



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



التعليم  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسنطينة  
كلية الطبيعة الحياة

**Département : Microbiologie**

**: ميكروبيولوجيا**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes**

Intitulé :

---

## **Recherche et identification des bacilles thermophiles facultatifs en industrie laitière**

---

**Présenté et soutenu par : BOUHAFS Meriem**

**Le : 27/06/2016**

**BOUSSEBOUA Amina Rayane**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** ABDELAZIZ Wided Maitre-assistant – UFM Constantine.

**Rapporteur :** BOULTIFAT Lynda Maitre-assistant – UFM Constantine.

**Examineur :** MEZIANI Meriem Maitre-assistant – UFM Constantine.

*Année universitaire  
2015 - 2016*

## **Remerciements**

*Nous tenons à remercier tout d'abord Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience, la volonté pour mener à terme ce travail.*

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

*Mlle ABDELAZIZ Wided présidente de jury.*

*Mlle MEZIANI Meriem examinatrice.*

*Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à notre encadreur Mme Boultifat Linda, pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses précieux conseils et sa contribution à l'élaboration de ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à Monsieur SEFARI Mohamed (directeur de la laiterie SAFILAIT), qui nous a permis de réaliser notre stage.*

*Toute notre reconnaissance va à l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie de la laiterie SAFILAIT pour leur aide.*

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

*Je dédie ce mémoire à*

*Mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices*

*A mes chères frères et sœur : Abd Enour, Abd Elmoumen et Hana*

*A toutes mes cousines et toute ma famille Bouhafis et Belhamra*

*Aucun mot ne pourra décrire vos dévouements et vos sacrifices.*

*A tous mes amis, En témoignage de l'amitié sincère qui nous a liée et des bons moments passés ensemble. Je vous dédie ce travail en vous*

*Souhaitant un avenir radieux et plein de bonnes promesses*

*Meriem*

*Dédicace*

*A toute ma famille*

*BOUSSSEBOUA et FOUAGH*

*Et*

*à tous ceux qui me sont chers*

*Amina Rayane*

## Table des matières

Introduction .....	01
--------------------	----

### Partie 1 : Synthèse bibliographique

#### Chapitre 01 : Généralités sur le lait

1. Définition du lait .....	02
2. Composition du lait .....	02
2.1 La matière grasse .....	03
2.2 Les glucides .....	03
2.3 Les protéines .....	03
2.4 Les enzymes .....	03
2.5 Les vitamines .....	04
2.6 Les hormones .....	04
2.7 Les minéraux .....	04
2.8 L'eau .....	05
2.9 Les gaz dissous .....	05
3. Propriétés du lait .....	05
3.1 Propriétés organoleptiques .....	05
3.2 Propriétés physico-chimiques .....	06
4. Le lait reconstitué .....	08
5. La valeur nutritive .....	08

#### Chapitre 02 : Contamination du lait

1. Qualité hygiénique du lait .....	10
2. Flore de contamination du lait .....	10
3. Origine de la contamination .....	10
3.1 Contamination par l'eau .....	10
3.2 Contamination par les manipulateurs .....	10

3.3 Contamination par la poudre .....	10
3.4 Contamination à partir des équipements .....	11
4. Pasteurisation du lait .....	11
4.1 Les types de pasteurisation .....	11
4.2 Le procédé de pasteurisation du lait .....	12

### **Chapitre 03 : Les bacilles thermophiles dans le lait pasteurisé**

1. Généralités sur les bacilles thermophiles .....	14
2. Définition des bacilles thermophiles .....	14
2.1 Les thermophiles obligatoires.....	14
2.2 Les thermophiles facultatifs .....	15
3. Taxonomie.....	15
4. Sporulation des bacilles thermophiles.....	15
4.1 Structure de l'endospore.....	17
4.2 Formation des spores .....	17
4.3 La résistance .....	19
4.4 La germination.....	20
5. Les biofilms des bacilles thermophiles .....	22
5.1 Étapes de la formation d'un biofilm.....	22
5.2 La formation du biofilm par des bacilles thermophiles dans les traitements du lait .....	24

### **Partie II : Etude expérimentale**

#### **Matériels et méthodes**

1. Présentation du lieu de travail .....	26
2. Prélèvement des échantillons .....	26
3. Traitement des échantillons.....	26
3.1 Préparation des solutions mères .....	26
3.2 La préparation des dilutions décimales .....	27
3.3 Isolement des bacilles thermophiles .....	27
3.4 Purification .....	27
4. Identification des souches .....	27

4.1 Examen macroscopique .....	27
4.2 Examen microscopique .....	28
4.3 Tests biochimiques .....	28
4.3.1 Test de la catalase .....	28
4.3.2 Identification par galerie classique .....	29
4.3.3 Détermination des activités enzymatiques .....	33

## **Résultats et discussion**

1. Résultats de l'isolement .....	36
2. Résultats de l'identification phénotypique .....	36
3. Morphologie cellulaire .....	38
4. Résultats des tests biochimiques .....	40
4.1 Test de la catalase .....	40
4.2 Résultats de l'identification par la galerie classique .....	40
4.3 Résultats des activités enzymatiques .....	42
4.4 Détermination des biotypes .....	44
Conclusion.....	46

Résumé

Références bibliographiques

Annexes

## Liste des figures

Figure 01 : Photomicrographies des espèces de <i>Bacillus</i> visualisées par microscopie à contraste de phase.....	13
Figure 02 : Spore de <i>Bacillus cereus</i> en microscopie électronique à transmission.....	16
Figure 03 : Etapes de la formation de l'endospore : Le cycle de <i>Bacillus megaterium</i> .....	18
Figure 04 : Photo d'un biofilm (×1 250).....	21
Figure 05 : Les étapes du développement d'un biofilm .....	23
Figure 06 : L'aspect morphologique des colonies de type A.....	35
Figure 07 : L'aspect morphologique des colonies de type B .....	35
Figure 08 : L'aspect morphologique des colonies de type C .....	35
Figure 09 : L'aspect morphologique des colonies de type D.....	35
Figure 10 : L'aspect morphologique des colonies de type E .....	35
Figure 11 : Photo des bacilles après coloration de Gram sous microscope GX100.....	37
Figure 12 : Photo des spores sous microscope au grossissement GX100.....	37
Figure 13 : Un test catalase positif. ....	39
Figure 14 : Activité amylolytique sur gélose à l'amidon .....	41
Figure 15 : Activité protéolytique des souches sur gélose au lait. ....	43

## Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition du lait de vache .....	02
Tableau 02 : Composition lipidique du lait.....	03
Tableau 03 : Composition minérale moyenne du lait de vache .....	04
Tableau 04 : Les proportions des gaz dissous présents dans le lait (en volume %).....	05
Tableau 05: Acidité naturelle du lait : apport des différents constituants .....	07
Tableau 06 : Résultats relatifs à l'origine des souches isolées.....	36
Tableau 07 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA après 24h d'incubation.....	38
Tableau 08 : Résultats de l'identification des bacilles thermophiles par la galerie classique..	40
Tableau 09 : Activités enzymatiques des souches isolées.....	42
Tableau 10 : Les biotypes des souches de Bacillus.....	44

## Liste des abréviations

**C°** : Degré Celsius.

**Ca<sup>2+</sup>** : Calcium.

**DLC** : Date Limite de Consommation.

**DPA** : l'acide dipicolinique.

**EPS** : Extracellulaire Polymérique Substance (substances polymériques extracellulaire).

**HTST**: High Temperature, Short Time.

**MG** : Matière Grasse.

**Min** : Minute.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**PAS** : protéines solubles dans l'acide.

**pH** : potentiel Hydrométrique.

**T** : Température.

**TSA** : Trypticase Soja-Agar.

**UFC** : unité Formant une Colonie.

**UHT** : Ultra Haute Température.

**μ** : Micro.

# Introduction

### Introduction

Le lait est considéré comme un produit alimentaire de base qui occupe de plus en plus une place importante dans l'alimentation quotidienne des algériens. L'Algérie se place au 3ème rang mondial en matière d'importation de lait et de produits laitiers, après l'Italie et le Mexique (Rachid Amellal., 2002). Grâce à sa richesse en éléments nutritifs, le lait constitue un excellent milieu de culture pour plusieurs types de microorganismes, qui peuvent entraîner son altération et causer des maladies chez les consommateurs.

La pasteurisation est un traitement thermique qui prolonge la durée de vie du lait et réduit ainsi le nombre de micro-organismes dangereux non sporulés. Les bactéries sporulées rencontrées en laiteries appartiennent à la flore thermorésistante telle que les bacilles thermophiles. Ces dernières ont la capacité de produire une endospore leur permettant de résister à certaines conditions défavorables.

Les bacilles thermophiles présents dans le lait reconstitué pasteurisé ont pour origine soit la poudre de lait soit les biofilms formés par ces cellules sur les équipements de la chaîne de fabrication (A. Brisabois et *al.*, 1997). Ces bactéries aérobies sporulées du genre *Bacillus* font partie de la flore de contamination responsable de la détérioration de la qualité du lait.

Dans cette optique l'objectif principal assigné à ce travail est l'évaluation de la contamination d'une laiterie locale, dans la région de Ain Smara à Constantine, par la mise en évidence d'une flore d'altération représentée par des bacilles thermophiles facultatifs isolés du lait reconstitué pasteurisé en adoptant le plan expérimental suivant :

- ✓ Isolement des bacilles thermophiles facultatifs à différentes étapes de la chaîne de fabrication (la poudre de lait, le lait standardisé, le lait à la sortie du pasteurisateur et le produit fini).
- ✓ Identification des souches isolées par galerie classique.
- ✓ Caractérisation des souches isolées par l'étude de leur pouvoir enzymatique.

**Partie I :**  
**Synthèse**  
**bibliographique**

# **Chapitre 01 :**

# **Généralités sur le lait**

### 1. Définition du lait

Selon le congrès international de la répression des fraudes tenu à Genève en 1908 le lait est défini comme « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée, dépourvu de colostrum ». Il doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques, et présenter toutes les garanties sanitaires. Il peut être commercialisé en l'état mais le plus souvent après avoir subi des traitements de standardisation lipidique et d'épurations microbiennes pour limiter les risques hygiéniques et assurer une plus longue conservation (Schuck et *al.*, 2008).

### 2. Composition du lait

Le lait est un substrat très riche fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment presque complet. Protides, glucides, lipides, sels minéraux et vitamines sont présents à des concentrations tout à fait satisfaisantes pour la croissance et les multiplications cellulaires (Tableau 01). (Bourgeois et *al.*, 1996).

**Tableau 01** : Composition du lait de vache (Alais et *al.*, 2005).

Composants	Composition (g/l)
Eau	905
Glucides (lactose)	49
<b>Lipides</b>	35
Matière grasse proprement dite	34
lécithine (phospholipides)	0.5
Insaponifiable (stérols, carotènes, tocophérols)	0.5
<b>Protides</b>	34
Caséine	27
Protéines « soluble » (globuline, albumines)	2.5
Substance azotées non protéique	1.5
Sel	9
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	Traces
Extrait sec total	127
Extrait sec non gras	92

### 2.1 La matière grasse

La matière grasse proprement dite, ou lipides neutres, (Alais et *al.*, 2005) se compose principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de  $\beta$ -Carotène (Tableau 02) (L.vignola et *al.*, 2002).

**Tableau 02 :** Composition lipidique du lait (L.Vignola et *al.*, 2002).

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

### 2.2 Les glucides

Ils sont essentiellement présentés par du lactose ; ce dernier est le constituant le plus abondant de la matière sèche (M. Luquet., 1985). D'autres glucides peuvent être présents en faible quantité, comme le glucose et le galactose qui proviendraient de l'hydrolyse du lactose (L.vignola et *al.*, 2002).

### 2.3 Les protéines

Les protéines sont des polymères linéaires d'acides aminés unis par une liaison peptidique (Moussarad., 2006). Elles sont indispensables au bon fonctionnement des cellules vivantes (Gouldet et Kowalski., 2011). Elles constituent aussi une part importante du lait et des produits laitiers (L.Vignola et *al.*, 2002). L'importante protéine est la caséine qui constitue bien souvent 80% des protéines du lait (Ebing et Rutgers., 2006).

### 2.4 Les enzymes

Les enzymes sont des substances organiques de nature protéique, produites par des cellules ou organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Dans les conditions normales le lait contient une grande variété d'enzymes (M. Luquet., 1985), principalement trois groupes : les hydrolases, les déshydrogénases (ou oxydase) et les

oxygénases. Les deux principaux facteurs qui influents sur l'activité enzymatique sont le pH et la température (L.vignola et *al.*, 2002).

### 2.5 Les vitamines

Les vitamines sont nécessaires au fonctionnement normal des processus vitaux et les aliments doivent en apporter en quantité suffisante. Le lait est une source non négligeable de ces substances. Ce sont, en général, de petites molécules de structures très variées. Cependant, elles jouent très souvent le rôle de co-enzyme qui, associée à une apo-enzyme de nature protéique, développe une activité biocatalytique (M. Luquet., 1985). On classe généralement les vitamines en deux catégories selon leur solubilité : les vitamines hydrosolubles et les vitamines liposolubles (L.vignola et *al.*, 2002).

### 2.6 Les hormones

Les hormones sont des substances chimiques spécifiques produites par une glande endocrine qui jouent un rôle important dans les fonctions essentielles de l'organisme. Elles peuvent être véhiculées de la glande productrice à l'organe récepteur par l'intermédiaire du sang et par simple phénomène de diffusion passive ; elles peuvent se retrouver dans le lait si l'organe récepteur est la glande mammaire. Les hormones que l'on peut trouver dans le lait appartiennent aux protéohormone et hormones peptidiques et aux hormones stéroïdes (M. Luquet., 1985).

### 2.7 Les minéraux

Les minéraux du lait ne forment qu'une faible partie de la matière sèche mais ils sont intéressants par leur contenu en calcium et en phosphore. Le lait est la plus importante source de calcium dans la nutrition humaine (Tableau 03). (Alais et *al.*, 2005).

**Tableau 03** : Composition minérale moyenne du lait de vache (Croguennec et *al.*., 2008)

Minéraux majeurs (en mg.l <sup>-1</sup> )	Lait de vache
Calcium	1200
Phosphore	920
Potassium	1500
Sodium	450
Chlore	1100
Magnésium	110

### 2.8 L'eau

L'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion. La présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres lui confère un caractère polaire. Ce caractère polaire est ce qui lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum. Puisque les matières grasses possèdent un caractère non polaire (hydrophobe), elles ne pourront se dissoudre et formeront une émulsion de type huile dans l'eau (H/E) il en est de même pour les micelles de caséines qui formeront une suspension colloïdale puisqu'elles sont solides (L.vignola et *al.*, 2002).

### 2.9 Les gaz dissous

Le lait contient des gaz dissous, essentiellement CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, et O<sub>2</sub>. Au cours des traitements technologiques, la teneur en CO<sub>2</sub> diminue et celle en N<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> peut augmenter (Tableau 04) (M. Luquet., 1985).

**Tableau 04** : Les proportions des gaz dissous présents dans le lait (en volume %) (Webb et Johnson., 1965).

CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	TOTAL
4.45 %	1.29 %	0.47 %	6.21 %

## 3. Propriétés du lait

### 3.1. Propriétés organoleptiques

- **Couleur**

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

- **Odeur**

Elle est très caractéristique et résulte de la matière grasse qui fixe des odeurs animales. Elle varie en fonction de l'alimentation de la femelle productrice, de l'ambiance de la traite, et du mode de conservation du lait (Fredot., 2006).

- **Saveur**

Le lait présente une saveur légèrement sucrée (L.Vignola., 2002), due à l'abondance du lactose qui a un faible pouvoir sucrant (Larbalétrier., 2015).

- **Viscosité**

La viscosité du lait est principalement fonction de sa teneur en protéines et en matières grasses, Ce qui fait que la viscosité du lait est très supérieure à celle de l'eau (Alais., 2007).

### 3.2 Propriétés physico-chimiques

Les principales propriétés physico-chimiques utilisées en industrie laitière sont la mesure du pH, la masse volumique, le point de congélation, le point d'ébullition, l'acidité et la densité.

- **La mesure du pH**

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait frais normal est neutre ou a tendance légèrement acide vis-à-vis de l'eau pure (pH 7 à 20 °C). S'il y a action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium ( $H_3O^+$ ) et donc une diminution du pH car :

$$pH = -\log [H_3O^+]$$

Si le pH <6,5 le lait est acide (M. Luquet., 1985).

- **La masse volumique**

La masse volumique du lait à 20°C est environ 1030kg/m<sup>3</sup>. Elle varie en fonction de la composition du lait, notamment de sa teneur en matière grasse qui a un effet prépondérant en raison de sa variabilité suivant la race et l'alimentation (Croguennec et *al.*, 2008).

- **Point de congélation**

Le point de congélation du lait est inférieur à celui de l'eau puisque la présence de solides solubilisés abaisse le point de congélation. Il peut varier de -0,530°C à -0,575°C avec une

moyenne à  $-0,555^{\circ}\text{C}$ . Un point de congélation supérieur à  $-0,530^{\circ}\text{C}$  permet de soupçonner une addition d'eau au lait (L.vignola et *al.*, 2002).

- **Point d'ébullition**

Le point d'ébullition est défini comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée. Ainsi, comme pour le point de congélation, le point d'ébullition subit l'influence de la présence des solides solubilisés. Il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit  $100,5^{\circ}\text{C}$  (L.vignola et *al.*, 2002).

- **Acidité du lait**

Dès sa sortie du pis de la vache, le lait démontre une certaine acidité. Cette acidité est due principalement à la présence de protéines, surtout les caséines et la lactalbumine, de substances minérales telles que les phosphates et le  $\text{CO}_2$ , et d'acides organiques, le plus souvent l'acide citrique. Elle varie entre 0,13 et 0,17% d'équivalent d'acide lactique (Tableau 05) (L.vignola et *al.*, 2002).

**Tableau 05 :** Acidité naturelle du lait : apport des différents constituants (L.vignola et *al.*, 2002)

Constituants	Acidité (%) d'équivalent d'acide lactique)
Caséines	0,05 à 0,08
Phosphates	0,05 à 0,07
Lactalbumine	0,01
$\text{CO}_2$	0,01 à 0,02
Acide citrique	0,01

- **La densité du lait**

La densité du lait est liée à sa richesse en matière sèche (lactose). Un lait pauvre aura une densité faible. Le lait enrichi en matière grasse a une densité qui diminue et, qu'à l'opposé, un lait écrémé a une densité élevée. L'appréciation précise de cette propriété se fait par la détermination de la masse volumique (L.vignola et *al.*, 2002).

### 4. Le lait reconstitué

La reconstitution du lait, consiste à mélanger de l'eau et du lait en poudre écrémé afin d'obtenir un produit dont la teneur en matière sèche est voisine de celle du lait liquide initial (ou conforme à un rapport eau/matière sèche donné). La reconstitution peut aussi être la dilution d'une poudre de lait grasse dans de l'eau (FAO., 1995).

- **Méthode de reconstitution**

La poudre de lait est versée dans l'eau contenue dans un tank tout en agitant assez énergétiquement pendant 20 à 30 minutes à une température qui varie entre 35 et 45 °C. Afin de permettre une bonne hydratation de la poudre, il faut maintenir le mélange sous une simple agitation mécanique en tank à une température de 5 à 10 °C pendant 5 à 12 heures.

Au cours de l'opération, il est nécessaire d'éviter l'introduction de l'air dans le mélange en utilisant des dispositifs de mélange comportant une pompe de recirculation avec apport de la poudre par une trémie située avant la pompe. Un système de filtration ou de nettoyage centrifuge peut être utile pour éliminer les particules résiduelles (FAO., 1995).

### 5. La valeur nutritive

Le lait de vache est hautement nutritif et peut jouer un rôle important dans l'alimentation des enfants comme celle des adultes (C. Latham., 2001).

Le goût riche du lait provient des matières grasses qui sont parmi les graisses alimentaires les plus facilement digestibles à cause de la finesse de leur émulsion. Elles comptent pour 49% des calories du lait entier (Anonyme., 2006).

Il contient des protéines à haute valeur biologique notamment la caséine qui représente 82% de ces dernières et le lactalbumine (J Senterre et R. Eeckels., 1996).

Il renferme aussi une bonne quantité de lipide et de lactose qui est presque le seul glucide présent dans le lait. Ces 2 composants constituent d'importantes sources d'énergies (Charles B et *al.*, 1991).

Un autre composant important du lait : le calcium qui est le minéral le plus abondant dans l'organisme, près de 99% sont concentrés dans les os et les dents. Le restant joue tout de

même un rôle dans le fonctionnement des cellules musculaires et les cellules nerveuses. Il participe également aux fonctions rénales, à la coagulation sanguine et à plusieurs processus enzymatiques (Cassard., 2013).

# **Chapitre 02 :**

# **Contamination du**

# **lait**

### 1. Qualité hygiénique du lait

La qualité bactériologique du lait est un élément important à prendre en compte pour fabriquer des produits laitiers de qualité, au goût typé, et dépourvue de germes pathogènes pour l'homme (Anonyme., 2009). La qualité du lait à l'usine est le résultat d'une chaîne de soins dont chaque maillon est essentiel.

### 2. Flore de contamination du lait

La contamination du lait se fait par l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, qui peuvent se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les consommateurs (L.Vignola., 2002).

### 3. Origine de la contamination

#### 3.1. Contamination par l'eau

L'eau utilisée dans la reconstitution de lait, doit être potable et notamment répondre aux standards fixés par l'organisation mondiale de la santé (OMS). Sur le plan microbiologique, elle ne doit contenir aucun germe pathogène (FAO., 1995).

#### 3.2. Contamination par les manipulateurs

Le lait n'est pas manutentionné dans des conditions de propreté scrupuleuse et peut se contaminer à n'importe quel moment par la poussière ou des gouttelettes portant des microorganismes pathogènes. Mais l'infection directe par des manutentionnaires de lait ou des ouvriers de laiterie porteurs de germes est encore plus commune.

On peut avoir une contamination du lait par les manipulateurs même après la pasteurisation (Jawetz et *al.*, 1973).

#### 3.3. Contamination par la poudre

Fournie est protégée de la contamination en eau avant utilisation, le nombre de microorganismes présents augmentent généralement au cours du stockage, bien que le nombre de spores peut rester constant. Les producteurs de la poudre, ne prennent pas en charge la croissance des micro-organismes, le contenu microbiologique varie selon l'utilisation ultérieure de la poudre. Pour cette raison, les organismes gouvernementaux et les laboratoires

ont développé des limites microbiologiques ou des spécifications qui s'appliquent à certains groupes de micro-organismes qui peuvent être présents dans le lait en poudre. Ces spécifications peuvent concerner les apports des matières à la qualité du lait et l'hygiène lors de la fabrication et du stockage (Augustin et *al.*, 2003).

### 3.4. Contamination à partir des équipements

Elle est souvent caractérisée par la formation des biofilms laitiers qui sont dominés par différentes bactéries. La formation de ces biofilms sur les équipements peut entraîner de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques dues à la détérioration des aliments et à la dépréciation des équipements (Flint et *al.*, 1997). Les micro-organismes dans les biofilms catalysent les réactions chimiques et biologiques provoquant la corrosion des métaux dans les tuyauteries et les réservoirs et ils peuvent réduire l'efficacité de transfert de chaleur s'ils deviennent suffisamment épais (Simoes et *al.*, 2009).

## 4. Pasteurisation du lait

De nombreuses substances comme le lait sont traitées par un chauffage contrôlé à des températures bien inférieures à celle de l'ébullition. Ce procédé connu sous le nom de pasteurisation, en l'honneur de son inventeur Louis Pasteur, a été adopté par les chimistes allemands V.H et F.Soxhlet en 1886 pour la conservation du lait et la réduction des maladies transmissibles par ce dernier.

La pasteurisation ne stérilise pas le lait mais elle tue tous les germes pathogènes présents et ralentit fort la détérioration en réduisant le nombre de microorganismes non pathogènes responsables du phénomène (M.Prescott et *al.*, 2003).

### 4.1. Les types de pasteurisation

Deux types de traitements sont généralement pratiqués en laiterie :

- **Pasteurisation haute ou HTST** (*high temperature, short time*) : Le lait est chauffé à une température entre 71-72°C pendant 15 à 40 secondes. Elle est réservée aux laits crus de bonne qualité. Sur le plan organoleptique et nutritionnel, la pasteurisation haute n'a que peu d'effets : la phosphatase alcaline est détruite et la peroxydase reste active. La DLC (date limite de consommation) des laits ayant subi une pasteurisation haute est de 7 jours après conditionnement (bouteille en verre ou en carton, polyéthylène ou aluminium).

- **Flash pasteurisation** : elle est pratiquée à une température entre 85 à 90°C pendant 1 à 2 secondes, sur le lait cru de mauvaise qualité. La phosphatase et la peroxydase sont détruites.

La destruction du bacille tuberculeux est souvent prise comme référence pour le choix du barème de pasteurisation (Jeantet et *al.*, 2007).

### 4.2. Le procédé de pasteurisation du lait

La pasteurisation haute température est le type de pasteurisation utilisé souvent en laiterie.

**-Préchauffage** : Le lait refroidi à 5°C, est soutiré du tank de collecte, puis pompé vers l'échangeur à plaque, dans la section de préchauffage, où il est chauffé à une température de 68°C.

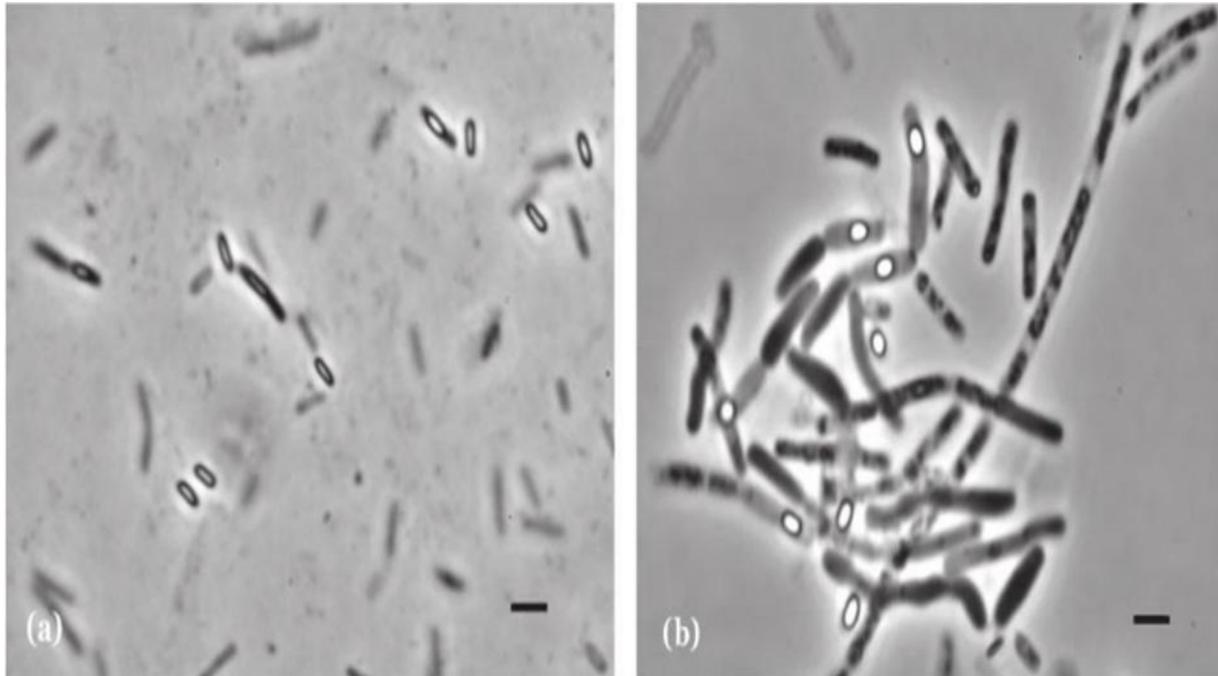
**- Dégazage** : Le lait préchauffé à 68°C est introduit tangentiellement dans la cuve sous vide. Les gaz véhiculés à la vapeur montent vers le haut de la chambre et sont aspirés par la pompe sous vide, et la vapeur se condense dans le condenseur et revient dans le lait.

**-Standardisation** : Une fois le lait sorti du dégazeur, on fait l'injection de la matière grasse laitière anhydre de façon à obtenir une teneur en matière grasse de 16 g/l.

**-Homogénéisation** : L'homogénéisation consiste à faire passer le lait sous forte pression à 60 bars à travers des orifices très étroits qui réduisent la taille des globules gras, et détruisent partiellement les micelles de caséines.

**-Pasteurisation proprement dite** : Le lait sort de l'homogénéisateur à une température de 60°C, il est conduit vers l'échangeur à plaque pour être chauffé à 90°C pendant 30 secondes dans le chambreur. Le lait pasteurisé est refroidi à une température de 5°C avec de l'eau glacée, puis stocké dans des tanks (Savage., 1933).

**Chapitre 03 :**  
**Les bacilles**  
**thermophiles dans le**  
**lait pasteurisé**



**Figure 01** : Photomicrographies des espèces de *Bacillus* visualisées par microscopie à contraste de phase. (Vos et *al.*, 2011).

(a) : *Bacillus pumilus*. Cellules minces cylindriques, spores subterminaux, pas de gonflement des sporanges.

(b) : grandes cellules de *Bacillus cereus* avec spores ellipsoïdaux, paracentraux et subterminaux, pas de gonflement des sporanges.

### 1. Généralités sur les bacilles thermophiles

Les bactéries du genre *Bacillus* sont des grands bacilles à Gram positif, groupés en chaînettes, sporulants, chimiohétérotrophes et généralement mobiles avec des flagelles péritriches. Ce genre est aérobique, ou parfois facultatif et catalase positive (Klein et *al.*, 2010). La plupart sont des saprophytes du sol, de l'eau, de l'air et des plantes, comme *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*. Ces microorganismes ne font pas partie des flores commensales de l'homme ou des animaux. Certains sont pathogènes que pour les insectes (Figure 01) (Delerras., 2007).

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

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

### 2. Définition des bacilles thermophiles

Les *Bacillus* thermophiles sont des organismes qui se développent entre 45 et 70° C. Ils sont souvent trouvés dans le lait. Ces organismes sont généralement associés avec le sol et le compost et sont soupçonnés d'être introduits dans le lait cru en faible nombre (<10 UFC / ml) pendant la traite (Flint et *al.*, 2015). Ils peuvent être divisés en deux groupes : les thermophiles obligatoires et les thermophiles facultatifs.

#### 2.1 Les thermophiles obligatoires

Les thermophiles obligatoires sont capables de se développer au-dessus de 45 °C jusqu'à 75-80°C mais elles ne sont pas capables de se développer à 37°C (Cuq et *al.*, 1992). On peut citer certaines espèces telles que : *Geobacillus stearothermophilus* (Delarras., 2014).

### 2.2 Les thermophiles facultatifs

Les thermophiles facultatifs font partie du genre *Bacillus* et ont l'aptitude à croître à des températures mésophiles et thermophiles (30-55°C), en fonction de la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus coagulans*, *B.licheniformis*, *B.pumilus*, *B.sporothermodurans* et *Bacillus subtilis* (Barbarous et Gulsun., 2014).

### 3. Taxonomie

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie de la famille des Bacillaceae.

Domaine : Bacteria ou Eubacteria

Phylum : Bacilli

Ordre : Bacillales

Genre : *Bacillus* (Delarras., 2007).

Ces bactéries peuvent être classées en fonction de la morphologie de la spore ; étudiée par examen microscopique ou en fonction de critères plus nombreux incluant le caractère respiratoire et fermentaire, la thermophilie,... etc (Guiraud., 2003).

Si on considère la spore, on distingue :

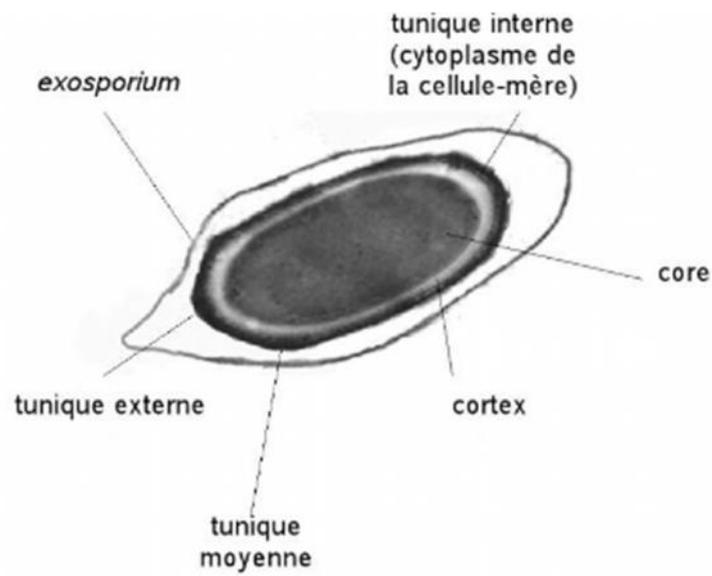
-Groupe 1 : spore ovale non déformante à paroi épaisse (exemple : *B. subtilis*).

-Groupe 2 : spore ovale déformante à paroi épaisse (exemple : *B. stearothermophilus*, *B. polymyxa*).

-Groupe 3 : spore sphérique déformante (exemple : *B.pasteurii* et *B.sphaericus*).

### 4. Sporulation des bacilles thermophiles

La sporulation est un phénomène naturel dans le cycle de croissance de certains groupes de bactéries telles que les espèces des *Bacillus* (Ponce et al., 2008). Il intervient lorsque les conditions deviennent défavorables à la croissance (carence en nutriments, en sels minéraux, manque d'eau), c'est-à-dire lorsque l'organisme est en situation de stress (Barill et al., 2012).



**Figure 02** : Spore de *Bacillus cereus* observée par microscopie électronique à transmission (Dromigny ., 2008).

Les endospores des bacilles thermophiles se distinguent par une formation rapide en environnement des produits laitiers, en revanche les facteurs qui contribuent à ce phénomène ne sont pas clairement compris (Postollec et *al.*, 2012). La plupart des travaux ont été réalisés sur les spores des bacilles mésophiles : *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*, leur processus de sporulation est censé être similaire à celui des bacilles thermophiles (Ponce et *al.*, 2008).

### 4.1 Structure de l'endospore

Les spores sont constituées d'un noyau, autrement connu sous le nom de protoplaste, qui contient le matériel nucléaire, entouré par la membrane corticale et le cortex, qui est à son tour enfermé dans le manteau de la spore. Certaines espèces, telles que *Geobacillus sp* et *Bacillus cereus*, peuvent avoir une couche au-dessus du manteau de la spore appelée exosporium d'autres espèces telles que *B. cereus* peuvent avoir des appendices. La principale différence entre les espèces dans la structure des spores est la structure et le nombre de couches dans le manteau des spores, alors que le cortex et le noyau sont très similaires. Par exemple, la plupart des spores contiennent une couche extérieure et intérieure. Cependant, d'autres spores peuvent contenir une couche dense entourée par un exosporium (Figure 02) (Burgess et *al.*, 2010).

### 4.2 Formation des spores

La sporulation est un processus complexe qui implique une succession d'étapes qui est considérée comme étant très similaire entre bactéries aérobies et anaérobies facultatives sporulées (Burgess et *al.*, 2010). Il y a d'abord formation d'un filament axial de matériel nucléaire (phase 1), suivie de l'invagination de la membrane cellulaire isolant une partie de l'ADN et constituant le septum de la préspore (phase 2). La membrane continue à se développer et entoure la préspore d'une seconde enveloppe (phase 3). Le cortex se forme, ensuite, dans l'espace compris entre les deux membranes du calcium et de l'acide dipicolinique s'y accumulent (phase 4). Les protéines de la tunique sont alors formées autour du cortex (phase 5) et l'endospore arrive à maturité (phase 6). Finalement des enzymes lytiques détruisent le sporange libérant la spore (phase 7) (M.Prescott et *al.*, 2010).

Comprendre comment se produit la formation de spores est important car cela peut aider à contrôler les spores dans les usines de transformation laitière. Généralement la température optimale et le pH optimal pour la formation des spores sont semblables à ceux pour la croissance des cellules végétatives. La présence des sels minéraux tels que le magnésium, le

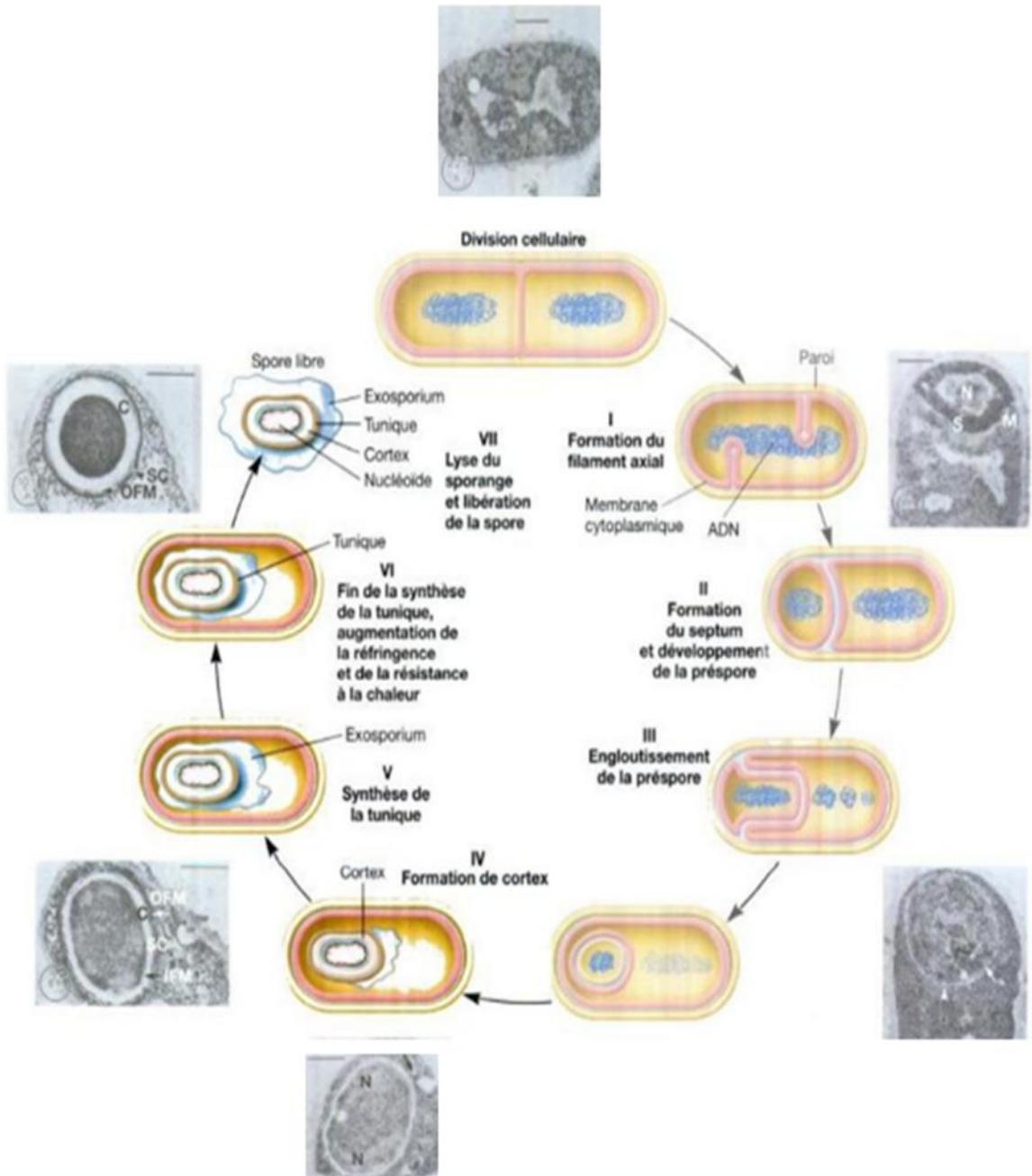


Figure 03 : Etapes de la formation de l'endospore : Le cycle de *Bacillus megaterium*.

(M.Prescott et al., 2010).

C : Cortex ; IFM et OFM : membrane interne et externe de la préspore ; M : mésosome ; N : nucléotide ; S : septum ; SC : tunique de la spore.

calcium et le potassium peut jouer un rôle important dans l'activation du processus de formation des spores (Figure 03) (Burgess et *al.*, 2010).

### 4.3 La résistance

Les spores sont résistantes à la chaleur, à la rupture mécanique et à une grande variété de produits chimiques, ce qui rend leur destruction très difficile dans les processus de fabrication des produits laitiers (Burgess et *al.*, 2010).

Dans le cas des bacilles mésophiles et facultativement thermophiles, des combinaisons de plusieurs propriétés contribuent à la résistance globale des spores de *Bacillus*, y compris leur faible teneur en eau, l'imperméabilité de la membrane interne, la couche de spores, le cortex peptidoglycane, les petites protéines solubles dans l'acide (PAS) et l'acide dipicolinique (DPA).

Les principales caractéristiques des spores associées à la résistance à la chaleur sont la minéralisation et l'activité faible en eau.

#### ▪ La minéralisation

Des minéraux sous forme de cations bivalents, le plus souvent les cations  $\text{Ca}^{2+}$ , sont situés dans le noyau des spores, principalement chélatés avec le DPA.

Les spores mutantes qui ont été incapables de produire le DPA ont également été incapables d'accumuler le calcium. La quantité de calcium dans les spores de *B. sporothermodurans* a montré une corrélation avec la résistance à la chaleur des spores de *Bacillus* mésophiles.

Le type de cation bivalent présent dans le noyau des spores influence sur la résistance à la chaleur. Par exemple, les spores de *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B.coagulans* produites sur la gélose contenant une variété d'ions, tels que le calcium et le magnésium se sont révélés être plus résistantes à la chaleur que celles produites sur la gélose nutritive supplémenté avec du manganèse seulement (Burgess et *al.*, 2010).

#### ▪ L'activité de l'eau

L'activité de l'eau des spores est aussi importante dans la résistance des spores. Il a été démontré que la structure des spores de *B.sporothermodurans* a changé quand les spores ont été isolées à partir des endroits différents par exemple les spores isolées du lait UHT étaient

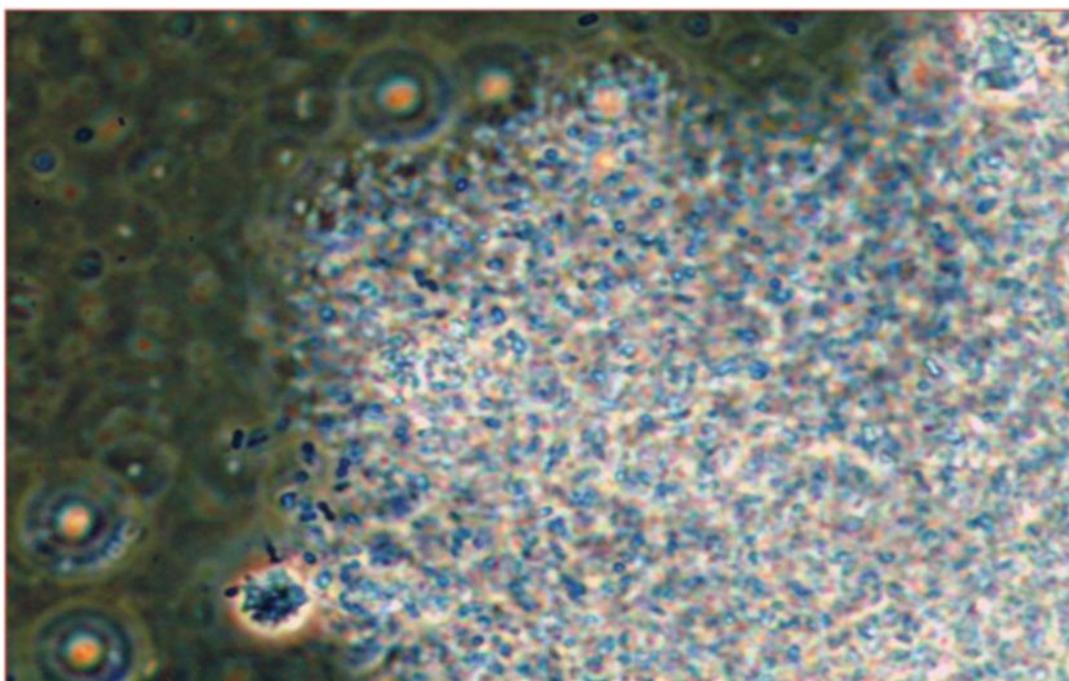
plus denses, plus petites et plus résistantes à la chaleur que celles isolées à partir du lait cru. En outre, des études ont montré que les spores formées à des températures supérieures à la température optimale de croissance d'une souche particulière ont tendance à être plus résistantes à la chaleur, et indiquent que le choc thermique peut être responsable de ce phénomène observé (Burgess et *al.*, 2010).

#### 4.4 La germination

Lorsque la spore est placée dans des conditions favorables de croissance, elle germe pour produire de nouveau une cellule végétative. Ce processus de transformation se déroule en 3 étapes : l'activation, la germination et la croissance (Jawetz., 1973).

- a. **L'activation** : est un processus réversible qui prépare les spores à la germination. Pour pouvoir germer, la spore doit être activée par un agent comme la chaleur, l'acidité ou les produits chimiques (Burgess et *al.*, 2010).
- b. **La germination** : ce processus est caractérisé par le gonflement de la spore, la rupture ou l'absorption de la tunique, la perte de la résistance à la chaleur ou à d'autres agressions (M. Prescott et *al.*, 2010) et surtout à la libération des composants de mucopéptide et de l'acide dipicolinique de la paroi cellulaire. Ce dernier acide ne se trouve que dans les spores et pourrait avoir un rôle dans l'inactivation des enzymes de la cellule normale qui réapparaissent après germination (Jawetz., 1973).
- c. **La croissance** : le protoplaste de la spore synthétise de nouveaux composés, émerge des restes de la tunique sporale et donne naissance à une bactérie active (M. Prescott et *al.*, 2010).

La conservation du lait sous l'action de la chaleur favorise l'activation des spores thermophiles (Asselin et Houzeau., 1911), les espèces thermophiles telles que *Bacillus coagulans*, *Geobacillus stearothermophilus* peuvent quelquefois être à l'origine d'altérations dans l'industrie des conserves par insuffisance de stérilisation ; les spores thermorésistantes peuvent alors survivre, germer, produire des bacilles qui vont contaminer l'aliment si les conditions sont favorables (Delarras., 2014).



**Figure 04** : Photo d'un biofilm ( $\times 1\ 250$ ) (Branger., 2007).

### 5. Les biofilms des bacilles thermophiles

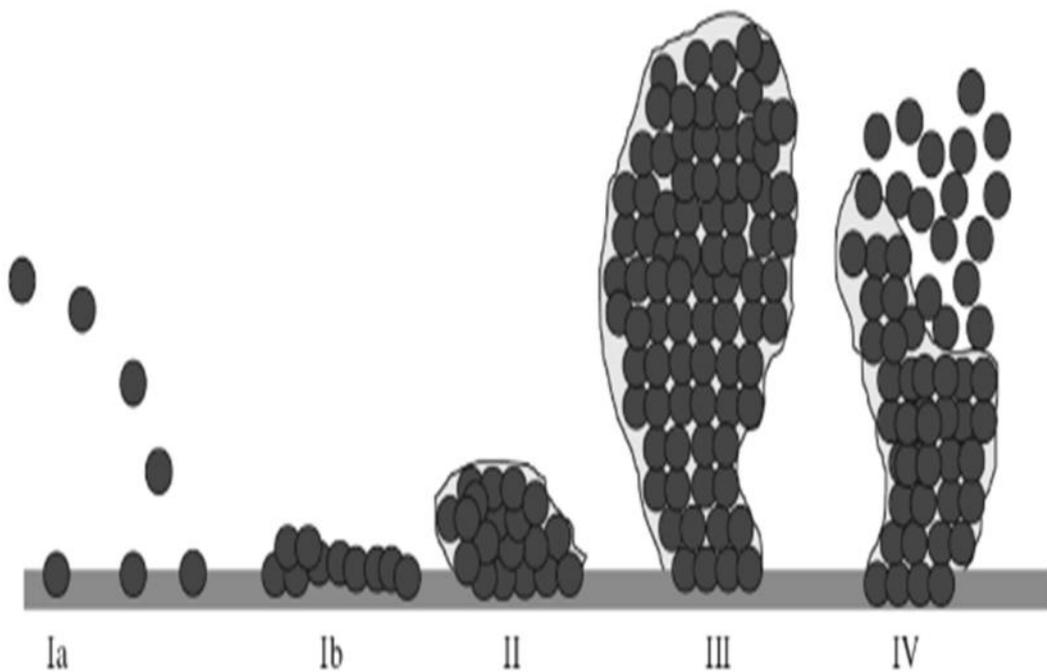
Un biofilm est un ensemble de microorganismes, soit de la même espèce, soit d'espèces différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il constitue un ensemble de cellules isolées et de microcolonies de cellules filles, associées entre elles et/ou aux surfaces.

Cet ensemble est contenu dans une matrice constituée d'exopolysaccharides bactériens, de matières organiques et non, ainsi que les macromolécules piégées du milieu environnant. Le biofilm n'est pas toujours un film continu (tapis), on observe parfois un développement en « patch » (Figure 04) (Branger et *al.*, 2007).

#### 5.1 Étapes de la formation d'un biofilm

Le biofilm peut se former très rapidement, en quelques heures, sa formation est constituée de plusieurs étapes :

- **L'adsorption** : étape réversible et courte, se caractérise par l'adhésion des microorganismes à une surface biotique ou abiotique, à la suite des interactions physico-chimiques des forces d'attraction et de répulsion, non spécifique, et intervenant après modification du support inerte sur lequel se sont déposées des molécules organiques du milieu ambiant (N Hygis., 1998).
- **La fixation** : étape irréversible due surtout à la formation par la bactérie d'un réseau fibrillaire d'exopolymère de nature essentiellement polysaccharidique, Ce réseau fibrillaire forme des ponts plus ou moins spécifiques entre les bactéries et le support (N Hygis., 1998)
- **La colonisation** : les bactéries se multiplient en formant des microcolonies et synthétisent encore plus d'exopolysaccharides aboutissant à la formation du biofilm à l'intérieur, cette formation suivie par la production d'une substance polymère extracellulaire (la matrice EPS) où les cellules bactériennes seront incluses à l'abri des fluctuations du milieu extérieur. De nouvelles bactéries viennent adhérer à ce biofilm. Le biofilm mature représente une structure complexe et les bactéries de diverses régions du biofilm pourront exprimer des gènes différents (N Hygis., 1998 ; Tremblay et *al.*, 2014).
- **Le détachement et la dispersion des cellules bactériennes** : Ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm. Le détachement des cellules peut être initié par différents facteurs : des perturbations mécaniques, la dégradation enzymatique



**Figure 05** : Les étapes du développement d'un biofilm (Le loir Yves, Ganttier ., 2009).

**Ia** : cellules planctonique ; **Ib** : attachement à la surface et formation d'un couche monocellulaire ; **II** : colonisation ; **III** : Maturation ; détachement **IV** : détachement biofilm.

de la matrice polymérique, la dégradation enzymatique du substrat sur lequel le biofilm est attaché...etc (Figure 05) (Tremblay et *al.*, 2014).

#### **5.2. La formation du biofilm par des bacilles thermophiles dans les traitements du lait**

La croissance extensive des biofilms dans les chaînes de fabrication peut se produire lorsque la surface de l'équipement est mal nettoyée, humide, en mauvais état d'entretien (oxydée, rouillée, rayée, entaillée) (Prospera., 2002), cycles de production sont trop longs et utilisation des ingrédients ou des sous-produits contaminés par les thermophiles (A. Ball et Tortorello., 2014).

Les biofilms des bacilles thermophiles sont désignés comme des biofilms de process. Ces biofilms particuliers sont généralement dominés par une seule espèce en raison des pressions sélectives de l'environnement (Burguess et *al.*, 2010) les pressions de sélection dans une usine de fabrication des produits laitiers peuvent inclure la chaleur, la composition du produit, le pH et l'activité de l'eau (Flint et *al.*, 2001). Les Biofilms des bacilles thermophiles sur l'acier inoxydable sont formés d'une monocouche et par conséquent ne font pas la maturation. Ce phénomène est susceptible de se produire dans des zones d'une usine de fabrication de produits laitiers qui sont régulièrement nettoyés et où il existe des taux de cisaillement élevés et qui sont des zones mortes, comme la surface des échangeurs de chaleur à plat. Cependant, dans d'autres sites des usines de fabrication laitière, où le flux est incompatible, comme au-dessous des plaques de distribution d'évaporateurs, les conditions peuvent permettre à la formation des structures multicouches pour former des cellules bactériennes ou elles peuvent être emprisonnées dans les encrassements du lait (Burguess et *al.*, 2010).

La formation de biofilm des bacilles thermophiles se produit dans les sections des usines de fabrication de produits laitiers où les températures élevées atteignent 40-65°C.

De nombreuses stratégies ont été testées pour éliminer, prévenir et ou retarder la formation de biofilms des bacilles thermophiles dans la fabrication de produits laitiers, mais avec succès limités. Cela est dû à la structure et la composition des biofilms de bacilles thermophiles qui ne sont pas bien connues dans les environnements en général et plus spécifiquement dans la transformation du lait (Acton, PhD., 2012).

#### ▪ **Fixation des spores et des cellules végétatives dans le biofilm des thermophiles**

L'attachement des spores et des cellules végétatives à la surface de l'équipement d'une usine de fabrication laitière sont considérés comme une source de biofilms de bacilles thermophiles celle-ci est une partie importante du développement du biofilm.

Les spores des bactéries thermophiles s'attachent plus facilement à la surface que les cellules végétatives bien qu'ils ont un mécanisme similaire (N Hygis., 1998 ; M. Fratamico et *al.*, 2009).

Les caractères physicochimiques des spores jouent un rôle important dans leurs capacités d'attachement aux surfaces inertes. Par contre l'EPS, ne semble pas être impliquée dans le processus de fixation des bacilles thermophiles sur des surfaces comme cela se produit dans d'autres espèces bactériennes (Parkar et *al.*, 2001 ; Burgess et *al.*, 2010).

#### ▪ **La croissance des populations attachées**

Après la fixation, les spores thermophiles germent et les cellules végétatives se reproduisent et forment un biofilm. Cependant, il est également possible qu'un biofilm peut être initié à partir de spores et de cellules végétatives adhérentes (Burgess et *al.*, 2009).

**Partie II :**  
**Etude expérimentale**

# **Matériels et méthodes**

### 1. Présentation du lieu de travail

Notre travail pratique a été réalisé au sein de la laiterie « Safilait » située à Ain Smara, il a pour objectif principal :

- ✓ L'isolement des bacilles thermophiles facultatifs à différentes étapes de la chaîne de production du lait pasteurisé reconstitué.
- ✓ L'identification des souches isolées par galerie classique.
- ✓ La caractérisation des souches isolées par l'étude de leur pouvoir enzymatique.

### 2. Prélèvement des échantillons

Quatre prélèvements ont été réalisés tout le long de la chaîne de fabrication du lait pasteurisé reconstitué comme suit :

- Premier prélèvement : poudre de lait (Poudre à 0% MG + Poudre à 26% MG)
- Deuxième prélèvement : le mélange : poudre de lait + eau, avant pasteurisation.
- Troisième prélèvement : le lait reconstitué à la sortie du pasteurisateur.
- Quatrième prélèvement : le produit fini (lait reconstitué pasteurisé conditionné).

Les échantillons du lait reconstitué sont prélevés à l'aide de flacons ou de tubes stériles.

Les échantillons de la poudre de lait sont prélevés en utilisant des boîtes de Pétri stériles.

Les prélèvements sont transportés directement au laboratoire où ils sont analysés dès leur réception.

### 3. Traitement des échantillons

#### 3.1 .Préparation des solutions mères

**-La solution mère de la poudre de lait :** Aseptiquement, 1g de poudre de lait est posé dans un tube qui contient 9 ml d'eau physiologique stérile. Le mélange est ensuite agité au vortex.

**-La solution mère du lait :** 9 ml de chaque échantillon de lait est prélevé à l'aide d'une pipette graduée puis versé dans des tubes en verre stériles.

### 3.2 La préparation des dilutions décimales

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution. Dans ce but, des dilutions décimales des échantillons à analyser (solutions mères précédemment préparées) sont effectuées en cascades jusqu'à la dilution  $10^{-3}$  (Journal Officiel de la République Algérienne., 2004).

### 3.3 Isolement des bacilles thermophiles

Des cultures sont réalisées par l'ensemencement de 0.1 ml de chacune des solutions mères et de leurs dilutions, en surface, sur milieu Trypticase Soja-Agar (TSA) coulé dans des boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à 37°C pendant 24 à 48heures.

### 3.4 Purification

Après incubation, l'aspect des colonies ayant poussés sur les milieux de cultures sont examinés. Selon la nécessité (si les boîtes contiennent plusieurs types de colonies), on procède à la purification de la souche en réalisant des repiquages successifs sur le même milieu d'isolement.

## 4. Identification des souches

L'identification des souches est réalisée après des examens macroscopique et microscopique et par l'étude de quelques caractères biochimiques.

### 4.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement, il consiste à observer directement, à l'œil nu, l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieu TSA (Trypticase soja-agar) après 24 à 48heures d'incubation en tenant compte des critères suivants :

**-La taille** : Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant de micromètres oculaires.

**-La forme des colonies** : circulaire, filamenteuse, irrégulière, ronde, étoilée...

**-Le relief** : plane, élevée, convexe, bombée, bossue...

**-Le bord** : régulier ondulé lobé, dentelé, filamenteux, bouclé

-**L'aspect** : duveteux, poudreux, granuleux...

-**La consistance** : molle, élastique, cartonnée ...

-**La couleur de la culture et de son verso**

-**L'opacité** : les colonies sont soit **opaques** et ne laissent pas passer la lumière, **translucides** en laissant passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli ou **transparentes** (laissent passer la lumière et voir les formes au travers) (Ripert., 2013).

#### 4.2. Examen microscopique

L'observation microscopique permet de définir certains caractères morphologiques et organisationnels des bactéries : forme (coque, bacille ou spirale), taille, le mode de regroupement (organisés en chaînette ou isolés), le Gram, la mobilité et la position de la spore (Alexandre et *al.*, 2008).

##### ❖ Coloration de Gram

A partir de cultures jeunes, de 24heures, les cellules des souches isolées sont fixées sur des lames et observées au microscope à l'immersion après avoir procédé à une coloration de Gram.

##### ❖ Coloration des spores

Les spores des souches isolées sont recherchées après un traitement thermique des cultures de 24heures au bain marie à 80°C pendant 10min. Une observation microscopique à l'immersion après la coloration de Gram permet de visualiser les spores. Les cellules végétatives sont colorées en violet ainsi que les sporanges, les endospores apparaissent rosées ou non colorées. En effet, les colorants de la coloration de Gram ne peuvent pas pénétrer dans les spores, protégées par leurs enveloppes (Delarras., 2014).

#### 4.3. Tests biochimiques

##### 4.3.1 Test de la catalase

###### - Principe

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> une libération d'oxygène gazeux selon la réaction  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$  (Denis., 2007).

### - **Technique**

A l'aide d'une anse de platine stérile on prélève une colonie bien isolée et on la dépose dans une goutte d'eau oxygénée  $H_2O_2$  sur une lame bien propre.

### - **Lecture**

La présence de la catalase se traduit par le dégagement immédiat de bulles d'oxygène.

L'absence de la catalase se traduit par l'absence de bulles d'oxygène.

### **4.3.2 Identification par galerie classique**

#### • **Utilisation des sucres (gélose au glucose, lactose, saccharose)**

#### **Principe**

Cette méthode permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), la production de gaz qui se manifeste par la production des bulles de gaz dans le culot, du lactose, du saccharose et d'autre part, la production d'hydrogène de sulfate ( $H_2S$ ). Le milieu utilisé est le TSI, une gélose inclinée dont le glucose, présent dans le culot, est attaqué par la voie fermentative entraînant une acidification du milieu avec ou sans production de gaz. Sur la pente, le lactose et le saccharose seront alors oxydés et fermentés. La production de l'  $H_2S$  se manifeste par un noircissement du culot.

#### **Technique**

A partir d'une suspension bactérienne et à l'aide d'une anse de platine stérile on prélève aseptiquement une ose et on réalise une piqure centrale dans le culot et des stries serrées sur la pente. L'incubation est réalisée à  $37^\circ C$  pendant 24heures.

#### **Lecture**

Lactose-saccharose positifs : pente virant au jaune.

Glucose positif : culot jaune.

$H_2S$  positif : noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot.

Production de gaz : présence des bulles de gaz dans le culot.

- **Utilisation du citrate**

### **Principe**

Ce test est réalisé sur le milieu citrate de Simmons, il est basé sur la capacité de la bactérie à utiliser le citrate comme seule source de carbone suite à la présence d'une enzyme citrate perméase (Cheesbrough., 2006).

### **Technique**

On utilise une culture pure et jeune (de 15 à 18heures) comme source d'ensemencement. Une seule colonie isolée est ensemencée sur la surface de la pente par des stries serrées. Le milieu est incubé 24heures à 37°C (P. Mac Williams., 2013).

### **Lecture**

Une croissance sur le milieu accompagnée d'un virage de sa couleur du vert au bleu indique un résultat positif (présence d'une citrate perméase). L'absence de croissance est un résultat négatif (Lippincott et Wilkins., 2008).

- **Production d'indole**

### **Principe**

Certaines bactéries transforment le tryptophane en indole. La présence d'indole est mise en évidence par l'addition du réactif de Kovacs (M. Prescott, 2003).

### **Technique**

Dans un bouillon d'eau peptonée exempte d'indole on transfère aseptiquement quelques gouttes de la suspension bactérienne. L'incubation est réalisée 24heures à 37°C.

### **Lecture**

Après incubation on ajoute une goutte du réactif de Kovacs. L'apparition d'une coloration rouge à la surface indique un test indole positif et l'absence de la coloration ou l'apparition d'un anneau jaune indique un test indole négatif.

- **Recherche de l'uréase**

### **Principe**

La recherche de l'uréase s'effectue sur milieu urée-indole. L'urée sous l'action d'une uréase bactérienne est transformée en carbonate d'ammonium alcalin entraînant une coloration rouge du milieu (Denis., 2007).

### **Technique**

On transfère le contenu d'une ampoule du milieu urée-indole dans un tube vide stérile, puis on ensemence avec une à deux gouttes de suspension de la souche à identifier. Le tube est incubé à 37°C pendant 24 heures.

### **Lecture**

L'uréase positive se traduit par l'apparition d'une coloration rose à rouge violacée tandis qu'une uréase négative est caractérisée par une teinte jaune orangée.

- **Test du mannitol-mobilité**

### **Principe**

Le mannitol mobilité est un milieu semi-solide contenant entre autre le mannitol, du rouge de phénol comme un indicateur de pH (Denis, 2007). Ce test permet de rechercher la fermentation du mannitol et la mobilité.

### **Technique**

Le milieu est ensemencé par piqure centrale et incubé à 37°C pendant 24 heures.

### **Lecture**

Si le milieu prend une coloration jaune : la bactérie est mannitol positif.

Si le milieu reste rouge : la bactérie est mannitol négatif.

Si les bactéries sont mobiles, elles se dispersent à partir de la piqure d'ensemencement créant un voile dans le milieu, sinon la bactérie est immobile.

- **Recherche de la nitrate-réductase**

### **Principe**

Les bactéries qui possèdent une nitrate-réductase, sont capables de transformer les nitrates en nitrites et éventuellement en azote.

### **Technique**

Un bouillon nitraté (bouillon nutritif supplémenté de 1,5 de nitrate de potassium) est ensemencé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne à étudier. Le bouillon est incubé à 37°C pendant 24heures.

### **Lecture**

Après incubation, 3 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution naphtylamine (Griess B) sont ajoutées au bouillon. Si une coloration rose fugace apparait, les nitrates ont été réduits en nitrites. En l'absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits au stade nitrites, soit les nitrates ont été réduits au stade azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de zinc (réactif de Zobell, qui va réduire les nitrates en nitrites) permet de trancher. Si une coloration rose apparait, alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. Si aucune modification de coloration n'est visible après ajout de zinc, alors les nitrites avaient été réduits au stade azote (Denis., 2007).

- **Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique**

### **Principe**

Le milieu Clark-Lubs contenant de l'acide pyruvique permet l'étude des produits de fermentation du glucose ; la différenciation entre la formation d'acide formique et d'acide acétique (réaction de rouge de méthyl, RM) et la formation d'acétoïne ou d'acétyl-méthylcarbinol (réaction de Voges-Proskauer) (Denis., 2007).

### **Test RM (rouge de méthyle)**

Le rouge de méthyle est un indicateur de pH avec un intervalle compris entre 6 (jaune) et 4.4 (rouge). Ce test permet la mise en évidence de la production des acides forts (acide lactique, acide acétique, acide formique) à partir de glucose par la voie de fermentation d'acide mixte (Winn et Jr et *al.*, 2006).

### Test VP (Voges-Proskauer)

Le test de Voges-Proskauer détecte la production du carbinol acétyle de méthyle (acétoïne), un produit naturel formé à partir d'acide pyruvique au cours de la fermentation du glucose. L'acétoïne en présence d'oxygène alcalin et atmosphérique, est oxydé en diacétyle qui réagit avec l'alpha-naphtol pour produire la couleur rouge (Parija., 2009).

### Technique

Un milieu Clark et Lubs est ensemencé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne, puis incubé 24 heures à 37°C.

### Lecture

Après incubation, 2 ml de milieu sont prélevés auxquelles on ajoute 1 à 2 gouttes du réactif RM. De même, 0,5 ml de KOH ou de NaOH (réactif VP 1) et 0,5 ml d'alpha-naphtol (réactif VP 2) sont ajoutés à un volume de 1 ml du milieu prélevé dans un autre tube stérile.

### Test RM

Si le tube présente une coloration rouge le test RM est positif. Dans le cas où la couleur est jaune le test est négatif.

### Test VP

Le tube présentant une coloration rouge est dit positif. Un test négatif est caractérisé par une couleur jaune.

#### 4.3.3 Détermination des activités enzymatiques

- Test de l'hydrolyse de l'amidon

### Principe

L'amidon est un polysaccharide, constitué d'amylose et d'amylopectine. La gélose à l'amidon est une gélose nutritive, additionnée de 1% d'amidon de pomme de terre. Elle permet de mettre en évidence la dégradation de ce polysaccharide par certaines espèces appartenant notamment au genre *Bacillus*.

### Technique

Les boîtes contenant le milieu sont ensemencées par une strie médiane avec les souches à caractériser. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 heures.

### **Lecture**

L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour de chaque colonie l'observation est plus nette en inondant la surface du milieu avec du lugol (solution iodo-iodurée).

Zone claire jaunâtre (couleur du lugol autour des colonies) : amidon hydrolysé positif.

Zone bleue : amidon hydrolysé négatif (Delarras., 2014).

- **Test d'hydrolyse de la caséine**

### **Principe**

La caséine, protéine du lait, peut être hydrolysée par certaines espèces bactériennes ; la recherche de l'activité caséolytique est notamment utile dans l'identification des Bacillus.

### **Technique**

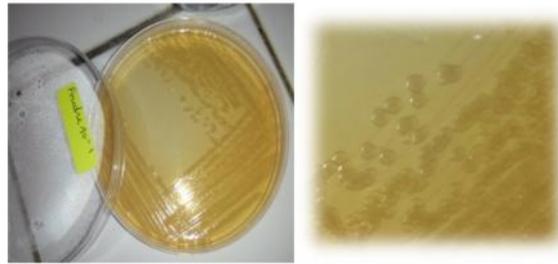
Le milieu gélose au lait est ensemencé par une strie centrale à partir d'une suspension des souches isolées. L'incubation est réalisée à la température adéquate 37°C pendant 24heures.

### **Lecture**

Les zones d'éclaircissement du milieu autour des colonies traduisent un résultat caséinolyse positif.

L'absence de telles zones exprime un test caséinolyse négatif (Delarras., 2014).

# Résultats et discussion



**Figure 06** : L'aspect morphologique des colonies de type A.



**Figure 07** : L'aspect morphologique des colonies de type B.



**Figure 08** : L'aspect morphologique des colonies de type C.



**Figure 09** : L'aspect morphologique des colonies de type D.



**Figure 10** : L'aspect morphologique des colonies de type E.

### 1. Résultats de l'isolement

Les cultures des différents échantillons prélevés ont permis d'isoler 5 souches au total. L'origine des souches isolées à partir des différents types de lait est mentionnée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 06** : Résultats relatifs à l'origine des souches isolées

Origine	Nombre des souches isolées à 37°C	Code
Poudre de lait	1	A
Lait standardisé	1	B
Lait pasteurisé	1	C
Produit fini	2	D, E

### 2. Résultats de l'identification phénotypique (caractères culturels)

Les colonies bactériennes se développant sur TSA après incubation de 24 heures à 37°C ont les aspects et couleurs suivants (Tableau 07) :

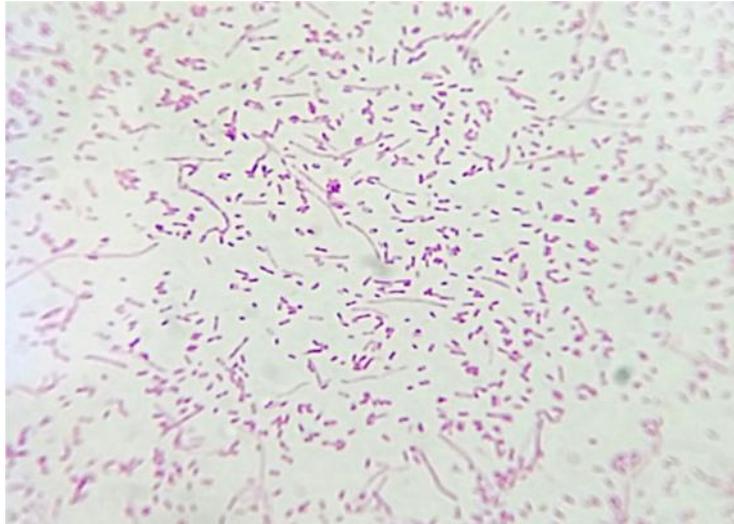
**Colonie de type A** : colonie d'une taille moyenne, circulaire, élevée, à bords réguliers, crémeuse, de couleur beige, translucide. (Figure 06).

**Colonie de type B** : colonie d'une petite taille, circulaire, plane, à bord régulier, crémeuse, de couleur beige, translucide. (Figure 07).

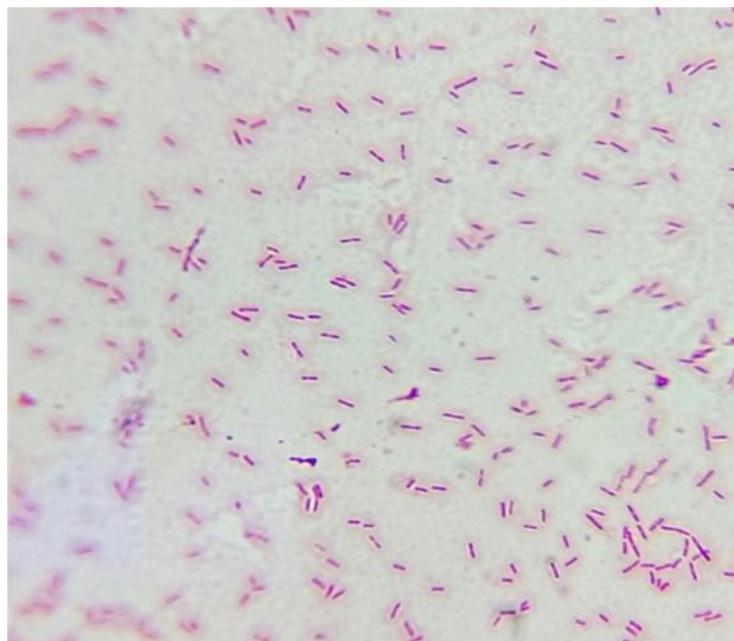
**Colonie de type C** : colonie d'une petite taille, circulaire, plane, à bord régulier, crémeuse, de couleur beige, translucide. (Figure 08).

**Colonie de type D** : colonie d'une taille moyenne, irrégulière, convexe, à bords ondulés, visqueuse, de couleur beige, opaque. (Figure 09).

**Colonie de type E** : colonie d'une grande taille, irrégulière, convexe, à bords ondulés, visqueuse, de couleur beige, translucide. (Figure 10).



**Figure 11 :** Photo des bacilles après coloration de Gram sous microscope GX100.



**Figure 12 :** Photo des spores sous microscope au grossissement GX100.

**Tableau 07 :** Aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA après 24h d'incubation.

Souche	Taille (mm)	forme	élévation	bords	Opacité			consistance	couleur
					opaque	translucide	transparente		
<b>A</b>	3	Circulaire	Elevée	Réguliers		+		Crémeuse	Beige
<b>B</b>	2	Circulaire	Plane	Réguliers		+		Crémeuse	Beige
<b>C</b>	4	Irrégulière	Plane	Ondulés	+			Crémeuse	Beige
<b>D</b>	4	Irrégulière	Convexe	Ondulés	+			Visqueuse	Beige
<b>E</b>	8	Irrégulière	Convexe	Ondulés		+		Visqueuse	Beige

### 3. Morphologie cellulaire

L'observation microscopique après coloration de Gram a permis de révéler que les cellules des souches isolées se présentent toutes sous forme de bâtonnets droits, de tailles différentes, regroupés en diplobacilles, ou en chainettes ayant des extrémités arrondies. Les endospores observées sont sphériques ou ovales réfringentes, certaines sont centrales non déformantes et d'autres sont terminales déformantes (Figure 11 ; 12).



**Figure 13** : Un test catalase positif.

#### 4. Résultats des tests biochimiques

##### 4.1 Test de la catalase

Les résultats du test de la catalase pour l'étude du type respiratoire ont montré que toutes les souches isolées sont catalase positives ; la réaction se traduit par le dégagement immédiat de bulles d'oxygène, (Figure 13). Ce résultat confirme l'affiliation à priori de ses souches aux bactéries du genre *Bacillus* qui sont des aérobies.

##### 4.2 Résultats de l'identification par la galerie classique

Pour l'identification des 5 souches, nous avons fait recours à la galerie classique. Les résultats des tests biochimiques sont représentés dans le tableau 08.

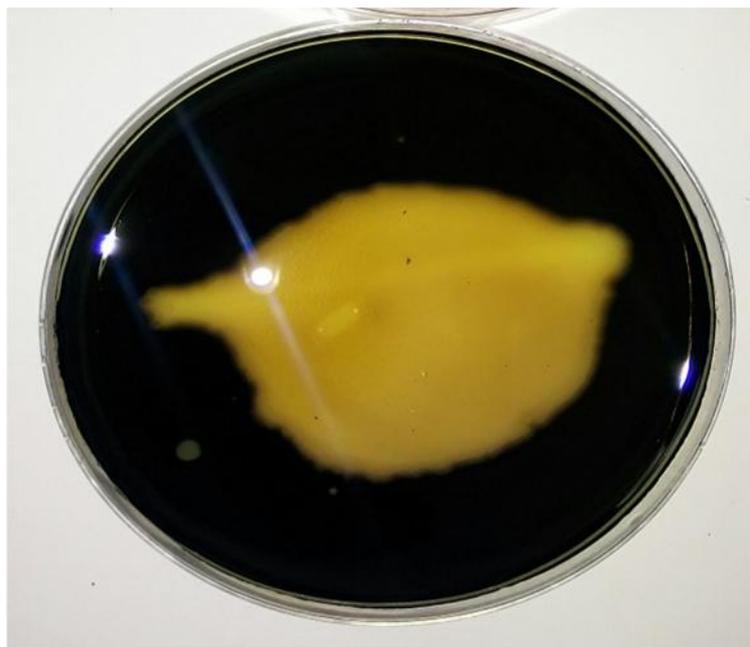
**Tableau 08** : Résultats de l'identification des bacilles thermophiles par la galerie classique

CB	S	A	B	C	D	E
Glucose		-	-	+	+	+
Saccharose		+	+	+	+	+
Lactose		+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S		-	-	-	-	-
Production de gaz		-	-	-	-	-
Mannitol		+	-	+	+	+
Mobilité		+	-	-	+	+
VP		+	+	+	+	+
RM		+	+	+	+	-
Citrate		-	-	+	+	-
Indole		-	-	-	-	-
Uréase		-	-	-	-	-
Nitrate réductase		+	+	+	+	+

S : souche ; CB : caractères biochimiques ; VP : Voges-Proskauer ; RM : Rouge de Methylene

+ : présence ; - : absence.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 08 on remarque que la plupart des souches sont capables de dégrader les 3 sucres : glucose, saccharose et lactose ; ce qui signifie qu'elles possèdent la  $\alpha$ -galactosidase. Cependant, aucune souche ne produit ni l'hydrogène sulfureux H<sub>2</sub>S ni le gaz.



**Figure 14** : Activité amylolytique sur gélose à l'amidon.

Sur le milieu mannitol-mobilité deux souches (B et C) sont immobiles les autres sont par contre mobiles, selon Klein et *al.*, (2010) Les bactéries du genre *Bacillus* sont généralement mobiles avec des flagelles péritriches. Par contre la souche B est incapable de fermenter le mannitol. D'autre part toutes les souches peuvent produire l'acétoïne.

Quatre souches A, B, C et D sont RM+, 2 souches seulement (C, D) peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie, le métabolisme du citrate est lié à la présence d'une citrate perméase.

On a remarqué l'absence de l'uréase ainsi que l'enzyme responsable de l'hydrolyse de tryptophane en indole chez toutes les souches. En revanche, la présence de nitrate réductase est notée chez tous les isolats.

### 4.3 Résultats des activités enzymatiques

Les résultats de la recherche des activités enzymatiques sont représentés dans le tableau 09.

**Tableau 09 :** Activités enzymatiques des souches isolées

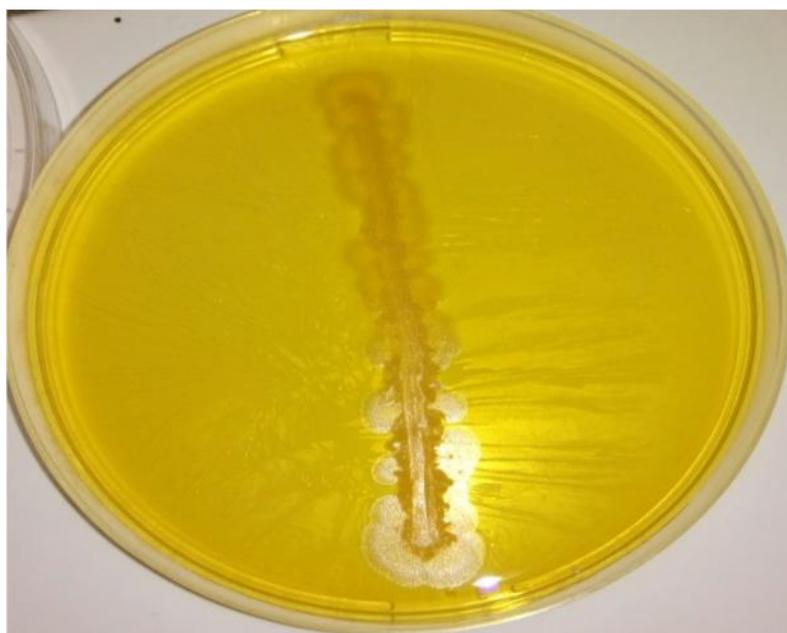
AE \ S	A	B	C	D	E
<b>Amylase</b>	-	+	+	-	+
<b>Protéase</b>	+	+	+	+	+

S : Souche ; AE : Activité Enzymatique ; + : présence ; - : absence

- **Activité amylolytique**

La plupart des souches sont capables d'hydrolyser l'amidon, ce qui signifie que ces dernières possèdent une amylase. L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour des colonies. (Figure 14).

Selon T. Satyanarayana, B. N. Johri (2005), de nombreuses espèces du genre *Bacillus* sont connues par leur capacité à produire des -amylases thermostables. Celles-ci comprennent des -amylases de *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Geobacillus thermoleovorans*, *B. stearothermophilus*, et *B. thermoamyloliquefaciens*.



**Figure 15 :** Activité protéolytique des souches sur gélose au lait.

- **Activité protéolytique (caseolytique)**

Le tableau 09 montre que toutes les souches possèdent la caséinase ; enzyme qui hydrolyse la caséine du lait. Cette protéase est mise en évidence par la formation d'un halo clair autour des colonies justifiant la dégradation de la caséine par les bactéries. (Figure 15).

Du fait que les bactéries du genre *Bacillus* sont considérées comme une flore de contamination du lait, leur présence peut être responsable du caillage du lait et des défauts de goûts d'odeurs et d'arômes par la production de la caséine k et la caséine micellaire (Carole L.Vignola., 2002).

#### 4.4 Détermination des biotypes

Les différents biotypes de bacilles thermophiles identifiés par la galerie classique et l'étude de l'activité enzymatique, selon la classification du Bergy's, sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau 10** : Les biotypes des souches de *Bacillus*.

<b>Biotypes</b>	<b>Souches</b>	<b>types de lait</b>	<b>Espèces</b>
1	A	poudre de lait	<i>Bacillus pumilus</i>
2	B	lait standardisé	<i>Bacillus polymyxa</i> <i>Bacillus alvei</i>
3	C	Lait pasteurisé	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus coagulans</i>
4	D	produit fini	<i>Bacillus pasteurii</i>
5	E	produit fini	<i>Bacillus polymyxa</i> <i>Bacillus alvei</i>

D'après le tableau 10, on remarque que les 5 souches (A, B, C, D, E) analysées par galerie classique et par l'étude de leur pouvoir enzymatique, correspondent à 5 biotypes différents. En effet, la différence porte sur 1 à 2 caractères, parfois ce qui indique que ces souches sont proches phénotypiquement.

La classification du Bergey's manual nous a orienter vers des espèces différentes appartenant toutes au genre *Bacillus*, qui ont été isolées à partir des différents échantillons de lait.

- Sur la base des caractères biochimiques nous avons pu identifier l'espèce *Bacillus pumilus* et *Bacillus pasteurii* respectivement dans la poudre de lait et le lait en sachets.

-Deux biotypes 2 et 5 isolés des échantillons de laits standardisé et conditionné, permettent une orientation aux mêmes espèces *Bacillus polymyxa* et *Bacillus alvei*.

-Les espèces *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans* regroupées dans le biotype 3 ont été retrouvés dans le lait pasteurisé.

Les résultats obtenus montrent l'existence des bacilles thermophiles facultatifs dans le lait reconstitué pasteurisé. Effectivement, Les travaux de plusieurs chercheurs ont mis en évidence la présence des bacilles thermophiles tels que *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*... dans différents types de lait. (Crielly et al., 1994 ; Brisabois et al., 1997).

# Conclusion

## Conclusion

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

L'objectif principal assigné à ce travail est d'isoler et identifier les bacilles thermophiles facultatifs à différents sites (la poudre de lait, le lait standardisé, le lait pasteurisé et le produit fini) de la chaîne de production du lait reconstitué pasteurisé.

Dans cette étude les résultats de l'identification ont révélés que toutes les souches isolées sont des bacilles à Gram positif. Elles possèdent toutes une catalase et ont la capacité de sporuler et de produire des enzymes extracellulaires telles que les amylases et les protéases.

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

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

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

- Le renforcement et l'amélioration des systèmes de nettoyage et de désinfection des équipements et installations.

# Résumé

## Résumé

Les bacilles thermophiles sont considérés comme un groupe important de contaminants dans les industries laitières, car ils sont capables de produire des enzymes et des acides qui peuvent entraîner des altérations du lait pasteurisé (Christieans et Zagorec., 2013).

Dans cette optique, l'objectif principal assigné à ce travail est d'identifier et caractériser des bacilles thermophiles facultatifs, isolés à partir de différents sites de la chaîne de production, du lait reconstitué pasteurisé, d'une laiterie locale.

Les résultats combinés de la caractérisation morphologique et biochimique ont permis d'orienter l'identification au genre *Bacillus* et de classer les souches dans 5 biotypes différents ; regroupant les espèces suivantes : *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus pasteurii* et *Bacillus alvei*.

Les souches isolées sont caractérisées par leur pouvoir de sporulation et de production d'enzymes extracellulaires, protéases et amylases, traduisant ainsi leur grand potentiel d'altération de la qualité du lait pasteurisé.

À travers cette étude, nous avons donc pu mettre en évidence la présence des bacilles thermophiles facultatifs dans des échantillons prélevés, tout le long de la chaîne de production du lait pasteurisé reconstitué. Ces résultats soulèvent de nouveau les problèmes causés par les germes contaminants, indésirables en industries agroalimentaire, auxquels il faut faire face pour garantir des produits finis seins permettant ainsi de préserver la santé publique.

**Mots clés :** Lait pasteurisé, poudre de lait, bacilles thermophiles facultatifs, spore, biofilm.

## **Abstract**

Thermophilic bacilli are considered like an important group of contaminants in dairy industries because they are able to produce enzymes and acids that can cause alterations of pasteurized milk.

In this context, the main objective for this work is to identify and characterize facultative thermophiles bacilli isolated from different sites of the production chain of reconstituted pasteurized milk, from a local dairy.

The combined results of morphological and biochemical characterization helped to orient the identification at the genus *Bacillus* and classify the strains in five different biotypes comprising the following species: *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus pasteurii* and *Bacillus alvei*.

The isolated strains are characterized by their capacity of production of extracellular enzymes, proteases and amylases, reflecting their great potential for alteration of the quality of pasteurized milk.

Through this study, so we were able to highlight the presence of facultative thermophiles bacilli in samples collected along the chain of production of reconstituted milk pasteurized. These results raise new problems caused by contaminants germs, unwanted in food processing, which must be addressed to ensure the finished products breasts and to preserve public health.

**Key words:** pasteurized milk, milk powder, facultative thermophiles bacilli, spore, biofilm.

عصيات لحرارة مجموعة هامة من الملوثات في صناعات الألبان لأنها قادرة على إنتاج الإنزيمات والأحماض التي يمكن أن تسبب تعديلات في الحليب .

في هذا السياق، فإن الهدف الرئيسي لهذا العمل هو تحديد ووصف العصيات من سلسلة إنتاج الحليب المبستر .

والكيميائي الحيوي على تحديد جنس العصيات وتصنيف السلالات في انواع حيوية مختلفة والتي تظهر في المجموعة التالية:

*Bacillus pumilus, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus coagulans, Bacillus polymyxa, Bacillus pasteurii Bacillus alvei.*

وتتميز السلالات المعزولة بقدرتها على إنتاج الإنزيمات الخلوية ياز والأمي . وهذا ما يزيد في امكانية القيمة النوعية للحليب .

من خلال هذه الدراسة، عصيات الاختياري في جميع العينات على طول سلسلة إنتاج الحليب . هذه النتائج تعيد من جديد طرح الإشكالية المتعلقة بالمشاكل التي تتسبب بها يم الغير مرغوب فيها في صناعة الأغذية، والتي يجب معالجتها لضمان المنتجات النهائية والحفاظ على

الحليب : الحليب، عضية مقاومة للحرارة اختيارية، بوغ، بيو فيلم.

# **Références bibliographiques**

1. **Adrian Ponce., Stephanie A. Connon., Pun To Yung.** (2008). Detection and Viability Assesment of Endospore Forming Pathogens. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer Science+Business Media. p : 481-523.
2. **Alain Branger., Marie-Madeleine Richer., Sébastien Roustel.** (2007). Microbiochimie et alimentation. Edition Laurence Audenet-Verrier. p : 132
3. **Alexandre Hervé., Granvalet Cosette., Guilloux-Benatier., Michèle Remize-Barnavon Fabienne.,Tourdot-Marechal Raphaëlle.** (2008). Les bactéries lactiques en œnologie. Edition Lavoisier. p : 113
4. **Alexandre Monvoisin.** (1911). Le lait, son analyse, son utilisation. Edition Asselin et Houzeau, Original provenant de l'Université du Wisconsin – Madison. p : 198
5. **Amellal Rachid.** (2002). La filière lait en Algérie : entre l'objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance. In : Allaya M. (ed.). Les agricultures maghrébines à l'aube. Montpellier : CIHEAM, 1995. p : 229-238 (Option s Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches ; n. 1 4)
6. **Augustin M.A., Clarke P.T., Craven H.M.** (2003). Powdered milk: characteristics of milk powders. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. p : 4703-4711.
7. **Barbarous Ozer., GulsunAkdemir-Evrendilek.** (2014). Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments. CRC Press. p : 13.
8. **Boukrouh Nouredine.** (2004, 07, Novembre). Journal Officiel de la République Algérienne (Alger) N°70. p : 20.
9. **Bourgeois C.M., Larpent j.p., Zucca J.** (1996). Microbiologie alimentaire. Tome2. Edition Tec et Doc, Lavoisier. p : 272.

10. **Camille delerras.** (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Tec and Doc, Lavoisier. p : 295 -296.
11. **Camille delerras.** (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries et de levures-moisissures. Edition Lavoisier. p : 31-70-126-143-145.
12. **Carl A.Ball., Mary-Lou Tortorello.,** (2014). Encyclopedia of Food Microbiology. Second Edition. p : 133.
13. **Carole Lapointe-Vignola., Fondation de technologie laitière du Québec.** (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. Edition : Presses inter Polytechnique. p : 1-3-4-21-26-29-51-89-90-539.
14. **Chantier prospea.** (2002). Loi d'orientation agricole, savoirs et qualifications professionnelles. Educagri Editions. p : 318.
15. **Charles Alais., Guy Linden., Laurent Miclo.** (2005). Biochimie alimentaire. 6ème édition de l'abrégé. p : 171-172-174.
16. **Charles Alais.** (1965). Science du lait : principes des techniques laitières 2ème éditions de Pontoise, Impr. Paris. p : 189.
17. **Charles B., O'Connor., Bansh R. Tripathi.** (1991). Introduction à l'étude du lait. Edition : ILRI (aka ILCA and ILRAD), Addis-Abeba. p : 7-8.
18. **Christian Moussarad.** (2006). Biochimie structurale et métabolique, De Boeck Supérieur. p : 17.
19. **Christieans Souad., Zagorec Monique.** (2013). Flores protectrices pour la conservation des aliments. Editions Quae. p : 52.
20. **Croguennec T., Jeantet R., Brulé G.** (2008). Fondements physicochimiques de la technologie laitière. Edition : Tec et Doc, Lavoisier, Paris. p : 6.
21. **Dromigny Eric.** (2008). *Bacillus cereus*. Edition Lavoisier. p : 43.
22. **Ernest Jawetz., Joseph L. Melnick., Edward A. Adelberg.** (1973). Microbiologie médicale. Edition Presses Université Laval. p : 21-115.
23. **Eugénie Baril., Louis Coroller., Olivier Couvert., Mohammed EL Jabri., Ivan Leguerinel., Florence Postollec., Christophe Boulais., Frédéric Carlin., Pierre Mafart.** (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. As a function of temperature, pH and aw. Food Microbiology. **32**(1). p : 79-86-869.
24. **FAO.** (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. p : 130-271

25. **Flint S.H., Bremer P.J., Brooks J.D.** (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. **11**(1). p : 81-97.
26. **François Denis.** (2007). Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Éditeur : Elsevier Masson. p : 22, 23, 24, 26.
27. **François M .Luquet.** (1985). Laits et produits laitiers vache. brebie. chèvre, Les Laits : de la mamelle à la laiterie. 1. Édition Technique et Documentational, Lavoisier. p : 3-4-5- 6- 74- 86.
28. **Fredot E.** (2005). Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Edition : Tec et Doc, Lavoisier. p : 10-14-397.
29. **Fredot E.** (2006). Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Edition : Tec et Doc, Lavoisier. p : 397.
30. **Gazengel Jean-Marie., Orecchioni Anne-Marie.** (2013). Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique 2ème édition. Edition : Lavoisier. p : 276.
31. **Henri Dupin., Jean-Louis Cuq., M –I. Malewiak., C. Leynaud –Rouaud., A.-M.Berthier.** (1992). Alimentation et nutrition humaines. Esf Editeur. p : 1276.
32. **Institut de l'élevage.** (2009). Traite des vaches laitières : matériel, installation, entretien. France Agricole Editions. p : 409.
33. **J Senterre., R. Eeckels.** (1996). Pédiatrie.Capita selecta. Edition Garant. p : 194.
34. **Jaques Fortin.** (1996). L'Encyclopédie visuelle des aliments. Québec Amérique. p : 596.
35. **Jeanet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P., Brulé G.** (2008). Les produits laitiers 2ème édition. Edition : Tec et Doc, Lavoisier, Paris. p : 1-111.
36. **Joseph-Pierre Guiraud.** (2003). Microbiologie alimentaire. Edition Dunod. p : 301.
37. **Koon Hoong Teh.** (2015). Biofilms in the Dairy Industry, edition by John Wiley and Sons. p : 51.
38. **Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein.** (2003). Microbiologie. Editeur: De Boeck Supérieur. p : 142-836.
39. **Lansing M. Prescott., Linda M. Sherwood., Christopher J. Woolverton.** (2010). Microbiologie 3ème édition. De Boeck superieur. p : 73-74 -75- 578.
40. **Le Loir Yves., Gantier Michel.** (2009). Staphylococcus aureus. Lavoisier. p : 139.

41. **Maria P. MacWilliams.** (2009). Citrate Test Protocol-Microbe Library.
42. **Michael C. Latham., Food and Agriculture Organization of the United Nations.** (2001). La nutrition dans les pays en développement Numéro 29 de Collection Fao : Alimentation Et Nutrition, ISSN 0253-2549. *Food & Agriculture Org.* p : 291.
43. **Monica Cheesbrough.** (2006). District Laboratory Practice in Tropical Countries. 2 part. Cambridge University Press. p : 65.
44. **N Hygis.** (1998). Hygiène hospitalière. Edition Presses Universitaires Lyon. p : 25.
45. **P M Fratamico., B A Annous., N W Guenther.** (2009). Biofilms in the Food and Beverage Industries. Elsevier. p : 287.
46. **Paul G. Engelkirk., Janet L. Duben-Engelkirk.** (2008). Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology. Editor Lippincott Williams and Wilkins. p : 303.
47. **Paul Vos., George Garrity., Dorothy Jones., Noel R. Krieg., Wolfgang Ludwig., Fred A. Rainey., Karl-Heinz Schleifer., William Whitman.** (2011). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. 2ème édition. Editor Springer Science and Business Media. p : 31.
48. **Pauline Ebing., Karin Rutgers.** (2006). AD36F 2006 La préparation de laitages. Edition Agromisa Foundation. p : 11.
49. **Pierre Gouldet., Alain Kowalski.** (2011). Physique et chimie : 1ère et terminale bac pro. Edition Educagri. p : 108.
50. **Postollec F., Bonilla S., Baron F., Jan S., Gautier M., Mathot AG., Hallier-Soulier S., Pavan S., Sohier D.** (2010). A multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food. *International Journal of Food Microbiology.* **142** (1-2). p : 78-88.
51. **Q. Ashton Acton., PhD.** (2012). Issues in General Food Research. Scholarly Editions.
52. **Ripert Christian.** (2013). Mycologie médicale. Edition Lavoisier. p : 327.
53. **Romain Jeantet., Thomas Croguennec., Pierre Schuck., Gérard Brulé.** (2007). Science des aliments. Edition Tec et Doc, Lavoisier. p : 28.

54. **Sara A. Burgess., Denise Lindsay., Steve H. Flint.** (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology*. **144**. p : 215-225.
55. **Simoès M., Simoès LC., Vieira MJ.** (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology*. **43**(4). p : 573-583.
56. **Subhash Chandra Parija.** (2009). Textbook of Microbiology and Immunology. Edition Elsevier India. p : 47.
57. **Washington Winn Jr., Stephen Allen., William Janda., Elmer Koneman., Gary Procop., Paul Schreckenberger., Gail Woods.** (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Edition Lippincott Williams and Wilkins. p : 1453.
58. **Yannick D.N. Tremblay., Skander Hathroubi., Mario Jacques.** (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res*. **78**(2). p : 110–116.
59. **Yves Cassard.** (2013). Le corps humain et son pouvoir d'autoguérison. Editions hymanis. p : 27.

# Annexes

**Milieu TSI (triple sugar iron agar)**

Composition en g/l eau distillée

Peptone.....	20
Agar.....	12
Lactose.....	10
Sucrose.....	10
NaCl.....	.05
Extrait de levure.....	.03
Extrait de viande.....	.03
Glucose.....	.01
Citrate de fer.....	.03
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	0,3
Rouge de phénol .....	0,025
pH7.4 ±0.2 à 25°C	

**Milieu citrate de Simmons**

Composition en g/l eau distillée

Agar.....	15
NaCl.....	.05
Sodium citrate.....	.02
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	.01
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	.01
MgSO <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0,2
Bleu de bromothymol.....	0,08
pH 6.9 ± 0.2 à 25° C	

**Milieu urée-indole**

Composition en g/l eau distillée

Tryptophane.....	03
Urée.....	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	01
NaCl.....	05
Alcool à 95°.....	10 mL
Rouge de phénol.....	2,5 mL

**Milieu Mannitol Mobilité Nitraté**

Composition en g/l eau distillée

Peptone tryptique de viande.....	20
Mannitol.....	02
RP1%.....	4mL
Nitrate K.....	01
Agar.....	04
pH = 7,6-7,8	

**Milieu Clark et Lubs**

Composition en g/l eau distillée

Peptone tryptique.....	05 à 07
Glucose.....	05
Phosphate bipotassique.....	05

pH = 7

**Milieu TSA**

Composition en g/l eau distillée

Poudre déshydraté.....40

**Gélose au lait**

Composition en g

Poudre de lait.....05

Eau distillée.....50mL

Agar.....02

Eau distillée.....50mL

Stériliser à l'autoclave 15min à 115°C.

**Gélose à l'amidon**

Composition en g

Amidon de pomme de terre.....10

Gélose nutritive.....01L

Stériliser à l'autoclave 15min à 121°C

**Eau physiologique stérile**

Composition en g/l eau distillée

NaCl.....09

Stériliser à l'autoclave 20min à 121°C.

## Recherche et identification des bacilles thermophiles en industrie laitière

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Juin 2016

### Résumé

Les bacilles thermophiles sont considérés comme un groupe important de contaminants dans les industries laitières, car ils sont capables de produire des enzymes et des acides qui peuvent entraîner des altérations du lait pasteurisé (Christieans et Zagorec., 2013).

Dans cette optique, l'objectif principal assigné à ce travail est d'identifier et caractériser des bacilles thermophiles facultatifs, isolés à partir de différents sites de la chaîne de production, du lait reconstitué pasteurisé, d'une laiterie locale.

Les résultats combinés de la caractérisation morphologique et biochimique ont permis d'orienter l'identification au genre *Bacillus* et de classer les souches dans 5 biotypes différents ; regroupant les espèces suivantes : *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus pasteurii* et *Bacillus alvei*.

Les souches isolées sont caractérisées par leur pouvoir de sporulation et de production d'enzymes extracellulaires, protéases et amylases, traduisant ainsi leur grand potentiel d'altération de la qualité du lait pasteurisé.

À travers cette étude, nous avons donc pu mettre en évidence la présence des bacilles thermophiles facultatifs dans des échantillons prélevés, tout le long de la chaîne de production du lait pasteurisé reconstitué. Ces résultats soulèvent de nouveau les problèmes causés par les germes contaminants, indésirables en industries agroalimentaire, auxquels il faut faire face pour garantir des produits finis sains permettant ainsi de préserver la santé publique.

**Mots clés :** Lait pasteurisé, poudre de lait, bacilles thermophiles facultatifs, spore, biofilm.

**Laboratoire de recherche :** de Microbiologie de Safilait

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** ABDELAZIZ Wided Maitre-assistant – UFM Constantine,  
**Rapporteur :** BOULTIFAT Lynda Maitre-assistant – UFM Constantine,  
**Examineur :** MEZIANI Meriem Maitre-assistant – UFM Constantine.

**Date de soutenance :** 27/06/2016

