



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا.

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

Evaluation du degré de contamination de lait de vache et de lait reconstitué pasteurisés par des espèces du groupe *Bacillus cereus*

Présenté et soutenu par : TAYANI Manel

Le : 27/06/2018

SAIDI SIEF Manel

Jury d'évaluation :

Président du jury : Melle. ABDELAZIZ W. (Maitre Assistante - UFM Constantine).

Rapporteur : Mme. BOULTIFAT L. (Maitre Assistante - UFM Constantine).

Examineurs : Melle. MEZIANI M. (Maitre Assistante - UFM Constantine).

*Année universitaire
2017 - 2018*

Remerciements

Nous remercions tout d'abords le bon dieu qui nous a donné le courage et la patience pour terminer ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur Mme. BOULTIFAT LINDA qui a accepté de nous encadrer et de diriger ce travail mais surtout pour son aide très précieuse.

Aux membres du jury Melle. ABDELAZIZ et Melle. MEZIANI qui ont accepté de juger notre travail.

Nos sincères remerciements au chef de département de l'usine ONALAIT Mme.MAHNOUK ISMAHEN Pour tous les efforts et l'aide précieuse qu'elle nous a apporté, nous remercions toute l'équipe de l'usine.

On voudrait remercier particulièrement Mme.KRIBECH MANEL qui nous a régulièrement suivis dans la réalisation de ce travail, on le remercie pour son soutien et son aide.

S'indresse également à l'équipe du laboratoire de microbiologie du département de microbiologie, pour leur disponibilité et leur collaboration.

Un grand merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Ce travail, et bien au-delà, je le dois à ma très chère maman pour son encouragement, à ma très chère famille qui m'a fourni au quotidien un soutien et une confiance sans faille et de ce fait, je ne saurais exprimer ma gratitude seulement par des mots. Que dieu vous protège et vous garde pour nous

A mes chères sœurs Rayen, Nour elhouda, Khaoula ; Oumaima.

A mon cher frère Hichem.

A mon oncle Adel .

A toutes mes familles chacun a son nom.

A mes adorables amies : Manel, Loubna, Halla, Amira, Amel, Roufaïda, pour leur fidélité.

A tous mes amis avec qui j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.

Tous mes professeurs qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.

Que toute personne m'ayant aidée de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Manel. S

Dédicace

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

*Mon adorable père aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime
le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne
vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être.*

*Ma chère mère, affable, honorable, aimable que je ne cesse de la remercier
pour tout ce qu'elle m'a donné.. Que dieu la récompense pour tous ces bienfaits.*

*A mes très cher frères et sœurs, Nabila, Karim et Selma mes anges gardien,
mes fidèles compagnants dans les moments les plus délicats de cette vie
mystérieuse. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et
de réussite.*

*Je tiens a remercie mes adorables amis : Manel, Ranya, khadidja, Mounira,
Loubna, Halla, Amira, Sara, Malak, Lamia qui m'ont toujours encouragé, et à
qui je souhaite plus de succès.*

*Et a tous les membres de ma famille, mes proches de prés et de loin et à ceux
qui me donnent de l'amour et de la vivacité.*

*Tous mes professeurs qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien
acquis.*

A tous ceux que j'aime.

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

Manel .T

Liste des abréviations

MG 0 % : Matière Grasse 0%.

MG 26% : Matière Grasse 26%.

PCA: *Plate Count Agar*.

TSI: triple sugar iron.

UFC/ml : Unité Format Colonie par millilitre.

pH : Le potentiel hydrogène.

G+C : Guanine+ Cytosine.

FAO: *Food and Agriculture Organization*.

O₂ : dioxyde d'oxygène.

CO₂ : dioxyde de carbone.

Aw : l'activité de l'eau.

UHT : *Ultra Hôte Température*.

µm : micromètre.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

EPS : Extracellulaire polymérique substance (substance polymériques extracellulaire).

CIP : *Clean-in-Place*.

HTST : *High-Température Short Time*.

HACCP : *Hazard Analysis Critical Control Point*.

PDA : Dihydrochlorure de Tétraméthyle para phénylène diamine.

Liste des figures

Figure 01 : Composition de la matière grasse du lait	6
Figure 02 : cyclone des différentes étapes de la production de la poudre de lait.....	12
Figure 03 : Cliché au microscope électronique d'un sporange et spore en formation.....	22
Figure 04 : Les étapes de formation de biofilm.....	23
Figure 05 : observation microscopique de la coloration de Gram ($G \times 100$).....	34
Figure 06 : Activités enzymatiques : A. Hydrolyse de la caséine, B. Hydrolyse de l'amidon, C. Hydrolyse de la lécithine.....	42

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition générale du lait de vache	4
Tableau 02 : Propriétés physico-chimiques du lait de vache	6
Tableau 03 : Classification des protéines	7
Tableau 04 : Composition minérale du lait de vache	8
Tableau 05 : Composition moyenne en vitamine du lait de vache cru	8
Tableau 06 : Caractéristiques des principales enzymes du lait de vache	9
Tableau 07 : La flore du lait cru.....	10
Tableau 08 : Composition des trois différents types de laits en poudre en (%)	11
Tableau 09 : Nouvelle classification du groupe <i>Bacillus cereus</i>	17
Tableau 10 : Résultat relatifs à l'origine des souches isolées.....	36
Tableau 11 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur PCA après incubation de 48h jusqu'à 72h à 30°C.....	38
Tableau 12 : Résultat de la coloration de Gram.....	39
Tableau 13 : Résultats des tests biochimique des isolats.....	40
Tableau 14 : Résultats des activités protéolytique, amylolytique et hémolytique des souches isolées.....	41

Résumé

Le lait joue un rôle important dans la nutrition humaine, mais peut représenter un risque potentiel de toxi-infections pour le consommateur.

L'objectif principal assigné à cette étude est d'évaluer le degré de contamination, du lait de vache et de lait reconstitué pasteurisés, tout le long de leur chaîne de fabrication (de la matière première au produit fini destiné à la consommation), par des bactéries du groupe *Bacillus cereus*.

L'échantillonnage à travers les différentes étapes de fabrication des deux types de lait a permis d'isoler sept souches.

Les résultats combinés de la caractérisation morphologique et biochimique des souches isolées ont permis d'orienter l'identification au genre *Bacillus*, probablement aux espèces *Bacillus cereus*/*Bacillus thuringiensis*.

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

A travers cette étude, nous avons donc pu mettre en évidence la présence des bactéries du groupe *Bacillus cereus*, dans les deux types de laits pasteurisés. Ces résultats soulèvent de nouveau les problèmes causés par les germes contaminants indésirables en industrie agroalimentaire auxquels il faut faire face pour garantir des produits finis sains permettant de préserver la santé publique.

Mots clés : Lait de vache pasteurisé, lait reconstitué pasteurisé, contamination, groupe *Bacillus cereus*, spore.

Abstract

Milk plays an important role in human nutrition, but may represent a potential risk of food poisoning to the consumer.

The main objective assigned to this study is to assess the degree of contamination, pasteurized cow's milk and reconstituted milk, all along their production chain (from the raw material to the finished product intended for consumption), by bacteria of the *Bacillus cereus* group.

Sampling through the different manufacturing stages of the two types of milk made it possible to isolate seven strains.

The combined results of the morphological and biochemical characterization of the isolated strains allowed to orient the identification to the genus *Bacillus*, probably to the species *Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis*.

Isolated strains were characterized by their ability to sporulate and produce extracellular enzymes, proteases and amylases, reflecting their high potential for altering the quality of pasteurized milk.

Through this study, we have been able to highlight the presence of bacteria in the *Bacillus cereus* group, in both types of pasteurized milks. These results again raise the problems caused by undesirable contaminants in the agri-food industry that must be addressed to ensure healthy finished products to preserve public health.

Key words: Pasteurized cow's milk, pasteurized reconstituted milk, contamination, *Bacillus cereus* group, spore.

ملخص

يلعب الحليب دوراً هاماً في تغذية الإنسان، ولكنه قد يمثل خطراً محتملاً للتسمم الغذائي للمستهلك. الهدف الرئيسي المخصص لهذه الدراسة هو تقييم درجة التلوث، وحليب الأبقار المبستر والحليب المعاد تكوينه، على طول سلسلة الإنتاج الخاصة به (من المواد الخام إلى المنتج النهائي المخصص للاستهلاك)، البكتيريا من مجموعة *Bacillus cereus*.

إن أخذ العينات من خلال مراحل التصنيع المختلفة من هذين النوعين من الحليب جعل من الممكن عزل سبعة سلالات.

النتائج المشتركة للتوصيف المورفولوجي والكيميائي الحيوي للسلالات المعزولة سمحت بتوجيه تحديد الهوية إلى جنس *Bacillus*، على الأرجح إلى الأنواع *Bacillus thuringiensis* / *Bacillus cereus*. تتميز السلالات المعزولة بقدرتها على تنشيط وإنتاج إنزيمات خارج الخلية والبروتياز والأملاح، مما يعكس إمكاناتها العالية لتغيير نوعية الحليب المبستر.

من خلال هذه الدراسة، تمكنا من إبراز وجود البكتيريا في مجموعة *Bacillus cereus*، في كلا النوعين من الحليب المبستر. هذه النتائج مرة أخرى تثير المشاكل الناجمة عن الملوثات غير المرغوب فيها في صناعة الأغذية الزراعية التي يجب معالجتها لضمان منتجات نهائية صحية للحفاظ على الصحة العامة.

الكلمات المفتاحية: حليب البقر المبستر، الحليب المعاد ترميمه، التلوث، مجموعة *Bacillus cereus*، بوع.

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction 1

I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : le lait pasteurisé

1. Le lait de vache

1.1. Définition..... 3

1.2. La composition générale de lait de vache..... 3

1.3. La composition microbiologique de lait de vache..... 9

1.3.1. La flore indigène ou originelle du lait 9

1.3.2. La flore contaminants du lait..... 10

2. Le lait reconstitué pasteurisé

2.1. Définition..... 11

2.2. La technologie de lait en poudre..... 11

2.3. La composition de lait en poudre..... 12

2.3.1. La Propriétés chimiques et physiques du lait en poudre..... 12

2.3.2. La composition microbiologique de lait en poudre..... 13

3. le procéder de la pasteurisation du lait 14

Chapitre 2 : le groupe *Bacillus cereus*

1. Le genre <i>Bacillus cereus</i>	15
2. L'espèce <i>Bacillus cereus</i>	15
3. le groupe <i>Bacillus cereus</i>	16
3.1. <i>Bacillus anthracis</i>	18
3.2. <i>Bacillus cereus sensu stricto</i>	18
3.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
3.4. <i>Bacillus mycoides</i> et <i>Bacillus pseudomycoides</i>	19
3.5. <i>Bacillus weihenstephanens</i>	19
4. Écologie du groupe <i>Bacillus cereus</i>	20
4.1.Réservoir primaire (le sol).....	20
4.2.Réservoirs secondaires (les aliments).....	20
5. La sporulation.....	21
6. La formation des biofilms.....	23

Chapitre 3 : altération du lait par les bactéries du groupe *Bacillus cereus*

1. Contamination de lait.....	24
2. Risques de maladie infectieuse inhérents à la consommation du lait.....	24
3. Voie de transmission.....	25
4. Pathologies liées au groupe <i>Bacillus cereus</i>	25
4.1. Atteintes non gastro-intestinales.....	25
4.2. Toxi-infections alimentaires	26
4.2.1. Syndrome émétique.....	26
4.2.2. Syndrome diarrhéique.....	26
5. Surveillance des bactéries du groupe <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments.....	27

II. Matériel et méthode

1. Présentation du lieu de travail.....	28
2. Prélèvement des échantillons.....	28
3. Traitement des échantillons.....	29

3.1. Préparation des solutions mères.....	29
3.2. Préparation des dilutions décimales.....	29
4. Isolements des bactéries du groupe <i>Bacillus cereus</i>	29
5. Purification.....	29
6. Identification des isolats	30
6.1.Caractéristique morphologique des isolats.....	30
6.1.1. Aspect macroscopique.....	30
6.1.2. Aspect microscopique.....	30
6.2. Caractérisation biochimique des isolats.....	31
6.2.1. Mise en évidence des enzymes respiratoire.....	31
6.2.2. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité.....	32
6.2.3. Utilisation du citrate sur le milieu citrate de Simmons.....	32
6.2.4. Utilisation des sucres (Glucose, Lactose, Saccharose).....	33
6.2.5. Production d'indole.....	33
6.2.6. Recherche de l'enzyme uréase.....	34
7. Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires.....	34
7.1. Activité amylolytique.....	34
7.2. Activité protéolytique (Hydrolyse de la caséine).....	34
7.3. Activité hémolytique.....	34
8. la croissance à 7 °C.....	35

III. Résultats et discussion

1. Résultats.....	36
1.1. Résultats de l'isolement.....	36
1.2. Résultats de l'identification phénotypique.....	36

2.1. Aspect macroscopique.....	38
2.2. Aspect microscopique.....	39
1.3. Résultats de l'identification biochimique.....	40
1.3.1. Test de la catalase.....	40
1.3.2. Test de l'oxydase.....	40
1.4. Résultats de l'identification par la galerie classique.....	40
1.5. Résultats de la mise en évidence des activités enzymatique.....	41
1.6. Résultats de la croissance à 7 °C.....	41
2. Discussion.....	44
IV. Conclusion.....	47

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Le lait est un aliment riche en nutriment fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment complet. En Algérie, le lait est considéré comme un produit de base dans la consommation où il occupe une place importante dans la ration alimentaire de la population. Les besoins sont estimés à 3,2 milliard de litre par an et ne couvrent que 40% des besoins, le reste de ces besoins est satisfait par l'importation de poudres de lait et des matières grasses laitières anhydres (Yakhlaf et *al.*, 2010).

Le lait par sa composition très riche, fournit également aux microorganismes un milieu favorable et des facteurs physicochimiques, pour une croissance optimale. Il est le siège du développement d'une flore de contamination dont l'importance dépend des conditions d'hygiène et des traitements que subit le lait telle la pasteurisation qui est un traitement thermique modéré permettant de réduire les formes végétatives mais n'a aucun effet sur les spores bactériennes. De ce fait, le lait doit répondre aux critères de pureté et de salubrité bien précis pour protéger le consommateur et garantir des qualités organoleptique et évidemment nutritionnelle supérieures.

En effet, certaines espèces du groupe *B. cereus* (*B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis* et *B. thuringiensis*) connus pour être particulièrement virulents, peuvent résister au traitement thermique, par leurs spores thermorésistantes et se retrouver dans le produit fini.

Les bactéries du groupe *B. cereus* sont des bacilles à Gram positif, sporogènes, ubiquistes du sol, retrouvés dans l'environnement et dans les aliments, principalement les laits et produits dérivés (Dromigny, 2008). *B. cereus* et les genres apparentés (*B. thuringiensis*...) sont fréquemment identifiés comme la cause de maladies alimentaires humaines de gravité moyenne dans le monde malgré quelques cas mortels signalés (Dierick et *al.*, 2005 ; EFSA, 2005 ; Dromigny, 2008). Ils sont l'agent étiologique de deux types de toxi-infections alimentaires. Une intoxication diarrhéique caractérisée généralement par des douleurs et des crampes abdominales et la diarrhée qui surviennent 6-18 heures après la consommation d'aliments contaminés (EFSA, 2005 ; Dromigny, 2008 ; Rajkovic et *al.*, 2008), et une intoxication émétique caractérisée par des nausées aiguës et des vomissements (Stenfors et *al.*, 2008) qui apparaissent 1 à 5 heures après la consommation des aliments contaminés et contenant la toxine préformée (EFSA, 2005 ; Dromigny, 2008).

Le développement de *B. cereus* dans le lait contribue également à la détérioration rapide de ce produit et limite sa durée de conservation. Spécifiquement, le développement de *B. cereus* dans le lait engendre des défauts technologiques occasionnant de nombreuses pertes aux acteurs de la chaîne de production et aux industriels (Bonfoh et *al.*, 2006).

Dans ce contexte, l'objectif principal assigné à ce travail est l'évaluation de la contamination de deux types de laits pasteurisés, produits localement, principalement par des espèces sporogènes appartenant au groupe *Bacillus cereus*.

Le présent travail est scindé en trois parties :

- ✓ La première partie présente le cadre général de l'étude par des rappels bibliographiques sur : le lait de vache et le lait reconstitué, les caractères généraux du groupe *Bacillus cereus* et la contamination du lait par les membres de ce groupe.
- ✓ La deuxième partie présente l'étude expérimentale : méthodologie adaptée pour l'isolement et l'identification (étude microbiologique).
- ✓ La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus, les interprétations éventuelles achevée par une conclusion générale.

I. Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1 :

Le lait pasteurisé

1. Le lait de vache

1.1. Définition

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum » (Pougheon et Goursaud, 2001).

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères, comme la vache, la chèvre et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant (Amiot *et al.*, 2002). Selon Aboutayeb (2009), le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femme et par celles des mammifères femelles pour la nutrition des jeunes. D'un pH (6,6 à 6,8) légèrement acide, proche de la neutralité (Pougheon, 2001).

Le lait cru est un lait qui n'a subi aucun traitement de conservation sauf la réfrigération à la ferme. La date limite de vente correspond au lendemain du jour de la traite. Le lait cru doit être porté à l'ébullition avant consommation (car il contient des germes pathogènes). Il doit être conservé au réfrigérateur et consommé dans les 24h (Fredot, 2006).

Le lait 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'épuration microbienne pour limiter les risques hygiéniques et assurer une plus longue conservation (Jeantet *et coll.*, 2008).

1. 2. La composition générale du lait de vache

Le lait est constitué de quatre phases (Fredot, 2006) :

- Une émulsion de matières grasses ou phase grasse constituée de globules gras et de vitamines liposolubles (A, D).
- Une phase colloïdale qui est une suspension de caséines sous forme de micelle.
- Une phase aqueuse qui contient les constituants solubles du lait (protéines solubles, lactose, vitamines B et C, sels minéraux, azote non protéique).
- Une phase gazeuse composée d'O₂, d'azote et de CO₂ dissous qui représente environ 5 % du volume du lait.

Les principaux constituants du lait par ordre croissant Tableau 01 selon Pougheon et Gouraud (2001) sont :

- L'eau, très majoritaire,
- Les glucides principalement représentés par le lactose,
- Les lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras,
- Les sels minéraux à l'état ionique et moléculaire,
- Les protéines, caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles,
- Les éléments à l'état de trace mais au rôle biologique important, enzymes, vitamines et oligoéléments.

Tableau 01 : Composition générale du lait de vache (Amiot et *al.*, 2002).

Constituants majeurs	Variations limites (%)	Valeur moyenne (%)
Eau	85,5 - 89,5	87,5
Matières grasses	2,4 - 5,5	3,7
Protéines	2,9 - 5,0	3,2
Lactoses	3,6 - 5,5	4,6
Minéraux	0,7 - 0,9	0,8

- **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 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 (ou hydrophobe), elles ne pourront se dissoudre et formeront une émulsion du type huile dans l'eau. Il en est de même pour les micelles de

caséines qui formeront une suspension colloïdale puisqu'elles sont solides. (Amiot et coll., 2002).

- **La matière grasse**

La matière grasse du lait est produite principalement à partir des acides gras volatils (acides acétique et butyrique). Le premier est formé principalement à partir des glucides pariétaux des fourrages (cellulose) et le second à partir des glucides rapidement fermentescibles (sucre de betterave). Une partie de la matière grasse du lait provient de la mobilisation des réserves lipidiques de la vache (jusqu'à 60 kg). Sous certaines conditions, des graisses alimentaires peuvent également contribuer à la formation de la matière grasse du lait (Stoll, 2003).

La matière grasse est présente dans le lait sous forme de globules gras de diamètre de 0.1 à 10µm et est essentiellement constituée de triglycérides (98%). La matière grasse du lait de vache représente à elle seule la moitié de l'apport énergétique du lait. Elle est constituée de 65% d'acides gras saturés et de 35% d'acides gras insaturés (Jeantet et coll., 2008). Elle renferme :

- Une très grande variété d'acides gras (150 différents);
- Une proportion élevée d'acides gras à chaînes courtes, assimilés plus rapidement que les acides gras à longues chaînes ;
- Une teneur élevée en acide oléique (C18:1) et palmitique (C16:0) ;
- Une teneur moyenne en acide stéarique (C18:0) ;

La membrane du globule gras du lait est constituée de phospholipides, de lipoprotéines, de cérébrosides, de protéines, d'acides nucléiques, d'enzymes et d'oligoéléments (métaux) et d'eau (Figure1) (Bylund, 1995).



Figure 01 : Composition de la matière grasse du lait (Bylund, 1995).

- **Les protéines**

Le lait de vache contient 3.2 à 3.5% de protéines réparties en deux fractions distinctes
Tableau 02 (Jeantet et coll., 2007) :

- Les caséines qui précipitent à pH 4.6, représentent 80% des protéines totales,
- Les protéines sériques solubles à pH 4.6, représentent 20% des protéines totales.

Tableau 02 : Classification des protéines (Brunner, 1981 cité par Pougeon, 2001)

NOMS	% des protéines	Nombre d'AA
CASEINES	75-85	
Caséine α_{S1}	39-46	199
Caséine α_{S2}	8-11	207
Caséine κ	25-35	209
Caséine λ	8-15	169
Caséine μ	3-7	
PROTEINES DU LACTOSERUM	15-22	
β -Lactoglobuline	7-12	162
α -Lactalbumine	2-5	123
Sérum-albumine	0.7-1.3	582
Immunoglobulines (G1, G2, A, M)	1.9-3.3	-
Protéoses-peptones	2-4	-

- **Le lactose**

Le lait contient des glucides essentiellement représentés par le lactose, son constituant le plus abondant après l'eau. Sa molécule C₁₂H₂₂O₁₁, est constituée d'un résidu galactose uni à un résidu glucose. Le lactose est synthétisé dans les cellules des acini à partir du glucose sanguin. Celui-ci est en grande partie produit par le foie (Mathieu, 1999).

Le lactose est quasiment le seul glucide du lait de vache et représente 99% des glucides du lait de monogastriques. Sa teneur est très stable entre 48 et 50 g/l dans le lait de vache. Cette teneur présente de faibles variations dans le sens inverse des variations du taux butyreux. Le lactose est un sucre spécifique du lait (Hoden et Coulon., 1991).

- **Les minéraux**

Selon le lait contient des quantités importantes de différents minéraux. Les principaux minéraux sont : calcium, magnésium, sodium et potassium pour les cations et phosphate, chlorure et citrate pour les anions (Gaucheron, 2004) (Tableau 03).

Tableau 03 : Composition minérale du lait de vache (Jeantet et coll., 2007)

<i>Eléments minéraux</i>	<i>Concentration (mg.kg⁻¹)</i>
Calcium	1043-1283
Magnésium	97-146
Phosphate inorganique	1805-2185
Citrate	1323-2079
Sodium	391-644
Potassium	1212-1681
Chlorure	772-1207

- **Les vitamines**

Les vitamines sont des substances biologiquement indispensables à la vie puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires. L'organisme humain n'est pas capable de les synthétiser (Vignola, 2002)

On distingue d'une part les vitamines liposolubles (A, D, E et K) et d'autre part les vitamines hydrosolubles (vitamine du groupe B et vitamine C) en quantité constantes (Jeantet et coll. 2008) (Tableau 04).

Tableau 04: Composition moyenne en vitamine du lait de vache cru (Amiot et coll., 2002)

<i>Vitamines</i>	<i>Teneur moyenne</i>
<i>Vitamines liposolubles</i>	
Vitamine A (+carotènes)	40µg/100ml
Vitamine D	2.4µg/100ml
Vitamine E	100µg/100ml
Vitamine K	5µg/100ml
<i>Vitamines hydrosolubles</i>	
Vitamine C (acide ascorbique)	2mg/100ml
Vitamine B ₁ (thiamine)	45µg/100ml
Vitamine B ₂ (riboflavine)	175µg/100ml
Vitamine B ₆ (pyridoxine)	50µg/100ml
Vitamine B ₁₂ cyanocobalamine)	0.45µg/100ml
Niacine et niacinamide	90µg/100ml
Acide pantothénique	350µg/100ml
Acide folique	5.5µg/100ml
Vitamine H (biotine)	3.5µg/100ml

- **Les enzymes**

Les enzymes sont des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Environ 60 enzymes principales ont été répertoriées dans le lait dont 20 sont des constituants natifs. Une grande partie se retrouve dans la membrane des globules gras mais le lait contient de nombreuses cellules (leucocytes, bactéries) qui élaborent des enzymes la distinction entre éléments natifs et éléments extérieurs n'est donc pas facile (POUGHEON, 2001) (Tableau 05).

Tableau 05 : Caractéristiques des principales enzymes du lait de vache (Vignola, 2002)

<i>Groupe d'enzyme</i>	<i>Classes d'enzymes</i>	<i>pH</i>	<i>Température (°C)</i>	<i>Substrats</i>
<i>Hydrolases</i>	<i>Estérases</i>			
	Lipases	8.5	37	Triglycérides
	Phosphatase alcaline	9-10	37	Esters phosphoriques
	Phosphatase acide	4.0-5.2	37	Esters phosphoriques
	<i>Protéases</i>			
	Lysozyme	7.5	37	Parois cellulaire microbienne
	Plasmine	8	37	Caséines
<i>Déshydrogénases ou oxydases</i>	Sulphydrile oxydase	7	37	Protéines, peptides
	Xanthine oxydase	8.3	37	Bases puriques
<i>Oxygénases</i>	Lactoperoxydase	6.8	20	Composés réducteurs+H ₂ O ₂
	Catalase	7	20	H ₂ O ₂

1.2.1. La composition physico-chimique du lait de vache

Les propriétés physicochimiques caractérisant le lait et leurs valeurs sont représentées dans le tableau 06 ci-dessous :

Tableau 06 : Propriétés physico-chimiques du lait de vache (Amiot et *al.*, 2002).

Propriétés	Valeur moyenne (Kg.dm ⁻³)
Densité du lait à 20°C	1,028 - 1,034
Densité du lait écrémé	1,035 - 1,036
Densité de la matière grasse	0,92 - 0,94
Point de congélation	- 0,55°C
pH	6,6 - 6,8
Acidité titrable	14 - 17 °D
Activité de l'eau à 20 °C	0,99

1.2.2. La composition microbiologique du lait de vache

Le lait est un fluide biologique complexe, sécrété par les femelles des mammifères du fait de sa composition physico-chimique susmentionnée plus haut, le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne. Pour d'autres germes banaux ou pathogènes, il n'est qu'un véhicule occasionnel. Selon leur importance, les microorganismes du lait sont répartis en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore contaminante (Rasolofo, 2010).

- **La flore indigène ou originelle du lait**

Le nombre de microorganismes est limité par le système immunitaire de l'animal et les agents antimicrobiens sécrétés dans le lait (Rasolofo, 2010).

Lorsque le lait provient d'un animal sain et qu'il est prélevé dans des conditions aseptiques, il devrait contenir généralement moins de 5 000 UFC/mL (Vignola, 2002).

- **La flore contaminante du lait**

La flore contaminante est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération qui est capable de causer des défauts sensoriels ou de réduire la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les consommateurs de lait (Vignola, 2002). La flore contaminante du lait possède en général un caractère mésophile dominant. Dans cette microflore contaminante, les bactéries sont dominantes et conditionnent le plus directement la qualité hygiénique ainsi que l'aptitude à la conservation et à la transformation du lait. En outre, le lait peut contenir des agents pathogènes dont la multiplication dépend principalement de la température et de la microflore du lait (Frank et Hassan, 2002).

Le lait contient un nombre variable de cellules qui sont des constituants normaux comme les globules blancs et les bactéries lactiques, mais également à des éléments d'origine exogène qui sont la plupart des microorganismes contaminants (tableau 07) (O'Connor et al., 1969).

Tableau 07 : la flore du lait cru (Brisabois et al., 2009)

	Flores	Exemples	Effets
	Flore original	<i>Micrococcus sp</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>	
	Flore contaminant	Flore d'altération	<i>Bacillus</i> Coliforme Levures et moisissures Pseudomonas
Flore pathogène		Bactéries infectieux Bactérie toxinogènes	Dérègle le système digestif provoquant des intoxications alimentaires

2. Le lait en poudre

2.1. Définition

Les laits en poudre sont des produits résultant de l'élimination partielle de l'eau du lait et l'évaporation autant que possible de sorte que l'eau est perdue et le lait devient poudre (Arie et *al.*, 2011).

Selon la FAO (2008) et aux termes de la norme n° A5 (1971) du Code des principes, on distingue trois catégories de lait en poudre : entier, partiellement écrémé et totalement écrémé dont la composition de chacun est représentée dans le tableau 08. Selon cette norme, ces catégories de laits peuvent recevoir des additifs alimentaires (stabilisants, émulsifiants, antiagglomérants) dans certaines conditions (FAO, 2008)

Tableau 08 : Composition des trois différents types de laits en poudre en (%).
(FAO, 2008)

Composants	Lait en Poudre entier	Lait en poudre partiellement écrémé	Lait en poudre écrémé
Matières grasses	26 - 40	1,5 – 26	≤ 1,5
Eau maximum	5	5	5

2.2. Technologie de la poudre de lait

Après les traitements d'épuration, de standardisation, de pasteurisation ou de préchauffage à haute température du lait, on procède à deux étapes principales : la concentration et le séchage. La concentration se fait par évaporation et l'ébullition se fait sur une surface chaude.

Pour des raisons de qualité, on cherche à limiter la température du lait et à réduire son temps de séjour d'où le traitement sous vide et en film mince. Pour des raisons énergétiques, on utilise l'effet multiple, la compression mécanique des vapeurs et le préchauffage du liquide. Il est ainsi possible d'évaporer plusieurs kilogrammes d'eau avec l'énergie de vaporisation de 1 kg d'eau, alors que le séchage demande l'énergie de plus de 1 kg de vapeur pour sécher 1 kg d'eau. Il y a donc intérêt à concentrer au maximum avant de procéder au séchage Figure 02 (FAO, 2008).

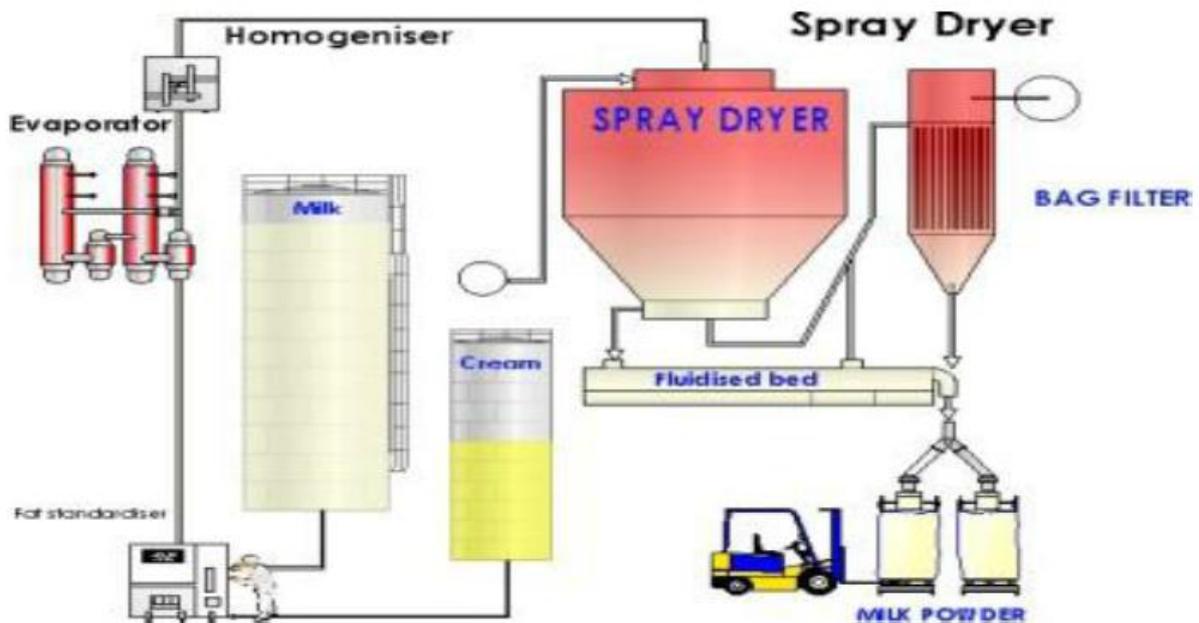


Figure 02 : cyclone des différentes étapes de la production de la poudre de lait.
(Soy, 2011).

2.3. La composition du lait en poudre

2.3.1. Les propriétés chimiques et physiques du lait en poudre

Les importants paramètres de qualité pour le lait en poudre sont constitués par la qualité microbiologique, les propriétés organoleptiques (AZZA et al., 2010) ainsi que les propriétés physico-chimiques suivantes :

- Teneur en eau
- Teneur en matière grasse
- Graisse libre
- Teneur en protéines
- Teneur en substances minérales
- Acide titrable
- Solubilité, reconstitution
- Aptitude à l'écoulement
- Densité apparente
- Charge thermique du lait écrémé en poudre (part de protéines sériques dénaturées)
- Particules brûlées
- Répartition de la grandeur des particules

- Oxygène résiduel dans l'emballage

2.3.2. La composition microbiologique du lait en poudre

Les propriétés microbiologiques des poudres dépendent essentiellement de la qualité initiale du produit et de la nature des opérations technologiques. Les différents traitements technologiques (traitement thermique, bactofugation, microfiltration) subits par le produit avant séchage conditionnent la qualité microbiologique de la poudre. Au cours du séchage, une partie de la flore initialement présente dans le produit est détruite, mais à un degré moindre que les traitements technologiques amonts cités précédemment, de plus une autre partie n'est qu'inactivée par le stress thermique (processus réversible à prendre en compte lors des dénombrements) (Jeant et *al.*, 2008).

La flore du lait en poudre est une flore composée surtout de microorganismes aisément thermorésistants. Les principaux genres sont les suivants :

- Microcoques thermorésistants fréquents dans les approvisionnements laitiers et difficiles à éliminer complètement du matériel et des installations laitières.
- Streptocoques thermorésistants qui prolifèrent quand l'hygiène de l'installation est non respectée et peuvent engendrer de graves infections.
- Corynébactéries dont la fréquence est très variable. Les souches thermorésistantes proviennent d'origines laitières et ne semblent pas dues à un manque d'efficacité dans le nettoyage des installations.
- Spores bactériennes telles que les spores de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* se trouvent dans presque toutes les poudres à moins que le lait ait été soumis à un traitement à très haute température.
- La flore peut comprendre aussi des microorganismes thermophiles à surveiller lorsque le lait en poudre est reconstitué.
- Des mésophiles qui peuvent provenir des contaminations atmosphériques ou d'un contact avec certaines surfaces de l'installation.
- Microorganismes pathogènes : le lait en poudre s'est toujours révélé exempt des pathogènes néanmoins au cours des années 1955 quelques épidémies d'intoxication alimentaires staphylococciques ont été imputées à un lait en poudre (Hobbs, 1955).

- **Les bactéries d'altération :**

La microflore du lait en poudre dépend de nombreux facteurs, notamment le nombre et le type de bactéries présentes dans le lait cru, la température de préchauffage, et les conditions de fonctionnement de l'évaporateur. Un grand nombre de micro-organismes dans le lait cru peut se retrouver dans le lait en poudre (Azza et *al.*, 2010).

- **Les bactéries pathogènes :**

Les bactéries pathogènes ont un intérêt majeur dans la poudre de lait, ils comprennent des *Salmonelles*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Et *Escherichia coli* alors que ces organismes ne se développent pas dans la poudre, ils restent nombreux pour de longues périodes de temps et peuvent se développer lorsque la poudre est reconstituée et conservée à température favorable (Azza et *al.*, 2010).

3. Le procédé de la pasteurisation du lait

La pasteurisation est un procédé qui consiste à chauffer les lait cru et reconstitué pendant quelques minutes ou secondes à une température entre 63 et 95° C, puis a les refroidir à 4°C de manière à détruire les germes nocifs qui pourraient être présents et réduire le nombre de microorganismes dangereux pour la santé (Ould Mustapha et *al.*,2012).

Pour que le lait soit pasteurisé, il doit être soumis :

- Soit à une température de 63° C pendant une durée de 30 minutes à basse température cette pasteurisation est presque abandonnée.
- Soit à une température de 85° C pendant une durée de 15-20 secondes (HTST/température moyenne).
- Soit encore instantanément à une température de 95° C HTST (haute température courte durée) (arrêté; 1993).

Ce type de pasteurisation haute température courte durée, est très répandu ces dernières années, où les deux préoccupations de sécurité alimentaire et le désir de prolonger la durée de conservation du lait liquide (Ranieri et *al.*, 2009).

Chapitre 2 :

Le groupe *Bacillus*

cereus

1. Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartenant à la famille des Bacillaceae est un genre bactérien particulièrement hétérogène. L'hétérogénéité extrême du genre est reflétée par la grande variété de places écologiques que les nombreuses espèces occupent et par l'extrême diversité de leurs statuts taxonomiques. Ce sont des bacilles à Gram positif, ou Gram variable, aérobies mais optionnellement aéro-anaérobies facultatifs (Jay et *al.*, 2005).

Ce sont des bactéries sporulées (Dromigny, 2008), caractérisées par une forme végétative mesurant entre 2 à 5 µm de long avec un diamètre compris entre 1 à 2 µm. La teneur en G + C de l'ADN des espèces varie de 32 à 69 %, ce qui est beaucoup plus large que ce qui est considéré comme raisonnable pour la définition d'un genre (TSCA, 1997).

2. L'espèce *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est une bactérie Gram-positif, anaérobie facultative formant une endospore. *B. cereus* est omniprésente dans le sol et dans de nombreux aliments crus et transformés tels que le riz, le lait et les produits laitiers, les épices et les légumes (Ynte et *al.*, 2000).

Bacillus cereus est une bactérie appartenant à la catégorie des Bacillaceae. Cette bactérie résiste à de hautes températures (plus de 100 C°), une des raisons pour laquelle elle est mise en cause dans de nombreuses intoxications alimentaires (Journal des Femmes Santé, 2018).

Les souches de *B. cereus* sont constituées de bacilles Gram positifs de 1,4 µm habituellement observés en paires ou en chaînettes courtes, mobiles, et ses colonies blanches d'aspect granuleux font entre 2 et 7 mm de diamètre, une croissance est observée à des températures se situant entre 10-20 C° et 35-45 C° la température optimale est d'environ 37C° (Murray et *al.*, 2007).

Bacillus cereus est responsable d'intoxications alimentaires spontanément résolutive (24-28heures) de deux types (syndrome diarrhéique et syndrome émétique) ainsi que d'infections opportunistes, elle est aussi associée à certaines cliniques comme l'ophtalmie et d'autres infections oculaires. (Le Scanff et *al.*, 2006).

La forme diarrhéique de l'intoxication à *B. cereus* est caractérisée par la présence de crampes abdominales, d'une diarrhée aqueuse profuse et d'un ténésme rectal parfois associés à de la fièvre et à des vomissements. (Rosovitz et *al.*, 1998).

La forme émétique de l'intoxication alimentaire à *B. cereus* est quant à elle caractérisée par la présence de nausées, de vomissements et d'une sensation de malaise parfois associés à une diarrhée. *B. cereus* peut être responsable d'infections des plaies, de bactériémies, de septicémies, de méningites, de pneumonies, d'infections du système nerveux central, d'endocardites, de péricardites, d'infections respiratoire et d'infections périphériques. Chez les patients immunodéprimés, l'infection peut être mortelle. Les souches de *B. cereus* qui possèdent des plasmides codant des facteurs de virulence semblables à ceux de *B. anthracis* peuvent être responsables de pneumonies graves (Drobniewski et al., 1993).

La forme diarrhéique de l'intoxication à *B. cereus* est associée à un délai d'apparition de 8 à 16 heures tandis que la forme émétique apparaît en 1 à 6 heures dans les deux cas, il y a habituellement résolution complète des symptômes en 24 heures (Logan et al., 2006).

3. Le groupe *Bacillus cereus*

L'expression « groupe *Bacillus cereus* » est en fait une nomenclature considérée comme empirique et non-taxonomique (Vilas-Boas et al., 2002), mais elle est de plus en plus utilisée par plusieurs auteurs (Rasko et al., 2005 ; Carlin et al., 2006 ; Guinebretiere et al., 2008).

Les espèces du groupe *Bacillus cereus* appartiennent au genre *Bacillus*. Ce groupe comprend six espèces génétiquement très proches formant des endospores (Rasko et al., 2005 ; Guinebretiere et al., 2008) correspondant à *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus weihenstephanensis*. Ce sont des bacilles assez volumineux, mesurant de 1 à 1,8 µm de diamètre par 4 à 8 µm de long, produisant habituellement des chaînes courtes. Les extrémités des cellules adjacentes des chaînes courtes sont à angles droit. En revanche, les extrémités libres des bacilles sont arrondies. (Dromigny, 2008).

Ce sont des bacilles à coloration de Gram positive, sporogènes, aéro-anaérobies facultatives, produisant une catalase et mobiles par ciliature péritriche sauf *B. anthracis* qui est immobile (Dromigny, 2008).

Malgré leur proximité génétique, les relations phylogénétiques et taxonomiques précises des membres du groupe *B. cereus*, restent encore controversées car les caractéristiques phénotypiques sont instables (Helgason et al., 2004 ; Van der Auwera et al., 2007). La classification des bactéries de ce groupe était initialement basée sur des caractères phénotypiques tels que la formation d'inclusions cristallines parasporales composées de

protéines insecticides chez *B. thuringiensis* et la présence de capsule chez *B. anthracis*. (Rasko et al., 2005).

À l'intérieur du groupe, trois bactéries, *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* ont une telle proximité génétique qu'elles sont considérées comme appartenant à une seule « espèce » dénommée *Bacillus cereus sensu lato* (Rasko et al., 2005).

En effet, les principales différences entre ces espèces sont basées sur leurs facteurs de virulence, codés par des gènes qui sont portés par des plasmides. En outre, certains de ces plasmides peuvent être échangés entre les membres du groupe *B. cereus* (Thomas et al., 2000 ; Van Der Auwera et al., 2007). Par conséquent, si une souche de *B. thuringiensis* perd ses plasmides, elle devient indiscernable de *B. cereus sensu stricto*.

Une division du groupe *B. cereus* en sept grands groupes phylogéniques (I-VII), basés sur les habitats, les limites de températures et les pouvoirs pathogènes a été proposée par (Guinebretiere et al., 2008). Dans cette classification, les espèces sont classées par profil thermique de croissance puis par leur cytotoxicité Tableau 09.

Tableau 09 : Nouvelle classification du groupe *Bacillus cereus* (Guinebretiere et al., 2008).

Groupes phylogéniques	Espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i>	Profils thermiques de croissances	Cytotoxicité
Groupe I	<i>B. pseudomycooides</i>	Mésophiles (de 10 à 43 °C)	Aucune observée
Groupe II	<i>B. cereus II</i> <i>B. thuringiensis II</i>	Psychrotolérantes (de 7 à 40 °C)	Toxines diarrhéiques
Groupe III	<i>B. cereus III</i> <i>B. thuringiensis III</i> <i>B. anthracis</i>	Mésophiles (de 15 à 45 °C)	Toxines diarrhéiques et émétiques Anthrax
Groupe IV	<i>B. cereus IV</i> <i>B. thuringiensis IV</i>	Mésophiles (de 10 à 45 °C)	Toxines diarrhéiques
Groupe V	<i>B. cereus V</i> <i>B. thuringiensis V</i>	Mésophiles intermédiaires (de 8 à 40 °C)	Toxines diarrhéiques
Groupe VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycooides</i> ,	Psychrotolérantes (de 5 à 37 °C)	Aucune observée
Groupe VII	<i>B. thuringiensis VI</i> <i>B. cytotoxicus</i>	Thermotolérantes (de 20 à 50 °C)	Toxines diarrhéiques

3.1. *Bacillus anthracis*

Sur le plan de l'étymologie, l'espèce *anthracis* vient du grec anthrax (le charbon) à cause de la maladie du charbon et des lésions noirâtres qu'elle provoque (Dromigny, 2008). *Bacillus anthracis* se distingue des autres membres du groupe *B. cereus* par son absence de mobilité, sa production de capsule, sa sensibilité à la pénicilline et son absence d'activité hémolytique (Vilas-Boas et al., 2007). Les spores de *B. anthracis* sont très résistantes aux conditions environnementales défavorables et sont capables de survivre dans les sols contaminés pendant de longues périodes (Mock et Fouet, 2001). Cet agent pathogène est responsable de l'anthrax, la maladie du charbon qui affecte les animaux, particulièrement les herbivores mais aussi les humains. La maladie se présente sous trois formes distinctes : pulmonaire, gastro-intestinale et cutanée. (Spencer, 2003).

3.2. *Bacillus cereus sensu stricto*

Le mot *ceruus* vient de l'adjectif latin *ceruus* (qui ressemble à la cire) à cause de la morphologie des colonies de *Bacillus cereus sensu stricto* formées sur les géloses. Les spores de *B. cereus sensu stricto* sont très résistantes aux conditions défavorables telles que la chaleur, la déshydratation, le dessèchement, ainsi qu'aux désinfectants et agents de nettoyage. Elles sont hautement hydrophobes, adhèrent facilement aux équipements et sont difficiles à éliminer. En plus de l'hydrophobicité, la présence d'exosporium et d'appendices de 0,45 à 3,8 µm en longueur contribueraient à la persistance des spores sur les équipements de traitement des denrées alimentaires et également à la formation de biofilm (Granum, 2007 ; Ankolekar et Labbé, 2010).

Bacillus cereus sensu stricto est un pathogène opportuniste pour les humains et les animaux. Il est responsable d'infections et surtout de toxi-infections alimentaires décrites chez l'homme et les animaux (Granum, 2007 ; Ankolekar et Labbé, 2010).

3.3. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis est une bactérie ubiquiste, d'origines diverses telles que le sol, les insectes, les excréments d'animaux végétariens, les produits végétaux entreposés ainsi que les habitats aquatiques (Dromigny, 2008). C'est un agent pathogène des insectes. L'énorme succès biotechnologique de ce pathogène réside dans sa capacité à produire des inclusions cristallines protéiques (δ -endotoxines) nommées « protéine Cry », au cours de la sporulation qui sont utilisées comme pesticides biologiques et du développement des plantes résistantes

aux insectes transgéniques (Bravo *et al.*, 2007 ; Sauka et Benintende, 2008).

B. thuringiensis possède des similarités phénotypiques avec *B. cereus sensu stricto* incluant la mobilité, l'activité hémolytique, la résistance à l'ampicilline. La seule caractéristique qui permet de différencier ces deux espèces est la présence d'inclusions cristallines protéiques chez *B. thuringiensis*. Compte tenu de la similarité taxonomique de *B. thuringiensis* et de *B. cereus sensu stricto*, certaines infections alimentaires généralement attribuées à *B. cereus sensu stricto* auraient pu être causées par *B. thuringiensis* (Rosenquist *et al.*, 2005). Des toxi-infections occasionnelles impliquant *B. thuringiensis* ont par ailleurs été rapportées (Jackson *et al.*, 1995).

3.4. *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides*

Pour *Bacillus mycoides*, mukes signifie en grec un champignon et oides la forme. Cette nomenclature fait référence à l'aspect des colonies. *Bacillus pseudomycoides* est une bactérie proche de *Bacillus mycoides* (un « faux » mycoides). Sa nomenclature a été validée par (Nakamura, 1998). Ces deux bactéries se distinguent des autres membres du groupe par l'aspect particulier de leurs colonies rhizoïdes sur le milieu nutritif solide (Nakamura, 1998). Elles peuvent être isolées à partir du sol, de la boue et des rhizosphères. Elles se différencient de *B. cereus sensu stricto* par l'apparence rhizoïde de leurs colonies et par leur composition en acides gras. Cependant, des souches de *B. mycoides* ne présentant pas des colonies rhizoïdes ont été identifiées (Jensen *et al.*, 2003). Contrairement à la plupart des membres du groupe *B. cereus*, *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* ne sont jusqu'à présent pas encore reconnus comme des agents pathogènes pour l'homme (Guinebretiere *et al.*, 2008).

3.5. *Bacillus weihenstephanensis*

L'espèce *B. weihenstephanensis* fait référence à Freising-Weihenstephan, une ville allemande. Sa nomenclature a été validée en 1998 (Lechner *et al.*, 1998). *Bacillus weihenstephanensis* est psychrotolérante. Plusieurs études concernant les souches psychrotolérantes du groupe *B. cereus* ont été rapportées (Pacova *et al.*, 2003). L'espèce *B. weihenstephanensis* a été initialement proposée par Lechner *et al.* (1998) pour désigner des souches du groupe *B. cereus*, capables de se développer entre 4 et 7 °C mais pas à 43 °C.

Malgré ces différences, l'existence d'une espèce distincte de *B. weihenstephanensis* est controversée. Guinebretiere *et al.* (2008) ont montré que les espèces du groupe *B. cereus* peuvent être subdivisées en sept grands groupes génétiques (I à VII) sur la base de limites de température. Ainsi, les souches psychrotolérantes sont réparties en deux différents groupes (II

et VI) selon ces auteurs. Cette division montre que toutes les souches de *B. weihenstephanensis* sont psychrotolérantes, mais toutes les souches psychrotolérantes du groupe *B. cereus* ne sont pas nécessairement des *B. weihenstephanensis* (Stenfors et Granum, 2001). Cette distinction soulève une question de discrimination des deux types de psychrotolérants. *B. weihenstephanensis* n'a pas encore été détectée dans des denrées impliquées dans une toxi-infection alimentaire, malgré son isolement à partir de différents produits alimentaires (Carlin et al., 2009). Ce constat n'est cependant pas le cas des psychrotolérants du groupe II. La structure génétique du groupe *B. cereus* regroupe donc au sein d'un même groupe phylogénétique, des souches appartenant à des espèces différentes mais partageant le même domaine de température de croissance (Guinebretiere et al., 2008).

4. Écologie du groupe *Bacillus cereus*

4.1. Réservoir primaire (le sol)

Le sol est considéré comme le réservoir primaire du groupe *Bacillus cereus* (Vilain et al., 2006). Un gramme de sol peut contenir de 10^3 à 10^5 spores d'espèces du groupe *B. cereus* (Christiansson et al., 1999 ; Guinebretiere et Nguyen-the, 2003). Selon (Vilain et al., 2006). Le groupe *B. cereus* est capable de se développer et d'avoir un cycle de vie dans le sol. Il est largement distribué dans l'environnement et possède plusieurs habitats. Outre le sol, les intestins des insectes, des invertébrés et des rongeurs pourraient également constituer des niches naturelles du groupe *B. cereus* (Margulis et al., 1998 ; Jensen et al., 2003 ; Swiecicka et al., 2006).

Les espèces du groupe *B. cereus* sont très répandues dans la nature et sont notamment retrouvées dans les fourrages pour animaux (Vaerewijck et al., 2001 ; Magnusson, 2007) et dans les fèces des bovins (Slaghuis et al., 1997).

4.2. Réservoirs secondaires (les aliments)

Le groupe *Bacillus cereus* peut être considéré comme un indicateur d'une contamination tellurique ou environnementale non maîtrisée par les traitements technologiques. Les contaminations des aliments par le groupe *B. cereus* sont associées à diverses sources en amont, en particulier l'environnement agricole et l'environnement industriel (Carlin, 2011). La présence du groupe *B. cereus* dans ces environnements entraîne ensuite la contamination des matières premières (Guinebretiere et al., 2003) et des trayons des vaches laitières contaminant eux-mêmes le lait cru (Vissers et al., 2007). Par sa capacité d'adhésion et de

résistance, le groupe *Bacillus cereus* est capable de contaminer et de persister dans l'environnement agroalimentaire (Dromigny, 2008). Il produit des spores thermorésistantes qui survivent aux opérations de chauffage (pasteurisation) ou de déshydratation dans l'industrie alimentaire. En raison de son caractère hydrophobe, il peut former ou initier des biofilms durant les étapes du processus et se retrouver dans des équipements industriels, tout au long de la chaîne de fabrication et dans des échangeurs de chaleur (Scheldeman et al., 2005 ; Oomes et al., 2007; Scott et al., 2007). Les emballages, l'air et l'eau sont également considérés comme d'éventuelles sources de contamination et de ré-contamination par le groupe *B. cereus* après pasteurisation (Eneroth et al., 1998; Pirttijarvi et al., 2000). Certaines souches du groupe *B. cereus* (psychrotrophes) sont capables de croître à des températures basses allant de 10 à 4 °C. Une conservation prolongée au réfrigérateur de produits et denrées traités par la chaleur entraîne en outre, une croissance spécifique des souches psychrotolérantes. D'autres souches thermorésistantes peuvent se développer à des températures aussi élevées que 55 °C et se multiplier rapidement au cours du refroidissement des aliments traités thermiquement. Par conséquent, les denrées alimentaires chauffées telles que les produits laitiers pasteurisés, les plats de riz chinois et les REPFED's (Refrigerated Processed Foods of Extended Durability) dont font partie les préparations réfrigérées précuites et les repas prêts à consommer (Wijnands et al., 2006), les produits déshydratés tels que l'alimentation pour nourrissons, les épices et aromates, les soupes et champignons déshydratés, le riz, les céréales et les pâtes de même que les soupes, les oeufs, l'attiéké, les ingrédients, les fruits et légumes préemballés, dont les graines germées, constituent des produits à haut risque (Guinebretiere et Sanchis, 2003; Iurlina et al., 2006 ; Reyes et al., 2007 ; Witkowska et al., 2011 ; Kouamé et al., 2012). En somme, le groupe *B. cereus* est ubiquiste du sol et leur présence dans la plupart des aliments crus apparaît comme inévitable, ce qui complexifie l'identification du ou des cycles de contamination du groupe *B. cereus*.

5. La sporulation

La sporulation est un processus naturel dans le cycle de croissance de certains groupes de bactéries telles que les espèces de *Bacillus* (Ponce et al., 2008). C'est un mécanisme de survie, généralement considéré comme un processus qui se produit lorsque l'organisme est en situation de stress (Barill et al., 2012). Dans l'environnement des produits laitiers, les bacilles thermophiles forment les endospore facilement dans les produits, mais les facteurs qui contribuent à ce processus ne sont pas clairement compris (Nazina et al., 2001; Augustin., 2010; Burgess et al., 2009). La plupart des travaux effectués sur les spores ont porté sur les

spores des bacilles mésophiles, *B. cereus* et *B. subtilis*. La structure, la sporulation et le processus de germination, ainsi que les mécanismes de résistance des spores, sont supposés être similaires à ceux des bacilles thermophiles (Ponce et *al.*, 2008).

Les spores sont constituées d'un noyau, qui contient des matières nucléaires, entouré par la membrane corticale et le cortex, qui est à son tour enfermé dans le manteau des spores (Ponce et *al.*, 2008).



Figure 03 : Cliché au microscope électronique d'un sporange et spore en formation (Garcia et Coll., 1982).

Bacillus cereus peut produire des spores dans des conditions appropriées, résultant en une résistance considérablement améliorée aux stress environnementaux tels que la chaleur, le rayonnement, la dessiccation, le pH extrême et les produits chimiques toxiques.

6. La formation de biofilm

Dans la nature, la plupart des microorganismes vivent au sein de communautés microbiennes appelées biofilms. Les biofilms sont constitués de microorganismes adhérents à une surface inerte ou vivante (Costeron et *al.*, 1995), on parle alors de communautés microbiennes fixées ou biofilm. Ces microorganismes sont incorporés dans une matrice organique généralement constituée de polymère extracellulaire ou EPS (Extrapolyméric Substance) synthétisé par ces mêmes microorganismes. Les polymères extracellulaires contiennent en majorités des polysaccharides macromoléculaires et en moindre mesure des protéines des lipides et des acides nucléiques (Myszka et *al.*, 2011).

Un biofilm bactérien peut être constitué d'une seule espèce bactérienne ou de différentes espèces bactériennes ainsi que des champignons, des algues et des protozoaires (O'Toole et *al.*, 2000).

Le développement des biofilms se produit généralement suivant un certain nombre d'étapes comme le montre la figure 05. Après l'adhésion et la production d'EPS, les microcolonies se développent, par la multiplication et l'empilement des cellules bactériennes et production de la matrice. Des canaux d'eau peuvent se développer dans la matrice des EPS pour permettre les échanges de gaz et la circulation des éléments nutritifs et des déchets. Cette matrice fournit également une source de nutriments pour les cellules bactériennes. Le processus de formation des biofilms diffère selon les espèces et l'environnement. Dans certains cas, les conditions environnementales peuvent ne pas permettre aux cellules de former des microcolonies et des structures de multicouches (Costerton et *al.*, 1995; Flint et *al.*, 2001; Parot., 2007).

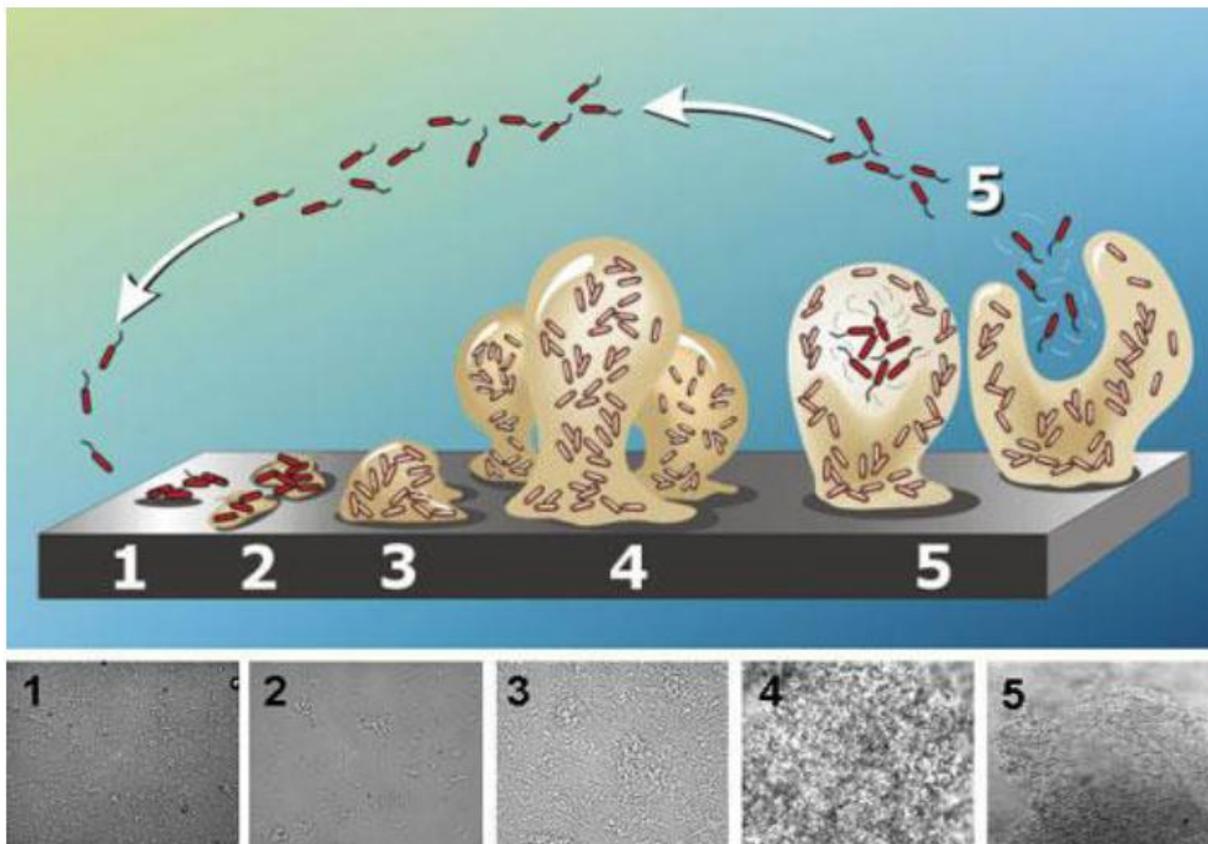


Figure 04 : Les étapes de formation de biofilm (Davies et *al.*, 2001).

(1) Attachement réversible des bactéries, (2) Adhésion irréversible, (3) formation des microcolonies et production d'EPS, (4) Maturation du biofilm, (5) Détachement et dispersion du biofilm.

Chapitre 3 :

Contamination du lait
par des espèces du
groupe *Bacillus cereus*

1. Contamination du lait

Le lait est un aliment qui favorise la prolifération des bactéries en tant que milieu alimentaire entier, considéré comme étant sensible aux bactéries dangereuses tel que les bactéries du groupe *Bacillus cereus* surtout qu'elles ont un l'avantage d'échapper au traitement thermique de pasteurisation du lait par leur pouvoir de sporulation.

La contamination du lait par des bactéries pathogènes a plusieurs origines. Le lait peut être contaminé immédiatement après la traite (matière première) par le sol ou par l'air environnant et lors d'un processus industriel long et complexe dans les usines (matériels, environnement, ...etc.) (Cherif Antar A., 2015).

2. Risques de maladies infectieuses inhérentes à la consommation du lait

Le lait n'est pas une sécrétion entièrement stérile. Dès que le lait est stocké, le risque de prolifération microbienne augmente et ce d'autant plus qu'une contamination peut survenir au cours d'un processus industriel long et complexe. Un dérapage et un pullulement de souches pathogènes sont possibles dans ces circonstances (AFSCA, 2011).

De nombreux pathogènes pour l'homme, dont *Bacillus cereus* producteurs d'entérotoxines peuvent être retrouvés dans le lait des bovins. La prévalence de ces agents dans le lait de bovins varie, mais leur présence a été démontrée dans beaucoup d'études. Dans les pays industrialisés, les épidémies humaines dues à la consommation de lait ou de produits à base de lait représentent 2 à 6 % des épidémies humaines d'origine alimentaire.

Le risque lié à la consommation de lait est considérablement réduit voire éliminé par le traitement thermique du lait. La pasteurisation (71°C/15 s ou 63°C/30 min, ou équivalent) réduit les pathogènes présents sous forme végétative dans le lait jusqu'à un niveau considéré comme sûr pour la santé publique. Cependant, la pasteurisation est incapable de détruire les spores de *Bacillus cereus* et, le choc thermique peut provoquer leur germination. La stérilisation et le traitement UHT du lait détruisent les formes végétatives des agents pathogènes ainsi que leurs formes sporulées, et un produit commercialement stérile est fourni (AFSCA, 2011).

3. Voies de contamination du lait

Les espèces du groupe *Bacillus cereus* sont ubiquitaires, largement répandues dans l'environnement et particulièrement dans le sol. Celui-ci pouvant être contaminé à hauteur de 10^3 à 10^5 spores de *B. cereus* par gramme. Par conséquent, on retrouve les spores de *Bacillus cereus* dans une grande variété d'aliments crus et d'ingrédients parmi lesquels le lait, les légumes, les céréales et la farine, les épices et les herbes, les agents texturants, les œufs liquides...

La contamination des aliments peut aussi se produire pendant leur transformation du fait de la persistance des spores sur les surfaces (équipements) et leurs propriétés de forte adhérence (biofilms). (INRS – Fiches zoonoses – Charbon).

Les principaux réservoirs pour *B. anthracis* sont le sol et la végétation. Les animaux herbivores tels que les bovins et les moutons peuvent donc être contaminés par ingestion ou inhalation (pâturage, eau, foin, paille, ensilage contaminés par les spores).

Les portes d'entrée de l'infection sont des contaminations de plaie ou de cathéter ou encore *via* les injections pratiquées par les toxicomanes. (Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp* in foodstuffs. (EFSA Journal (2005) 175, 1-48).

4. Pathologies liées à quelques espèces du groupe *Bacillus cereus*

Très largement répandu dans la nature, certaines espèces du groupe *B. cereus* se comportent comme des pathogènes opportunistes responsables d'infections systémiques et locales. Elles sont également responsables de toxi-infections alimentaires (EFSA, 2005).

4.1. Atteintes non gastro-intestinales

Des infections non gastro-intestinales causées par les espèces du groupe *B. cereus* ont été rapportées avec une fréquence en augmentation, peut-être en raison d'une conscience croissante du potentiel pathogène de ces microorganismes. Le groupe *B. cereus* a été identifié comme agent de cas graves de septicémies, d'endocardites, de pneumonies, d'infections cutanées, d'infections orthopédiques, de méningites et d'infections de blessures traumatiques, en majorité chez des individus immunodéprimés. *B. cereus sensu stricto* peut être responsable, bien que rarement, de mammites chez les bovins et d'avortements chez les bovins et ovins (EFSA, 2005).

4.2. Toxi-infections alimentaires

Une toxi-infection est par définition une maladie causée par l'ingestion d'aliments contaminés par certains agents infectieux ou d'aliments dans lesquels la toxine est préformée. Dans les cas d'intoxication, la pathologie n'est pas due à la prolifération d'un microorganisme dans l'aliment mais à l'ingestion d'une toxine sécrétée par la bactérie et préformée dans l'aliment avant son ingestion

Les toxi-infections alimentaires liées aux espèces du groupe *B. cereus* sont le plus souvent associées à une population égale ou supérieure à 10^5 à 10^8 UFC/g ou UFC/L d'aliments consommés, bien que des épidémies associées à des aliments contenant 10^3 UFC/g aient été décrites (Arnesen et al., 2008). Toutes les souches du groupe *B. cereus* n'ont pas la même capacité à provoquer des symptômes diarrhéiques, certaines étant même utilisées comme probiotiques (Hoa et al., 2000, Kniehl et al., 2003)

4.2.1. Syndrome émétique

Le syndrome émétique est généralement associé à la consommation d'aliments farineux tels que les nouilles, les pâtes, le riz ainsi que les préparations à base de riz. Il est caractérisé par des nausées et des vomissements, qui se manifestent entre 1 à 5 h après ingestion de l'aliment contaminé (EFSA, 2005). La rapidité de l'apparition des symptômes suggère que la toxine est préformée dans l'aliment (Agata et al., 2002 ; Ehling-Schulz et al., 2004) L'agent responsable du syndrome émétique est un petit dodecadepsipeptide cyclique : le céréulide. La dose de céréulide suffisante pour provoquer des symptômes émétiques serait de l'ordre de 5 à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masse corporelle (EFSA, 2005).

4.2.2. Syndrome diarrhéique

Le syndrome diarrhéique est la forme la plus anciennement diagnostiquée des infections provoquées par les espèces du groupe *B. cereus*. C'est en 1950 que *B. cereus* a véritablement été associé pour la première fois à une intoxication alimentaire de type diarrhéique (Dromigny, 2008). Le syndrome diarrhéique est caractérisé par des douleurs abdominales, une diarrhée et occasionnellement des nausées et vomissements. Le syndrome diarrhéique dû au groupe *B. cereus* rappelle les accidents dus à *Clostridium perfringens*. Les symptômes apparaissent 8 à 16 heures après l'ingestion d'aliments contenant un nombre élevé de *B. cereus*, environ 10^5 à 10^9 cellules/spores par gramme d'aliment. Les symptômes disparaissent en moins de 24 à 48 heures (Dromigny, 2008).

Quatre entérotoxines sont proposées comme étant la cause des symptômes diarrhéiques : HBL et NHE qui sont des entérotoxines à trois composantes, BceT et CytK qui sont des protéines cytotoxiques (Michelet et Mahillon, 2003; Granum, 2007).

5. Surveillance des bactéries du groupe *Bacillus cereus* dans les aliments

Les espèces du groupe *B. cereus* sont ubiquistes du sol et de l'environnement. Par conséquent leur présence dans les aliments est inévitable. Les traitements par la chaleur, à l'exception de l'appertisation, n'éliminent pas les spores dans les denrées alimentaires. Les spores sont présentes dans quasiment toutes les catégories d'aliments avant leur conservation, généralement en nombre trop peu élevé pour causer une toxi-infection alimentaire (TIA). Les risques pour la santé humaine pourraient provenir de contaminations initiales anormalement élevées. Cependant, ils sont dus le plus souvent à la multiplication de ce groupe de bactéries lors de l'exposition des aliments à des températures inappropriées. Elles peuvent se développer dans la plupart des aliments, entre 4 et 48 °C (55 °C pour quelques souches) dès que le pH et l'activité de l'eau (aw) sont favorables à leur croissance. Les mesures majeures de contrôle sont la maîtrise de la température et la mise en place d'un plan HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Point). Une combinaison appropriée de la température et de la durée de conservation doit permettre de prévenir la croissance des bactéries du groupe *B. cereus* jusqu'à des charges ne dépassant pas les limites acceptables au stade de la consommation où la production de la toxine émétique n'est pas possible. Ceci devrait être vérifié par des analyses microbiologiques (Communauté Européenne, 2007).

Les espèces du groupe *B. cereus* ne font pas l'objet de critères de sécurité des aliments selon la réglementation européenne. Toutefois, le règlement (CE) N° 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) N° 2073/2005 du 5 décembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, définit un critère d'hygiène des procédés pour les « présomptions de *B. cereus* » dans le cas des préparations en poudre pour nourrissons et pour les aliments diététiques en poudre destinés à des utilisations médicales spécifiques pour nourrissons âgés de plus de six mois (Communauté Européenne, 2007).

II. Matériel et méthodes

1. Présentation du lieu de travail

Notre travail pratique a été réalisé au niveau d'une unité de production de lait locale « GIPLAIT » Ex « ONALAIT » située à Chaabet Ersas, dans laquelle nous avons effectué des prélèvements d'échantillons : de lait de vache pasteurisé et de lait reconstitué pasteurisé. L'ensemble des analyses microbiologiques (isolement, purification, identification) a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie de la laiterie et de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université des frères Mentouri- Constantine 1.

L'objectif principal assigné à ce travail consiste à évaluer le niveau ou le degré de contamination de lait de vache et de lait reconstitué pasteurisés produits localement par les membres du groupe *Bacillus cereus*.

2. Prélèvements des échantillons

Au total huit prélèvements ont été réalisés, à différents niveaux, tout le long de la chaîne de production des deux types de laits (lait de vache et lait reconstitué) pasteurisés comme suit :

- lait de vache

Premier prélèvement : Citerne de collecte (avant pasteurisation).

Deuxième prélèvement : sortie pasteurisation.

Troisième prélèvement : Tanks (après pasteurisation).

Quatrième prélèvement : Lait de vache pasteurisé conditionné (Produit fini).

- lait reconstitué pasteurisé

Premier prélèvement : Poudre de lait (poudre à 0% MG + poudre à 26% MG).

Deuxième prélèvement : Mélange poudre de lait + eau (avant pasteurisation).

Troisième prélèvement : Lait reconstitué (après pasteurisation).

Quatrième prélèvement : Lait reconstitué pasteurisé conditionné (Produit fini).

Les échantillons de lait de vache et de lait reconstitué pasteurisé sont prélevés à l'aide de tubes stériles. Ceux de la poudre de lait sont prélevés en utilisant des sacs stériles. Les prélèvements gardés à 4°C sont acheminés directement au laboratoire où ils sont analysés immédiatement dès leur réception.

3. Traitement des échantillons

3.1. Préparation des solutions mères

3.1.1. La solution mère de la poudre de lait

Aseptiquement, 5g de poudre de lait est posé dans un flacon qui contient 45 ml d'eau peptoné, maître le mélange pendant 24 heures à 37°C.

3.1.2. La solution mère du lait de vache et du lait reconstitué pasteurisé

Pour le lait de vache : C'est le lait de vache cru qui vient des fermes dans des citernes de collectes.

Pour le lait reconstitué pasteurisé : C'est le mélange qui prépare dans des grandes tanks qui constitué de l'eau + (la poudre MG 0% et la poudre MG 26%).

3.2. 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} (JORA, 2004).

4. Isolement des bactéries du groupe *Bacillus cereus*

L'isolement des bactéries du groupe *Bacillus cereus* à partir des échantillons de laits est réalisé par ensemencement de 0,1ml de la solution mère ou de ses dilutions, en surface, sur milieu PCA préalablement coulé sur boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées en aérobiose pendant 48 à 72 heures à 30°C.

5. Purification

Après incubation, l'aspect des colonies ayant poussés sur les milieux de cultures est examiné. Selon la nécessité (si les boîtes contiennent plusieurs types de colonies), on procède à la purification des souches en réalisant des repiquages successifs sur le même milieu d'isolement. L'opération est renouvelée jusqu'à ce qu'on s'assure de la pureté des souches, estimée par observation microscopique après coloration de Gram.

6. Identification des isolats

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

6.1. Caractérisation morphologique

6.1.1. Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies (aspect, forme, couleur, taille...) est déterminé après incubation à 30° C, des isolats cultivés sur milieu solide PCA (Plate Count Agar) pendant 48 à 72 heures.

- **La taille :** Elle est 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 : en comparant la taille de la colonie et le diamètre du champ, on aura une idée plus précise de la taille des petites colonies.
- **La forme :** bombée, ronde, plate, ombiliquée, à centre surélevé, à bords dentelés, en étoile.
- **L'aspect de la surface :** Il est bien observé par transillumination oblique. Il peut être lisse, rugueux, ...etc.
- **L'opacité :** Les colonies sont décrites comme opaques (ne laissent pas passer la lumière), translucides ou transparentes.
- **La consistance :** Il s'agit d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses, sèches ou encore muqueuses.
- **La couleur (pigmentation) :** Les colonies sont habituellement de couleur crème. Une couleur différente est due à des pigments (microbiologie Oran IGMO : Etude macroscopique et microscopique).

6.1.2. Aspect microscopique

La morphologie, l'arrangement des cellules, le type pariétale des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par une coloration de Gram à l'aide d'un microscope optique (microbiologie Oran IGMO : Etude macroscopique et microscopique).

➤ **Coloration de Gram**

Par la coloration différentiel de Gram, les bactéries Gram positive sont colorées en violet, les bactéries Gram négatives sont colorées en rose, ceci est due à une différence de composition de la paroi effectuée à partir d'un frottis ou d'un étalement.

Les colonies obtenues sur milieu gélosé PCA sont soumises à une coloration de Gram, à fin de déterminer la forme des cellules (coques et bacilles), leur arrangement et leur Gram (Guiraud, 2003).

➤ **Coloration de la spore**

Les spores des bactéries isolées sont visualisées suite à une observation microscopique à l'immersion après coloration de Gram. 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 Camille., 2014).

6.2. Caractérisation biochimique des isolats

6.2.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires

➤ **Catalase**

• **Principe**

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir de l' H₂O₂ une libération d'oxygène gazeux selon la réaction :



• **Technique**

La présence de la catalase est mise en évidence en déposant, à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur, une quantité suffisante de la culture sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.

• **Lecture**

La présence d'une catalase se traduit, instantanément, par la formation de bulles d'oxygène (Gerhardt et *al.*, 1994).

➤ **Oxydase**

- **Principe**

Le test d'oxydase est basé sur la production de l'enzyme indophénol-oxydase par les organismes possédant le cytochrome *C*. Cette enzyme, en présence de l'oxygène atmosphérique, oxyde un colorant redox (Dihydrochlorure de Tétraméthyle para phénylène diamine) pour former un composé violet (Kohler et *al.*, 2009).

- **Technique**

A partir d'une culture jeune ensemencée sur PCA, une colonie est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur (Aslanzadeh, 2006) puis mise en contact avec un disque d'oxydase.

- **Lecture**

Un virage de la couleur en violet indique la présence de l'enzyme oxydase chez la bactérie.

6.2.2. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité

- **Principe**

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité.

- **Technique**

Les souches étudiées sont ensemencées sur le milieu semi-solide mannitol-mobilité par piqûre centrale, et incubées à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 18 à 24h.

- **Lecture**

Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol (Gerhard et *al.*, 1994), une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (Marchal et *al.*, 1991).

6.2.3. Utilisation du citrate sur le milieu citrate de Simmons

- **Principe**

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone : le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu.

- **Technique**

La pente du milieu est ensemencée par une strie longitudinale et incubé à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 5 jours.

- **Lecture**

- ✓ Une Citrate-positive se traduit par une culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).

- ✓ Une Citrate-négative se traduit par une absence de culture (coloration, verte, du milieu inchangée) (Marchal et *al.*, 1991).

6.2.4. Utilisation des sucres (Glucose, Lactose, Saccharose)

- **Principe**

Ce test permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose, du saccharose et d'autre part, la production d'hydrogène sulfureux (H₂S) sur milieu gélosé le TSI (Triple Sugar Iron agar).

- **Technique**

A l'aide d'une anse contenant des colonies prélevées, on ensemence la pente puis le culot d'un tube contenant le milieu TSI par piqûre centrale. L'incubation est faite à 37°C±1°C pendant 48 à 72h.

- **Lecture**

- ✓ Une coloration jaune de la pente indique un résultat positif pour le lactose (utilisation du lactose).

- ✓ Une coloration jaune du Culot montre que la bactérie utilise le glucose.

- ✓ Une coloration jaune de la zone intermédiaire indique l'utilisation du saccharose.

La production d' H₂S se traduit par un noircissement de la zone joignant la pente et le culot et celle de gaz CO₂ ou H₂ par des bulles dans la gélose (Marchal et *al.*, 1991).

6.2.5. Production d'indole

- **Principe**

Certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole. La présence de ce dernier (l'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 24 heures 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.

6.2.6. Recherche de l'enzyme 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 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**

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

7. Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires

7.1. Activité amylolytique

La mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon est réalisée par l'ensemencement des souches par une strie médiane sur gélose à l'amidon. Après incubation à 37°C, des observations régulières sont effectuées chaque 24 heures pendant 72 heures en recouvrant la gélose par une solution de lugol. L'absence de coloration autour de la culture indique la dégradation de l'amidon alors que les zones contenant l'amidon se colorent en brun (De vos et *al.*, 2009).

7.2. Activité protéolytique (Hydrolyse de la caséine)

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur gélose au lait. Les souches isolées sont ensemencées par strie médiane sur la gélose, puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Les résultats sont appréciés quotidiennement durant 72 heures. L'apparition d'une auréole claire autour de la culture indique la dégradation de la caséine (De vos et *al.*, 2009).

7.3. Activité hémolytique

L'hémolyse se réfère à la répartition des érythrocytes ou globules rouges. En microbiologie, des bactéries peuvent être classées en fonction de leur capacité à induire une

hémolyse sur un milieu de gélose au sang. Trois types d'hémolyse peuvent se produire et sont classés comme alpha, bêta et gamma hémolyse. Chaque type est caractérisé par les caractéristiques physiques et les différentiels des degrés variables de la lyse des cellules du sang du fait des hémolysines spécifiques, ou des produits chimiques qui provoquent une hémolyse, sécrétées par les bactéries particulières (Health Savety. Les trois types d'hémolyse possible sur moutons gélose au sang).

L'opération consiste a ajouté stérilement 2.5 ml du sang frais dans un flacon de 250 ml de la gélose au sang à 45 °C, les bactéries du groupe *Bacillus cereus* sontensemencées et incubées en aérobiose pendant 24 heures à 30 °C.

8. la croissance à 7 °C

Inoculer une gélose PCA par les souches isolées et incubé dans une étuve réglée à 7°C pendant 7 jours (Jenson, 2014).

III. Résultats et Discussion

1. Résultats

1.1. L'isolement

Au total 7 souches ont été isolées à partir des échantillons de laits prélevés. L'origine des souches isolées à part est mentionnée dans le tableau 10 ci-dessous :

Tableau 10 : Résultat relatifs à l'origine des souches isolées.

Produit laitier	Site de prélèvement	Nombre de souches isolées à 30°C	Code
Lait reconstitué	Poudre de lait (poudre à 0% MG + poudre à 26% MG).	3	A B C
	Mélange poudre de lait + eau (avant pasteurisation).	1	D
	Lait reconstitué (après pasteurisation).	0	
	Lait reconstitué pasteurisé conditionné (Produit fini).	0	
Lait de vache	Citerne de collecte (avant pasteurisation).	2	E F
	Sortie pasteurisation	0	
	Tanks (après pasteurisation).	1	G
	Lait de vache pasteurisé conditionné (Produit fini).	0	

1.2. L'identification

1.2.1. Caractérisation morphologique

- **Aspect macroscopique :**

Les colonies bactériennes isolées sur gélose PCA après incubation de 48 à 72 heures à 30°C présentent les caractères cultureux mentionnés dans le tableau 11.

Colonie de type A : colonie d'une grande taille, circulaire, élevée, bords dentelé, crémeuse de couleur beige, opaque.

Colonie de type B : colonie d'une taille moyenne, circulaire, élevée, bords régulier, crémeuse, couleur beige, opaque.

Colonie e type C : colonie d'une grande taille, circulaire, élevée, visqueuse, de couleur beige, bords dentelé, opaque.

Colonie de type D : colonie d'une grande taille, circulaire, élevée, bords dentelés, crémeuse de couleur beige, opaque.

Colonie de type E : colonie d'une taille moyenne, circulaire, élevée, bords dentelé, crémeuse de couleur beige, opaque.

Colonie de type F : colonie d'une grande taille, circulaire, élevée, bords régulier, crémeuse de couleur beige, opaque.

Colonie de type G : colonie d'une taille moyenne, circulaire, bombée, bords régulier, visqueuse, de couleur beige, opaque.

Tableau 11 : Aspect morphologique des colonies isolées sur PCA après incubation
de 48 à 72 heures à 30°C

Souche	Taille	Forme	Élévation	Bords	Opacité	Consistance	couleur
A	10 mm	Circulaire	Elevée	Dentelée	Opaque	Crémeuse	Beige
B	04 mm	Circulaire	Elevée	Réguliers	Opaque	Crémeuse	Beige
C	09mm	Circulaire	Elevée	Dentelés	Opaque	Crémeuse	Beige
D	07 mm	Circulaire	Elevée	Dentelés	Opaque	Crémeuse	Beige
E	05 mm	Circulaire	Elevée	Dentelés	Opaque	Crémeuse	Beige
F	10 mm	Circulaire	Elevée	Régulier	Opaque	Crémeuse	Beige
G	05 mm	Circulaire	Bombée	Régulier	Opaque	Visqueuse	Beige

• **Aspect microscopique**

L'observation microscopique après coloration de Gram a révélé que 90 % des souches isolées sont des gros bacilles généralement au bout carré et seulement 10 % sont des cocci, toutes à Gram positif ayant des spores avec un mode de regroupement différent (Tableau12).

Tableau 12 : Résultat de la coloration de Gram

Souches	Gram	Spore	Forme	Mode de regroupement
A	+	+	Bacille	En amas
B	+	+	Bacille	Individuelle
C	+	+	Bacille	En chaine et en paire
D	+	+	Bacille	En chaine
E	+	+	Bacille	En amas
F	+	+	Bacille	En amas
G	+	+	Cocci	En paire et en amas

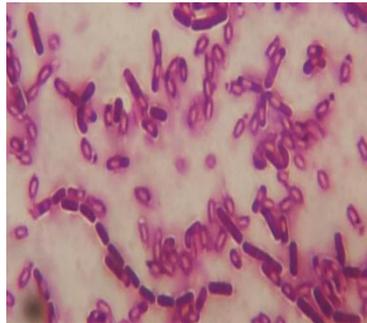
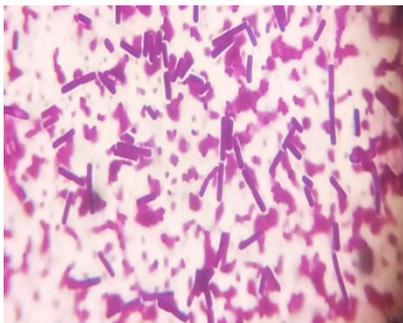


Figure 05 : observation microscopique de la coloration de Gram (G \times 100).

Remarque : La souche notée G a été écarté de l'étude puisqu'il s'agit d'une coque, alors que notre étude visait à isoler les souches appartenant au groupe *Bacillus cereus* qui sont des bacilles, donc seules les cellules typiques (bacilles) ont été retenues.

1.3. La caractérisation biochimique des isolats

L'ensemble des résultats de la caractérisation biochimique des souches isolées est récapitulé dans le tableau 13.

Tableau 13 : Résultats des tests biochimique des isolats.

	A	B	C	D	E	F
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	-	-	+	-	-
Saccharose	+	-	-	-	-	-
Lactose	+	-	-	+	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Production de gaz	-	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	+	+	-	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-	-
Croissance à 7°C	-	-	-	-	-	-

(+) : résultat positif

(-) : résultat négatif

D'après le tableau 13, le résultat de la mise en évidence des enzymes respiratoires a révélé que toutes les souches isolées sont catalase positives. Cependant, elles sont oxydases négatives montrant leur incapacité à oxyder le réactif PDA (NN-diméthyle-paraphénylène diamine).

En ce qui concerne l'utilisation des sucres glucose, saccharose, lactose, Les résultats obtenus montrent que seule la souche A est capable de dégrader les trois sucres, contrairement aux souches (B, C, E, F) qui sont incapables de les utiliser. Le glucose et le lactose sont les deux sucres assimilés par la souche D. Aucun dégagement de gaz ni production d'H₂S n'a été remarqué, ceci est noté pour tous les isolats.

Il apparaît clairement du tableau que les bacilles isolés sont tous mobiles, utilisant le mannitol, produit de dégradation du D mannose à l'exception des bacilles notés A et D.

La capacité des souches à assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie n'est pas observée et ceci pour toutes les souches. La même constatation est faite pour la production d'indole, puisque elles se montrent toutes incapables de dégrader le tryptophane en indole et sont de ce fait, indole négatif.

La capacité à se développer à 7 °C n'est pas observées pour toutes les souches.

1.4. La mise en évidence des activités enzymatiques

Les résultats de la mise en évidence des activités protéolytique, amylolytique et hémolytique sont illustrés dans le tableau 14.

Tableau 14: Résultats des activités protéolytique, amylolytique et hémolytique des souches isolées.

Souche	Caséinase	Amylase	Hémolyse
A	+	+	+
B	+	+	+
C	+	+	+
D	+	+	+
E	+	+	+
F	+	+	+

(+) : résultats positifs.

(-) : résultats négatifs.

Il apparait du tableau que l'ensemble des souches sont capables d'hydrolyser l'amidon ce qui signifie que ces dernières possèdent une enzyme amylase. L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour des colonies. De même, les souches possèdent également une protéase, la caséinase ; enzyme qui hydrolyse la caséine du lait. Cette caséinase est mise en évidence par la formation d'un halo clair autour des colonies justifiant la dégradation de la caséine par ces souches.

Il ressort également du tableau que toutes les souches ont la capacité à induire une hémolyse sur le milieu gélose au sang. Les colonies apparaissent grisâtre autour d'une zone

d'hémolyse, de couleur vert foncé, comme le montre la figure N. Ceci résulte de l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine par le peroxyde d'hydrogène sécrétée par les bactéries. En outre, l'hémolyse n'entraîne pas de lyse complète des cellules sanguines et est donc souvent appelée hémolyse partielle ou incomplète (Health Savety. Les trois types d'hémolyse possible sur moutons gélose au sang).

Les résultats sont illustrés dans la figure 06.

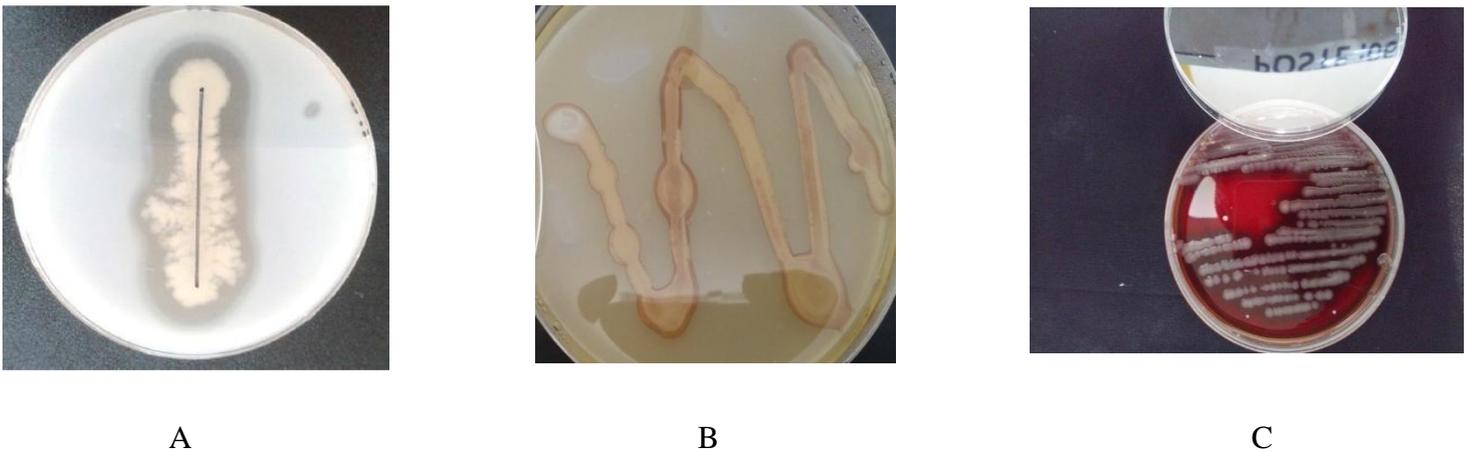


Figure 06 : Activités enzymatiques : A. Hydrolyse de la caséine, B. Hydrolyse de l'amidon, C. Hydrolyse de la lécithine.

2. Discussion

Dans la présente étude nous avons essayé d'évaluer la contamination de deux types de laits pasteurisés (lait de vache et lait reconstitué), tout le long de leur chaîne de fabrication (de la matière première au produit fini destiné à la consommation), spécifiquement par des bactéries appartenant au groupe *Bacillus cereus*. Un groupe largement constitué d'espèces non pathogènes mais également connu par la présence d'espèces pathogènes présentant un risque de danger potentiel pour l'homme.

L'échantillonnage tout le long de la chaîne de fabrication des deux types de lait a permis de détecter une contamination par des espèces appartenant toutes au genre *Bacillus*. Les résultats de l'identification morphologique et biochimique montrent clairement que toutes les souches isolées sont des bacilles Gram positifs, catalase positive, aérobies, mésophiles, sporulées, leurs colonies sont opaques de couleur crème ne produisant pas de pigmentation, tous ces caractères nous ont permis de les rattacher au genre *Bacillus*.

Le groupe *Bacillus cereus* est constitué d'espèces relativement très proches il s'agit de : *Bacillus cereus sensus stricto* bactérie pathogène opportuniste de l'homme, *Bacillus thuringiensis* pathogène d'insectes, *Bacillus anthracis* agent de l'anthrax ou maladie du charbon, *Bacillus mycoide et pseudomycoide* les deux caractérisées par une croissance rhizoïdale sur milieux solides et enfin une espèce psychrotolérante *Bacillus weihenstephanensis* (Jensen, 2003). Pour différencier *Bacillus cereus* des autres espèces proches (*Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus thuringiensis*) certains caractères culturels, physiologiques et biochimiques peuvent être pris en considération. *Bacillus anthracis* peut être différenciée par son caractère immobile, *Bacillus mycoides et Bacillus pseudomycoides* sont caractérisées par leurs colonies rhizoïdes typiques sur milieux gélosés, *Bacillus thuringiensis* est une espèce produisant des inclusions cristallines protéiques (δ -endotoxines), *Bacillus weihenstephanensis* est la seule espèce de ce groupe capable de croître à 7° C. En prenant en compte toutes ces différences les souches isolées à partir des échantillons de lait de vache et de lait reconstitué pasteurisés appartiennent probablement soit à l'espèce *Bacillus cereus sensus stricto* communément connue sous le nom de *Bacillus cereus* soit à l'espèce *Bacillus thuringiensis*. Il a été reporté par la bibliographie que *B. thuringiensis* possède des similarités phénotypiques avec *B. cereus sensu stricto* incluant la mobilité et l'activité hémolytique (Rosenquist *et al.*, 2005). Ce résultat, confirme bien ceux publiés dans certaines études qui notent également des difficultés dans l'identification de

certaines espèces du groupe *Bacillus cereus* d'origine alimentaires en raison des similarités dans les séquences de leur ADNr 16S (Fernandez et al., 2013).

Dans cette étude, la détection d'une contamination, au niveau des échantillons de laits, par des souches appartenant au genre *Bacillus* est un résultat similaire à celui publié par Raevuori, M., et L. Koiranen, 1978 qui ont signalés la présence de *Bacillus cereus* dans le lait cru et le lait pasteurisé. Cette contamination peut être expliquée par le caractère ubiquitaire de ces bactéries et leur large distribution dans l'environnement comme il a été rapporté par Bartoszewicza et al., (2008), chose qui facilite leur contamination dans une large variété d'aliments à différents stades de la chaîne alimentaire (Oguntoyinbo, 2007). La contamination peut avoir plusieurs sources, elle peut être véhiculée par divers substrats y compris le sol et les équipements laitiers (Bartoszewicza et al., 2008). De plus, ces bactéries sont connues par leur potentiel de formation des biofilms, car il a été démontré que ces bacilles ont un grand pouvoir d'adhésion et de formation de biofilms au niveau des installations en acier inoxydable et sont de ce fait très difficiles à éradiquer (Steve Flint et al., 2015).

Plusieurs études ont signalées que *Bacillus cereus spp* sont des contaminants fortement liés à de larges variétés d'aliments à savoir le lait et autres produits laitiers (Reyes et al., 2007 ; Bartoszewicza et al., 2008). Remarquablement, ces espèces sont capables d'échapper aux processus de pasteurisation et survivent par la production d'endospores dans les aliments crus ou bruts et ceux traités thermiquement (Durack et al., 2006).

En particulier, la contamination du lait par des membres du groupe *Bacillus cereus* est d'une grande importance, non seulement en raison de leur capacité à la détérioration des aliments mais également par leur potentiel à causer des maladies pour l'homme (Anderson Borge et al., 2001). L'aptitude à la détérioration a été confirmée dans cette étude, puisque ces bactéries sporulées, ont été caractérisées par leur capacité à produire deux types d'enzymes extracellulaires importantes responsables de la dégradation du lait. Ces dernières donnent au lait une flaveur anormale et des défauts de structure (De Jonghe et al., 2010). Plusieurs études ont montrés que les bactéries aérobies sporulées appartenant au groupe *Bacillus cereus* ont été liées de façon répétée à la détérioration du lait cru et reconstitué pasteurisé ainsi que d'autres produits laitiers (Cempirkova R., 2002 ; Cosentino S. et al., 1997 ; Crielly E.M. et al., 1994 ; Meer R.R et al., 1991 ; Ternstro'm A. et al., 1993).

Effectivement, *Bacillus cereus* a été reconnue comme un agent causal d'intoxications alimentaires (depuis plus de 40 ans) et a été liée à des syndromes émétiques et diarrhéiques d'origine alimentaire (Ghelardi et *al.*, 2002).

Pour cela des mesures de contrôle doivent être prises pour lutter contre ces bactéries sporogènes par le contrôle de la chaîne de fabrication, de la matière première jusqu'au produit fini, et l'amélioration des systèmes de nettoyage et de désinfection appliqués par l'unité de production.

IV. Conclusion

Les bactéries jouent un rôle important dans l'industrie agroalimentaire. Elles sont utilisées dans la fabrication de nombreux produits alimentaires tels que les fromages et les yaourts ainsi que d'autres aliments fermentés, mais elles sont également responsables de la détérioration des aliments et considérées comme des agents d'intoxications alimentaires.

Dans cette optique, notre travail avait pour objectif principal d'évaluer la contamination de deux types de laits pasteurisés (lait de vache et lait reconstitué), collectés à différentes étapes de leur processus de production : avant pasteurisation, après pasteurisation et produit prêt à l'emploi, spécifiquement par des bactéries appartenant au groupe *Bacillus cereus*.

L'échantillonnage tout le long des différentes étapes de fabrication des deux types de lait a permis d'isoler sept souches. Ces dernières ont fait l'objet d'une caractérisation morphologique et biochimique qui a permis de les affilier au genre *Bacillus*.

Le groupe *Bacillus cereus* est constitué de six espèces génétiquement très proches (*Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus thuringiensis*). Certains caractères culturels, physiologiques et biochimiques ont été pris en considération pour pouvoir les différencier. L'ensemble des caractères testés a permis l'identification présomptive de deux espèces : *Bacillus cereus*/*Bacillus thuringiensis*. Ce qui permet de conclure que les souches isolées appartiennent soit à l'espèce *Bacillus cereus* soit à l'espèce *Bacillus thuringiensis*.

Ces bactéries sporulées, sont également caractérisées par leur capacité à produire deux types d'enzymes extracellulaires importantes responsables de la dégradation du lait au court du stockage. Ces dernières donnent au lait une saveur anormale et des défauts de structure (De Jonghe et al., 2010).

A la lumière de cette étude, il apparaît clairement qu'une contamination par les bactéries sporulées, membres du groupe *Bacillus cereus* a été détectée dans les deux types de laits à différentes étapes de leur processus de fabrication, c'est pourquoi et en ce qui concerne la discussion croissante sur la santé et la sécurité des aliments, une meilleure connaissance des caractéristiques liées à l'origine, à l'identité et à la qualité des aliments pourrait aider à améliorer les mesures de contrôle des spores, contribuant ainsi à la réduction de la perte alimentaire due à une détérioration microbienne.

De plus, une connaissance des flux de contamination à travers la ligne de production devrait aider à identifier les étapes critiques dans le processus de contamination par les espèces du groupe *Bacillus cereus*, et donc aider à améliorer la sécurité en réduisant ou en éliminant la contamination à la source.

En perspectives, il serait intéressant de :

- Sensibiliser les éleveurs producteurs de lait pour la mise en place de meilleurs moyens afin de garantir une matière première de meilleure qualité sanitaire.
- Améliorer le système de nettoyage en place (CIP) des équipements laitiers.
- Assurer un contrôle microbiologique continu tout le long de la chaîne de fabrication, par l'application de la démarche HACCP (Analyse des dangers et des points critiques pour la maîtrise).

Références

Bibliographiques

A

ABOUTAYEB R., (2009) Technologie du lait et dérivés laitiers <http://www.azaquar.com>.

(2002) :Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait *In VIGNOLA C.L*, Science et technologie du lait Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN:3-25-29 (600 pages).

AFSCA (2011). Avis 15-2011 du comité scientifique de l'agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire. Évaluation des risques et bénéfices de la consommation de lait cru de bovins, et de l'effet du traitement thermique du lait cru sur ces risques et bénéfices (dossier Sci Com 2010/25, auto-saisine), 26 p.

Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait *In: Vignola C.L.*, Science et technologie du Lait : transformation du Lait (2^{ème} Eds). École polytechnique de Montréal, ISBN : 3-25-29 pp 600

AMIOT. J., FOURNER. S., LEBEUF Y., PAQUIN P., SIMPSON R et TURGEON H., (2002) :Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait *In VIGNOLA C.L*, Science et technologie du lait Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN:3-25-29 (600 pages).

Ankolekar C., Labbé R.G. (2010). Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 982-984.

Andersen Borge, G.I., Skeie, M., Sorhaug, T., Langsrud, T., Granum,P.E. (2001).Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int. J. Food Microbiol.*, **69**: 237–246.

Arrêté interministériel (1993). d'après le journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire.N°69 correspondant aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. P 2-5.

ARIE. F, SriKumalaningsh et Ariesta .W (2012)Process engineering of Drying milk powder with Foam mat drying method.journal of basic and applied scientific research 2(4) :3588-3592.

Aslanzadeh, 2006. Biochemical profile-based microbial identification system. Assessment related to microbial food contamination.

Augustin, Jean-Christophe. "Challenges in risk assessment and predictive microbiology of foodborne spore-forming bacteria." *Food microbiology* 28.2 (2011): 209-213.

B

Bravo A., Gill S.S., Soberon M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, **49**: 423-435.

Bartoszewicza, M., Hansenb, BM., Swiecicka, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology.*, **25**: 588–596.

Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., De Buyser, M. L., Collette, C., Garin-Bastuji, B., & Thorel, M. F. (1997). Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, *16*(1), 452-471.

Burgess, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M., & Flint, S. H. (2009). The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of applied microbiology*, *107*(3), 1012-1018.

BRUNNER J.,(1981) Cow milk proteins: twenty five years of progress. *J dairy Sci*, 1981,**64** : 1038-1054. *In* **POUGHEON S.,** Contribution a l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France: 31(102 pages).

BYLUND G., (1995) Dairy processing handbook-Tetra pak processing systems AB S-221 86 , Lund ,Sweden : 18- 23-381(436 pages).

C

Cadot C., Tran S.L., Vignaud M.L., De Buyser M.L., Kolstø A.B., Brisabois A., Nguyen-Thé C., Lereclus D., Guinebretiere M.H., Ramarao N. (2010). InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **48** (4): 1358-1365.

Carlin F., Fricker M., Pielat A., Heisterkamp S., Shaheen R., Salonen M.S., Svensson,B., Nguyen-the C., Ehling-Schulz M. (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology*, **109**: 132-138.

Carlin F., Brillard J., Broussole V., Clavel T., Duport C., Jobin M., Guinebretiere M.H, Auger S., Sorokine A., Nguyen-Thé C. (2009). Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International*, **43**: 1885-1894.

Carlin F. (2011). Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*, **28** : 177-182.

Cherif Antar A., 2015. Identification et caractérisation de la flore mésophile constitutive des biofilms inféodés aux lignes de production de lait de vache pasteurisé. Doctorat en Biologie Moléculaire et Biochimie. *Univ. De Tlemcen*.

Christiansson A., Bertilsson J., Svensson B. (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing Period. *Journal of Dairy Science*, **82**: 305-314.

D

De Vos P., Garrity G-M., Jones D., Krieg N-R., Ludwig W., Rainey F-A., Schleifer K-H. And Whitman W-B., (2009). Bergey'S Manual Of Systematic Bacteriology, *7nd edition. Volume three, the firmicutes. springer*, New York, USA.

Delerras , C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Tec and Doc, Lavoisier. P: 295 -296.

Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(4), 324-338.

Durak, M., Fromm, H., Huck, J., Zadoks, R., Boor, K. (2006). Development of molecular typing methods for *Bacillus spp.* and *Paenibacillus spp.* isolated from fluid milk products. *Journal of Food Science.*, **71: M50-M56.**

E

Eneroth A., Christiansson A., Brendehaug J., Molin G. (1998). Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International Dairy Journal*, **8: 829-834.**

F

Franworth E., Mainville I. (2010). Les produits laitiers fermentés et leur potentiel thérapeutique, Centre de recherche et de développement sur les aliments, Saint-Hyacinthe. <http://www.dos.transf.edwa.pdf>. Consulté le 11/10/ 2012.

Fernández-No, I.C., Böhme, K., Díaz-Bao, M., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J., Calomata, P. (2013) Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food Microbiology.*, **33**: 235-242.

FREDOT E., (2006) Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier: 25 (397 pages).

Frank J.F., Hassan A.N. (2002). Microorganisms associated with milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Oxford: Elsevier, pp. 1786-1796.

Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., & Crawford, R. (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, *90*(2), 151-157.(microbiologie Oran IGMO : Etude macroscopique et microscopique [en ligne] (page consulté le 26/05/18) <http://www.intik.net<.....<microbiologie>).

I

Iurlina M. O., Saiz A.I., Fuselli S.R., Fritz R. (2006). Prevalence of *Bacillus spp.* in different food products collected in Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, **39**: 105-110.

J

Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. (2005). Modern Food Microbiology 7th edition. Springer Science + Business Media. New York, NY. 790 p.

Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J., Mahillon J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, **5**: 631-640.

Jenson L . (2014). Bacillus Detection by Classical Cultural Techniques. *Encyclopedia of food microbiology*. Volume 1, 140 : 135-140.

JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P. et BRULE G., (2007) Science des aliments-technologie des produits alimentaires tec et doc, Lavoisier : 17 (456 pages).

JEANTET R., CROGUENNEC T., MAHAUT M., SCHUCK P. et BRULE G., (2008) Les produits laitiers ,2^{ème} édition, Tec et Doc, Lavoisier: 1-3-13-14-17 (185 pages).

H

Helgason E., Tourasse N.J., Meisal R., Caugant D.A., Kolstø A.B. (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 191-201.

Health Savety. Les trois types d'hémolyse possible sur moutons gélose au sang [en linge] (page consulté le 05/06/2018 à 9 :45) fr.winesino.com/public-health savety/public-health/100707375663.html.

Hobbs, Betty C., and Muriel E. Smith. "Outbreaks of paratyphoid B fever associated with imported frozen egg. II. Bacteriology." *Journal of Applied Bacteriology* 18.3 (1955): 471-477.

HODEN P., et COULON H., (1991) Composition chimique du lait, [http:// www.2.vet.lyon.fr](http://www.2.vet.lyon.fr).

G

Garcia, J. L., Bensoussan, M., Bianchi, A., & Mandel, M. (1982). Taxonomienumérique de *Bacillus thermophiles* isolés de sols de rizière de l'Afrique de l'Ouest. *Annales de Costerton, J. William.* "Phenotypic plasticity in bacterial biofilms as it affects issues of viability and

culturability." *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Spri **Myszka, K., & Czaczyk, K.** (2011). Bacterial biofilms on food contact surfaces-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), 173-180. nger US, 2000. 131-145.

GAUCHERON F., (2004) :Minéraux et produits laitiers. Tec et Doc, Lavoisier:783 (922 pages).

Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A., Senesi, S. (2002). Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters.*, **208** :129-134.

Guinebretiere M.H., Thompson F.L., Sorokin A., Normand P., Dawyndt P., Ehling-Schulz M., Svensson B., Sanchis V., Nguyen-The C., Heyndrickx M., De Vos P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*, **10** : 851-65.

Granum P.E. (2007). *Bacillus cereus*. In: Doyle M. P. and Beuchat L. R (ed.). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington D.C., 440-456.

Guinebretiere M.H., Nguyen The C. (2003). Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurised zucchini puree processing plant, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, **43**: 207-215.

Guinebretiere M. H., Sanchis V. (2003). *Bacillus cereus lato*. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie*, 18 : 95-103.

K

Kouamé A.K., Djéni T.N., N'Guessan F.K. Djè K. M. (2012). Postprocessing microflora of commercial *attiéké* (a fermented cassava product) produced in the south of Côte d'Ivoire. *Letters in Applied Microbiology* **56**: 44-50.

Thomas D.J., Morgan J.A., Whipps J.M., Saunders J.R. (2000). Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 118-124.

L

Logan, N. A., & Rodrigez-Diaz, M. (2006). *Bacillus spp. and Related Genera*. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (2nd ed., pp. 139-158). West Sussex, England, UK: John Wiley and Sons Ltd.

Lechner S., Mayr R., Francis K.P., Pruss B.M., Kaplan T., Wiessner-Gunkel E., Stewart G.S., Scherer S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**: 1373-1382.

M

MATHIEU J.,(1999)Initiation à la physicochimie du lait, Tec et Doc, Lavoisier, Paris: 3-190 (220 pages).

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (Eds.). (2007). *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed.) American Society of Microbiology Press.-

Le Scanff, J., Mohammedi, I., Thiebaut, A., Martin, O., Argaud, L., & Robert, D. (2006). Necrotizing gastritis due to *Bacillus cereus* in an immunocompromised patient. *Infection*, 34(2), 98-99. doi : 10.1007/s15010-006-5019-6.

Mock M., Fouet A. (2001). Anthrax. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 647-671.

Margulis L., Jorgensen J.Z., Dolan S., Kolchinsky Rainey F.A., Lo S.C. (1998). The Arthromitus stage of *Bacillus cereus* : Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**: 1236-1241.

Magnusson M. (2007). *Bacillus cereus* in the housing environment of dairy cows. Thèse de doctorat, Alnarp, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences. pp. 46.

microbiologie Oran IGMO : Etude macroscopique et microscopique [en ligne] (page consulté le 26/05/18 à 23 :15)<http://www.intik.net><.....<microbiologie.

N

Nakamura L.K. (1998). *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**: 1031-1035.

O

OuId Mustapha,A., N'diyae D., OuId Kory B., (2012). Etude de la qualité du lait pasteurisé des industries laitières situées à Nouakcote (Mauritanie) Sciences du vivant Biologie.Editions Mersenne: Volume 4 N 0120804 ISSN 2111 - 4706.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, *54*(1), 49-79.

Oguntoyinbo, F. (2007): Monitoring of marine *Bacillus* diversity among the bacteria community of sea water. *African Journal of Biotechnology.*, **6**: 163-166.

Oomes S.J.C.M., van Zuijlen A., Hehenkamp,J. O., Witsenboer,H., Van der Vossen J., Brul, S. (2007). The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology*, **120**: 85-94.

O'Connor, F., B. M. McKenna, and A. C. O'Sullivan. "Bacteriological and whey protein denaturation aspects of heating processes used in the manufacture of low-heat skim-milk powder." *Irish Journal of Agricultural Research* (1969): 417-430.

P

Pacova Z., Svec P., Stenfors L.P., Vyletelova M., Sedlacek I. (2003). Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow's milk. *Czech Journal of Animal Science*, **48**: 93-96.

POUGHEON S., (2001) Contribution a l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France: 34 (102 pages).

Pougheon S.I.A.S. (2001). Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse de doctorat d'état, École Nationale Vétérinaire, Université Toulouse III - Paul Sabatier, France, 102 pages.

POUGHEON S .et GOURSAUD J., (2001) Le lait caractéristiques physicochimiques *In DEBRY G.,* Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 6(566 pages).

POUGHEON S .et GOURSAUD J., (2001) Le lait caractéristiques physicochimiques *In DEBRY G.,* Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 6(566 pages).

P. Piyasena, E. Mohareb, R.C. McKellar,(2003) Inactivation of microbes usingultrasound: areview, *International Journal of Food Microbiology* 87 - 207–216.

R

Rasolofo E.A. (2010). Analyse du microbiote du lait par les méthodes moléculaires. Mémoire pour l'obtention du grade de Philosophie doctor (Ph.D.) de l'université Laval .Québec. Canada.

Ranieri ML, Huck JR, Sonnen M, Barbano DM, Boor KJ., (2009). High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 92(10): 4823-4832.

Reyes J. E., Bastias J. M., Gutiérrez, M. R., Rodríguez, M. (2007). Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiology*, **24** : 1-6.

Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S., Ravel J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, **29** (2): 303-329.

Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I., & Chambliss, G. H. (1998). *Bacillus*. In L. Collier, A. Balows, M. Sussman, A. Balows & B. I. Duerden (Eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infection : Systematic Bacteriology* (9th ed., pp. 709-729). USA: Arnold.

S

Sauka D.H., Benintende G.B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: general aspects. An approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural pests. *Revista Argentina de Microbiologia*, **40**: 124-40.

Slaghuis B. A., Te Giffel M. C., Beumer, R. R., André G. (1997). Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *International Dairy Journal*, **7**: 201-205.

Scheldeman P., Pil A., Herman L., De Vos P., Heyndrickx M. (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** : 1480-1494.

Scott S.A., Brooks J.D., Rakonjac J., Walker K.M.R., Flint, S.H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, **60**:109-117.

SOY b (2011). Milk powder production
.http://www.docstoc.com/docs/70425205/MilkPowder-Production

Spencer R.C. (2003). *Bacillus anthracis*. *Journal of Clinical Pathology*, **56**: 182-187.

Stenfors L.P., Granum P.E. (2001). Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiology Letters* **197**: 223-228.

Swiecicka I., Van der Auwera G.A., Mahillon J. (2006). Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. *Microbial ecology*, **52**: 544-51.

V

Van der Auwera G.A., Timmerly S., Hoton F., Mahillon J. (2007). Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, **113** (2): 164-172.

Vaerewijck M.J.M., De Vos P., Lebbe L., Scheldeman P., Hoste B., Heyndrickx M. (2001). Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 1074-1084.

Vissers M.M.M., Te Giffel M. C., Driehuis F., De Jong P., Lankveld J. M. G. (2007). Predictive modeling of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk during grazing and housing periods. *Journal of Dairy Science*, **90**: 281-292.

Vilain S., Luo Y., Hildreth M.B., Brözel V.S. (2006). Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 4970-4977.

W

Wijnands L.M., Dufrenne J.B., Rombouts F.M., in 't Veld, P.H., van Leusden F.M., (2006). Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in The Netherlands. *Journal of Food Protection*, **69**: 2587-2594.

Witkowska A.M., Hickey D.K., Alonso-Gomez M., Wilkinson M.G. (2011). The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control*, **22**: 616-625.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : composition pour le milieu d'isolement.

Milieu PCA

Composition en g/l eau distillée

Poudre déshydraté.....23.5

Annexe 2 : composition pour le milieu de l'activité caseolytique.

Gélose au lait

Poudre de lait.....05

Eau distillée.....50ml

Agar.....02

Eau distillée.....50ml

Stériliser à l'autoclave 15min à 115 C°

Annexe 3 : composition pour le milieu de l'activité amilolytique.

Gélose à l'amidon

Composition en g

Amidon en pomme de terre.....10

Gélose nutritive.....01L

Stériliser à l'autoclave 15min à 115 C°

Annexe 4 : pour faire les dilutions décimales.

Eau physiologique stérile

Composition en g/l eau distillée

NaCl.....09

Stériliser à l'autoclave 20min à 121 C°

Annexe 5 : composition pour le milieu de l'identification biochimique

Milieu TSI (triple sugar iron agar)

Composition en g/l eau distillée

Peptone.....20

Agar.....12

Lactose.....10

Sucrose.....10

Extrait de levure	03
NaCl.....	05
Extrait de viande	03
Glucose.....	01
Citrate de fer.....	03
NaS ₂ O ₃	0, 3
Rouge de phénol.....	0, 025
pH 7.4-rée 0.2 à 25 C°	

Annexe 6 : composition pour le milieu de l'identification biochimique.

Milieu citrate de Simmons

Composition en g/l eau distillée

Agar.....	15
NaCl.....	05
Sodium de citrate.....	02
K ₂ HPO ₄	01
(NH ₄) ₂ SO ₄	01
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.2
Bleu de bromothymol.....	0.08
PH 6.9-0.2 à 25 °C	

Annexe 7 : composition pour le milieu de l'identification biochimique.

Milieu urée-indole

Composition en g/l eau distillée

Tryptophane.....	03
Urée.....	20
Kh ₂ HPO ₄	01
NaCl.....	05
Alcool à 95°	10ml
Rouge de phénol.....	2, 5ml

Annexe 8 : composition pour le milieu de l'identification biochimique.

Milieu Mannitol Mobilité Nitraté

Composition en g/l eau distillée

Peptone trypsine de viande.....	20
Mannitol.....	02
RP1 %.....	4ml
Nitrate K.....	01
Agar.....	04

PH=7, 6-7, 8

Annexe 9 : composition pour le milieu de l'identification biochimique.

Milieu Clark et Lubs

Composition en g/l eau distillée

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

pH=7

Annexe 10 : composition pour le milieu de l'activité hémolytique.

Milieu gélose au sang

Composition en g/l eau distillée

Mélange spécial de peptones.....	23
Amidon	01
NaCl.....	05
Agar.....	10
Sang de mouton	50ml

pH=7,3

Annexe 11 : Coloration de Gram

Technique

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de Gentiane* ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. À ce stade, les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram+ sont violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la *Fushine* pour colorer les cellules Gram- présentes en rose. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif (grossissement X 100) en ajoutant quelques gouttes d'huile à immersion (Singleton, 1999).

Annexe 12 : Composition des colorants de la coloration de Gram

Fuschine

Fuschine basique.....	1g
Alcool éthylique à 9%.....	10ml
Phénol.....	5g
Eau distillée.....	100 ml

Lugol

Iode.....	1g
Iodure de potassium.....	2g
Eau distillée.....	300ml

Violet de gentiane

Violet de gentiane.....	1g
Ethanol à 90 %	10ml
Phénol.....	2g
Eau distillée	100ml

Titre : Evaluation du degré de contamination de lait de vache et de lait reconstitué pasteurisés par les espèces du groupe *Bacillus cereus*.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire Des Microorganisme.

Résumé

Le lait joue un rôle important dans la nutrition humaine, mais peut représenter un risque potentiel de toxi-infections pour le consommateur.

L'objectif principal assigné à cette étude est d'évaluer le degré de contamination, du lait de vache et de lait reconstitué pasteurisés, tout le long de leur chaîne de fabrication (de la matière première au produit fini destiné à la consommation), par des bactéries du groupe *Bacillus cereus*.

L'échantillonnage à travers les différentes étapes de fabrication des deux types de lait a permis d'isoler sept souches.

Les résultats combinés de la caractérisation morphologique et biochimique des souches isolées ont permis d'orienter l'identification au genre *Bacillus*, probablement aux espèces *Bacillus cereus/ Bacillus thuringiensis*.

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

A travers cette étude, nous avons donc pu mettre en évidence la présence des bactéries du groupe *Bacillus cereus*, dans les deux types de laits pasteurisé. Ces résultats soulèvent de nouveau les problèmes causés par les germes contaminants indésirables en industrie agroalimentaire auxquels il faut faire face pour garantir des produits finis sains permettant de préserver la santé publique.

Mots clés : Lait de vache pasteurisé, lait reconstitué pasteurisé, contamination, groupe *Bacillus cereus*, spore.

Laboratoire de recherche : Onalait

Laboratoire de microbiologie UFM Constantine

Jury d'évaluation :

Président du jury : Melle. ABDELAZIZ W (Maitre Assistante - UFM Constantine),
Rapporteur : Mme. BOULTIFAT L (Maitre Assistante - UFM Constantine),
Examineur : Melle. MEZIANI M (Maitre Assistante - UFM Constantine).

Date de soutenance : 27/06/2018