles que celles de (Yang et al., 2020 ; Santana et al., 2020 ; Rabêlo et al., 2021) qui ont constaté que la majorité des isolats sont des Gram négatifs, il est possible que le grand nombre de bactéries Gram positifs observé dans notre étude soit dû à la résistance des bactéries sporulantes psychrotrophes à Gram positif contenues dans le lait pasteurisé. Ces bactéries peuvent résister à la pasteurisation et à la stérilisation, et continuer leur développement dans le lait réfrigéré, contrairement aux bactéries Gram négatifs (Samaržija et al., 2012). Il est important de noter que, bien menées, les méthodes de traitement thermique du lait pasteurisé éliminent les bactéries psychrotrophes Gram négatifs qui

prédominant dans le lait réfrigéré, cependant leurs enzymes thermostables et les spores des bactéries psychrotrophes Gram positifs persistent (Samaržija et al., 2012).

Dans les usines laitières, l'application d'une chaleur au lait pasteurisé (65-69 °C pendant 15 secondes) avant la pasteurisation peut diminuer le taux de bactéries psychrotrophiques à Gram négatifs de 77 à 97 %. Cependant, cela n'a pas d'impact sur les bactéries sporulées psychrotrophiques à Gram positifs (Samaržija et al., 2012).

Les bactéries à Gram positifs sont largement répandues dans l'environnement, et les contaminants courants du lait appartiennent à ce groupe (Garedew et al., 2015). On estime que les bactéries sporulantes psychrotrophes Gram positives sont susceptibles de contaminer le lait et les produits laitiers pasteurisés tout au long du processus de production, notamment via des zones inaccessibles du système de production, les biofilms présents sur l'équipement de la laiterie (Samaržija et al., 2012), ainsi que par d'autres voies telles que l'extraction de lait de vaches atteintes de mammite et l'utilisation d'ustensiles mal désinfectés lors des processus de traite, de transport et de stockage (Garedew et al., 2015).

Malgré la richesse des données disponibles sur les bactéries psychrotrophes à Gram négatif, leur implication dans la détérioration du lait et leur production d'enzymes thermostables, les connaissances concernant leurs homologues à Gram positif restent limitées, notamment en ce qui concerne leur activité protéolytique et leur capacité à former des biofilms. Bien que les bactéries psychrotrophes à Gram positif soient généralement moins abondantes dans le lait pasteurisé réfrigéré, leur aptitude à former des biofilms et à produire des enzymes protéolytiques peut favoriser leur persistance sur les surfaces des équipements de transformation laitière et contribuer ainsi à la détérioration des produits finis (Zarei et al., 2023).

1.3. Identification biochimique

1.3.1. Milieu mannitol mobilité

Parmi les 46 souches bactériennes isolées à partir des échantillons laitiers analysés, une diversité phénotypique significative a été observée, particulièrement en ce qui concerne la mobilité bactérienne et la capacité de fermenter le mannitol (figure n°31). Ces deux caractères biochimiques sont des marqueurs phénotypiques essentiels, couramment employés dans les schémas d'identification bactérienne pour distinguer les genres et espèces, notamment ceux d'intérêt en microbiologie alimentaire (Barrow & Feltham, 2003).

Sur 27 observations réalisées à 4 -7 °C pendant 7 à 10 jours, la répartition des phénotypes montrait que 48,15 % (13 souches) des souches étaient mobiles tandis que 51,85 % (14 souches) étaient immobiles. Concernant la fermentation du mannitol, 37,04 % (10 souches) des observations étaient positives, incluant une souche présentant un résultat mitigé, et 62,96 % (17 souches) étaient négatives. Cette diversité phénotypique reflète la présence de bactéries (psychrotrophes) actives, susceptibles d'inclure des entérobactéries mobiles et mannitol-positives (par exemple *Enterobacter* spp.) ou certaines espèces de *Bacillus*, des bacilles mobiles mannitol-négatifs (probablement *Pseudomonas* non fermentatifs), ainsi que des cocci immobiles mannitol-positifs (tels que *Staphylococcus epidermidis* ou *Lactococcus* spp.) et des bactéries immobiles mannitol-négatives (*Micrococcus*, *Staphylococcus* non fermentatifs ou bactéries peu actives) (Holt et al., 1994 ; Quigley et al., 2013 ; Samaržija et al., 2012).

Cette richesse phénotypique reflète une contamination probable d'origine environnementale ou liée aux pratiques d'hygiène lors de la traite, pouvant compromettre la qualité microbiologique et la sécurité des produits laitiers. Plusieurs études confirment que le lait pasteurisé peut être un vecteur important pour des agents pathogènes tels que *Salmonella*, *Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*, représentant ainsi un risque notable pour la santé publique (Abebe et al., 2016).

À 4 °C, température simulant les conditions de réfrigération et favorisant la croissance des bactéries psychrophiles (Samaržija et al., 2012), 19 observations ont été réalisées après un temps d'incubation de 7 à 10 jours. Les résultats ont montré que 100% des souches étaient immobiles et . Concernant la fermentation du mannitol, 15,79 % (3 souches) des souches étaient positives, incluant une souche à résultat mitigé, tandis que 84,21 % (16 souches) étaient négatives. La prédominance des souches immobiles et mannitol-négatives à 4 °C est typique des bactéries psychrophiles dont le métabolisme est ralenti à basse température.

Cependant, la présence d'une souche mobile et mannitol-positive suggère que certaines bactéries, telles que *Pseudomonas fragi* ou des *Lactococcus* adaptés au froid, peuvent maintenir une activité métabolique suffisante pour altérer les produits laitiers réfrigérés (Quigley et al., 2013).

Les bactéries psychrophiles, en particulier les espèces du genre *Bacillus*, peuvent survivre au traitement de pasteurisation et proliférer durant la réfrigération du lait. Ces microorganismes produisent des enzymes thermostables telles que les lipases et les protéases, capables de dégrader les constituants du lait, entraînant ainsi des altérations organoleptiques notables. Cela

compromet la qualité sensorielle du produit et réduit sa durée de conservation (Wang et al., 2024).

La comparaison des souches bactériennes psychrotrophes et psychrophiles isolées dans des conditions d'incubation réfrigérées (4-7 °C) révèle des différences importantes en termes d'activité métabolique et de potentiel d'altération des produits laitiers. Les bactéries psychrotrophes, bien qu'originaires d'environnements à température plus élevée (37 °C), conservent une capacité à se développer ou à rester actives à basse température, ce qui suggère une contamination possible post-pasteurisation ou environnementale. En revanche, les psychrophiles, adaptées aux basses températures, présentent un métabolisme ralenti mais suffisant pour fermenter le mannitol et maintenir leur mobilité, deux caractéristiques clés pour leur identification et l'évaluation de leur impact sur la qualité des produits laitiers. Ainsi, l'analyse conjointe de la mobilité et de la fermentation du mannitol constitue un outil pertinent pour différencier ces souches et anticiper leur rôle dans l'altération microbologique sous conditions de conservation réfrigérée (Abebe et al., 2016 ; Samaržija et al., 2012 ; Barrow & Feltham, 2003).



Figure 26: Diversité phénotypique significative observée parmi les souches bactériennes, notamment en ce qui concerne leur mobilité et leur capacité à fermenter le mannitol.

1.3.2. Milieu TSI

Parmi les 46 souches bactériennes isolées à partir des échantillons laitiers, une diversité notable a été mise en évidence à travers leurs profils sur milieu Triple Sugar Iron (TSI). Ce test biochimique permet d'évaluer la capacité des bactéries à fermenter différents sucres (glucose, lactose, saccharose) et à produire du sulfure d'hydrogène, fournissant ainsi des indices essentiels pour leur identification et la différenciation des espèces (figure n°32). Ces caractéristiques aident à déterminer le potentiel d'altération ou de pathogénicité des souches bactériennes isolées (Barrow & Feltham, 2003).

La diversité observée reflète la complexité du microbiote laitier, qui comprend des bactéries mésophiles et psychrophile, chacune présentant des capacités métaboliques variées. Cette diversité est un facteur clé dans la qualité et la sécurité des produits laitiers, car certaines souches peuvent altérer le lait ou présenter un risque sanitaire (Quigley et al., 2013).

Sur un total de 26 tests TSI réalisés à 4-7 °C pendant 7 à 10 jours, 69,23 % (18 souches) ont présenté un profil K/K (culot rouge, pente rouge), indiquant une absence de fermentation des sucres. Parmi les autres profils, 7,69 % (2 souches) ont montré un profil A/A (fermentation du glucose et des autres sucres) et 3,85 % (1 souche) un profil K/A (fermentation du glucose uniquement). Des cas de production de gaz et de sulfure d'hydrogène (H₂S) ont été également observés, avec une production de H₂S dans 19,2 % des tests et de gaz dans 11,5 %. Ces résultats concernent principalement les bactéries psychrotrophes, capables de maintenir une activité métabolique fermentaire même à basse température, ce qui peut altérer la qualité du lait et poser des risques sanitaires (Jay et al., 2005 ; Holt et al., 1994).

En revanche, les tests réalisés sur des souches psychrophiles incubées à la même température (4-7 °C) pendant 7 à 10 jours ont montré une homogénéité totale avec un profil K/K, sans fermentation des sucres ni production de gaz ou de H₂S. Cette absence de fermentation traduit une activité métabolique fermentaire très ralentie ou absente, caractéristique des psychrophiles qui survivent mais fermentent peu à froid (Samardžija et al., 2012).

Ainsi, bien que les psychrotrophes puissent conserver une capacité fermentaire visible à 4-7 °C, les psychrophiles présentent un métabolisme fermentaire limité dans ces conditions. Cependant, il est important de noter que même sans fermentation visible, ces bactéries peuvent produire des enzymes extracellulaires (lipases, protéases) qui dégradent la qualité du lait lors du stockage réfrigéré (Yang et al., 2020).

Dans le test TSI, les symboles K et A décrivent l'état du pH dans deux parties du tube : la pente (surface) et le culot (fond). K signifie un milieu alcalin (basique), indiquant l'absence de fermentation et une couleur rouge ou rose. A signifie un milieu acide, indiquant la fermentation des sucres et un changement de couleur vers le jaune dû à la production d'acides.

- K/K (culot rouge, pente rouge) : absence de fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose), milieu basique en surface et au fond.

- K/A (culot jaune, pente rouge) : fermentation du glucose uniquement, culot acide (jaune), pente basique (rouge).

- A/A (culot jaune, pente jaune) : fermentation du glucose et du lactose et/ou saccharose, milieu entièrement acide (jaune).

Ces profils sont essentiels pour différencier les bactéries selon leur capacité à fermenter différents sucres, et sont largement utilisés en microbiologie alimentaire et médicale pour l'identification bactérienne (Barrow & Feltham, 2003 ; Holt et al., 1994).

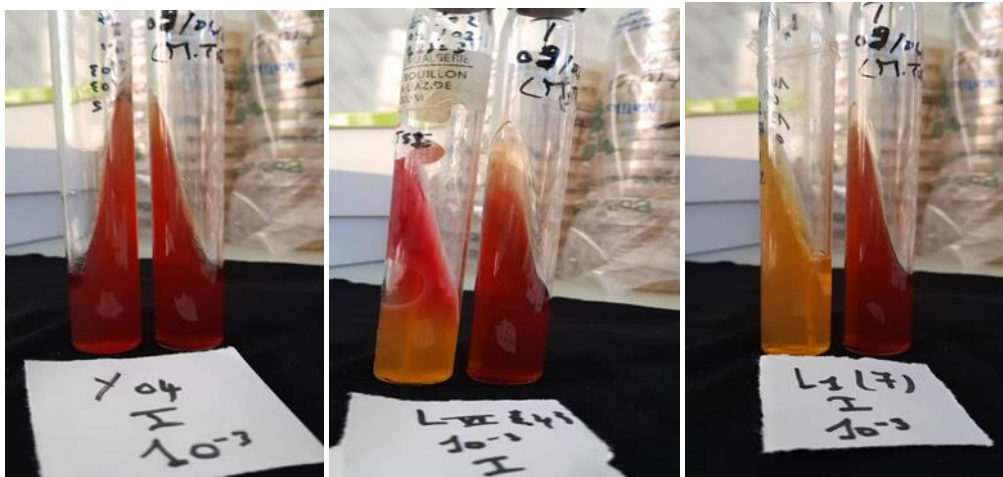


Figure 27: Profils métaboliques variés observés chez les souches bactériennes isolées, révélés par le test sur milieu TSI.

1.3.3. Le Test catalase

Le test de la catalase est une méthode rapide et fiable qui ne dépend pas de la température d'incubation pour fournir des résultats stables, ce qui en fait un outil précieux pour l'identification préliminaire des bactéries (Barrow & Feltham, 2003).

Ce test permet de distinguer efficacement les bactéries aérobies des anaérobies, facilitant ainsi l'orientation diagnostique et la classification bactérienne. Il est également utile pour détecter la présence de micro-organismes potentiellement pathogènes ou contaminants dans les produits alimentaires, contribuant ainsi à la sécurité alimentaire et à la qualité des produits (Quigley et al., 2013).

Un total de 46 tests de catalase a été réalisé sur des souches bactériennes isolées. Parmi celles-ci, 42 souches (soit environ 91,3 %) ont donné un résultat positif, indiquant la production de l'enzyme catalase capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. Quatre souches (environ 8,7 %) ont montré un résultat négatif.

La forte majorité de souches catalase-positives suggère que la plupart des bactéries isolées sont aérobies ou anaérobies facultatives, capables de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène produites lors de la respiration aérobie. Ces bactéries sont couramment rencontrées dans des environnements riches en oxygène, tels que les produits laitiers, et incluent des genres comme *Staphylococcus*, *Micrococcus*, ainsi que plusieurs bacilles Gram-négatifs aérobies, notamment *Pseudomonas* et certaines entérobactéries. Les souches catalase-négatives correspondent généralement à des bactéries anaérobies strictes ou aérotoles, telles que *Lactobacillus* et *Streptococcus*, qui jouent un rôle clé dans la fermentation des produits laitiers et peuvent servir d'indicateurs de qualité (Madigan et al., 2012 ; Jay et al., 2005).

1.3.4. Les plaques API 20 E

La galerie API 20 E est un système miniaturisé, standardisé et largement utilisé pour l'identification biochimique rapide des entérobactéries ainsi que d'autres bacilles Gram-négatifs non exigeants. Ce système comprend 20 microtubes contenant des substrats déshydratés qui, une fois réhydratés par une suspension bactérienne, permettent d'évaluer la capacité du micro-organisme à fermenter divers glucides et à produire différentes enzymes. Les résultats de ces réactions sont ensuite codés numériquement, ce qui permet une identification probable du genre et de l'espèce grâce à une base de données dédiée. Ce système offre une méthode fiable et efficace pour caractériser le profil métabolique des souches bactériennes, avec une précision reconnue dans plusieurs études cliniques (Shayegani et al., 1978 ; O'Hara et al., 1993).

Parmi les 46 souches bactériennes isolées, les 10 souches à Gram négatif soumises à l'identification à l'aide des galeries API 20 E ont révélé une diversité notable d'espèces. Les résultats ont mis en évidence la présence de plusieurs genres bactériens prédominants. Des espèces du genre *Pseudomonas* ont été fréquemment rencontrées, incluant *Pseudomonas aeruginosa* (1 souche), *Pseudomonas horikoshii* (1 souche), *Pseudomonas spp. gr.* (1 souche), et *Pseudomonas fluorescens* (1 souche). D'autres identifications incluent *Aeromonas hydrophila* (1 souche), *Aeromonas hydrophila gr2* (1 souche), *Listeria innocua* (1 souche, notée Gram +), *Psychrobacter spp.* (1 souche), *Acinetobacter* (1 souche), *Enterobacter cloacae* ou *Yersinia spp.* (1 souche), *Serratia liquefaciens* (1 souche). Ces résultats confirment la diversité bactérienne présente dans les échantillons analysés, comprenant à la fois des bacilles Gram-négatifs et des cocci Gram-positives.

Tableau 6 :

Identification préliminaire des souches isolées à l'aide des galeries API 20

Souches	Identification API20E
L1,5*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
L VI.1	<i>Pseudomonas horikoshii</i>
L V 3	<i>Aeromonas hydrophila</i> ou <i>Pseudomonas spp.</i>
LV. 1	<i>Aeromonas hydrophila</i> gr2
L9.1*	<i>Listeria innocua</i> (gram +)
FI.6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
FA.1 (3)	<i>Psychrobacter spp.</i>
LA.1 (2)	<i>Acinetobacter</i>
L3.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ou <i>Yersinia spp.</i>
L1(7)	<i>Serratia liquefaciens</i>

Les identifications obtenues par les galeries API 20 E révèlent un écosystème bactérien complexe dans les échantillons étudiés, dominé par des bactéries Gram-négatives typiques, fréquemment associées à l'altération des aliments réfrigérés. La prévalence du genre *Pseudomonas* (incluant *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas horikoshii*, *Pseudomonas fluorescens* et une *Pseudomonas spp.* gr.) est particulièrement significative, car ces bactéries sont des psychrotrophes bien connues, capables de proliférer à basse température et de produire des enzymes extracellulaires (protéases, lipases) qui dégradent la qualité organoleptique du lait, même après pasteurisation (Samaržija et al., 2012). La présence d'*Aeromonas hydrophila* indique également un potentiel d'altération, cette espèce étant associée à l'eau et aux produits laitiers. D'autres identifications comme *Serratia liquefaciens* et *Enterobacter asburiae* confirment la diversité des entérobactéries et autres bactéries Gram-négatives pouvant contaminer le lait. La détection d'*Acinetobacter* et *Psychrobacter spp.*, également des psychrotrophes, renforce l'idée d'une flore microbienne adaptée au froid (Quigley et al., 2013). La présence d'une souche Gram-positive comme *Listeria innocua*, bien que non pathogène, suggère la possibilité de contamination environnementale par des espèces apparentées potentiellement dangereuses, telles que *Listeria monocytogenes*, ce qui nécessite une surveillance accrue (Wiedmann et al., 2000).

L'identification via les plaques API 20 E de nos souches psychrophiles et psychrotrophes dans notre situation est incertaine dans le niveau espèce, mais satisfaisante dans la plupart des cas au niveau genre. Cela dit que ces souches ont présenté un niveau métabolique très bas dans les conditions d'incubation à froid, ce qui pourra erroné les résultats des tests biochimiques. Pour cela, les résultats présentés ont fait l'objet d'une combinaison entre l'aspect macroscopique, microscopique, physiologique, biochimique et enzymatique.

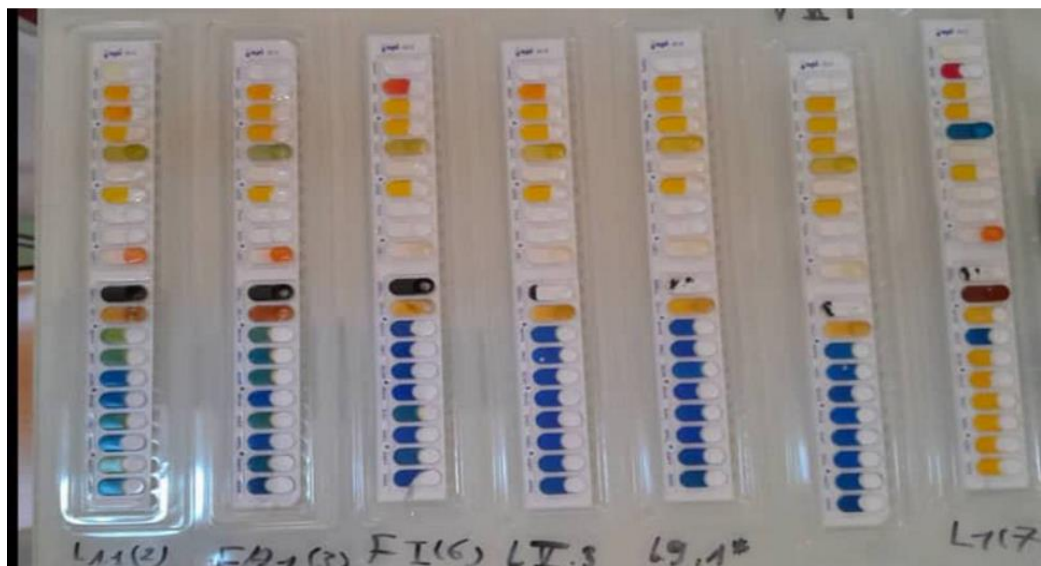


Figure 28 : Profil biochimique obtenu à l'aide de la galerie API 20 E pour l'identification de souches bactériennes isolées du lait cru et de produits laitiers.

2. Dépistage de la production d'enzymes extracellulaires

Le stockage et le transport du lait pasteurisé à basse température favorisent la prolifération de bactéries psychrotrophes capables de produire des enzymes extracellulaires thermostables, représentant une menace majeure pour la qualité et la durée de conservation des produits laitiers (Liangchao Dai et al., 2023). Notre étude visait à évaluer la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (protéases, lécithinases, amylases et lipases) par des bactéries isolées de lait pasteurisé et de produits laitiers, incubées à des températures simulant les conditions réfrigérées (4 °C, psychrophiles) et ambiantes (37 °C, psychrotrophes) ou combinées (37 °C suivi de 4 °C, psychrotrophes), afin de mieux comprendre leur rôle dans la détérioration des produits.

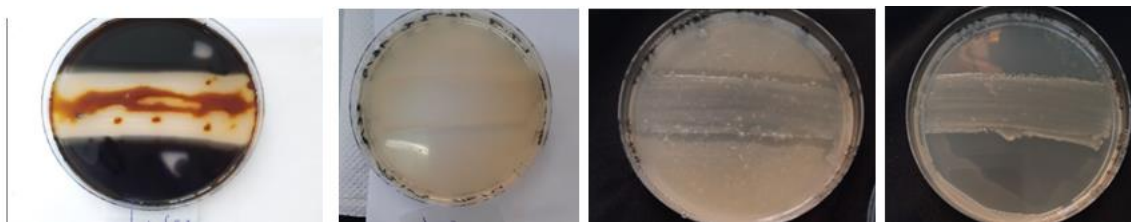


Figure 29 : Diversité des activités hydrolytiques extracellulaires (Amylases , protéases, lécithinases, lipases) illustrée par la formation de zones claires autour des colonies de bactéries isolées du lait cru et de produits laitiers.

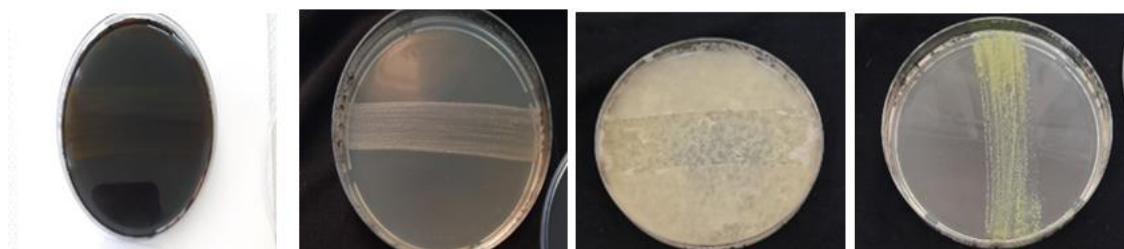


Figure 30 : Absence d'activités hydrolytiques extracellulaires (Amylases, protéases, lécithinases, lipases), mise en évidence par l'absence de halos autour des colonies bactériennes isolées du lait cru et de produits laitiers.

Sur un total de 46 isolats (78,26 % Gram positif et 21,73 % Gram négatif) provenant de 36 échantillons de lait pasteurisé, 4 de yaourt et 5 de fromage nature, la production enzymatique a présenté une variabilité selon le type d'isolats et les conditions d'incubation. Les souches psychrophiles (croissance à 4 °C) ont montré une production significative de protéases et de lécithinases (36,95 % chacune (n=17)), suivies par les lipases (21,73 % (n=10)) et les amylases (19,56 % (n=9)). Les psychrotrophes incubés à 4 °C présentaient une production enzymatique plus faible, avec moins de 7 % pour chaque enzyme. Les souches psychrotrophes (croissance à 37 °C) étaient globalement les plus enzymatiquement actives, avec 43,47 % (n=20) de protéases, 47,82 % (n=22) de lécithinases, 28,26 % (n=13) de lipases et 30,43 % (n=14) d'amylases. Parmi les isolats, L9.1* et Lv.2 se distinguent par leur capacité à produire l'ensemble des enzymes, illustrant la diversité fonctionnelle intra-espèces.

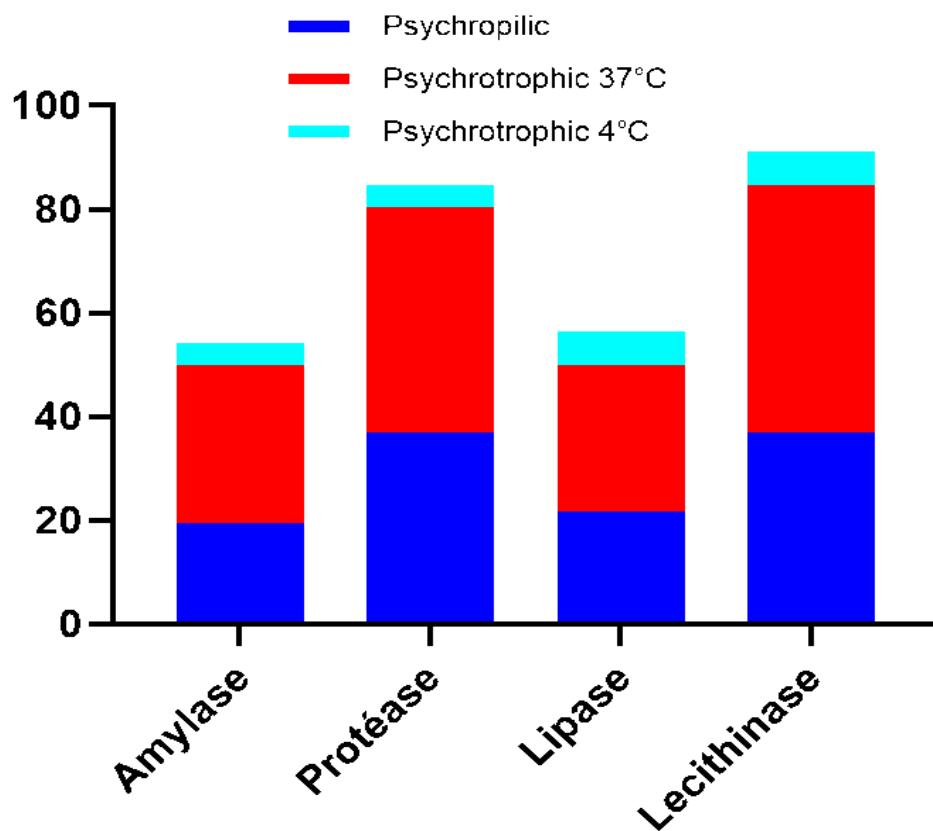


Figure 31 : Répartition relative (%) de la production enzymatique des différentes souches bactériennes psychrophiles (croissance à 4 °C), psychrotrophes incubées à 4 °C et

psychrotrophes incubées à 37 °C pour quatre types d'enzymes : protéases, lécithinases, lipases et amylases.

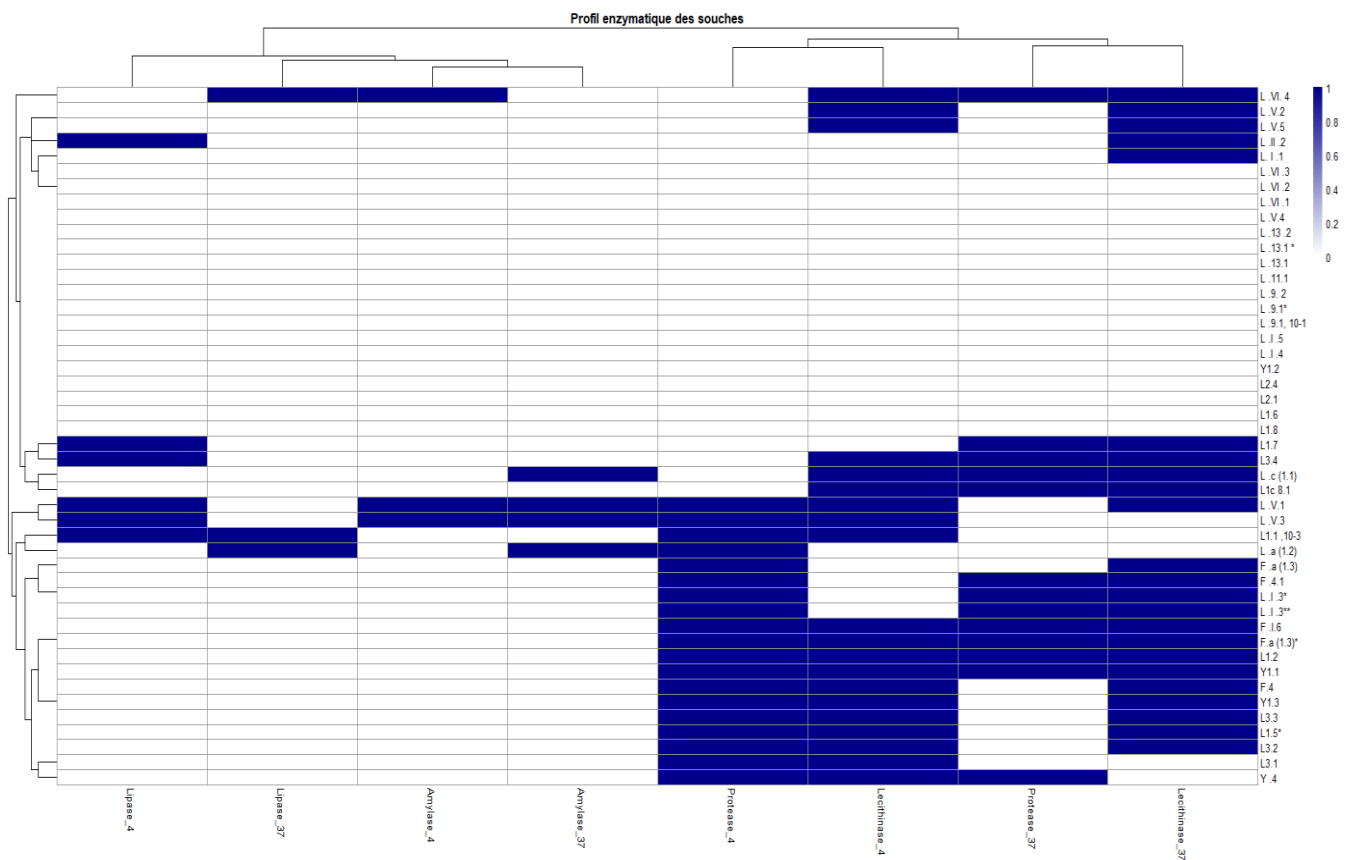


Figure 32 : profil enzymatique des souches .

L'analyse visuelle à l'aide d'une heatmap a permis d'identifier des profils enzymatiques distincts entre les différentes souches bactériennes. Les regroupements par similarité ont révélé que certaines souches présentent une activité combinée élevée pour plusieurs enzymes, suggérant une capacité accrue à altérer les composants du lait, notamment les protéines, les lipides, les glucides et les phospholipides. Cette variabilité enzymatique inter-souches pourrait s'expliquer par la diversité métabolique des groupes microbiens étudiés (psychrophiles, psychrotrophes à 4 °C et à 37 °C), ainsi que par leur origine écologique. L'observation de sous-clusters fortement colorés suggère l'existence de profils métaboliques marqués, indépendamment de la température d'isolement.

La température d'incubation et le groupe microbien sont deux facteurs déterminants dans l'expression de l'activité enzymatique ($p < 0,05$ pour plusieurs coefficients). Notamment, les souches psychrotrophes incubées à 37 °C ont montré une probabilité significativement plus

élevée de produire certaines enzymes par rapport aux psychrophiles. Cela suggère que certaines souches psychrotrophes, bien qu'adaptées au froid, expriment plus efficacement leurs enzymes à des températures modérément élevées, ce qui pourrait poser un risque en cas de rupture de la chaîne du froid. L'enzyme elle-même est également un facteur discriminant, certaines (comme la protéase) étant plus fréquemment produites que d'autres (ex. : la lecithinase), confirmant des tendances déjà décrites dans la littérature.

Les psychrotrophes à 4 °C, bien que moins actifs globalement que ceux à 37 °C, présentent encore des taux significatifs de production enzymatique, notamment de lipase et d'amylase, ce qui renforce leur implication dans l'altération du lait même en conditions de réfrigération. Les psychrophiles, en revanche, ont montré un profil plus limité, indiquant une capacité d'altération plus faible. Ces résultats soulignent l'importance de considérer la diversité métabolique des contaminants psychrotrophes dans les stratégies de conservation des produits laitiers, en particulier en ce qui concerne les enzymes thermorésistantes.

Les traitements thermiques appliqués au lait, tels que la pasteurisation ou la stérilisation à ultra-haute température (UHT), permettent d'éliminer efficacement les bactéries psychrotrophes. Cependant, les enzymes extracellulaires qu'elles produisent, notamment les protéases et les lipases, posent problème en raison de leur résistance à la chaleur. Ces enzymes thermostables peuvent survivre aux procédés thermiques industriels, altérant ainsi la qualité du lait pendant le stockage et réduisant sa durée de conservation (Xue Qin et al., 2023). Il a été démontré qu'elles conservent entre 60 et 70 % de leur activité après pasteurisation, et encore 30 à 40 % après un traitement UHT (Yalew et al., 2024).

Les enzymes issues des bactéries psychrotrophes et psychrophiles jouent un rôle crucial dans la dégradation des produits laitiers. Les protéases dégradent la caséine, ce qui modifie la texture, la couleur et diminue le rendement en fromage. Les lecithinases, en perturbant les membranes des globules gras, facilitent l'action des lipases. Bien que l'activité lipasique soit généralement moindre, elle contribue néanmoins à des défauts organoleptiques en libérant des acides gras libres responsables de goûts rances.

Pour simuler les conditions industrielles, les enzymes extracellulaires produites par des souches sélectionnées ont été soumises à des traitements thermiques imitant la pasteurisation (65 °C pendant 30 minutes ou 90 °C pendant 16 secondes) et la stérilisation UHT (140 °C pendant 5 secondes). L'activité résiduelle des protéases et lipases a ensuite été mesurée afin d'évaluer leur stabilité thermique.

Les résultats ont révélé que la protéase produite par *Pseudomonas* spp. possède une résistance thermique remarquable, conservant jusqu'à 58,6 % de son activité après un traitement UHT (140 °C, 5 s). De même, *Lactococcus* et *Chryseobacterium* spp. ont maintenu une activité protéasique partielle, avec des activités résiduelles maximales respectives de 32,3 % et 29,6 %, conformément aux observations de Yuan et al. Concernant les lipases, celle produite par *Acinetobacter* spp. a également montré une bonne thermostabilité, conservant 55,4 % d'activité après traitement UHT, ce qui corrobore les études antérieures sur la persistance des lipases d'*Acinetobacter* dans le lait pasteurisé.

Globalement, les protéases et lipases sécrétées par les bactéries psychrotrophes se distinguent par leur forte stabilité thermique. Matéos et al. ont observé qu'après chauffage à 110 °C pendant 120 secondes, l'activité protéasique résiduelle pouvait atteindre $82,5 \pm 5,6$ %. Cette robustesse enzymatique est attribuée à la capacité des protéases thermostables à se replier partiellement après dénaturation thermique, permettant ainsi une récupération de leur activité catalytique lorsque la température baisse (Xue Qin et al., 2023).

Ces enzymes thermostables sont responsables de divers défauts dans les produits laitiers, tels que le rancissement, l'apparition d'arômes désagréables, la sédimentation et l'instabilité des gels, engendrant ainsi d'importantes pertes économiques pour l'industrie laitière (Yalew et al., 2024). Par conséquent, les bactéries psychrotrophes et leurs enzymes représentent un défi majeur pour les transformateurs de lait.

Lors du stockage réfrigéré, ces enzymes jouent un rôle important dans la détérioration du lait et des produits laitiers lors du stockage réfrigéré. En hydrolysant les protéines, notamment la caséine, et les lipides, elles provoquent divers défauts technologiques et sensoriels, tels que la sédimentation de la phase protéique, la gélification spontanée, la séparation de la matière grasse, l'apparition de goûts rances ou amers, ainsi que le développement d'odeurs indésirables (Jie Wu et al., 2025).

La persistance de ces enzymes après les traitements thermiques constitue un obstacle majeur pour l'industrie laitière, car elle compromet la stabilité physique, microbiologique et organoleptique des produits finis, en particulier ceux à longue durée de conservation.

Les résultats de cette étude confirment largement les observations antérieures sur le rôle central des bactéries psychrotrophes dans la dégradation du lait pasteurisé et de ses dérivés. Dai et al. (2023) ont montré qu'environ la moitié des isolats psychrophiles issus de lait pasteurisé réfrigéré à 4 °C ou 10 °C produisent des enzymes extracellulaires, principalement des protéases

et des lipases, avec une grande variabilité selon les espèces. La majorité des isolats présentent une activité enzymatique, surtout lipolytique ou mixte (lipolytique et protéolytique), avec peu d'isolats exclusivement protéolytiques. Cette tendance suggère que les capacités enzymatiques diffèrent non seulement entre genres, mais aussi au sein d'une même espèce, ce que confirme par une importante variabilité intra-spécifique.

Parmi les genres bactériens psychrotrophes fréquemment isolés dans le lait pasteurisé comprennent des bactéries Gram-positives comme *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria* et *Streptococcus*, ainsi que des Gram-négatives telles qu'*Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* et *Yersinia* (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007 ; Wei et al., 2019 ; Yang et al., 2020). Ces microorganismes sont reconnus pour leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques extracellulaires thermostables, notamment des protéases, des lipases et parfois des lécithinases, qui conservent une activité partielle même après des traitements thermiques sévères comme la pasteurisation ou la stérilisation UHT.

Rabelo et al. (2020), ont mis en évidence la production d'enzymes altérantes dans divers produits laitiers biologiques, notamment les lécithinases, protéases et lipases. Ils notent, que les enzymes lipolytiques, bien que produites par un faible pourcentage d'isolats, sont responsables des premières dégradations sensorielles (goût rance, astringent, savon) dues à la libération d'acides gras libres. De plus, la dégradation des membranes des globules gras par les phospholipases ou lécithinases favorise l'action des lipases, aggravant ainsi l'altération du produit.

D'une part, la combinaison des approches culture-dépendantes et des analyses enzymatiques a révélé que l'identification taxonomique seule ne permet pas de prédire de manière fiable l'impact technologique des bactéries. En effet, des isolats appartenant à une même espèce peuvent présenter des profils enzymatiques très hétérogènes, ce qui souligne la nécessité d'évaluations fonctionnelles directes pour caractériser leur potentiel d'altération.

cette étude met en lumière la complexité encore mal caractérisée de la flore psychrotrophe du lait cru et l'importance de développer des outils de détection ciblant non seulement les espèces bactériennes, mais aussi leurs activités enzymatiques. Alors que les technologies de traitement thermique et de réfrigération progressent, les enzymes résiduelles produites par ces microorganismes deviennent le principal facteur limitant la qualité et la durée de vie des produits laitiers.

Par ailleurs, les travaux de Rabelo et al. (2020) mettent en évidence l'impact sensoriel et technologique de ces enzymes, notamment la dégradation des caséines et des triglycérides, entraînant des saveurs amères ou rances, une diminution du rendement fromager et une altération de la texture. Cette étude apporte un éclairage supplémentaire en identifiant *Microbacterium* comme un genre thermoturque enzymatiquement actif, potentiellement indicateur de contamination et difficile à éliminer par pasteurisation. Les conséquences industrielles de ces activités enzymatiques sont bien documentées. Yalew et al. (2024) rappellent que la présence d'enzymes thermostables peut provoquer des défauts majeurs tels que la gélification d'âge du lait UHT, phénomène que nous avons confirmé en lien avec une charge bactérienne supérieure à 5,5 log UFC/mL. De plus, les résidus enzymatiques inhibent les cultures de fermentation, perturbant les temps de coagulation et affectant la texture de produits comme le fromage et le yaourt. Des défauts spécifiques, comme la décoloration bleue de la mozzarella, ont été attribués à la contamination par des psychrotrophes pigmentés (ex. *Pseudomonas fluorescens*), illustrant la diversité des altérations possibles.

Enfin, bien que certaines de ces enzymes puissent être bénéfiques en fromagerie lors d'un affinage contrôlé, leur présence incontrôlée dans le lait pasteurisé constitue un facteur critique de détérioration. Elles représentent ainsi une arme à double tranchant, dont l'impact dépend du contexte technologique et des conditions de maîtrise.

3. Évaluation de la formation de biofilm

Les résultats de la détection de la production du biofilm *in vitro* par la technique des microplaques de titration en PVC 96 puits ont montré que toutes les bactéries psychrophiles isolées sont classées comme faiblement formatrices de biofilms ($n = 6/6$) à une température comprise entre 4 et 7 °C, après 96 heures d'incubation, et toutes ont été isolées à partir du lait.

Les bactéries psychrotrophes isolées sont, quant à elles, classées en trois catégories selon leur capacité à former des biofilms : faible, moyenne et forte, lors de deux conditions d'incubation, à 37 °C et entre 4 et 7 °C.

Les résultats obtenus pour les bactéries psychrotrophes après une incubation de 96 heures à 37 °C montrent que 92,30 % ($n=24/26$) des bactéries sont fortement formatrices de biofilms, dont 69,23% ($n=18/24$) proviennent du lait, 11,53 % ($n=3/24$) du fromage et 11,53 % ($n=3/24$) du yaourt. Par ailleurs, 3,84 % ($n = 1/26$) sont moyennement formatrices de biofilms,

provenant du lait, et 3,84 % ($n = 1/26$) sont faiblement formatrices de biofilms, issues du fromage (figure n°38).

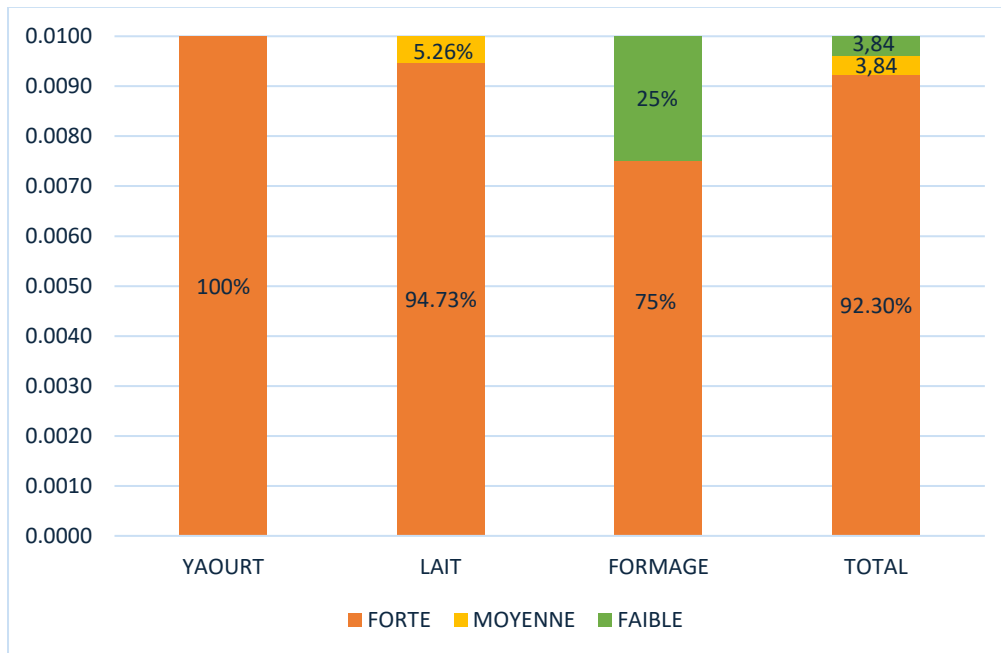


Figure 33 : classification des bactéries psychrotrophes testées liés à leur capacité de former des biofilms à 37°C pendant 96h.

En revanche, les résultats obtenus à une température comprise entre 4 et 7 °C, avec le même temps d'incubation, révèlent une distribution différente : 38,46% ($n=10/26$) des bactéries sont fortement formatrices de biofilms, dont 26,92% ($n=7/10$) proviennent du lait, 7,69% ($n=2/10$) du yaourt et 3,84% ($n=1/10$) du fromage ; 34,61% ($n = 9 /26$) sont moyennement formatrices, avec 30,76% ($n=8/9$) provenant du lait et 3,84% ($n=1/9$) du fromage ; enfin, 26,92 % ($n = 7/26$) sont faiblement formatrices de biofilms, dont 15,38% ($n=4/7$) proviennent du lait, 7,69% ($n=2/7$) du fromage et 3,84% ($n=1/7$) du yaourt (figure n°39).

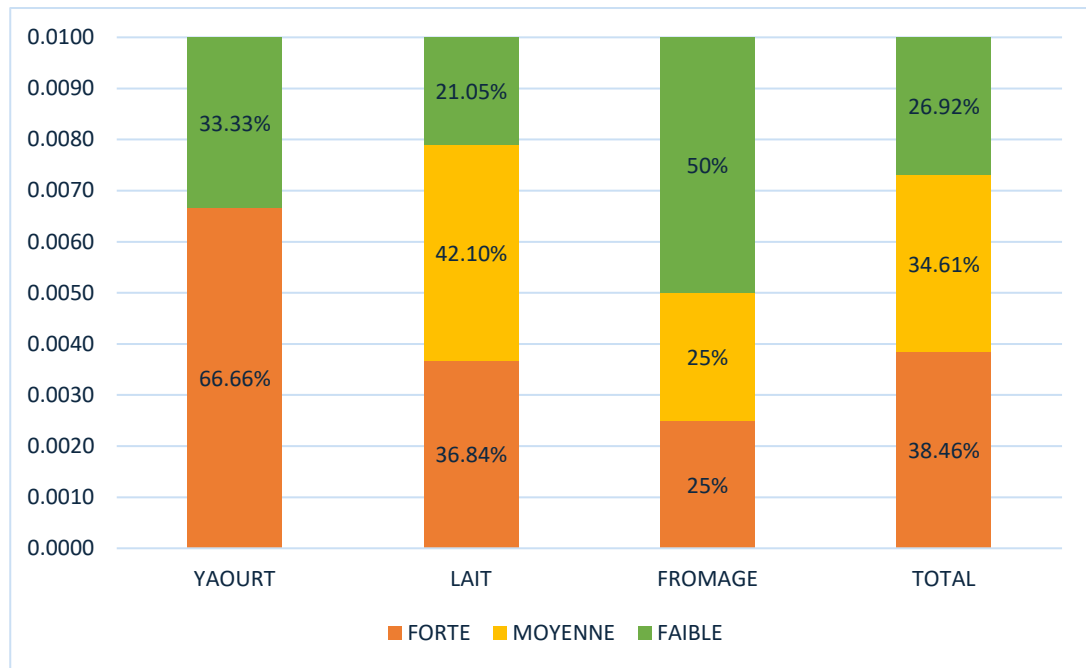


Figure 34 : classification des bactéries psychrotrophes testées liés à leur capacité de former des biofilms à une température comprise entre 4 et 7 °C pendant 96h.

La recherche de Rabêlo et al. (2021) a également démontré qu'il existe trois catégories de bactéries en termes de formation de biofilms à 37 °C : faible, moyenne et forte. Selon leurs résultats, 68,7 % des isolats bactériens étaient peu ou pas producteurs de biofilms, 28,3 % ont formé des biofilms de manière modérée, tandis que seulement 3,0 % étaient fortement producteurs de biofilms. Une prévalence faible ou absente de formation de biofilms a été observée respectivement dans le lait entier pasteurisé (55,1 %) et les fromages Minas Frescal (89,7 %). Dans les yaourts, seules des formations de biofilms faibles (50 %) et moyennes (50 %) ont été détectées.

Les résultats de l'étude de Zarei et al. (2023) ont montré qu'après une incubation de 72 heures à 7 °C, 4 souches (soit 11,1 %) ne formaient pas de biofilm, tandis que 10 (27,8 %) et 19 (52,8 %) généraient respectivement de petites et moyennes quantités de biofilm. À ce stade, trois souches (8,3 %) produisaient de vastes quantités de biofilm sur des microplaques en polystyrène.

L'agrégation bactérienne est un processus par lequel les microorganismes intercommuniquent et peuvent constituer une communauté multi-espèces (Bogo et al., 2020). Presque toutes les variétés de bactéries psychrotrophes ont la faculté de s'attacher aux surfaces dures, ce qui leur permet de créer un biofilm sur les parois internes des équipements laitiers

(Samaržija et al., 2012). Même les bactéries qui ne forment pas de biofilm peuvent s'attacher aux matrices générées par d'autres bactéries (Rabêlo et al., 2021).

La capacité de produire un biofilm est une autre source d'inquiétude associée aux bactéries psychrotrophes présentes dans le lait. Cette faculté peut favoriser leur persistance dans les dispositifs de traite, les réservoirs, les joints et les tuyaux (Zarei et al., 2023), considérés comme une source importante de recontamination (Rabêlo et al., 2021).

Par conséquent, cela entraîne un effet défavorable sur l'ensemble de l'industrie laitière, puisqu'il peut se manifester à toutes les étapes du développement des produits laitiers. Ainsi, l'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection peut diminuer (Bogo et al., 2020), entraînant d'importantes pertes financières dues à la détérioration des produits (Hebishy et al., 2024).

4. Influence de la température sur la durée de conservation du lait

Les résultats montrent une relation exponentielle inverse entre la température de stockage et la durée de conservation du lait pasteurisé. Pour *Pseudomonas*, la durée de vie chute de 28 jours à 0°C à seulement 2 jours à 10°C, révélant une sensibilité thermique accrue. Cette tendance s'explique par l'activation des enzymes protéolytiques (thermostables) et lipolytiques qui catalysent la dégradation des composants du lait dès que la température dépasse 4°C.

Pour *Bacillus*, bien que moins virulent à basse température, on observe un point critique à 8°C où la durée de vie diminue de 60%. Ce phénomène correspond à la transition des spores vers des formes végétatives actives. La différence fondamentale entre ces deux genres bactériens réside dans leur cinétique métabolique : *Pseudomonas* double sa biomasse en 2 heures à 4°C contre 8 heures pour *Bacillus*, expliquant son impact prédominant sur l'altération précoce du lait.

Impact de la température sur la durée de conservation du lait

pH fixé à 6.8 (pH naturel du lait)

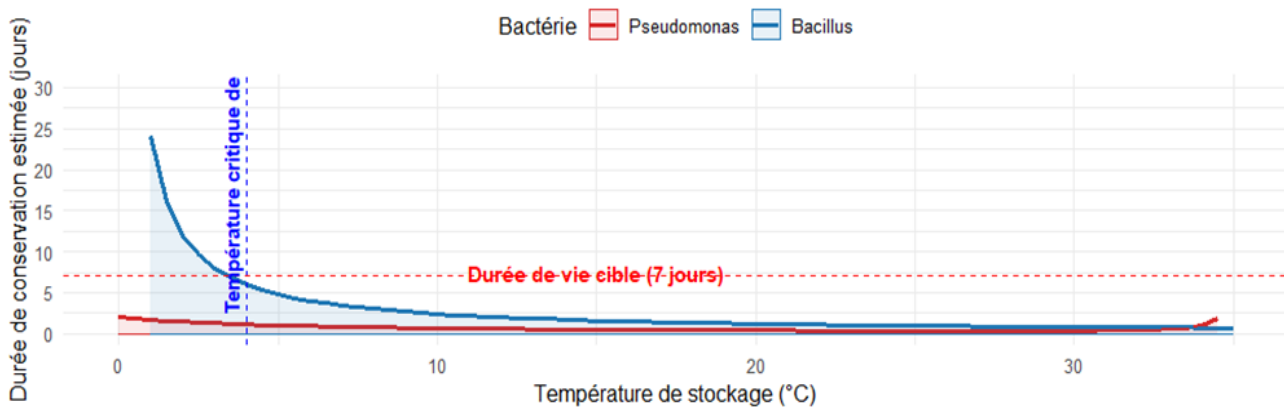


Figure 35 : Impact de la température sur la durée de conservation du lait.

5. Impact du pH sur la durée de conservation (Température = 4°C)

L'analyse révèle un optimum de croissance à pH 6.6-6.8 (pH naturel du lait) pour les deux bactéries, où la durée de vie minimale est observée. L'acidification à pH 6.0 prolonge la conservation de 170% pour *Pseudomonas* et 240% pour *Bacillus*, démontrant l'efficacité de l'acidification comme barrière antimicrobienne.

Cela explique la non détection de ces deux genres dans les autres prélèvements des produits à base du lait (fromage nature et yaourt).

Notamment, *Bacillus* montre une sensibilité accrue aux pH < 6.0 en raison de l'incapacité de ses spores à germer en milieu acide.

Ceci ouvre des perspectives pour l'utilisation de cultures acidifiantes bioprotectrices dans les produits laitiers.

Impact du pH sur la durée de conservation du lait

Température fixée à 4°C

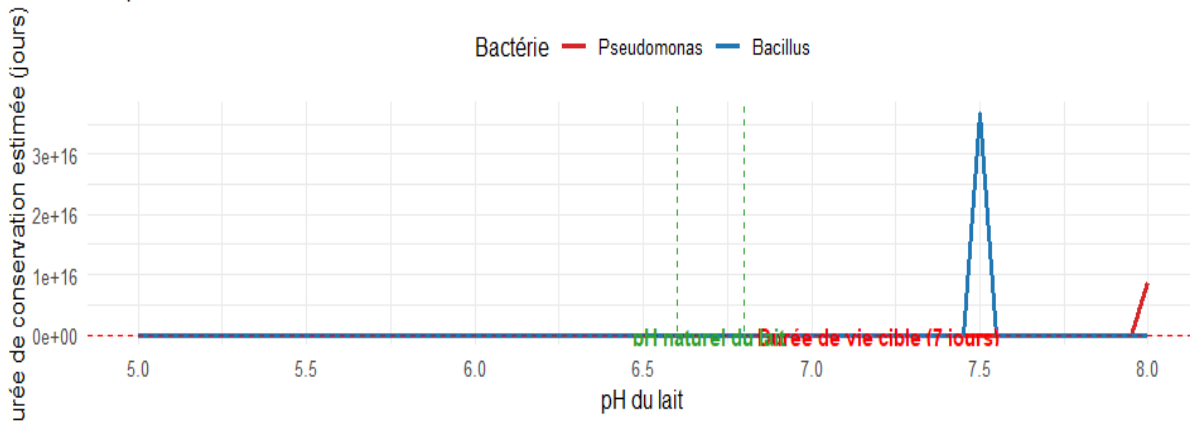


Figure 36 : Impact du pH sur la durée de conservation du lait.

6. Interaction température-pH et implications pratiques

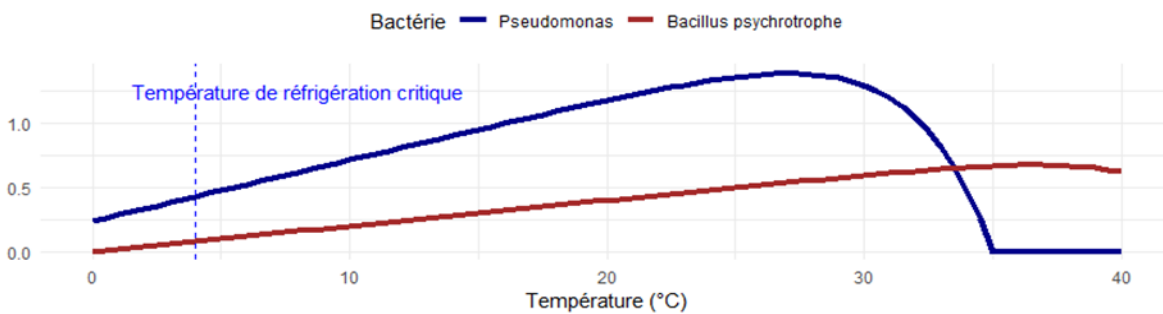
Les cartes thermiques révèlent des comportements distincts :

- *Pseudomonas* : La zone critique (< 7 jours) couvre 85% du domaine étudié (0-10°C, pH 5.5-7.5), confirmant son rôle majeur dans l'altération réfrigérée. Le point critique industriel (4°C, pH 6.8) correspond à un "hot spot" métabolique où la lactase bactérienne atteint son Vmax.
- *Bacillus* : Présente deux noyaux de risque :
 1. Basse température/pH neutre (germination lente des spores)
 2. Température >8°C/pH acide (croissance végétative accélérée)

Ces profils opposés impliquent des stratégies de contrôle différenciées :

- Pour *Pseudomonas* : Refroidissement rapide post-pasteurisation < 2°C
- Pour *Bacillus* : Acidification modérée (pH 6.2-6.5) combinée à la biopréservation

Effet de la température sur la croissance (pH=6.8)



Effet du pH à 4°C

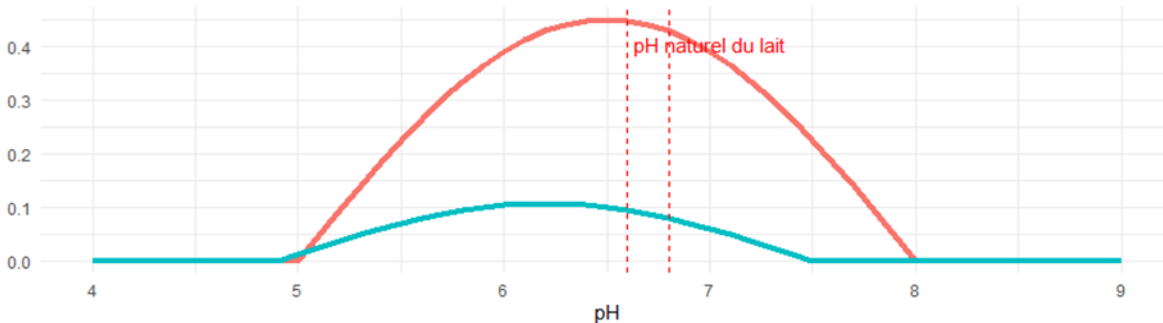


Figure 37 : Influence de la température et pH sur la croissance des bactéries psychrotrophes dans le lait.

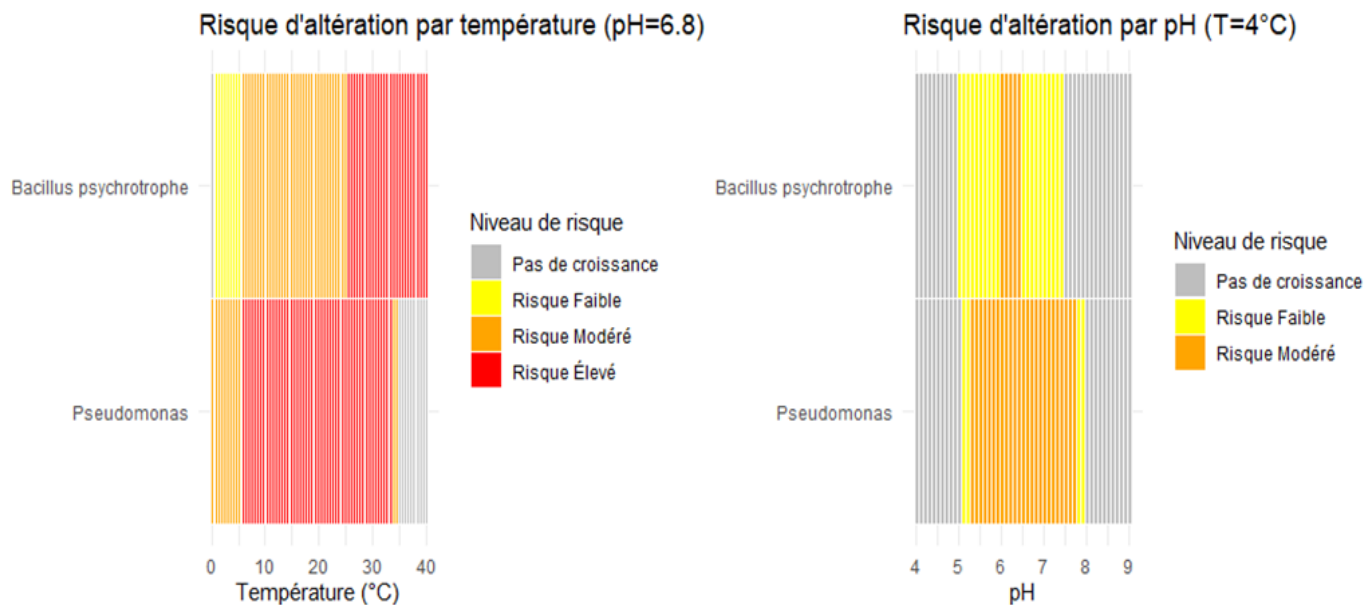


Figure 38 : Évaluation du risque d'altération microbienne en fonction de la température et du pH chez *Bacillus psychrotrophes* et *Pseudomonas*.

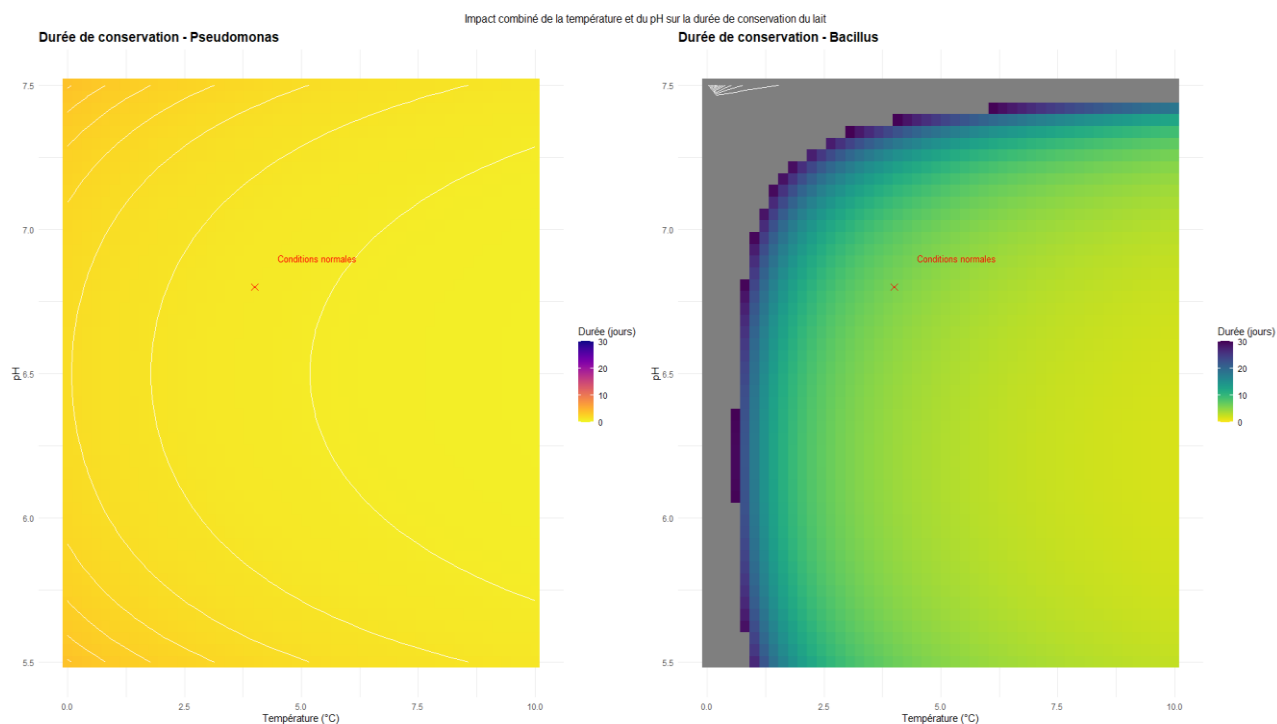


Figure 39 : Impact combiné de la température et du pH sur la durée de conservation du lait.

A decorative graphic of a scroll, consisting of a horizontal line with rounded ends and a vertical line extending downwards from the left end, all enclosed in a thin black border. The scroll is positioned in the upper-middle section of the page.

Conclusion & perspectives

La charge bactérienne psychrotrophe ainsi que le profil des bactéries Gram-négatives et Gram-positives ont été évalués dans 27 produits laitiers biologiques commerciaux, incluant le lait entier pasteurisé, le fromage nature et le yaourt, répartis équitablement. La capacité de formation de biofilm et la production d'enzymes de détérioration ont également été étudiées.

Les résultats ont montré des niveaux élevés de bactéries psychrotrophes dans ces produits, révélant des problèmes de qualité microbiologique liés notamment aux conditions de manipulation. Ces bactéries présentent la capacité de produire des enzymes de détérioration et de former des biofilms.

Au total, 46 isolats incubés à 7 °C et 37 °C ont produit au moins une enzyme, avec 7, 23 et 7 isolats capables d'en produire respectivement deux, trois et quatre. Les isolats psychrophiles à gram positif L9.1* et Lv.2, prédominants dans le lait cru, étaient également de forts producteurs d'enzymes. Parmi les isolats, 33 présentaient une activité protéolytique, 23 une activité lipolytique, 23 une activité amylasique et 39 une activité lécithinasique. La production de ces enzymes thermostables pose un défi majeur pour l'industrie laitière, car elles résistent aux traitements thermiques et accélèrent la détérioration.

Tous les isolats psychrophiles (100 %) se sont révélés faiblement producteurs de biofilm, malgré que le nombre des souches bactériennes testées soit statistiquement non significatif mais plutôt informatif. En revanche, les isolats psychrotrophes ont montré des capacités de production de biofilm variables selon la température d'incubation. À 37 °C, 92,30 % des isolats psychrotrophes étaient fortement producteurs de biofilm, 3,84 % modérés, et 3,84 % faibles producteurs. Cependant À 4 °C, 38,64 % des isolats étaient forts producteurs, 34,61 % modérés et 26,92 % faibles producteurs. Ces biofilms favorisent l'adhésion bactérienne aux surfaces, rendant leur élimination plus difficile et augmentant le risque de contamination.

Par ailleurs, cette étude quantifie l'impact différentiel de *Pseudomonas* et *Bacillus* comme étant les souches les plus détectées dans notre étude sur la stabilité du lait pasteurisé.

Trois leviers (niveau) critiques émergent :

1. Maîtrise thermique : Maintenir une chaîne du froid < 4°C sans fluctuation
2. Modulation du pH : Cibler pH 6.2-6.5 pour inhiber sélectivement *Bacillus*
3. Délai critique : Limiter la conservation à 7 jours maximum à 4°C

Ces résultats soulignent des lacunes dans les pratiques d'hygiène lors de la production de produits laitiers en Algérie, soulevant des inquiétudes quant à la sécurité alimentaire et à la qualité. Pour répondre à ces enjeux, il est essentiel d'adopter des méthodes de détection avancées, plus rapides et précises, afin d'assurer la production de produits laitiers sûrs et de haute qualité.

Il est essentiel de prioriser la détection précoce et l'analyse fonctionnelle des bactéries psychrotrophes et de leurs enzymes, particulièrement au niveau des fermes, afin de limiter les pertes économiques dès l'amont de la chaîne de production.

Les résultats obtenus et les observations faites pendant cette étude ont permis de répondre à certaines interrogations, mais ont aussi contribué à soulever d'autres questionnements. Par conséquent, plusieurs axes peuvent être envisagés pour compléter et poursuivre ce travail :

- ✓ L'identification précise des souches doit être complétée par des techniques avancées de biologie moléculaire, telles que le séquençage de l'ARN 16S et l'analyse génomique complète, permettant une caractérisation fine des populations microbiennes.
- ✓ Une cartographie détaillée de la prévalence des souches toxigènes doit être établie pour mieux anticiper et prévenir les risques de détérioration des produits laitiers.
- ✓ Des études ciblées sont nécessaires pour évaluer les dangers microbiens, en particulier la résistance aux antibiotiques, aussi bien chez l'Homme que chez les animaux d'élevage.
- ✓ Il convient également d'approfondir les recherches sur les biofilms, notamment en explorant des méthodes innovantes pour inhiber l'adhésion bactérienne sur les surfaces en contact avec les aliments, afin d'améliorer la maîtrise de la contamination.

Enfin, ces avancées contribueront à l'allongement de la durée de vie du lait consommé en Algérie, notamment par la prolongation de la date limite de consommation (DLC), tout en garantissant un haut niveau de sécurité sanitaire et de qualité des produits.



Références Bibliographiques

1. Abebe, E., Gugsu, G., & Ahmed, M. (2016). Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *Journal of Tropical Medicine*, 2016, Article ID 8396872. <https://doi.org/10.1155/2016/8396872>
2. Al-Ghanayem, A. A., & Joseph, B. (2020). Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 104, Issue 7, pp. 2871–2882). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10429-x>
3. Amiot, J., et al. (2002). Flore indigène du lait cru. Université Mostaganem.
4. Anonyme. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et nutrition. [p. 28].
5. Atia, R. M., Mohamed, H. A., AboELRoos, N. A., & Awad, D. A. B. (2023). Growth patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in milk fortified with chitosan and selenium nanoparticles during refrigerated storage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(11). <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03757-3>
6. Barrow, G. I., & Feltham, R. K. A. (2003). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria* (3rd ed.). Cambridge University Press.
7. Baş, M., Yüksel, M., & Çavuşoğlu, T. (2007). Difficulties and barriers for the implementing of HACCP and food safety systems in food businesses in Turkey. *Food Control* 18, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.09.002>
8. Battistuzzi, F. U., Feijao, A., & Hedges, S. B. (2004). A genomic timescale of prokaryote evolution: Insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evolutionary Biology*, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-44>
9. Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 1–20.
10. Białkowska, A., Majewska, E., Olczak, A., & Twarda-clapa, A. (2020). Ice binding proteins: Diverse biological roles and applications in different types of industry. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10020274>
11. Bogo, M., Aracéli Costa, G., Paula Guedes Frazzon, A., & de Souza da Motta, A. (2020). *EVALUATION OF THE ADHESION POTENTIAL OF PSYCHROTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM REFRIGERATED RAW BUFFALO MILK: SIMULATING STORAGE CONDITIONS*.
12. Bouchenitfa, Y. (n.d.). Psychrotrophic bacteria in milk and their negative effects on dairy products quality: A review. République Algérienne Démocratique et Populaire, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, Sciences de la Nature et de la Vie. Présenté devant le jury : Chekroud K. (Président), Bouchekrit M. (Examinateur), Boubendir A. (Promoteur)

13. BRC. (2012). BRC Global standard for food safety. Issue 6. London: British Retail Consortium.
14. Buchanan, R.L., Smith, J.L., & Long, W. (2000). Microbial risk assessment : dose-response relations and risk characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 159–172.
15. Calahorrano-Moreno, M. B., Ordoñez-Bailon, J. J., Baquerizo-Crespo, R. J., Dueñas-Rivadeneira, A. A., B S M Montenegro, M. C., & Rodríguez-Díaz, J. M. (2022b). Contaminants in the cow's milk we consume? Pasteurization and other technologies in the elimination of contaminants. *F1000Research*, 11, 91. <https://doi.org/10.12688/f1000research.108779.1>
16. Cayot, P., & Lorient, D. (1998). La micelle de caséine. In *Structures et technofonctions des protéines*.
17. Codex Alimentarius. (2006). Codex General Standard for Cheese: CODEX STAN A-6-1978. 26th Session FAO/WHO Food Standards Programme.
18. Coleman, M.E., & Marks, H.M. (1999). Qualitative and quantitative risk assessment. *Food Control* 10, 289–297. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(99\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00052-3)
19. Cousin, M. A. (1982). Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection*, 45(2), 172–207. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-45.2.172>
20. Dai, L., Hu, S., Pang, X., Zhang, S., Yu, D., Zhang, Y. M., Wang, Y., Wu, J., Lv, J., & Lu, G. (2023). Community diversity of psychrophilic bacteria in dairy farm raw milk and its characteristic enzyme production at different temperature. *Food Bioscience*, 54, 102921. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102921>
21. Dash, K. K., Fayaz, U., Dar, A. H., Shams, R., Manzoor, S., Sundarsingh, A., Deka, P., & Khan, S. A. (2022). A comprehensive review on heat treatments and related impact on the quality and microbial safety of milk and milk-based products. In *Food Chemistry Advances* (Vol. 1). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100041>
22. Decimo, M., Silveti, T., & Brasca, M. (2016). Antibiotic Resistance Patterns of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria from Bulk Tank Milk. *Journal of Food Science*, 81(4), M944-51. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13250>
23. Dey, A., Chattopadhyay, A., Saha, P., Mukhopadhyay, S., Maiti, T. K., Chatterjee, S., & Roy, P. (2014). An Approach to the Identification and Characterisation of a Psychrotrophic Lipase Producing *Pseudomonas* sp ADT3 from Arctic Region. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 05(04), 322–332. <https://doi.org/10.4236/abb.2014.54040>
24. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002 Sep;8(9):881-90. doi: 10.3201/eid0809.020063. PMID: 12194761; PMCID: PMC2732559.
25. EFSA. (2020). Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production. *EFSA J.* 18, 1–89. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6090>

26. Eskandari, A., Leow, T. C., Rahman, M. B. A., & Oslan, S. N. (2020). Antifreeze proteins and their practical utilization in industry, medicine, and agriculture. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 12, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10121649>
27. FAO. (1999). Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. *FAO Agric. Consum. Prot.* 63, 68. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(66\)80695-8](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(66)80695-8)
28. FAO/OMS. (2019). Milk and dairy products in human nutrition. *FAO Food and Nutrition Paper* 91.
29. FAO/WHO. (2003). Hazard characterization for pathogens in food and water: Guidelines. *Microbiological Risk Assessment Series* 3. WHO Press, Geneva.
30. FAO/WHO. (2008). Exposure assessment of microbiological hazards in foods: Guidelines. *Microbiological Risk Assessment series n°07*. Rome.
31. Farooq, S., Nazir, R., Ganai, S. A., & Ganai, B. A. (2021). Isolation and characterization of a new cold-active protease from psychrotrophic bacteria of Western Himalayan glacial soil. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92197-w>
32. Featherstone, S. (2015). Hazard analysis and critical control point (HACCP) systems in food canning, [a complete course in canning and related processes \(Fourteenth Edition\)](#) Volume 2: Microbiology, Packaging, HACCP and Ingredients, Pages 215–234
33. Ferrocino, I., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2022). Investigating dairy microbiome: an opportunity to ensure quality, safety and typicity. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 73, pp. 164–170). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.08.009>
34. Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>. PMID: 27510863
35. Fredot, E. (2016). *Connaissance des aliments*. Éditions Lavoisier, Paris.
36. Garayoa, R., Vitas, A.I., Díez-Leturia, M., & García-Jalón, I. (2011). Food safety and the contract catering companies: food handlers, facilities and HACCP evaluation. *Food Control*, 22, 2006–2012.
37. Garedew, L., Mengesha, D., Birhanu, A., & Mohammed, A. (2015). Diverse Gram-positive bacteria identified from raw and pasteurized cow milk consumed at Gondar town and its environs, Ethiopia. In *Ethiopian Veterinary Journal* (Vol. 19, Issue 1). <http://dx.doi.org/J0.4314/evj.v19il.3>
38. Gharib, G., Saeidiharzand, S., Sadaghiani, A. K., & Koşar, A. (2022). Antifreeze Proteins: A Tale of Evolution From Origin to Energy Applications. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.770588>
39. Goetz, C., Sanschagrin, L., Jubinville, E., Jacques, M., & Jean, J. (2024). Recent progress in antibiofilm strategies in the dairy industry. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25554>

40. Gounot, A. M. (1986). Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia*, 42(11-12), 1192-1197. <https://doi.org/10.1007/BF01946390>. PMID: 3536570.
41. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.
42. Hamdan, A. (2018). Psychrophiles: Ecological significance and potential industrial application. In *South African Journal of Science* (Vol. 114, Issues 5–6). Academy of Science of South Africa. <https://doi.org/10.17159/sajs.2018/20170254>
43. Hantsis-Zacharov, E., & Halpern, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7162–7168. <https://doi.org/10.1128/AEM.00866-07>
44. Hebishy, E., Yerlikaya, O., Reen, F. J., Mahony, J., Akpinar, A., Saygili, D., & Datta, N. (2024). Microbiological aspects and challenges of dairy powders – II: Biofilm/biofouling. In *International Journal of Dairy Technology* (Vol. 77, Issue 3, pp. 691–712). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.13076>
45. Heinemann, U., & Roske, Y. (2021). Cold-shock domains—abundance, structure, properties, and nucleic-acid binding. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 2, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers13020190>
46. Higuchi, K., Yabuki, T., Ito, M., & Kigawa, T. (2020). Cold shock proteins improve *E. coli* cell-free synthesis in terms of soluble yields of aggregation-prone proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(6), 1628–1639. <https://doi.org/10.1002/bit.27326>
47. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (Eds.). (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Williams & Wilkins.
48. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (2011). *Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management*. Springer.
49. Ingraham, J. L., & Stokes, J. L. (1959). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 23, 97–108.
50. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2011). *Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management*. Springer.
51. ISO. (2009). ISO/TS 22002-1 Programmes prérequis pour la sécurité des denrées alimentaires. Partie 1: Fabrication des denrées alimentaires.
52. ISO. (2018). ISO 22000:2018 Systèmes de management de la sécurité des denrées alimentaires — Exigences pour tout organisme appartenant à la chaîne alimentaire
53. Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed.). Springer Science+Business Media.
54. Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7th ed.). Springer.

55. Jeantet, R., Brulé, G., & Delaplace, G. (2011). *Génie des procédés appliqué à l'industrie laitière* (2nd ed., p. 60). Tec et Doc. Lavoisier.
56. Kasana, R. C. (2010). Proteases from Psychrotrophs: An Overview. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 36, Issue 2, pp. 134–145). <https://doi.org/10.3109/10408410903485525>
57. Keto-Timonen, R., Hietala, N., Palonen, E., Hakakorpi, A., Lindström, M., & Korkeala, H. (2016). Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic *Yersinia*. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01151>
58. Khalid, T., Hdaifeh, A., Federighi, M., Cummins, E., Boué, G., Guillou, S., & Tesson, V. (2020). Review of quantitative microbial risk assessment in poultry meat: the central position of consumer behavior. *Foods*, MDPI, 9, 1661. doi:10.3390/foods9111661.
59. Kim, H. J., Lee, J. H., Hur, Y. B., Lee, C. W., Park, S. H., & Koo, B. W. (2017). Marine antifreeze proteins: Structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Marine Drugs*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/md15020027>
60. Knight, G. (2015). Biofilm control in dairy manufacturing plants. In K. H. Teh, S. Flint, J. Brooks, & G. Knight (Eds.), *Biofilms in the Dairy Industry* (pp. 229–251). Wiley Blackwell.
61. Kuddus, M., Roohi, Arif, J., & Ramteke, P. (2011). Cold-active Microbial α -amylase: Adaptation Strategies and Biotechnological Potentials. *Biotechnology(Faisalabad)*, 10.
62. Kumar, A., Mukhia, S., Kumar, N., Acharya, V., Kumar, S., & Kumar, R. (2020). A Broad Temperature Active Lipase Purified From a Psychrotrophic Bacterium of Sikkim Himalaya With Potential Application in Detergent Formulation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00642>
63. Lammerding, A.M., & Fazil, A. (2000). Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 147–157. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00269-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00269-5)
64. Laslo, É., & György, É. (2018). Evaluation of the microbiological quality of some dairy products. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 11(1), 27–44. <https://doi.org/10.2478/ausal-2018-0002>
65. Leekumjorn, S., Cho, H. J., Wu, Y., Wright, N. T., Sum, A. K., & Chan, C. (2009). The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(7), 1508–1516. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.002>
66. Luquet, F. (1990). *Lait et produits laitiers (vache, chèvre, brebis) : transformation et technologie*. Techniques et documentation Lavoisier. Paris. [pp. 41–65].
67. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2012). *Brock biology of microorganisms* (13th ed.). Pearson Education.

68. Ministère de l'Économie et des Finances. (2009). Spécifications techniques de l'achat public lait et produits laitiers. Paris, France : OEAP. [p. 47].
69. Monteiro De Souza, P. (2010). APPLICATION OF MICROBIAL-AMYLASE IN INDUSTRY-A REVIEW. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850–861.
70. Moyer, C. L. (2007). Psychrophiles and psychrotrophs. In *Encyclopedia of microbiology* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000402.pub2>
71. Nakaminami, K., Karlson, D. T., & Imai, R. (2006). Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. <https://www.pnas.org>
72. O'Hara, C. M., Rhoden, D. L., & Miller, J. M. (1993). Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemicals for identification of Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6), 1397–1401.
73. Oh, H., & Lee, J. (2024). Psychrotrophic Bacteria Threatening the Safety of Animal-Derived Foods: Characteristics, Contamination, and Control Strategies. *Food Science of Animal Resources*, 44(5), 1011–1027. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2024.e70>
74. Özer, B., & Yaman, H. (2014). Milk and milk products: Microbiology of liquid milk. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed., pp. 721–727). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00219-6>
75. Pougheon, S., & Goursaud, J. (2001). Le lait : caractéristiques physicochimiques. In G. Debry (Ed.), *Lait, nutrition et santé* (pp. 342). Tec & Doc, Paris. ANONYME. (2000). *Manuel de transformation du lait* (2ème éd.). [105 p.].
76. Qin, X., Cheng, J., Qi, X., Guan, N., Chen, Q., Pei, X., Jiang, Y., Yang, X., & Man, C. (2023). Effect of thermostable enzymes produced by psychrotrophic bacteria in raw milk on the quality of ultra-high temperature sterilized milk. *Foods*, 12(20), 3752. <https://doi.org/10.3390/foods12203752>
77. Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
78. Rabêlo, C. A., Ricardo, M., Porfírio, J. A., Pimentel, T. C., Nascimento, J. dos S., & Costa, L. E. de O. (2021). Psychrotrophic bacteria in brazilian organic dairy products: Identification, production of deteriorating enzymes and biofilm formation. *Food Science and Technology (Brazil)*, 41(3), 799–806. <https://doi.org/10.1590/fst.68420>
79. Rahman, R., Bheemasetti, T. V., Govil, T., & Sani, R. (2024). Psychrophiles to control ice-water phase changes in frost-susceptible soils. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-51060-w>
80. Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., & Imanaka, T. (2001). Low-Temperature Lipase from Psychrotrophic *Pseudomonas* sp. Strain KB700A. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4064–4069. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4064-4069.2001>

81. Saha, S., Majumder, R., Rout, P., & Hossain, S. (2024). Unveiling the significance of psychrotrophic bacteria in milk and milk product spoilage – A review. *The Microbe*, 2, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100034>
82. Samaržija, D., Zamberlin, S., & Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62(2), 77–95.
83. Samaržija, D., Zamberlin, Š., & Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk quality. In *Mljekarstvo* (Vol. 62, Issue 2).
84. Santana, E. H. W. de, Luiz, L. L., Pasquim, P. da S., Pinto, L. de F. B., Pereira, F. de A. B., Gasparini, G. B. F. B., Lorenzetti, E., Bruzaroski, S. R., & Eleodoro, J. I. (2020). Psychrotrophic microorganisms in raw milk and the cheese quality. *Research, Society and Development*, 9(9), e127997217. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7217>
85. Shaheen, M., Ullah, I., Rafiq, M., Maqsood Ur Rehman, M., Shah, A. A., & Hasan, F. (2020). Purification and characterization of lipase from psychrophilic bacteria *Pseudomonas mandelii* HTB2 from Batura Glacier, Pakistan. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(3), 4103–4114. https://doi.org/10.15666/aeer/1803_41034114
86. Shayegani, M., Maupin, P. S., & McGlynn, D. M. (1978). Evaluation of the API 20E system for identification of nonfermentative gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 7(6), 539–545.
87. Silva, C. C. G., Ribeiro, S. C., & Bottari, B. (2023). Editorial: Microbial communities and microbiomes in dairy products. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1265035>
88. Sørhaug, T., & Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 8(2), 35–41. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01006-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01006-6)
89. Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.
90. Tamime, A. Y., & Deeth, H. C. (1980). Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43, [p. 939–977].
91. Taye, Y., Degu, T., Fesseha, H., & Mathewos, M. (2021). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. *Scientific World Journal*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/4697445>
92. Vasavada, P. C. (2003). Microbial quality and safety of milk and milk products. In *Dairy Microbiology Handbook* (3rd ed., pp. 19–74). Wiley-Interscience.
93. Vettoretti, A. (2024). Tendances mondiales de la consommation laitière. *Économie Agroalimentaire*, 39(2), 101-115
94. Vettoretti, C. (2024). Sécurité et qualité microbiologique des produits laitiers. Éditions Lavoisier.

95. Vignola, M. (2002). *Appréciation de la qualité bactériologique du lait cru*. Université Mentouri Constantine.
96. Wang, Y., Yang, Y., Zhang, Y., Wu, Y., Huang, X., Chen, H., & Ren, L. (2024). Investigation of changes in bacterial community of pasteurized milk during storage. *Foods*, *13*(3), 451. <https://doi.org/10.3390/foods13030451>
97. Whyte, L. G., & Inniss', W. E. (1992). Cold shock proteins and cold acclimation proteins in a psychrotrophic bacterium. www.nrcresearchpress.com.
98. Wiedmann, M., Czajka, J., Barany, F., & Batt, C. A. (2000). Detection of pathogenic *Listeria* in food using a PCR-based assay. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *24*(4), 341–345. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000009>
99. Wu, J., Meng, L., Xu, W., Zhao, Y., Liu, H., Zheng, N., Rahman, A., & Wang, J. (Year unknown). Multiplex qPCR for simultaneous quantification of the main psychrotrophic bacteria and their enzymes in raw milk. (*Please provide journal name, volume, pages, and year if available*).
100. Yalew, K., Pang, X., Huang, S., Zhang, S., Yang, X., Xie, N., Wang, Y., Lv, J., & Li, X. (2024). Recent development in detection and control of psychrotrophic bacteria in dairy production: Ensuring milk quality. *Foods*, *13*(18), 2908. <https://doi.org/10.3390/foods13182908>
101. Yang, Q., Liu, Y., Zhan, X., & Zhang, Y. (2020). Microbial community and physicochemical changes in pasteurized milk during storage. *Food Microbiology*, *89*, 103418. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103418>
102. Yang, X., Guo, X., Liu, W., Tian, Y., Gao, P., Ren, Y., Zhang, W., Jiang, Y., & Man, C. (2020). The complex community structures and seasonal variations of psychrotrophic bacteria in raw milk in Heilongjiang Province, China. *LWT*, *134*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110218>
103. Zarei, M., Elmi Anvari, S., Maktabi, S., Saris, P. E. J., & Yousefvand, A. (2023). Identification, proteolytic activity quantification and biofilm-forming characterization of Gram-positive, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from cold raw milk. *PLoS ONE*, *18*(9), e0290953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290953>



Annexes

Annexe 01

1. Milieux de culture

1.1 Milieux de culture solides

➤ Gélose nutritive

pour la conservation des souches à courte terme et faire la détection sur boîtes de pétrie.

Composition :

Peptone.....5g

Extrait de viande.....01g

Chlorure de sodium.....05g

Agar.....15g

pH=7.3

Préparation : 23g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C, 15min

➤ gélose PCA (Plate Count Agar)

Composition :

Tryptone.....5g

Extrait de levure..... 2.5g

Glucose..... .1g

Agar agar bactériologique.....12g

pH à 25 °C : 7,0 ± 0,2.

Préparation : 17.5 dans 1000 ml d'eau purifiée/distillée .Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

1.2 Milieux de culture liquides

➤ Bouillon cœur cervelle (BHIB)

Composition :

Infusion de cervelle de veau.....12.5g

Infusion de cœur de bœuf.....05g

Peptone.....10g

Glucose.....02g

Chlorure de sodium.....02g

Phosphatase di sodique.....05g

pH= 7.4

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C, 15min.

• Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf

- ❖ Utiliser des œufs frais de poule dont la coquille est intacte.
- ❖ Nettoyer les œufs avec une brosse et un détergent liquide, puis rincer à l'eau courante.
- ❖ Désinfecter l'œuf en le plongeant dans une solution d'éthanol à 70% pendant 30s, puis les laisser sécher à l'air libre ou réaliser un flambage.
- ❖ Aseptiquement, casser chaque œuf et séparer le blanc du jaune par transferts répétés de demi-coquille à l'autre.
- ❖ Recueillir les jaunes d'œufs dans un récipient stérile et compléter avec trois fois leur volume d'eau physiologie stérile.

• Composition du milieu complet

Milieu de base (Gélose nutritive).....100ml

Émulsion de jaune d'œuf..... .5ml

2.La galerie API 20 E

Introduction et objet du test

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice.

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).

- Sortir la galerie de son emballage.

- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

NOTE : API 20 E doit être utilisé avec des Enterobacteriaceae et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux. Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. Brucella et Francisella) ne font pas partie de la base de

données API 20 E. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule d'API Suspension Medium (5 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" de la notice du produit, ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.

- A l'aide d'une pipette ou d'une PSIpette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).

- Réaliser une suspension bactérienne en homo-généisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : la plupart des espèces de *Vibrio* sont halophiles. En cas de suspicion d'un *Vibrio*, réaliser la suspension bactérienne dans API NaCl 0,85 % Medium.

Inoculation de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSIpette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :

- pour les tests CIT , VP et GEL , remplir tube et cupule,
- pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
- pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

- Refermer la boîte d'incubation.

- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

Lecture et Interprétation

Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou –) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

NOTE : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3:
 - Réincuber la galerie 24 heures (\pm 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
 - Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).
 - Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe Identification).

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

- Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

- Identification :

Elle est réalisée à partir de la base de données (V4.1)

- * à l'aide du Catalogue Analytique :

- Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

- * à l'aide du logiciel d'identification apiweb TM :

- Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres. Par ailleurs dans certains cas, le profil à 7 chiffres étant insuffisamment discriminant, les tests complémentaires suivants sont nécessaires :

- Réduction des nitrates en nitrites (NO₂) et en azote (N₂) : ajouter 1 goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2 à 5 minutes. Une coloration rouge indique une réaction positive (NO₂). Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) : ajouter 2 à 3 mg de réactif Zn dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté jaune indique une réaction positive (N₂) à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule est orange-rouge, la réaction est négative, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zinc. Cette réaction est intéressante pour les bacilles à Gram négatif oxydase positive.

NOTE : Pour les mêmes raisons que le test indole (se référer à la note du paragraphe "Lecture de la galerie"), le test de réduction des nitrates doit être réalisé en dernier.

- Mobilité (MOB) : Inoculer une ampoule d'API M Medium (cf notice).

- Culture sur gélose de MacConkey (McC) : Ensemencer un milieu de Mac Conkey (cf notice).
- Oxydation du glucose (OF-O) : Inoculer une ampoule d'API OF Medium (cf notice).
- Fermentation du glucose (OF-F) : Inoculer une ampoule d'API OF Medium (cf notice).

Ces tests complémentaires, mentionnés dans l'introduction (Codage des profils) du Catalogue Analytique, peuvent être utilisés pour constituer un profil à 9 chiffres, identifiable avec le logiciel d'identification.



D'autres tests supplémentaires peuvent être proposés en cas de faible discrimination. Se référer au logiciel ou Catalogue Analytique.

Test catalase

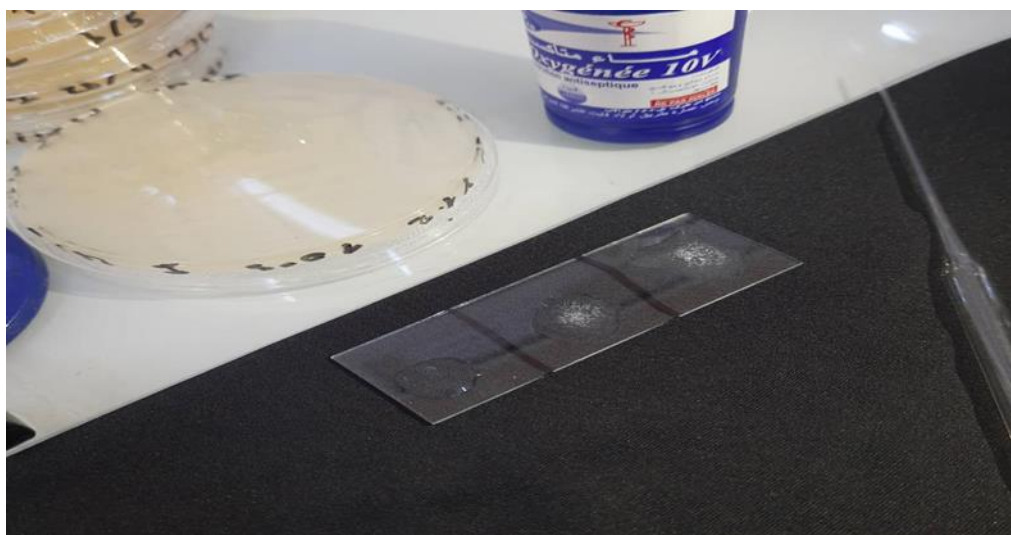


Figure : Mise en évidence de l'activité catalasique chez des souches bactériennes d'origine laitière.

Préparation de la suspension bactérienne

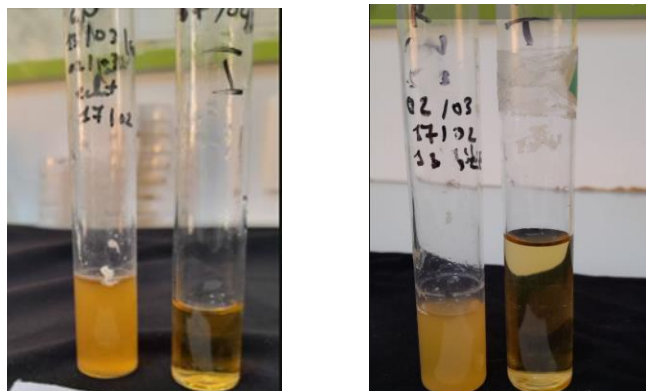


Figure N° 22: Aspect trouble d'une culture bactérienne en milieu d'enrichissement BHIB.

Évaluation de la formation de biofilm

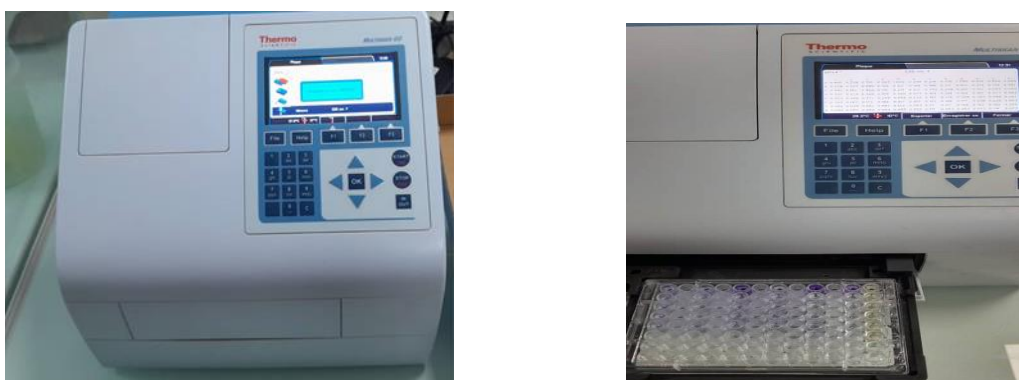


Figure : La lecture de la formation de biofilm par la technique des microplaques de titration à 96 puits (PVC) sur un spectrophotomètre lecteur de microplaque (photographie prise au laboratoire).

الملخص

تهدف هذه الدراسة التطبيقية إلى تقييم وجود البكتيريا البردية (المحبة للبرودة والمتحملة للبرودة) في ثلاثة منتجات لبنية شائعة في السوق المحلي، وهي الحليب المبستر، الياغورت الطبيعي، والجبن الطازج، وتحليل خصائصها الفيزيولوجية والإنزيمية التي قد تؤثر على جودة وسلامة هذه المنتجات أثناء التخزين البارد. تم تنفيذ العمل انطلاقاً من الكشف عن هذه الكائنات الدقيقة في المنتجات المذكورة وعزلها، ثم توصيفها من حيث نشاطها الإنزيمي (أميلاز، ليباز، بروتياز) في درجات حرارة مختلفة وقدرتها على تشكيل الأغشية الحيوية (biofilms)، مع تقدير تأثير وجودها على العمر التخزيني للحليب باستخدام أدوات النمذجة والتنبؤ الميكروبيولوجي. لتحقيق هذه الأهداف، تم جمع 27 عينة (9 عينات من كل منتج) من الأسواق المحلية بمدينة الأغواط، الجزائر. خضعت العينات لتحليل دقيقة بعد الحضانة في ظروف تبريد عند $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ، حيث تم عزل السلالات وتنقيتها ثم توصيفها باستخدام تقنيات مجهرية (صبغة غرام)، واختبارات حيوية كاختبار الحركة، TSI، وتخمير Mannitol. كما تم تقييم نشاطها الإنزيمي باستخدام أوساط خاصة، واختبار قدرتها على تكوين البيوفيلم باستخدام ألواح PVC. كشفت النتائج أن عددًا مهمًا من السلالات أظهر نشاطًا إنزيميًا واضحًا تحت ظروف البرودة، إلى جانب قدرة متفاوتة على إنتاج الأغشية الحيوية، ما يشير إلى دور هذه الكائنات في تسريع تدهور المنتجات اللبنة وتقليل مدة صلاحيتها حتى في ظروف التبريد. تُظهر هذه الدراسة التأثير المشترك لدرجة الحرارة ودرجة الحموضة على استقرار الحليب المبستر. أظهرت *Pseudomonas* قدرة عالية على النمو عند درجات حرارة منخفضة (من 4 درجات مئوية)، مما يساهم في تلف الحليب بشكل مبكر. أما *Bacillus*، فتصبح أكثر نشاطًا فوق 8 درجات مئوية نتيجة تحول الأبواغ إلى خلايا نشطة. كما أدى خفض درجة الحموضة إلى 6.0 إلى إطالة مدة الحفظ بشكل واضح. توصي الدراسة باستراتيجيات تحكم مختلفة: التبريد السريع لمواجهة البكتيريا الزائفة، والتحميض المعتدل للحد من نمو العسوبات توصي الدراسة بأهمية تحسين نظم التخزين والمراقبة الدقيقة لهذه البكتيريا في وحدات الإنتاج الغذائية.

الكلمات المفتاحية: الفلورا البردية، منتجات الألبان، النشاط الإنزيمي، الأغشية الحيوية، الحفظ البارد، التنبؤ الميكروبيولوجي.

Abstract

This applied study aims to assess the presence of psychrophilic and psychrotrophic flora in three commonly consumed dairy products in Algeria—pasteurized milk, plain yogurt, and fresh cheese—and to explore their physiological and enzymatic characteristics that may affect product quality and safety during cold storage. The research involved isolating and identifying cold-tolerant microorganisms from these products, evaluating their enzymatic activity (amylase, lipase, and protease) at different temperatures, and investigating their ability to form biofilms, while also estimating their impact on milk shelf life through microbial prediction tools. To achieve these goals, 27 samples (9 from each product type) were collected from local markets in Laghouat, Algeria. After incubation at $4 \pm 1^\circ\text{C}$, isolates were purified and subjected to a series of microbiological and biochemical tests, including Gram staining, motility, triple sugar iron (TSI), and mannitol fermentation. Enzymatic activity was assessed using specific differential media, and biofilm-forming potential was evaluated using PVC microplate assays. The results revealed that several strains exhibited notable cold-active enzymatic activity and variable abilities to form biofilms, suggesting their significant role in accelerating spoilage and reducing shelf life even under refrigeration conditions. This study shows that temperature and pH significantly affect pasteurized milk stability. *Pseudomonas* grows rapidly even at 4°C , while *Bacillus* becomes critical above 8°C due to spore germination. Acidifying milk to pH 6.0 reduces their activity, supporting targeted control strategies: rapid cooling for *Pseudomonas* and moderate acidification for *Bacillus*. Based on these findings, the study highlights the need for improved monitoring systems in dairy production environments and encourages the adoption of targeted hygienic and preservation strategies to limit the impact of these microorganisms.

Keywords: Psychrophilic flora, dairy products, enzymatic activity, biofilms, cold storage, microbial shelf-life prediction.

Résumé

Cette étude appliquée vise à évaluer la présence de la flore psychrophile et psychrotrophe dans trois produits laitiers couramment consommés en Algérie : le lait pasteurisé, le yaourt nature et le fromage frais, tout en explorant leurs caractéristiques physiologiques et enzymatiques susceptibles d'influencer la qualité et la sécurité de ces produits pendant le stockage à froid. Le travail repose sur l'isolement et l'identification de ces micro-organismes, l'évaluation de leur activité enzymatique (amylase, lipase, protéase), ainsi que leur capacité à former des biofilms, en parallèle avec l'estimation de leur impact sur la durée de conservation du lait à l'aide d'outils de prédiction microbiologique. Au total, 27 échantillons (9 de chaque type de produit) ont été collectés sur les marchés locaux de Laghouat, en Algérie. Après incubation à $4 \pm 1^\circ\text{C}$, les souches isolées ont été purifiées et soumises à diverses analyses microbiologiques et biochimiques, notamment la coloration de Gram, la mobilité, le test TSI et la fermentation du mannitol. L'activité enzymatique a été évaluée sur des milieux spécifiques, et la capacité à produire des biofilms a été mesurée à l'aide de plaques en PVC. Les résultats ont montré que plusieurs souches présentaient une activité enzymatique notable à froid et une capacité variable à former des biofilms, soulignant leur rôle dans l'altération des produits laitiers et la réduction de leur durée de conservation, même à basse température. L'étude montre que la température et le pH influencent fortement la stabilité du lait pasteurisé. *Pseudomonas* se développe rapidement à froid, causant une altération dès 4°C , tandis que *Bacillus* devient critique au-delà de 8°C en raison de la germination de ses spores. L'acidification à pH 6.0 réduit leur activité, suggérant des stratégies de contrôle ciblées : refroidissement rapide pour *Pseudomonas* et acidification modérée pour *Bacillus*. L'étude recommande de renforcer les systèmes de surveillance dans les unités de production laitière et d'adopter des mesures de prévention ciblées pour limiter l'impact de cette flore.

Mots-clés: Flore psychrophile, produits laitiers, activité enzymatique, biofilms, stockage à froid, prédiction microbiologique.