



Institut : Sciences et Technologie
N° d'ordre :
Matricule :

Département: Sciences de la Nature
et de la Vie

www.centre-univ-mila.dz

Thèse

Présentée pour l'obtention du Diplôme de Doctorat LMD

Etude de la dynamique et phylogénétique des populations bactériennes psychrotrophes du lait cru récolté dans la région de Mila

Préparée par : Bouchair khadidja

Directeur de thèse: Boubendir Abdelhafid

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité: Biodiversité et Valorisation des Ressource
Naturelles

N°	Nom & Prénom	Grade	Université	Designation
1	YAHIA Abdelouahab	Professeur	Centre Univ. de Mila	Président
2	BOUBENDIR Abdelhafid	M.C.A	Centre Univ. de Mila	Rapporteur
3	CHEBBAH Mohamed	Professeur	Centre Univ. de Mila	Examineur
4	BOUNAMOUS Azzeddine	Professeur	Centre Univ. de Mila	Examineur
5	MOUSSI Abdelhamid	Professeur	Université de Biskra	Examineur
6	BENMEDDOUR Tarek	M.C.A	Université de Biskra	Examineur

Année Universitaire: 2020/2021

Remerciements

Je remercie, en premier lieu, le grand **Dieu** pour m'avoir donné la force et la résolution pour réaliser ce travail.

Toutes les expressions de l'estime et de gratitude du monde sont insuffisantes pour exprimer mes remerciements à mes parents qui m'ont accompagné durant tout mon cursus d'étude.

Je remercie vivement :

* Monsieur Le professeur **BOUBENDIR Abdelhafid**, Docteur Microbiologiste au Département de Sciences de la Nature et de la Vie à Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila, pour avoir accepté de m'encadrer et me diriger. Je le remercie également pour ces précieux conseils, son grand sens d'humanisme, sa grande générosité et sa grande volonté à me suivre le long de ce travail

* Le professeur YAHIA Abdelouahab enseignant Professeur au Département de Sciences de la Nature et de la Vie à Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila, pour avoir accepté de présider le jury et pour avoir beaucoup consacré de son précieux temps. Le Professeur YAHIA Abdelouahab est connu au sein de la communauté universitaire par sa parfaite organisation ; qu'il trouve à travers ce travail toute l'expression de remerciements

* Le professeur CHEBBAH Mohamed enseignant Professeur au Département de Sciences de la Nature et de la Vie à Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila, pour avoir accepté de juger ce travail et pour avoir beaucoup consacré de son précieux temps. toute l'expression du meilleur respect et l'honneur que nous lui témoignons.

* Le professeur BOUNAMOUS Azzeddine enseignant Professeur au Département de Sciences de la Nature et de la Vie à Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila, pour avoir accepté de juger ce travail et pour avoir beaucoup consacré de son précieux temps. toute l'expression du meilleur respect et l'honneur que nous lui témoignons.

* Le Professeur MOUSSI Abdelhamid enseignant au Université Mohamed Khider de Biskra pour avoir accepté de juger ce travail et pour son déplacement jusqu'à Mila,

tenant compte des charges pédagogiques et des responsabilités et activités scientifiques qu' il assure à Universitaire Mohamed Khider de Biskra. Que le Docteur MOUSSI Abdelhamid Trouve, à travers cette invitation au jury, toute l'expression du meilleur respect et l'honneur que nous lui témoignons.

* Le Professeur BENMEDDOUR Tarek enseignant à Université Mohamed Khider de Biskra pour avoir accepté de juger ce travail et pour son déplacement jusqu'à Mila, tenant compte des charges pédagogiques et des responsabilités et activités scientifiques qu' il assure à Universitaire Mohamed Khider de Biskra. Que le Docteur BENMEDDOUR Tarek Trouve, à travers cette invitation au jury, toute l'expression du meilleur respect et l'honneur que nous lui témoignons.

nous nous adressons toute l'expression de notre profond respect à tous les collègues du Laboratoire des sciences naturelles et des matériaux, Centre universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila, **Algérie**

Soumya EL ABED pour leur aide précieuse et contribution scientifique dans la réalisation de ce travail Université Sidi Mohamed Ben Abdullah, Fès, Maroc
Tous les enseignants du Département des Sciences de la Nature et de la Vie de
Centre universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila, Algérie.

Résumé

Afin d'évaluer les changements dynamiques du consortium microbien du lait cru de vache pendant la réfrigération, explorer la diversité des bactéries psychrotrophes et déterminer les relations évolutives entre les taxons sur la base du gène ARNr16S, des échantillons de lait cru ont été collectés dans deux fermes laitières situées dans le bassin et une montagne de la région de Mila en Algérie. Le stockage à froid des échantillons de lait à 4 °C a été utilisé pour promouvoir la croissance microbienne des psychrotrophes pendant 10 jours. La flore microbienne du lait a été cultivée par les méthodes de culture dépendante et l'identification des isolats bactériens a été conduite par les méthodes phénotypiques à la base des critères cultureux, morphologiques et biochimiques ; de plus quelques isolats bactériens ont fait l'objet d'une identification moléculaire par séquençage partiel du gène ARNr16S. Les variations du nombre total viable et les paramètres cinétiques de la croissance microbienne ont été analysées durant la réfrigération à l'aide du modèle Baranyi et Roberts.

Les comptes microbiens initiaux dans les échantillons de lait cru prélevés dans les deux fermes (bassin et montagne) était de $3,87 \pm 0,11$ à $2,94 \pm 0,04$ log UFC. mL⁻¹ respectivement, et la croissance maximale ne dépassait pas $7,00 \pm 0,12$ log UCF. mL⁻¹. La limite d'hygiène a été dépassée après 2 jours dans la ferme du bassin et plus tard après 6 jours dans la ferme de montagne. Le temps de génération variait de $1,20 \pm 0,55$ à $4,18 \pm 0,22$ jours dans la ferme du bassin et la ferme de montagne respectivement. Le retard notable en croissance microbienne dans le lait de la ferme de montagne par rapport à celui du bassin pourrait être lié au mode d'alimentation intérieur / extérieur adopté en montagne opposé à l'alimentation à l'intérieur seule dans la ferme du bassin. Cette durée de conservation prolongée suggère à la fois la présence de molécules bioactives antimicrobiennes issues des plantes pâturées par les vaches à l'extérieur de la ferme de montagne et à la sélection géographique de microorganismes à potentiel antagoniste évoluant dans la microflore du lait. Les populations bactériennes psychrotrophiques ont été identifiées comme *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Enterococcus* et *Lactobacillus*. *Enterococcus* constitue le plus grand groupe composé de 9 taxons, avec *E. faecalis* étant l'espèce prédominante.

L'analyse de la génomique comparative sur la base des séquences du gène ARNr16S des souches *E. faecalis* isolées avec ceux de différentes géographies et climats dans le monde a été menée. Les observations des variations génétiques ont montré que sept souches *E. faecalis* (MH569850, MH569851, MH569854, MH569856, MH569857, MH569859 et MH569860) ont enregistré des similitudes de séquences inférieures à 97%, ce qui conduit à l'hypothèse que les isolats pourraient représenter une nouvelle espèce du genre *Enterococcus*.

Mots clés: lait cru de vache, réfrigération, paramètres de croissance microbienne, populations bactériennes psychrotrophes, phylogénie, durée de conservation.

Abstract

In order to evaluate the consortium microbial dynamic changes of raw cow's milk during refrigeration, explore the diversity of psychrotrophic bacteria and determining the evolutionary relationships between taxa on the basis of the 16S rRNA gene, raw milk samples were collected in two dairy farms situated in basin and mountain areas in the region of Mila, Algeria. Cold storage of milk samples at 4 °C was used to promote psychrotrophic microbial growth during 10 days. The microbial flora of milk was determined by culture methods and the identification of bacterial isolates was carried using cultural, morphological and biochemical criteria. In addition some bacterial isolates have been the subject of a molecular identification by partial sequencing of the 16S rRNA gene. The variations in total viable count and kinetic parameters of microbial growth were analyzed during refrigeration using Baranyi and Roberts Model. The initial microbial counts ranged from 2.94 ± 0.04 to 3.87 ± 0.11 log CFU * mL⁻¹ and the maximum growth did not exceed 7.00 ± 0.12 log CFU * mL⁻¹. The hygienic limit was surpassed after 2 days in the basin farm and later after 6 days in mountain farm. The generation time varied from 1.20 ± 0.55 to 4.18 ± 0.22 days in the basin farm and mountain farm respectively. The notable delay in microbial growth in milk from the mountain farm compared to the one from basin could be related to indoor/outdoor feeding mode adopted in mountain opposed to indoor feeding in the basin farm. This prolonged shelf-life suggests the possible presence of antimicrobial molecules coming from plants grazed around the farm and the selection in the microbiota of some microbial species with antagonist potential. The psychrotrophic bacterial populations were identified as *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Enterococcus* and *Lactobacillus*. *Enterococcus* constitutes the largest cluster composed of 9 taxa, with *E. faecalis* being the predominant species. The comparative genomic analysis on the basis of 16S rRNA gene sequence of *E. faecalis* isolates with related strains from different geographies and climates was performed. The observations of the genetic variations showed that seven *E. faecalis* strains (MH569850, MH569851, MH569854, MH569856, MH569857, MH569859 and MH569860) registered similarities of sequences less than 97%, which lead to the hypothesis that the isolates could represent a novel species of the genus *Enterococcus*.

Key words: raw cow milk, refrigeration, microbial growth parameters, psychrotrophic bacterial populations, Phylogeny, shelf-life

ملخص




من أجل تقييم التغيرات الديناميكية الميكروبية لحليب البقر الطازج اثناء التبريد ثم استكشاف تنوع البكتريا المحبة للبرودة وتحديد العلاقات التطورية بين الانواع باستعمال مورثة ARNr16s تم جمع عينات الحليب من مزرعتين منتجتين للالبان (حوض و جبل) متواجدين في منطقة ميله ، الجزائر. تم استخدام التخزين البارد لعينات الحليب عند 4 درجات مئوية لتعزيز النمو الميكروبي خلال 10 أيام من التبريد تمت زراعة البكتريا وفقا للمعايير المعتمد عليها تم التعرف على العزلات عن طريق دراسة الخصائص الظاهرة الزراعية الشكلية الكيميائية الحيوية في حين بعض العزلات تم التعرف عليها بواسطة الخصائص الوراثية باستعمال مورثة ARNr16s تم تحليل الاختلافات في حركية النمو الميكروبي باستخدام نموذج روبرت وبارياني

كانت الأعداد الميكروبية الأولية في عينات الحليب الطازج التي تم جمعها من المزرعتين (الحوض والجبل) 0.11 ± 3.87 إلى 0.04 ± 2.94 لوغاريتم CFU. مل -1 على التوالي ، ولم يتجاوز الحد الأقصى للنمو 0.12 ± 7.00 سجل UCF. مل -1. تم تجاوز حد النظافة بعد يومين في مزرعة الأحواض وبعد ذلك بعد 6 أيام في المزرعة الجبلية. تراوح زمن التوليد من 0.55 ± 1.20 إلى 0.22 ± 4.18 يوم في مزرعة الأحواض والمزرعة الجبلية على التوالي. يمكن ربط التأخير الملحوظ في نمو الميكروبات في اللبن من المزرعة الجبلية مقارنةً بالنمو من الحوض بطريقة التغذية الداخلية / الخارجية المعتمدة في الجبال بدلاً من التغذية الداخلية وحدها في مزرعة الأحواض. يشير هذا العمر الافتراضي الممتد إلى وجود جزيئات نشطة بيولوجيًا مضادة للميكروبات من النباتات التي ترعى بها الأبقار خارج المزرعة الجبلية والانتقاء الجغرافي للكائنات الدقيقة ذات الإمكانيات العدائية التي تتطور في النباتات الدقيقة للحليب. تم تحديد المجموعات البكتيرية ذات التغذية النفسية مثل *Acinetobacter* و *Pseudomonas* و *Aeromonas* و *Chryseobacterium* و *Enterococcus* و *Lactobacillus*. المكورات المعوية هي أكبر مجموعة تتكون من 9 أصناف ، مع *E. faecalis* كونها الأنواع السائدة.

تم إجراء تحليل الجينوم المقارن على أساس تسلسل الجين لسلاسل *E. faecalis* المعزولة مع تلك الموجودة في مناطق جغرافية ومناخ مختلفة حول العالم. أظهرت ملاحظات الاختلافات الجينية أن سبع سلالات من *E. faecalis* (MH569850)، MH569851، MH569856، MH569856، MH569856، MH569857، MH569859 و MH569860 سجلت تشابهًا في التسلسل أقل من 97% ، مما أدى إلى فرضية أن العزلات يمكن أن تمثل نوعًا جديدًا من الجنس. المكورات المعوية.

الكلمات المفتاحية: حليب البقر الطازج، التبريد، معلمات النمو الميكروبي ، البكتريا المحبة للبرودة ، فيلوجنتك ، مدة الصلاحية.

Liste des Figures

Numéro	Intitulé	Page
Figure 1	Taux de croissance des bactéries psychrotrophes en fonction de la température en comparaison avec d'autres types bactériens (Lemarchand et Desbiens, 2009).	6
Figure 2	Arbre phylogénétique montrant la diversité du genre <i>Acinetobacter</i> (Vaz-Moreira et al., 2011).	11
Figure 3	Arbre phylogénétique montrant la diversité du genre <i>Chryseobacterium</i> (Hantsis-Zacharov et al., 2008).	13
Figure 4	Arbre phylogénétique montrant la diversité du genre <i>Lactobacillus</i> (Azizi et al., 2017).	15
Figure 5	Arbre phylogénétique montrant la diversité du genre d' <i>Enterococcus</i> (Vancanneyt et al., 2004).	17
Figure 6	Arbre phylogénétique montrant la diversité du genre <i>Stenotrophomonas</i> (Weber et al., 2018).	19
Figure 7	Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases (Augustin, 2005).	23
Figure 8	Les principales phases de la courbe de croissance bactérienne et paramètres qui la caractérise (Delhalle et al., 2012).	24
Figure 9	Augmentation de la TBC, PBC et PLiBC liée aux variations de température en Bohême du Sud et de l'Ouest (Cempírková et Mikulová, 2009).	29
Figure 10	PBC au jour de l'échantillonnage et pendant le stockage de lait cru du vache à 4 °C en Tunisie (Gargouri et al., 2013).	30
Figure 11	Courbes de croissance obtenues par modélisation avec l'équation de Gompertz du nombre total des cellules de bactéries viables dans des échantillons de lait de 3 vaches pendant 21 jours de stockage à 4 °C (Boubendir et al., 2016).	31
Figure 12	Effet de différentes conditions de stockage sur le nombre total de bactéries (TPC) et le nombre de bactéries psychrotrophes (PBC) des échantillons de lait cru A, B et C; stockage à  2°C,  4°C, 	32

	6°C, 8°C, 10°C et 12°C ((Vithanage et al., 2017).	
Figure 13	Carte de la wilaya de Mila (Service du cadastre de la wilaya de Mila, modifiée, 2021).	33
Figure 14	Les vaches laitières prélevées dans l'étude.	34
Figure 15	Suivi de la cinétique de croissance microbienne durant la réfrigération du lait.	36
Figure 16	Etapes opératoires de l'évaluation de la flore totale viable.	37
Figure 17	Mode opératoire pour l'isolement des bactéries spécifiques.	38
Figure 18	Mode opératoire de l'isolement des souches lactiques.	39
Figure 19	Variation du pH pendant la conservation à froid du lait cru à 4 °C durant 10 jours, dans deux fermes (bassin et montagne), avec les principaux genres bactériens isolés.	57
Figure 20	Courbes de croissance du nombre total des bactéries viables obtenues par le modèle de Baranyi et Roberts dans le lait réfrigéré pendant 10 jours à 4 °C, provenant de deux fermes laitières du bassin (A) et de la montagne (B) dans la région de Mila, Algérie.	60
Figure 21	Evolution des populations bactériennes psychrotrophes dans le lait réfrigéré pendant 10 jours à 4 °C, provenant d'une ferme laitière dans une montagne à Hamala dans la région de Mila, Algérie.	66
Figure 22	Carte géographique du monde montrant la situation des isolats de la présente étude et les autres isolats utilisés dans l'étude de la génomique comparative à la base du gène ARNr16S (selon la classification climatique de Koppen Geiger) (Kottek et al., 2006) modifié.	71
Figure 23	Arbre phylogénétique basé sur le gène ARNr 16S montrant la relation entre neuf taxons d' <i>Enterococcus faecalis</i> isolés à partir de lait cru dans une zone aride d'Algérie et des souches apparentées issus d'autres zones géographiques (GenBank). Les pourcentages bootstrap (basés sur 1000 réplifications) se réfèrent à l'analyse du maximum de vraisemblance / parcimonie maximum / jonction de voisins. Seules les valeurs supérieures à 50 % sont affichées. Les numéros d'accès, les pays et les climats sont indiqués à côté des noms des taxons.	74

Figure 24	Arbre phylogénétique basé sur le gène ARNr 16S montrant la relation entre neuf taxons d' <i>Enterococcus faecalis</i> isolés à partir de lait cru dans une zone aride d'Algérie. Les pourcentages bootstrap (basés sur 1000 réplifications) se réfèrent à l'analyse du maximum de vraisemblance / parcimonie maximum / jonction de voisins. Les numéros d'accès sont indiqués à côté du nom des taxons.	77

Liste des tableaux

Numéro	Intitulé	Page
Tableau 1	Groupes bactériens prédominants trouvés dans le lait cru après le stockage à froid dans différents pays en utilisant des méthodes de culture dépendante et indépendante (Rasolofo et al., 2010 ; Mallet et al., 2012 ; Boubendir et al., 2016 ; Vithanage et al., 2016 ; Ribeiro Júnior et al., 2018).	8
Tableau 2	Autres bactéries psychrotrophes du lait cru réfrigéré (Lafarge et al., 2004 ; Rasolf et al., 2010 ; Raats et al., 2011 ; Quigley et al., 2013 ; Oliveira et al., 2015 ; Vithanage et al., 2016).	19
Tableau 3	Les valeurs prédites des paramètres de croissance microbienne par l'équation de Gompertz obtenus en modélisant les données du dénombrement de la moyenne des bactéries viables totales durant le stockage réfrigéré de trois échantillons de lait (Boubendir et al., 2016).	31
Tableau 4	Description de l'aspect cultural et macroscopique des colonies bactériennes.	49
Tableau 5	Bactéries isolées sur gélose au sang additionnée de céfazoline.	51
Tableau 6	Caractérisation macroscopique et microscopique des isolats bactériens du lait cru réfrigéré.	52
Tableau 7	Les résultats des tests culturaux et biochimiques utilisés pour l'identification des bactéries présumées isolées durant le stockage à froid du lait à 4 °C. Entr: <i>Enterococcus</i> , List: <i>Listeria</i> , Stph: <i>Staphylococcus</i> , Acin: <i>Acinetobacter</i> , Prot: <i>Proteus</i> , Aero: <i>Aeromonas</i> , Psdo: <i>Pseudomonas</i> , Klbs: <i>Klebsiella</i> , Yers: <i>Yersinia</i> , Baci: <i>Bacillus</i> , Chry: <i>Chryseobacterium</i> .	54
Tableau 8	Confrontation et correspondance biomoléculaire avec GenBank	55
Tableau 9	Evolution de la croissance microbienne en $\log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de la flore totale du lait à 4 °C durant 10 jours.	58
Tableau 10	Paramètres de croissance microbienne obtenus par le modèle Baranyi et Roberts des données de comptage moyen de bactéries viables totales durant le stockage réfrigéré des échantillons de lait, provenant de deux fermes laitières du bassin (A) et de la montagne (B) dans la région de Mila, Algérie.	61

Tableau 11	Le nombre en log UFC. mL ⁻¹ des bactéries psychrotrophes dans le lait réfrigéré à 4 °C pendant 10 jours, dans une ferme laitière à Hamala (montagne) dans la région de Mila, Algérie	65
Tableau 12	L'ensemble des souches utilisées dans l'analyse phylogénétique	70
Tableau 13	Matrice de similarité (1 - distance) des souches d' <i>Enterococcus faecalis</i> isolées à partir de lait réfrigéré dans une zone semi-aride d'Algérie et d'isolats d' <i>E. faecalis</i> provenant de lait dans différentes zones géographiques du monde, avec le pays et le climat correspondants du site d'isolement.	73
Tableau 14	Matrice de similarité (1 - distance) des souches d' <i>Enterococcus faecalis</i> isolées à partir de lait réfrigéré dans une zone aride d'Algérie.	76

Liste des abréviations

pH : potentiel hydrogène

UHT : Upérisation à Haute Température

ARNr16S : Acide RiboNucleique ribosomique constituant la petite sous unite 16S des ribosomes

E. coli : *Escherichia coli*

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

UFC : Unité formant Colonie

CSP : Cold Shock Proteins

CAP : Cold Acclimation Proteines

TBC : Totale bacteria count

PBC: Psychrotrophic bacterial count

ADN : Acide Desoxiribo Nucleique

ARN : Acide RiboNucleique

µm : Micromètre

mL : Millilitre

GN : Gélose Nutritive

MRS: Man Rogosa et sharp

FTV : Flore totale Viable

BL : Bactéries lactiques

BS : Bactéries spécifiques

PCR : Polymerase Chain Reaction

ddNTP : didésoxycléoside triphosphate

dNTP : désoxycléoside triphosphate

UV : Ultra- Violet

pb : paire de base

rpm : rotation par minute

NCBI: National Centre for Biotechnology Information

MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis



TABLE DES MATIERES

Liste des Abréviations.....	I
Liste des Tableaux.....	III
Liste des Figures.....	IV
Introduction.....	1

Partie I : Recherche Bibliographique

Chapitre 1. Les Bactéries psychrotrophes dans le lait cru

1.1. Définition.....	5
1.2. Adaptation au froid.....	5
1.3. Impact du développement des psychrotrophes dans le lait.....	7
1.4. La biodiversité psychrotrophique du lait.....	7
1.5. Les bactéries psychrotrophes les plus rencontrées dans le lait.....	9
1.5.1. Le genre <i>Acinetobacter</i>	9
1.5.1.1. Propriétés générales.....	9
1.5.1.2. Taxonomie.....	10
1.5.1.3. Phylogénie.....	10
1.5.2. Le genre <i>Chryseobacterium</i>	11
1.5.2.1. Propriétés générales.....	11
1.5.2.2. Taxonomie.....	12
1.5.2.3. Phylogénie.....	13
1.5.3. Le genre <i>Lactobacillus</i>	14
1.5.3.1. Propriétés générales.....	14
1.5.3.2. Taxonomie.....	14
1.5.3.3. Phylogénie.....	15

1.5.4. Le genre <i>Enterococcus</i>	15
1.5.4.1. Propriétés générales.....	15
1.5.4.2. Taxonomie.....	16
1.5.4.3. Phylogénie.....	16
1.5.5. Le genre <i>Stenotrophomonas</i>	17
1.5.5.1. Propriétés générales.....	17
1.5.5.2. Taxonomie.....	18
1.5.5.3. Phylogénie.....	18
1.6. Autres bactéries psychrotrophes du lait.....	19

Chapitre 2. Dynamique et paramètres de croissance microbienne

2.1. Définition.....	20
2.2. Cinétique de croissance des populations microbiennes.....	20
2.2.1. Description de la cinétique de croissance microbienne.....	20
2.2.2. Paramètres de croissance.....	23
2.3. Modèles de croissance.....	24
2.3.1. Modèles primaires.....	25
2.3.1.1. Modèle exponentiel.....	25
2.3.1.2. Modèle logistique.....	26
2.3.2. Modèles secondaires.....	27
2.4. Dynamiques de la croissance microbienne à froid.....	28

Partie II : Recherche Expérimentale

1. Matériel et Méthodes

1.1. Echantillonnage du lait cru.....	33
1.2. Culture bactérienne.....	35

1.3. Contrôle de l'évolution de la flore microbienne.....	35
1.3. Recherche des bactéries spécifiques.....	37
1.5. Recherche des bactéries lactiques.....	39
1.6. Identification phénotypique des isolats.....	40
1.7. Conservation des souches.....	42
1.7. Identification moléculaire.....	42
1.8. Analyse phylogénétique et dendrogrammes.....	48
2. Résultats et Discussions	
2.1. Identification phénotypique.....	49
2.2. Identification moléculaire.....	55
2.3. Evolution du pH.....	56
2.4. Dynamiques de la croissance microbienne.....	58
2.5. Traitement biomathématique.....	60
2.5.1. Niveau de croissance initiale.....	61
2.5.2. Niveau de croissance maximale.....	62
2.5.3. Phase de latence.....	63
2.6. Evolution des populations bactériennes psychrotrophes dans le lait de montagne..	65
2.7. Analyse phylogénétique et dendrogrammes.....	70
2.8. La phylogénie de l' <i>Enterococcus</i>	72
Conclusion	78
Références	81
Annexe	VII



Introduction

Introduction générale

Le lait et les produits laitiers constituent une composante essentielle de l'alimentation humaine dans de nombreuses régions du monde. Ils jouent un rôle clé dans la nutrition, en santé et dans le développement tout au long de la vie (FAO, 2013; Quigley et al., 2013). Cependant, la teneur en nutriments élevée des laits, qui comprend les protéines, lipides, glucides, vitamines, minéraux et acides aminés essentiels, tous à un pH proche de la neutralité et à une activité de l'eau élevée offrent un environnement physico-chimique propice à la multiplication d'un large éventail de microorganismes, y compris une série d'espèces bactériennes (Mcphee et Griffiths, 2011 ; Quigley et al., 2013). Certains d'entre eux sont utiles, d'autres sont pathogènes pour l'animal et l'homme et d'autres sont responsables d'altération de la qualité sensorielle, organoleptique et nutritionnelle du lait (Oliveira et al., 2015).

Le refroidissement prolongé du lait cru ralentit la croissance microbienne, cependant il favorise le développement des bactéries psychrotrophes, ce fait est devenue une limitation fondamentale pour la durée de vie des produits laitiers (De Jonghe et al., 2011). Le lait fraîchement tiré du pis ne contient souvent pas de populations détectables des bactéries psychrotrophes. Initialement, ils représentent moins de 10 % dans le lait cru réfrigéré, qu'ils évoluent comme les principaux microorganismes constituant plus de 70 à 90 % du microbiote (Decimo et al., 2014). Malgré que ces microorganismes ont des températures de croissance optimales et maximales au-dessus de 15 et 20 °C, respectivement (Oliveira et al., 2015), ils ont la capacité de pousser à basses températures entre 2-7 °C grâce à un enrichissement en acide gras polyinsaturés dans leur membrane. Sous les conditions de croissance à basse température, les bactéries psychrotrophiques synthétisent les phospholipides et lipides neutres contenant des proportions accrues d'acides gras insaturés, ce qui entraîne une réduction du point de fusion des lipides. Ce phénomène sert à maintenir leur fluidité, permettant ainsi la fonctionnalité continue, le transport des soluté, la sécrétion d'enzymes extracellulaires, la fluidité de la membrane et l'activité de transport des métabolites nécessaires à la croissance et reproduction des bactéries à basse température (Samaržija et al., 2012).

Les bactéries psychrotrophes ont la capacité de produire des enzymes hydrolytiques extracellulaires protéases et les lipases qui jouent un rôle dans la détérioration des produits laitiers (Cempírková et Mikulová, 2009). Les lipases sont responsables de la dégradation de la matière grasse du lait associée au développement d'arômes rances et savonneux et parfois d'un goût quelque peu amer en raison de la libération d'acides gras de faible poids moléculaires

(De Jonghe et al., 2011). Les protéases sont liées à l'amertume dans le lait, des rendements réduits de fromage doux et gélification du lait stérilisé UHT (Upérisation à Haute Température). La majorité des protéases peuvent dégrader les caséines; la durée de conservation des produits laitiers est considérablement limitée par les psychrotrophes (Decimo et al., 2014). Habituellement, les bactéries psychrotrophes responsables de la détérioration du lait et des produits laitiers ne sont pas pathogènes. Cependant, certaines espèces sont capables de montrer une résistance aux antimicrobiens et/ou à produire des toxines. Ainsi, ils devraient être considérés comme des agents pathogènes opportunistes pour l'homme (Samaržija et al., 2012).

Différentes populations bactériennes psychrotrophiques ont été isolées à partir du lait cru de vache dans différentes zones géographiques du monde entier. A la fois elles appartiennent à des Gram-négatifs (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Serratia* et *Enterobacter*) et à des Gram-positif (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*) (Rasolofa et al., 2010; Gargouri et al., 2013; Boubendir et al., 2015; Vithanage et al., 2016; Machado et al., 2017). Les bactéries psychrotrophes sont omniprésentes dans la nature, principalement dans l'eau et le sol, y compris la végétation. Un petit nombre des bactéries psychrotrophes peut également être présent dans l'air (Samaržija et al., 2012). La diversité des bactéries psychrotrophes dans différents pays est étroitement associée aux habitats naturels, à l'hygiène et aux pratiques de traite dans les fermes (Yuan et al., 2019). En outre, des changements spécifiques de la composition du lait en relation avec les herbes et les plantes utilisées pour l'alimentation des animaux et le mécanisme d'action des plantes le microbiote du lait et sa dynamique lors de la réfrigération (Coppa et al., 2011). De nombreuses études ont montré les effets bénéfiques des herbes et des épices sur la consommation d'aliments pour animaux, les fonctions immunitaires et la santé, ainsi que sur la fermentation et la productivité du rumen (Boubendir et al., 2016).

La courbe de croissance bactérienne est une représentation de la dynamique des populations microbiennes, une notion fondamentale en microbiologie. Elle permet de comprendre et de suivre l'évolution de ces populations. Elle a des applications dans le domaine de la conservation des aliments, en microbiologie industrielle et dans l'évaluation et le traitement des maladies infectieuses (Tortora et al., 2010). Des changements dynamiques de la flore psychrotrophique dans le lait pendant 24 h de réfrigération (Lafarge et al., 2004) et dans du lait provenant de différentes origines géographiques (Franciosi et al., 2011) ont été examinés. Vyletřlova et al. (2000) évalua la dynamique de la croissance microbienne des

mésophiles et psychrotrophes dans le lait cru de vache à différents moments de stockage et de températures. Gargouri et al. (2013) a confirmé que le comportement de dynamique des bactéries psychrotrophes dans le lait cru conserver à 4 °C était lié au temps de stockage et à la valeur de contamination initiale. Des relations intéressantes ont été élucidées entre l'origine géographique du lait et la diversité génétique et l'activité antimicrobienne, suggérant la corrélation profonde entre la région géographique et certaines conduites génotypiques et métaboliques du microbiote laitier (Silvetti et al., 2014).

La procédure d'amplification directe et le séquençage des gènes ARNr16S de l'environnement a révolutionné l'écologie microbienne et a définitivement changé la façon de l'étude des procaryotes dans l'environnement (Rajwar et Sahgal, 2016). Le séquençage des gènes de l'ARNr16S permet l'identification des espèces ou du niveau sous-espèce en raison de la présence de régions divergentes dans ce gène parmi de nombreuses bactéries, tandis que la catégorisation des bactéries au sein de la même espèce est autorisée par les régions conservées (Janda et Abbott, 2007). Les gènes d'ARNr16s pourraient identifier un organisme en reconstruisant sa phylogénie, ainsi que la possibilité de stocker des séquences dans des bases de données, ce qui entraîne le rapide adoption du gène de l'ARNr16S par microbiologiste (Rajwar et Sahgal, 2016). L'analyse phylogénétique basée sur le gène de l'ARNr16S est universellement utilisée et représente l'outil le plus important pour l'étude de l'évolution bactérienne et de l'écologie. Cette analyse est adoptée pour la détermination de la diversité bactérienne dans l'environnement, la mise en place d'une liaison phylogénétique des genres bactériens et de l'évaluation de l'abondance relative de taxa, aussi elle permet de déduire la relation évolutive entre les espèces. Cai et al., 2012; Vetrovsky et al., 2013).

La majeure partie des études sur le consortium microbien du lait réfrigéré ont été menées sur le lait produit par des vaches élevées dans les régions tempérés et humides (Rasolofo et al., 2010). Reste que les données sur la dynamique de la croissance microbienne et la biodiversité bactérienne du lait réfrigéré utilisant l'analyse phylogénétique est manquante dans le monde particulièrement en Algérie.

Dans ce contexte, les objectifs principaux du présent travail sont :

Objectif 1 : Evaluation de la dynamique de la croissance microbienne durant toute la durée de réfrigération du lait dans deux fermes laitières de la région de Mila en Algérie. Pour cela, le travail a été conduit selon les étapes suivantes :

- Récolte des échantillons de lait cru dans deux fermes laitières, une dans le bassin et l'autre dans la montagne de la région de Mila.
- Stockage à froid des échantillons et prélèvement à des intervalles de temps réguliers.
- Analyse de l'évolution de la flore totale viable.
- Etude des caractères culturels et de la morphologie coloniale.
- Etude des caractères microscopique par examen à l'état frais et coloration de Gram.
- Isolement et caractérisation phénotypique de quelques genres bactériens pathogènes ou responsables d'altération.
- Construction des courbes des cinétiques de croissance microbienne, analyse des paramètres de croissance microbienne et utilisation d'un modèle biomathématique pour l'expression et la description de l'évolution de la flore microbienne.

Objectif 2 : Exploration de la diversité des bactéries psychrotrophes du lait cru et détermination des relations évolutives entre les taxons sur la base du gène de l'ARNr16S. L'approche expérimentale proposée pour la réalisation de cette partie comporte globalement les étapes suivantes :

- Identification moléculaires de quelques isolats bactériens par séquençage partielle du gène de l'ARNr16S et traitement bioinformatique des séquences nucléiques.
- Alignement multiple, calcul des distances évolutives et construction de l'arbre phylogénétique.

Pour supporter ce travail expérimental une littérature faite essentiellement de deux chapitres a été développée. Le premier chapitre sur les bactéries psychrotrophes dans le lait dans éclairc sur la définition des bactéries psychrotrophes, leurs mécanismes d'adaptation au froid, aussi l'impact du développement de ces groupes dans le lait comme, de plus la biodiversité psychrotrophique du lait spécialement celle des bactéries psychrotrophes les plus rencontrées dans le lait à savoir leurs propriétés générales, taxonomie et phylogénie. Le deuxième sur la dynamique et les paramètres de croissance microbienne comprend une définition de la croissance, description de la cinétique de croissance microbienne, explication des paramètres de croissance, les modèles de croissance utilisés et enfin dynamiques de la croissance microbienne à froid.



Partie I :
Recherche
Bibliographique



Chapitre I

1. Les Bactéries psychrotrophes dans le lait cru

1.1. Définition

Le lait cru fournit un environnement physico-chimique propice à la multiplication d'un large éventail de micro-organismes, y compris une série d'espèces bactériennes psychrotrophes (principalement *Pseudomonas*) qui contaminent le lait lors de la collecte et / ou de la transformation (McPhee et Griffiths, 2011). La conservation au froid du lait dans les fermes minimise la croissance de la microflore mésophile, cependant les basses températures favorisent la croissance de la microflore psychrotrophique dans le lait (Mankai et al., 2012). Le terme psychrotrophes (également dénommé psychrotolérants) fait référence aux micro-organismes qui ont la capacité de se développer à de basses températures mais qui ont des températures de croissance optimales et maximales supérieures à 15 et 20 °C, respectivement (Oliveira et al., 2015). Les bactéries psychrotrophes sont omniprésentes dans la nature, principalement dans l'eau et le sol, y compris la végétation. Un petit nombre de bactéries psychrotrophes peuvent également être présentes dans l'air.

Leur activité métabolique optimale s'exprime à des températures comprises entre 20 et 30 °C. Cependant, ils peuvent croître et se multiplier à basse température grâce à un enrichissement en acide gras polyinsaturés dans leurs lipides membranaires. En d'autres termes, la membrane cellulaire altérée assure une perméabilité suffisante pour la fluidité membranaire et l'activité de transport des métabolites nécessaires, ce qui permet la préservation de la croissance et à la reproduction des bactéries à basse température (Samaržija et al., 2012).

1.2. Adaptation au froid

Les températures influencent les taux de croissance bactérienne, en affectant la conformation des macromolécules cellulaires et d'autres constituants, déterminent ainsi les taux de réactions enzymatiques cellulaires cruciales pour la viabilité (Fonseca et al., 2011). Par conséquent, l'adaptation de la cellule aux basses températures nécessite des enzymes qui sont actifs dans cet état (Chattopadhyay, 2006). Dans des conditions de croissance à basse température, les bactéries psychrotrophes synthétisent des phospholipides et des lipides neutres contenant des proportions accrues d'acides gras insaturés, entraînant une réduction du point de fusion des lipides. Ce phénomène sert à maintenir la fonctionnalité du transport de soluté, la sécrétion des enzymes extracellulaires et la fluidité de la membrane (Jay, 2005). Chez *E. coli* et *B. subtilis* deux grandes familles de protéines sont synthétisée durant

l'adaptation. Protéines de classe I, appelées « Cold Shock Proteins » ou CSP se déroule immédiatement après la chute de température, il s'agit d'une réponse rapide et aigüe au cours de laquelle se déroule une synthèse massive. Protéines de classe II appelées « Cold Acclimation Proteins » ou CAPs. Ces protéines CAP, qui sont synthétisées progressivement jusqu'à atteindre un niveau modéré, sont déjà présentes à 37°C, alors que les CSP sont indétectables (Beckering et al., 2002; Phadtare, 2004).

En effet, l'analyse transcriptomique de *Pseudomonas putida* (souche KT2440) a révélé que l'expression d'au moins 266 gènes (près de 5% du génome) a été « modifiée pendant la croissance à basse température par rapport aux cellules cultivées à 30 °C. Plusieurs de ces changements semblaient être orientés vers la neutralisation des problèmes créés telles que l'augmentation du repliement des protéines, l'augmentation de stabilité des structures secondaires ADN/ARN, mémoire réduite, la fluidité de la membrane et les taux de croissance réduits (Fonseca et al., 2011).

Les microorganismes psychrophiles se développent plus rapidement à une température de 15 °C ou moins, mais sont incapables de croître au-dessus de 20 °C (Figure 1). Alors que les microorganismes psychrophiles sont adaptés pour la croissance aux basses températures près du point de congélation de l'eau (Shivaji et al., 2011).

En général, les microorganismes psychrophiles ont un rendement de croissance et une activité microbienne plus élevés à basse température par rapport à une température proche de la température maximale de croissance, plus souvent expliqué par une adaptation microbienne réussie à l'environnement froid naturel (Prasad et al., 2014).

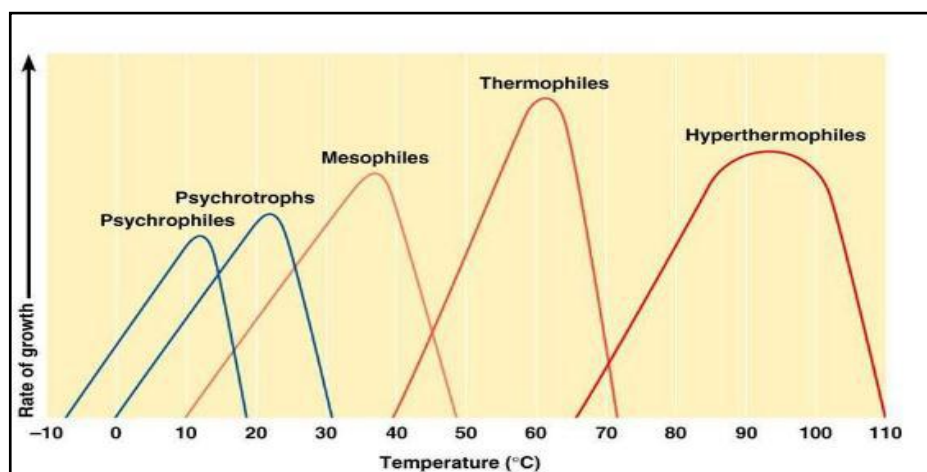


Figure 1. Taux de croissance des bactéries psychrotrophes en fonction de la température en comparaison avec d'autres types bactériens (Lemarchand et Desbiens, 2009).

1.3. Impact du développement des psychrotrophes dans le lait

Lors de la réfrigération du lait cru les populations bactériennes psychrotrophes dominent la microflore, et leurs enzymes extracellulaires, essentiellement des protéases, lipases et phospholipases (Bornert, 2000), contribuent à l'altération des produits laitiers (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007; Cempírková et Mikulová, 2009; Boubendir et al., 2011; Oliveira et al., 2015). Plusieurs de ces enzymes sont capables de conserver leur activité entre 60-70% après pasteurisation et 30-40% après stérilisation du lait. Les protéinases des bactéries psychrotrophes déstabilisent la caséine par hydrolyse, et le résultat de formation d'une structure de gel ou la coagulation du lait stérilisé pendant le stockage. Dans la fabrication du fromage, les protéinases (qui ne sont pas extraites par le lactosérum) entraînent une perte de rendement importante. En outre, la protéolyse causée par des bactéries psychrotrophes a un effet négatif sur la saveur des produits, qui a été décrite comme amère, étrangère, impure, fruitée, levure ou métallique (Samaržija et al., 2012). Les lipases, en hydrolysant les triglycérides, provoquent des défauts de goût associés à la dégradation des graisses dans la crème, le beurre, le fromage et les produits UHT (De Jonghe et al., 2011). La majorité des bactéries psychrotrophes qui provoquent la détérioration du lait et des produits laitiers ne sont pas pathogènes. Cependant, certaines espèces de ces bactéries ont la capacité de produire des toxines et / ou montrent une résistance aux antibiotiques et elles doivent être donc considérées comme des pathogènes opportunistes humains (Samaržija et al., 2012).

1.4. La biodiversité psychrotrophique du lait

Plusieurs études ont été menées pour caractériser le microbiote psychrotrophique dans le lait et identifier les microorganismes prédominants après stockage à froid (Dogan et Boor, 2003; Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007; Ercolini et al., 2009; Marchand et al., 2009; Rasolofo et al., 2010; Raats et autres 2011). Les bactéries psychrotrophes isolées du lait appartiennent aux genres Gram négatif (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, and *Flavobacterium*) et Gram positif (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Lactobacillus*) et sont classées taxonomiquement en sept classes. Les gammaprotobactéries, les bacilles et les actinobactéries sont les classes dominantes contenant entre 19 et 21 espèces, tandis que les alphaprotobactéries, les bêtaprotéobactéries, les flavobactéries et les sphingobactéries sont les quatre classes les moins importantes (Hantsis Zacharov et Halpern, 2007). Certains genres ont été détectés moins fréquemment dans le lait cru comme *Kocuria* (Lafarge et al., 2004) et *Facklamia* (Rasolofo et al., 2010).

Le nombre des psychrotrophes constitue environ 10% du nombre total d'aérobies mésophiles immédiatement après la traite effectuées dans des conditions hygiéniques, et peuvent atteindre une moyenne de 90% après stockage à froid (Decimo, 2012). Rasolofo et al. (2010) ont notés que la biodiversité du microbiote de lait cru diminue au cours de la période de conservation à froid jusqu'à ce que le microbiote psychrotrophe soit dominant (Tableau 1) Cependant, ce groupe de bactéries qui aiment le froid peuvent représenter plus de 75% du microbiote de lait cru lorsqu'il est collecté dans des mauvaises conditions d'hygiène (Hantis-Zacharov et Halpern, 2007; Malacarne et al., 2013).

Tableau1. Groupes bactériens prédominants trouvés dans le lait cru après le stockage à froid dans différents pays en utilisant des méthodes de culture dépendante et indépendante

Pays	Méthodes dépendantes de la culture	Conditions de stockage	Références
Canada	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus equorum</i> <i>Facklamia tabacinasalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus uberis</i>	4 °C / 3 jours	Rasolofo et al. (2010)
France	<i>L. lactis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2- 4 °C / 24- 48 h	Mallet et al. (2012)
Algérie	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Chryseobacterium indologenes</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	4 °C / 7 jours 4 °C / 10 jours 4 °C / 21 jours	Boubendir et al. (2016)

	<i>Acinetobacter guillouiae</i>		
Australie	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus weihenstephanensis</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Hafnia</i> <i>Bacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Microbacterium</i>	2 °C / 10 jours 4-10 °C / 10 jours	Vithanage et al. (2016)
Brésil	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterobacter kobei</i> <i>Aerococcus urinaeequi</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Kurthia gibsonii</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> <i>Streptococcus parauberis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Serratia ureilytica</i>	7 °C / 10 jours	Ribeiro Júnior et al. (2018)

1.5. Les bactéries psychrotrophes les plus rencontrées dans le lait

1.5.1. Le genre *Acinetobacter*

1.5.1.1. Propriétés générales

Les cellules d'*Acinetobacter* sont des bâtonnets courts à Gram négatif (coccobacilles), mesurant 1,0-1,5 sur 1,5-2,5 microns pendant la croissance; ils deviennent souvent plus coccoïdes pendant la phase stationnaire. Les cellules se trouvent par paires ou en petits

groupes; les groupes forment des colonies lisses et pâles sur des milieux solides. Toutes les espèces sont strictement aérobies, catalase positive et oxydase négative. Ces bactéries peuvent utiliser une sélection variée de matières organiques comme sources de carbone (Visca et al., 2011).

Acinetobacter est parmi les genres le plus dominants dans le lait cru et les espèces appartenant à ce genre sont omniprésentes dans la nature et caractérisées par leur tendance à tolérer le séchage et la poly chimiothérapie (Gurung et al., 2013). Ces caractéristiques permettent à ces organismes de survivre et de mieux se propager dans n'importe quel environnement, comme les boues, les hôpitaux et autres lieux. Certaines espèces d'*Acinetobacter* sont également psychrotolérantes, leur apparition fut démontrée à basse température dans les habitats tels que les légumes surgelés et les produits de la pêche ou du lait cru réfrigéré (Vaz-Moreira et al., 2011).

Les espèces appartenant à *Acinetobacter* ont déjà été signalé être hautement lipolytiques mais moins protéolytiques (Vithanage et al., 2016). Aussi, une forte prévalence d'isolats appartenant à *Acinetobacter* dans le lait cru a été signalée avec la prévalence de traits de résistance aux antimicrobiens (Gurung et al., 2013).

1.5.1.2. Taxonomie

Le genre *Acinetobacter* a été créé par Brisou et Prévot (1954) et appartient à la famille de *Moraxellaceae* dans la classe des *Gammaproteobacteria* (Feng et al., 2014).

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	<i>Moraxellaceae</i>
Genre	<i>Acinetobacter</i>
Espèce	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>A. baumannii</i>

1.5.1.3. Phylogénie

Dans l'étude de Vaz-Moreira et al. (2011), la souche G30^T représente une nouvelle espèce, pour laquelle le nom *Acinetobacter rudis*. nov est proposé. La souche G30^T a été isolée dans le nord de Palestine à partir de lait cru, sur une gélose agar dans une étude sur la dynamique

saisonnaire des communautés psychrotolérantes cultivables dans ce produit. Sur la base de la similitude des séquences génétiques de l'ARNr16S, les plus proches voisins des souches G30^T comprenaient les souches types d'*A. venetianus* (96,5%), *A. guillouiae* (96,4%), *A. bereziniae* (96,3%), *A. radioresistens* (96,0%) , *A. junii* (95,8%), *A. baumannii* (95,8%), *A. calcoaceticus* (95,5%), *A. johnsonii* (95,4%) et *A. baylyi* (95,2%) (Figure 2).

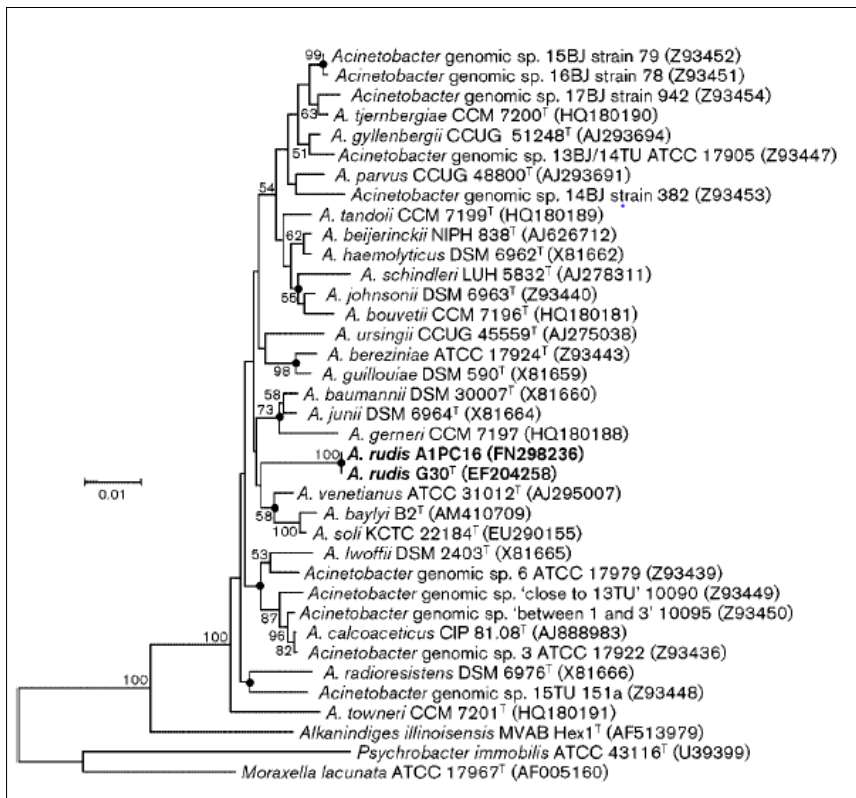


Figure 2. Arbre phylogénétique montrant la diversité du genre *Acinetobacter* (Vaz-Moreira et al., 2011).

1.5.2. Le genre *Chryseobacterium*

1.5.2.1. Propriétés générales

Les cellules de cet organisme sont des bâtonnets Gram-négatifs, non mobiles, non sporulants avec des côtés parallèles et des extrémités arrondies, mesurant typiquement 0,5 µm de large et 1 à 3 µm de long. Les granules intracellulaires de poly-β-hydroxybutyrate sont absents. Les organismes sont aérobies et chimio-organotrophes. Toutes les souches poussent à 30 °C tandis que la plupart des souches poussent à 37 °C. La croissance sur milieu solide est généralement pigmentée (jaune à orange), mais des souches non pigmentées se produisent. Les colonies sont translucides (parfois opaques), circulaires, convexes ou faiblement

convexes, lisses et brillantes, avec des bords entiers. En termes d'activité enzymatique, toutes les espèces sont positives pour la catalase, l'oxydase et la phosphatase et une forte activité protéolytique se produit. Elles sont résistantes à une large gamme d'agents antimicrobiens (Bekker, 2011).

Chryseobacterium (précédemment classée dans *Flavobacterium*) apparaît également comme un membre dominant dans le lait cru réfrigéré. L'espèce *Chryseobacterium indologenes* a été trouvée dans le lait cru réfrigéré, cette espèce est plus généralement considérée comme un habitant habituel des sols et des plantes (Bekker 2011 ; Machado et al., 2017). Il résiste fréquemment à la plupart des agents β -lactamines et démontre une association occasionnelle avec la résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones (Maravic et al., 2013).

1.5.2.2. Taxonomie

Depuis la première description de *Chryseobacterium* par Vandamme et al. (1994), un certain nombre de nouvelles espèces ont été ajoutées. En juin 2019, 112 espèces du genre *Chryseobacterium* avaient été décrites (www.Bacterio.net/chryseobacterium.html), *Chryseobacterium gleum* étant l'espèce type. Les espèces de *Flavobacterium* ont été divisées en quatre groupes naturels de Holmes (1992) dans la deuxième édition Prokaryotes. Le premier groupe (groupe A) comprenait *Flavobacterium balustinum*, *F. breve*, *F. gleum*, *F. indologenes*, *F. indoltheticum* et *F. meningosepticum* (Bekker, 2011). Les études phylogénétiques réalisées par Vandamme et al. (1994) ont indiqué que ces espèces forment un groupe serré, et *Chryseobacterium* a donc été proposé comme nouvelle épithète générique pour ces organismes.

Règne	Bacteria
Embranchement	Bacteroidetes
Classe	Flavobacteria
Ordre	<i>Flavobacteriales</i>
Famille	<i>Flavobacteriaceae</i>
Genre	<i>Chryseobacterium</i>
Espèce	<i>Chryseobacterium indologenes</i>

1.5.2.3. Phylogénie

Dans l'étude de Hantsis-Zacharov et al. (2008) trois souches bactériennes à Gram négatif, en forme de bâtonnet, oxydase positive, aérobies, non mobiles, H9^T, H10 et H15, ont été isolées dans une étude sur la diversité des cultures de bactéries psychrotrophes dans le lait cru de vache. Des comparaisons de séquences du gène de l'ARNr 16S ont montré que les trois souches étaient très proches les unes des autres (99,6 à 99,8% de similitudes de séquence) (Figure 3). Une étude taxinomique polyphasique des isolats a permis de les identifier comme membres du genre *Chryseobacterium* (famille *Flavobacteriaceae*, phylum *Bacteroidetes*). Sur la base de propriétés phénotypiques et phylogénétiques distinctives, les trois isolats de lait représentaient une nouvelle espèce du genre *Chryseobacterium* (Figure 3), pour laquelle le nom *Chryseobacterium bovis*. nov. est proposé.

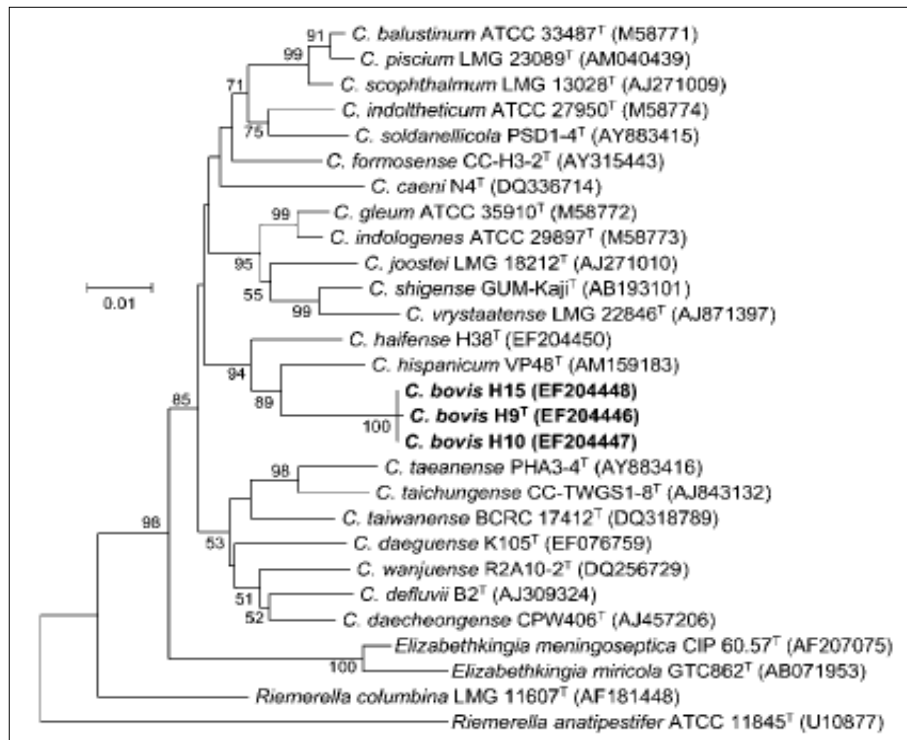


Figure 3. Arbre phylogénétique montrant la diversité du genre *Chryseobacterium* (Hantsis-Zacharov et al., 2008).

1.5.3. Le genre *Lactobacillus*

1.5.3.1. Propriétés générales

Les cellules de cet organisme sont des bâtonnets longs et fins, courts au coccobacilles à Gram positif, groupés en paires ou en chaînes au niveau macroscopiques les colonies des lactobacilles sont généralement de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques, toutes les espèces sont négatives pour la catalase et l'oxydase (Guiraud et al., 2004; Denis et al., 2007).

Le genre *Lactobacillus* est très diversifié, selon les estimations les plus récentes, il comprend 174 espèces différentes et 27 sous-espèces (www.bacterio.cict.fr). Les lactobacilles peuvent être trouvés dans des niches riches en glucides, y compris celles associées aux plantes, aux animaux, à l'ensilage et au lait cru (Bernardeau et al., 2008). Selon Lafarge et al. (2004), *L. lactis* était l'espèce la plus fréquemment détectée dans les échantillons de lait cru français. Les espèces appartenant à *Lactobacillus* ont déjà été signalées être hautement protéolytique (Marroki et al., 2011). Ces bactéries peuvent également sécréter certaines molécules antimicrobiennes, comme l'éthanol, d'acide gras, peroxyde d'hydrogène et de bactériocines pour exercer l'activité antimicrobienne (Chen et al., 2019), cet effet peut avoir un potentiel applications via l'utilisation des souches de *Lactobacillus* comme cultures de départ dans les aliments fermentés ou comme conservateurs alimentaires (Chen et al., 2019).

1.5.3.2. Taxonomie

Le genre *Lactobacillus* appartient au phylum Firmicutes, classe des bacilles, ordre des *Lactobacillales*, famille des *Lactobacillaceae* (Garrity et al., 2004)

Règne	Bacteria
Embranchement	Firmicutes
Classe	Bacilli
Order	<i>Lactobacillales</i>
Famille	<i>Lactobacillaceae</i>
Genre	<i>Lactobacillus</i>

1.5.3.3. Phylogénie

Dans l'étude de Azizi et al. (2017) dix-neuf *Lactobacillus* ont été isolés du fromage motrice de lait cru iranien. Selon le séquençage des isolats, *Lactobacillus* consistait principalement de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus Casei* et *Lactobacillus Buchneri* avec *Lactobacillus brevis* a montré la population la plus élevée (65%) de *Lactobacillus* isolé dans le fromage motrice du lait cru (Figure 4).

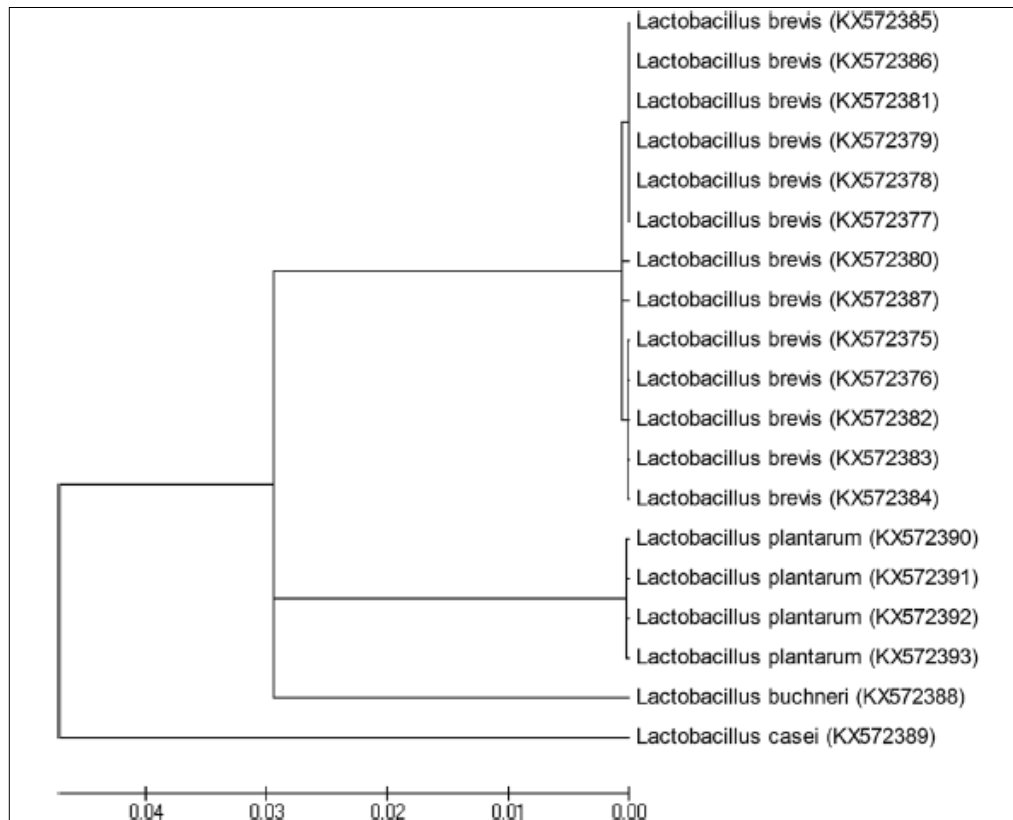


Figure 4. Arbre phylogénétique montrant la diversité du genre *Lactobacillus* (Azizi et al., 2017).

1.5.4. Le genre *Enterococcus*

1.5.4.1. Propriétés générales

Les bactéries appartenant à *Enterococcus* sont à Gram-positive, catalases négative, non sporulées et facultativement anaérobies. Ils poussent de manière optimale à 35 °C, mais tolèrent des températures comprises entre 10 et 45 °C (Bouymajane et al., 2018). Se sont des cocci ovoïdes, isolées en paires ou en chaînes courtes. Les colonies d'entérocoques apparaissent translucides avec un diamètre inférieur à 1 mm, et certaines souches sont β -hémolytiques sur géloses au sang (Švec et al., 2004 ; Benagli et al., 2011). Dans l'étude de Bouymajane et al. (2018), le taux de résistance de l'*Enterococcus* était très élevé pour

l'ampicilline, la streptomycine, la tétracycline, l'érythromycine et la ciprofloxacine et modéré pour la pénicilline.

Les entérocoques sont présents dans les légumes, matières végétales et denrées alimentaires, en particulier d'origine animale comme les produits laitiers (Morandi et al., 2012). En Turquie, Citak et al. (2005) ont montré qu' *E. faecalis* était le principal *Enterococcus* dans le lait cru. Giannino et al. (2009) ont enregistré la présence d' *E. faecalis*, *E. faecium* dans le lait cru. *Enterococcus* est reconnu pour prolonger la durée de conservation et améliorer la sécurité sanitaire des aliments car il produit des substances antimicrobiennes, par exemple l'acide lactique, les bactériocines (entérocoques) et le peroxyde d'hydrogène. Les bactériocines suscitent une grande attention en étant couramment actives contre de nombreux pathogènes d'origine alimentaire à Gram positif tels que *Clostridium botulinum*, *L. monocytogenes* et *S. aureus* (Fortina et al., 2004; Morandi et al., 2012).

1.5.4.2. Taxonomie

Le genre *Enterococcus* appartient au phylum Firmicutes, classe des bacilles ordre Lactobacillales, famille *Enterococcaceae* (Euzéby, 2008).

Règne	Bacteria
Embranchement	Firmicutes
Classe	Bacilli
Order	Lactobacillales
Famille	<i>Enterococcaceae</i>
Genre	<i>Enterococcus</i>
Espèce	<i>Enterococcus faecalis</i>

1.5.4.3. Phylogénie

En Belgique trois souches *Enterococcus* ont été isolées à partir des produits laitiers. Les séquences complètes déterminées des trois isolats laitiers ont révélé des similitudes supérieures à 99,9%. La comparaison avec les séquences déposées disponibles dans GenBank / EMBL a classé les souches du genre *Enterococcus* avec les plus proches voisins *E. sulfurous* et *E. saccharolyticus* (similitudes de séquence de 98,6 et 98,0%, respectivement) (Figure 5). Ces derniers taxons de référence et les isolats laitiers constituaient une branche distincte dans l'arbre phylogénétique (Vancanneyt et al., 2004).

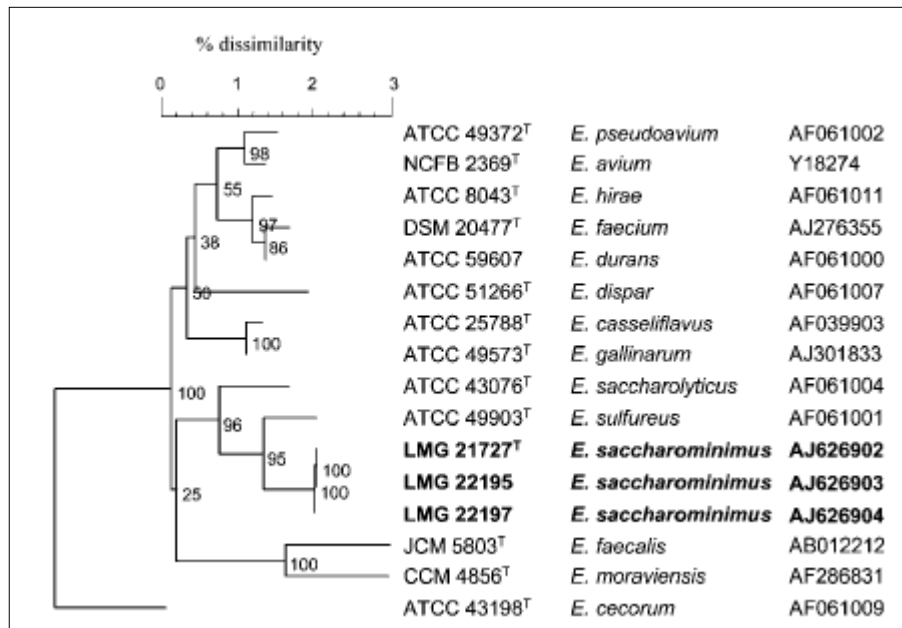


Figure 5. Arbre phylogénétique montrant la diversité du genre d'*Enterococcus* (Vancanneyt et al., 2004).

1.5.6. Le genre *Stenotrophomonas*

1.5.6.1. Propriétés générales

Les cellules sont des bacilles à Gram négatif, non fermentaire, aérobie strict, oxydase et catalase positives (Looney et al., 2009). Les espèces du genre *Stenotrophomonas* sont les habitants communs d'une grande variété des milieux naturels et artificiels dans divers régions géographiques. En particulier, les souches des espèces *Stenotrophomonas* ont été isolées du sol et de la rhizosphère. En général, *Stenotrophomonas* sont également connus pour présenter une résistance aux métabolites antimicrobiens des plantes (Ryan et al., 2009; Alavi et al., 2014). De plus, il est intéressant de noter que *S. rhizophila* possède des gènes uniques essentiels pour une tolérance élevée à la salinité et est un promoteur de croissance des plantes dans les sols très salés (Alavi et al., 2014). En Algérie, Boubendir et al. (2016) ont montré que *Stenotrophomonas rhizophila*, *S. maltophilia* étaient des espèces prédominantes au cours des 7 premiers jours de stockage au froid du lait cru. De Jonghe et al., (2011) ont isolé *Stenotrophomonas* seulement au début de la réfrigération du lait cru.

1.5.6.2. Taxonomie

Le genre *Stenotrophomonas* membre de la famille *Xanthomonadaceae* (Palleroni et Bradbury 1993) appartient à la classe des Gammaproteobacteria (Yang et al., 2006). Il est phylogénétiquement placé dans la sous-classe λ des Proteobacteria (Moore et al., 1997). *Stenotrophomonas maltophilia*, anciennement appelée *Pseudomonas maltophilia* et *Xanthomonas maltophilia* (Yang et al., 2006).

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Order	Xanthomonadales
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Stenotrophomonas</i>
Espèce	<i>S. maltophilia</i>

1.5.6.3. Phylogénie

Dans l'étude de Weber et al. (2018) cinq isolats Gram-négatifs, en forme de bâtonnet, ne formant pas de spores ont été obtenus à partir de biofilms sur différents sites d'une machine à traire en Allemagne, représentées par la souche M15^T (*S. maltophilia*' LMG 10879) et WS40^T (*S. maltophilia*' LMG 29892). Elles étaient soumises à la base de données GenBank à NCBI. Les séquences du gène de l'ARNr 16S presque complètes de M15^T (1475 pb) et WS40^T (1479 pb) présentaient la plus grande similitude avec la souche type *S. maltophilia* NCTC10257^T (Figure 6).

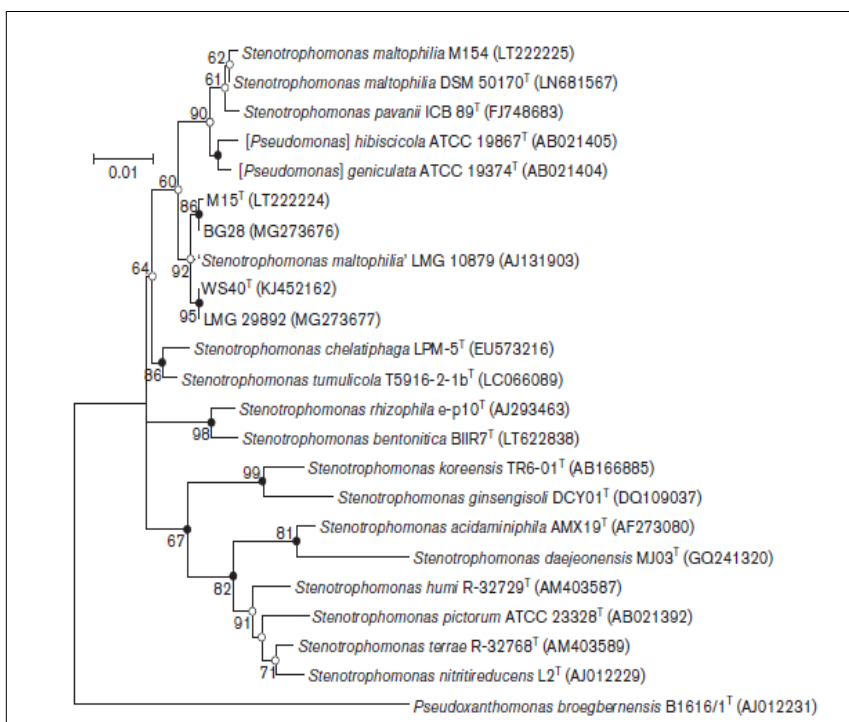


Figure 6. Arbre phylogénétique montrant la diversité du genre *Stenotrophomonas* (Weber et al., 2018)

1.6. Autres bactéries psychrotrophes

Le Tableau 2 montre d'autres bactéries isolées à partir du lait cru refroidi dans différents études menées dans le monde.

Tableau 2. Autres bactéries psychrotrophes du lait cru réfrigéré

Bactéries à Gram négatif	Bactéries à Gram positif	Références
<i>Serratia</i>	<i>Kocuria</i>	Lafarge et al., 2004
<i>Pseudomonas</i>	<i>Facklamia</i>	Rasolf et al., 2010
<i>Alcaligenes</i>	<i>Clostridium</i>	Raats et al., 2011
<i>Hafnia</i>	<i>Staphylococcus</i>	Quigley et al., 2013
<i>Acinetobacter</i>	<i>Microbacterium</i>	Oliveira et al., 2015
<i>Achromobacter</i>	<i>Corynebacterium</i>	Vithanage et al., 2016



Chapitre II

2. Dynamique et paramètres de croissance microbienne

2.1. Définition

La croissance bactérienne peut être définie comme une augmentation du nombre de cellules dans une population. Une augmentation du nombre de cellules se produit quand la cellule se divise pour devenir deux, deux cellules se divisent pour devenir quatre, etc. Au cours de cette division tous les composants structurels des cellules sont doublés. Le temps nécessaire pour doubler la population microbienne est connu comme le temps de génération ou le temps de doublement. Le temps de génération varie avec l'espèce considérée et les conditions de culture. La croissance exponentielle se produit lorsque le nombre de cellules double au cours d'une période d'intervalle régulière (Madigan et Martinko, 2006).

Selon Guezlane-tebibel et al. (2010) la croissance se définit comme l'accroissement ordonné de tous les composants d'un organisme, c'est un phénomène de grand intérêt biologique, dont l'importance écologique et pratique est considérable. Elle peut être étudiée sur milieu solide ou en milieu liquide. Lorsqu'un microorganisme isolé est déposé à la surface d'un milieu solide, sa multiplication donne naissance à une colonie microbienne qui se développe en générale en l'espace de 24h (Guezlane-tebibel et al., 2010).

2.2. Cinétique de croissance des populations microbiennes

2.2.1. Description de la cinétique de croissance microbienne

Depuis la première description de Buchanan (1918), il est classique de distinguer plusieurs phases dans la croissance des cultures bactériennes. Ces phases sont caractérisées par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication de la culture. On reconnaît classiquement les sept phases successives suivantes (Figure 7) :

- **la phase stationnaire initiale ou phase de latence (λ).** Elle est caractérisée par une vitesse de multiplication nulle ($\mu = 0$). Lorsqu'une population microbienne se trouve placée dans un milieu favorable, la croissance ne débute pas immédiatement mais seulement après une phase de latence de durée variable (Prescott et al., 2003). Cette phase correspond à une période d'adaptation de l'inoculum (N_0) à son nouvel environnement de croissance. La nature du milieu, l'état physiologique des cellules, la taille de l'inoculum se sont des facteurs qui influent sur la durée de cette période (Delhalle et al., 2012).

- **la phase d'accélération** (μ augmente) ou la phase d'augmentation de la vitesse de croissance qui passe plus ou moins rapidement de zéro à sa valeur maximale, au cours de laquelle la multiplication cellulaire démarre avec une vitesse spécifique de croissance de plus en plus grande (Guiraud, 2003). Cette phase est considérée par certains auteurs comme faisant partie de la phase de latence. Les bactéries commencent à se multiplier pour atteindre progressivement la vitesse maximum de croissance (μ_{max}) ($0 < \mu < \mu_{max}$), pendant la quelle le métabolisme cellulaire reprend et la croissance démarre (Augustin et Garry, 2005).
- **la phase de croissance à vitesse constante maximale ou phase de croissance exponentielle.** Les cellules commencent à se diviser ; elles entrent dans une période de croissance appelée phase de croissance exponentielle (Tortora et al., 2011). Elles se présentent sous la forme d'une portion linéaire lorsque l'on représente l'évolution du logarithme de la concentration bactérienne ou de la biomasse en fonction du temps. Pour une bactérie donnée, la valeur de cette vitesse de croissance maximale dépend des caractéristiques du milieu de culture ; ($\mu = \mu_{max}$), au cours de cette phase toutes les bactéries se trouvent dans leur état physiologique optimal et se multiplient à leur taux de croissance maximum (Augustin et Garry, 2005). C'est la période durant laquelle la reproduction cellulaire est la plus intense, et le temps de génération atteint est constant et à la plus courte durée. Comme le temps de génération est constant pendant cette phase, la représentation logarithmique de la croissance est une droite (Tortora et al., 2010). La croissance exponentielle est une croissance à l'équilibre, tous les constituants cellulaires sont synthétisés à des vitesses constantes les unes par rapport aux autres (Prescott et al., 2003). Pour une bactérie donnée, la valeur de cette vitesse de croissance maximale dépend des caractéristiques du milieu de culture. La physiologie de la croissance bactérienne exponentielle et de la réplication implique plusieurs tours de synthèse d'ADN, couplés à une transcription et la traduction, pour synthétiser les macromolécules nécessaires (Faith et al., 2007).
- **la phase de diminution de la vitesse de croissance (décélération).** Qui graduellement devient nulle; ($\mu_{max} > \mu > 0$) (Delhalle et al., 2012).), elle est due à l'épuisement d'un ou de plusieurs substrats limitants (sucres, acides aminés, etc.), à l'accumulation de produits toxiques (acide lactiques, acide acétiques, peroxydes, etc.) ou simplement à l'abaissement du pH (Augustin et Carlier, 2000).

- **la phase stationnaire** maximale ou plus simplement phase stationnaire qui correspond à un arrêt de la croissance, la culture atteint alors sa densité maximale. Le ralentissement puis l'arrêt de la croissance sont dus à l'épuisement d'une substance nutritive ou à toutes autres modifications des propriétés du milieu de culture le rendant impropre à la croissance des microorganismes; la vitesse de croissance est nulle ($\mu = 0$) et la culture atteint sa densité maximale ($X = X_{\max}$) (Delhalle et al., 2012). C'est un état dynamique, durant lequel des cellules meurent et d'autres croissent, partiellement aux dépens des produits issus de la lyse des cellules mortes. Les cellules en phase stationnaire subissent des modifications importantes. Elles sont notablement plus petites que les cellules en phase exponentielle (Paolozzi et al., 2015).
- **la phase de début de décroissance.** Elle correspond à un début de disparition des cellules (Augustin et Carlier, 2000).
- **la phase de décroissance,** au cours de cette dernière phase, les bactéries ne se divisent plus, beaucoup d'entre elles meurent et sont lysées par les enzymes qu'elles libèrent. Le taux de mortalité peut être constant comme le taux de croissance (Guezlane-tebibel et al., 2010). La mort d'une population microbienne, comme sa croissance durant la phase exponentielle, est habituellement logarithmique (une proportion constante de cellules meurt chaque heure), souvent la seule façon de déterminer si une cellule bactérienne est morte, est de l'incuber (Prescott et al., 2003). La phase de décroissance ne se traduit pas toujours par un taux de mortalité d'ordre exponentiel. Dans certains cas, des bactéries survivantes peuvent amorcer une nouvelle phase de multiplication aux dépens des substances libérées par la lyse (c'est la phase cryptique). On parle aussi de phase d'accélération (entre phase de latence et phase stationnaire) où μ augmente, et de phase de ralentissement (entre phase exponentiel et phase stationnaire) où μ diminue (Guezlane-tebibel et al., 2010).

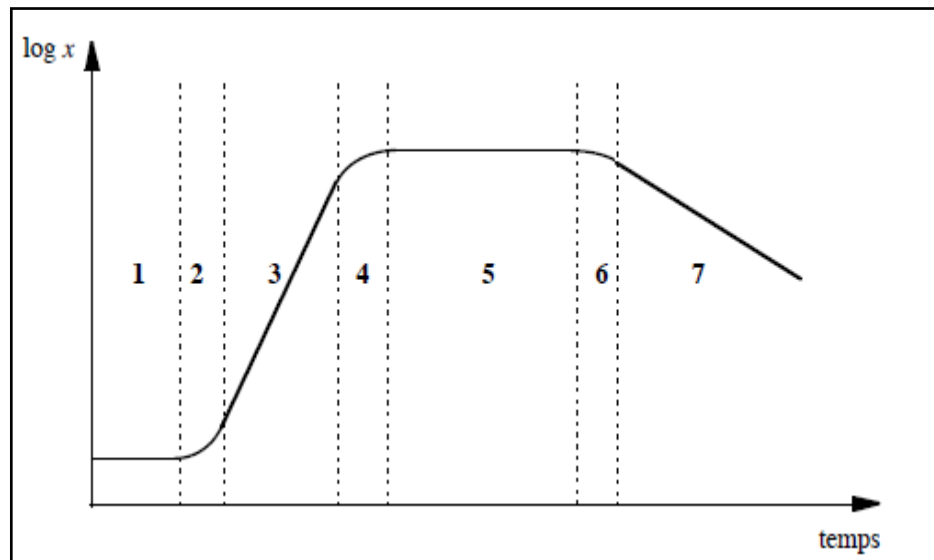


Figure 7. Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases. x représente la densité ou la biomasse de la culture. Les phases sont : (1) phase stationnaire initiale ou de latence, (2) phase d'accélération de la croissance, (3) phase de croissance à vitesse constante, (4) phase de ralentissement de la croissance, (5) phase stationnaire maximale, (6) et (7) phases de décroissance (Augustin, 2005).

2.2.2. Paramètres de croissance

Les microbiologistes divisent traditionnellement les courbes de croissance bactérienne en phases de latence suivie d'une phase exponentielle puis d'une phase stationnaire (Baranyi et Pin, 1999). Les microbiologistes utilisent classiquement les paramètres suivants pour caractériser ces différentes phases : la densité cellulaire initiale (X_0), le temps de latence (λ), la vitesse de multiplication maximale (μ_{\max}) ou le temps de génération (G) et la densité maximale atteinte (X_{\max}) (Figure 8) (Augustin et Carlier, 2000).

- Le temps de génération G . C'est l'intervalle de temps entre deux divisions successives, $G = t/n$ (Guezlane-Tebibel et al., 2010).
- Le taux de croissance (μ), se définit comme la vitesse spécifique de croissance en (h^{-1}). C'est-à-dire la vitesse de croissance (dX/dt) rapportée à l'unité de biomasse (X) (Baranyi et Pin, 1999). On peut l'appeler aussi la vitesse spécifique de croissance (Guiraud, 2003).

On peut définir une relation simple entre le taux de croissance et le temps de génération, soit (Augustin et al., 1999):

$$\mu = \ln 2 / G.$$

- Le temps de latence (λ) est défini par convention comme étant l'intersection de la droite correspondant à la phase exponentielle avec la droite horizontale passant par la concentration initiale X_0 (Baranyi et Pin, 1999).
- La vitesse de multiplication ou taux de croissance (vitesse de croissance par unité de densité) maximum, (μ_{\max}) est la pente correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi logarithmiques) (Baranyi et Pin, 1999).

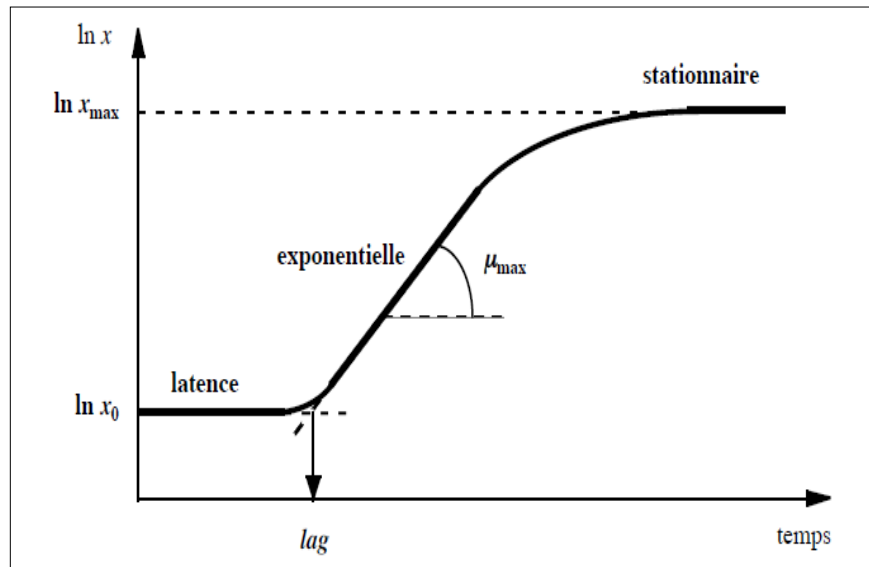


Figure 8. Les principales phases de la courbe de croissance bactérienne et paramètres qui la caractérise: lag est le temps de latence, μ_{\max} est le taux de croissance maximum, X_0 et X_{\max} sont les densités cellulaires initiales et maximales (Delhalle et al., 2012).

2.3. Modèles de croissance

Pour décrire une telle courbe et réduire les données mesurées à un nombre limité de paramètres intéressants, les chercheurs ont besoin de modèles adéquats. Un certain nombre de modèles de croissance sont trouvés dans la littérature, tels que les modèles de Gompertz, Richards, Baranyi, le modèle logistique et d'autres. Ces modèles décrivent le nombre d'organismes (N) ou le logarithme du nombre d'organismes [$\log(N)$] en fonction du temps (Zwietering et al., 1990).

Un modèle est une représentation simplifiée de la réalité facilitant la prédiction ou l'estimation et est exprimé en langage mathématique (Pavé, 1994). En microbiologie, la modélisation consiste en la construction d'un modèle de description de l'évolution d'une population bactérienne. Pour ensuite réaliser des prédictions de ce développement dans de nouvelles conditions environnementales (Mc Meekin et al., 1993).

Des modèles primaires, secondaires et tertiaires sont utilisés pour modéliser le comportement des microorganismes. Le modèle primaire vise à reproduire l'évolution de la concentration en microorganismes au cours du temps dans un environnement donné. Les modèles secondaires permettent de décrire l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres primaires. Les modèles tertiaires utilisent des systèmes experts et des bases de données afin d'établir des relations entre les modèles primaires et secondaires (Whiting et al., 1993).

2.3.1. Modèles primaire

On les distingue en modèles déterministes ou stochastiques. La plupart des modèles utilisés actuellement sont des modèles déterministes. Dans ces modèles, l'évolution du nombre de cellules d'une population microbienne peut être décrite par un ensemble de paramètres, à savoir X_0 , λ , μ_{\max} , X_{\max} . Mais certains modèles tentent également de connecter le comportement des cellules individuelles à celui de toute la population. Ceci conduit aux modèles stochastiques ou probabilistes dans lesquels les paramètres du modèle sont des variables des distributions aléatoires représentant l'ensemble de la population bactérienne. Cela signifie que les paramètres du modèle font partie d'une distribution aléatoire pouvant représenter la variabilité biologique entre les cellules individuelles d'une même population (Augustin et Carlier, 2000).

2.3.1.1. Modèle exponentiel

Ce modèle très simple décrit la phase exponentielle, mais ne tient pas compte de la phase de latence ni de la phase stationnaire. Ce modèle ajuste bien la phase de croissance exponentielle, mais il est mal adapté pour décrire les croissances que l'on observe dans la nature et qui sont généralement limitées. Le remplacement du modèle exponentiel est l'emploi du modèle linéaire à trois phases proposé par Buchanan et al. (1997) correspondant au modèle exponentiel avec démarrage et freinage brusque où $N(t)$ correspondant au nombre de cellules au temps t :

$$\begin{aligned} \ln [N(t)] &= \ln(N_0) && \text{si } t \leq \lambda \\ &= \ln(N_0) + \mu(t-\lambda) && \text{si } t > \lambda \\ &= \ln(N_{\max}) && \text{si } N(t) \geq N_{\max} \end{aligned}$$

Le modèle de Buchanan en 3 phases linéaires est utilisé plus récemment dans l'ajustement de données de croissance de *E. coli* O157:H7 (Buchanan et al., 1997). Les modèles non linéaires, basés sur des fonctions sigmoïdes comme le modèle logistique ou de Gompertz, permettent un meilleur ajustement (López et al., 2004).

2.3.1.2. Modèle logistique

Le modèle logistique avec délai de rupture. Il suppose l'absence de croissance durant la phase de latence et de transition entre cette phase et la phase de croissance exponentielle (rupture). Ce modèle comporte quatre paramètres : N_0 , la concentration bactérienne initiale, N_{max} , la concentration bactérienne maximale, μ_{max} , le taux maximal de croissance, et λ , le temps de latence (Rosso et al., 1995).

$$\begin{aligned} \ln[N(t)] &= \ln(N_0) && \text{si } t \leq \lambda \\ &= \ln(N_{max}) - \ln\left[1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0} - 1\right)e^{-\mu(t-\lambda)}\right] && \text{si } t > \lambda \end{aligned}$$

Un modèle de croissance et a été proposé par Baranyi et al. (1993). Il est également un des plus utilisé actuellement. Ce modèle est basé sur une équation différentielle (phase exponentielle) et complété par deux fonctions d'ajustement. La première fonction d'ajustement décrit la phase de transition entre la phase de latence et la phase exponentielle. Ce processus de transition est déterminé par un paramètre additionnel représentant l'état physiologique des bactéries et est caractérisé par une augmentation graduelle d'une valeur comprise entre 0 et 1. La seconde fonction d'ajustement permet de décrire la phase d'inhibition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (Baranyi et al., 1994).

De plus, sa formulation dynamique permet son utilisation directe pour simuler des croissances en conditions environnementales variables dans le temps, utilisation qui a déjà été validée par plusieurs auteurs en conditions thermiques variables. La forme analytique du modèle de Baranyi est décrite ci-après

$$\begin{aligned} \ln N(t) &= \ln(N_0) + \mu A(t) - \ln\left[1 + \frac{e^{\mu A(t)} - 1}{e^{(N_{max} - N_0)}}\right] \\ \text{Ou } A(t) &= t + \frac{\ln(e^{-\mu t} + e^{-\mu \text{lag}}) - e^{-\mu t - \mu \text{lag}}}{\mu} \end{aligned}$$

Le modèle de Baranyi est très utilisé car il donne des résultats satisfaisants lors d'ajustement de modèles sur des données de laboratoire. Le succès de ce modèle peut être expliqué en partie par la mise au point de DMFit, un logiciel gratuit d'ajustement basé sur le modèle primaire de Baranyi disponible sur <http://www.combase.cc/toolbox.html>.

2.3.2. Modèles secondaires

Les modèles secondaires consistent à relier l'effet des facteurs environnementaux pH, la température et de l' a_w sur les paramètres primaires (taux maximal de croissance et au temps de latence). A partir de ce constat deux approches ont été développées :

- la première approche : les modèles polynomiaux décrivent simultanément l'effet de tous les facteurs environnementaux à l'aide de fonctions polynomiales. Ces modèles polynomiaux sont utilisés pour décrire l'évolution du temps de latence ou du taux de croissance en fonction de facteurs tels que la température, le pH, le taux de sel, le taux de nitrite ou d'autres substances inhibitrices (Buchanan et Phillips, 1990). Cependant ces modèles présentent des inconvénients qui limitent leur utilisation à savoir ne sont pas extrapolables en dehors de la plage expérimentale (Baranyi et al., 1996) ce qui les rend donc difficilement utilisables en prévision, l'ajustement des paramètres des modèles nécessite de réaliser de nombreuses expériences (Buchanan et Phillips, 1990).
- la deuxième approche permet de décrire l'effet des facteurs environnementaux pris individuellement contrairement à l'approche précédente L'inconvénient de cette approche est que les interactions entre facteurs écologiques sont négligées sur le domaine de croissance des microorganismes (Delhalle et al., 2012).

Les modèles secondaires sont de la forme :

$$\theta_1 = g(e_i, \theta_2) + \varepsilon_i$$

θ_1 : valeur du paramètre primaire dans l'environnement défini par le vecteur des facteurs environnementaux e_i

g : fonction de régression

θ_2 : vecteur des paramètres secondaires apparaissant dans la fonction de régression

ε : erreur (ou résidu) associée à l'observation.

2.4 Dynamiques de la croissance microbienne à froid.

Les bactéries mésophiles psychrotrophes présentent, aux températures de réfrigération, une courbe de croissance caractérisée par une phase de latence longue, pouvant durer plusieurs jours, et par une pente très faible au cours de la phase de croissance exponentielle, témoignant d'un allongement important du temps de génération. Plus la température est proche de la température limite inférieure de croissance et plus la multiplication est lente. Des écarts très faibles de température peuvent avoir une incidence notable sur l'activité de la flore psychrotrophe. Ainsi, si une température de + 2 °C exerce un effet inhibiteur très net, une activité bactérienne très significative peut être constatée dès + 4 °C (Bornert, 2000).

Cempírková et Mikulová (2009) ont étudiés la contamination d'échantillons en vrac de lait cru de vache par des bactéries lipolytiques psychrotrophes (PLiBC), le nombre total de bactéries psychrotrophes (PBC) et de bactéries mésophiles (TBC) a été surveillée pendant deux ans sur huit fermes laitières. La dynamique de la croissance de ces bactéries a été étudiée expérimentalement dans trois échantillons de lait en vrac sans conservateur et stocké à différentes températures de 4, 6, 5 et 10 °C (Figure 9).

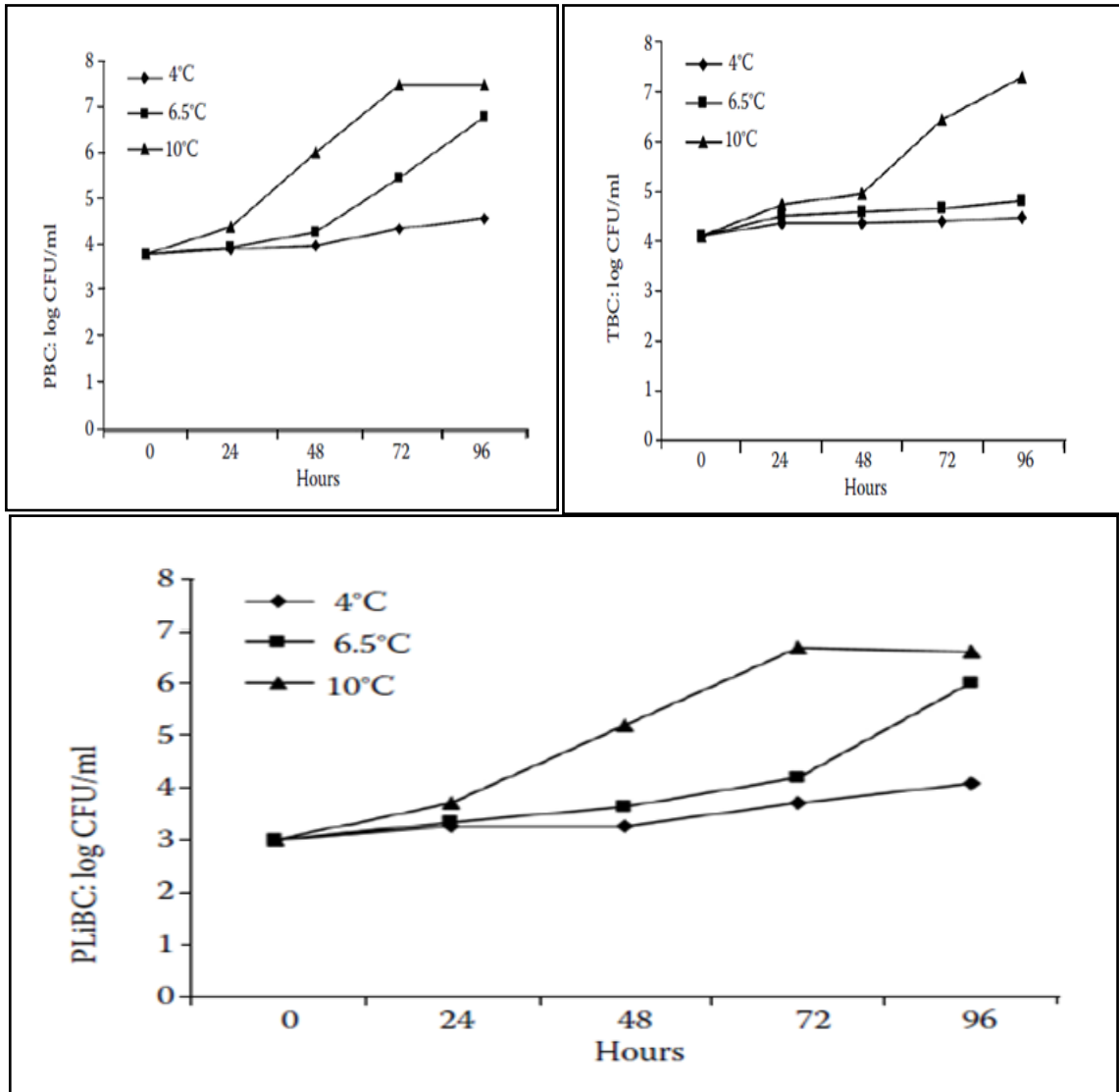


Figure 9. Augmentation de la TBC, PBC et PLiBC liée aux variations de température en Bohême du Sud et de l'Ouest (les points du graphique représentent les logarithmes moyens des valeurs déterminées dans trois échantillons de lait différents). TBC - nombre total de bactéries, PBC - nombre de bactéries psychotropes, PLiBC -bactéries lipolytiques psychotropes (Cempírková et Mikulová, 2009).

Aussi, Gargouri et al. (2013) en Tunisie ont étudiés la dynamique de la PCB (nombre de bactéries psychrotrophes) dans le lait cru de vache stocké à 4 °C durant 72 h (Figure 10).

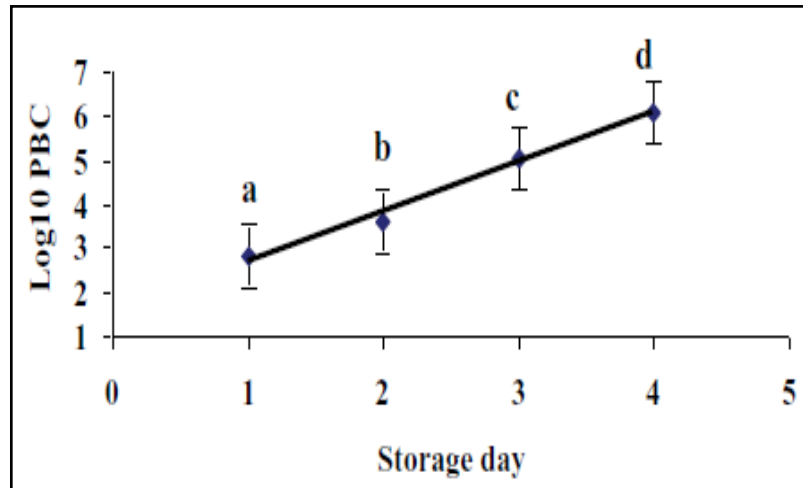


Figure 10 : PBC au jour de l'échantillonnage et pendant le stockage de lait cru du vache stocké à 4 °C en Tunisie (Gargouri et al., 2013).

Boubendir et al. (2016) ont étudiés dans le lait de vache d'une région aride d'Algérie, la diversité des communautés bactériennes de lait cru et l'effet de la réfrigération sur leur dynamique de croissance microbienne (Figure 11).

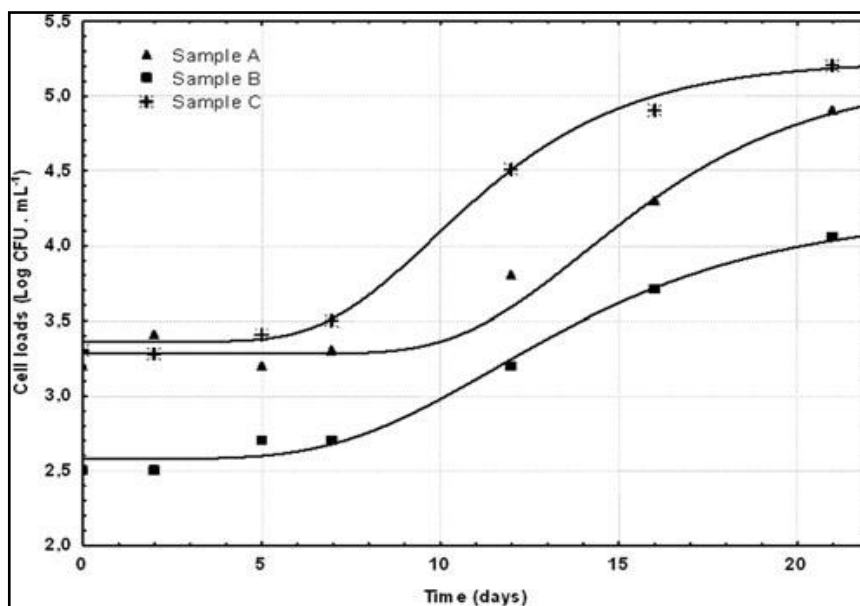


Figure 11. Courbes de croissance obtenues par modélisation avec l'équation de Gompertz du nombre total des cellules de bactéries viables dans des échantillons de lait de 3 vaches pendant 21 jours de stockage à 4 °C (Boubendir et al., 2016).

Les 3 échantillons de lait ont été analysés pendant 21 jours en raison d'une croissance microbienne lente. La charge microbienne initiale des échantillons de lait, variait de 2,5 à 3,5 log UFC . mL⁻¹. Le Tableau 3 rapporte les paramètres Gompertz obtenus.

Tableau 3. Les valeurs prédites des paramètres de croissance microbienne par l'équation de Gompertz obtenus en modélisant les données du dénombrement de la moyenne des bactéries viables totales durant le stockage réfrigéré de trois échantillons de lait (Boubendir et al., 2016).

	μ_{\max}	λ
Echantillon A	0,19	10,50
Echantillon B	0,14	7,10
Echantillon C	0,22	6,74
Moyenne	0,18	8,11

μ_{\max} : la vitesse maximale de croissance (Δ Log UFC . mL⁻¹*jour) λ : le temps de génération (jours).

D'autre part, Vithanage et al. (2017) en Australie ont examiné l'effet de différentes conditions de réfrigération à 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C, 10 °C et 12 °C sur la qualité microbologique du lait cru provenant de trois différentes fermes laitières avec des comptes microbiens initiaux très différents (Figure 12).

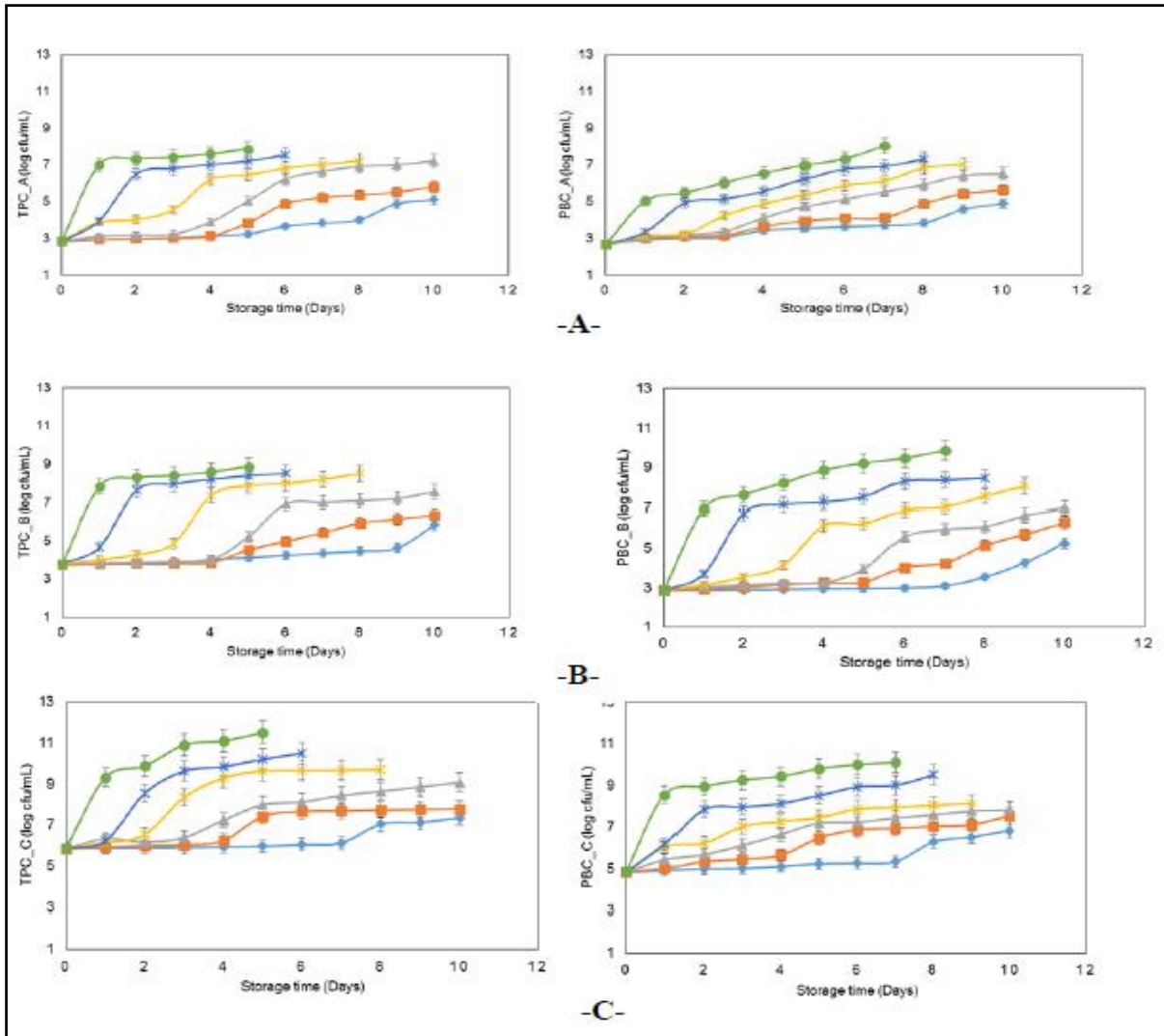


Figure12. Effet de différentes conditions de stockage sur le nombre total de bactéries (TBC) et le nombre de bactéries psychrotrophes (PBC) des échantillons de lait cru A, B et C; stockage à 2°C, 4°C, 6°C, 8°C, 10°C et 12°C (Vithanage et al., 2017).



Partie II :
Recherche
Expérimental



***Matériel
& Méthodes***

1. Matériel et Méthodes

1.1. Echantillonnage du lait cru

Les zones concernées par les prélèvements sont situées dans la wilaya de Mila dans la localité d'El-Kherba ($36^{\circ} 27'N / 6^{\circ} 15'E$) et Hamala ($36^{\circ} 34'18''N / 6^{\circ} 20'24''$) avec une altitude de 598 m et 829 m respectivement (Figure 13). Les deux fermes laitières délivraient le lait deux fois par jour (matin et après midi).

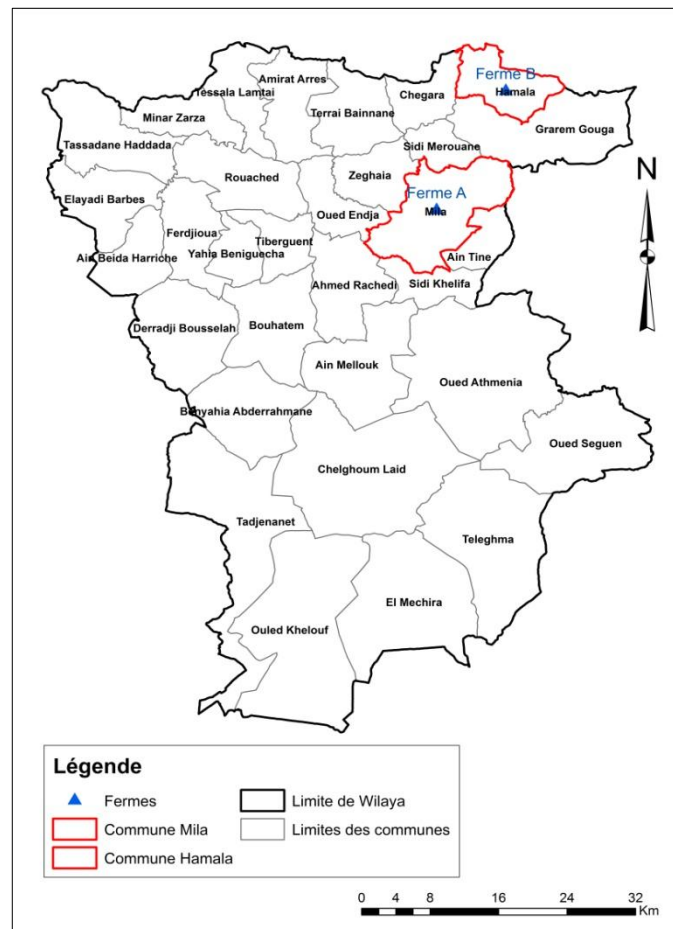


Figure 13. Carte de la wilaya de Mila (Service du cadastre de la wilaya de Mila, modifiée, 2021).

Les vaches prélevées lors de ce travail sont principalement des hybrides issus de croisements entre des bovins laitiers locaux et des vaches importées telles que la Française Frisonne Pie noire et la Montbéliard Pie rouge (Figure 14).



Figure 14. Les vaches laitières prélevées dans l'étude.

Au moment des prélèvements, les vaches laitières ayant fait l'objet de cette étude ne présentaient aucun signe apparent de maladies. Elle n'était pas sous traitement antibiotique, n'étaient pas gestantes et avaient une moyenne d'âge de trois ans.

Les vaches se nourrissaient à l'intérieur principalement d'ensilage, d'orge, d'avoine et de foin dans la ferme de bassin (Ferme A: El-Kherba). Tandis que dans la ferme de montagne (Ferme B: Hamala), les vaches se nourrissent à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de plantes répandues qui poussaient dans l'environnement fermier à savoir le *Thymus*, *Origanum*, *Malva*, *Hibiscus*, *Rosmarinus* et *Olea*. Dans les deux fermes, le revêtement en ciment du sol et des murs est absent, et les vaches sont exposées directement à la terre où se mélangent ensilage et matières fécales. La traite se fait de manière mécanique à l'aide de machines trayeuse pour faciliter et accélérer le processus de traite.

A chaque prélèvement, les extrémités des trayons ont été nettoyées par essuyage à l'aide de serviettes en papier sec et stérile; les premiers jets sont éliminés et 25 mL de lait cru sont collectés directement des quatre pis de chaque vache et transférés dans des flacons stériles. Les échantillons sont transportés au laboratoire à 4 °C dans une glacière.

1.2. Culture bactérienne

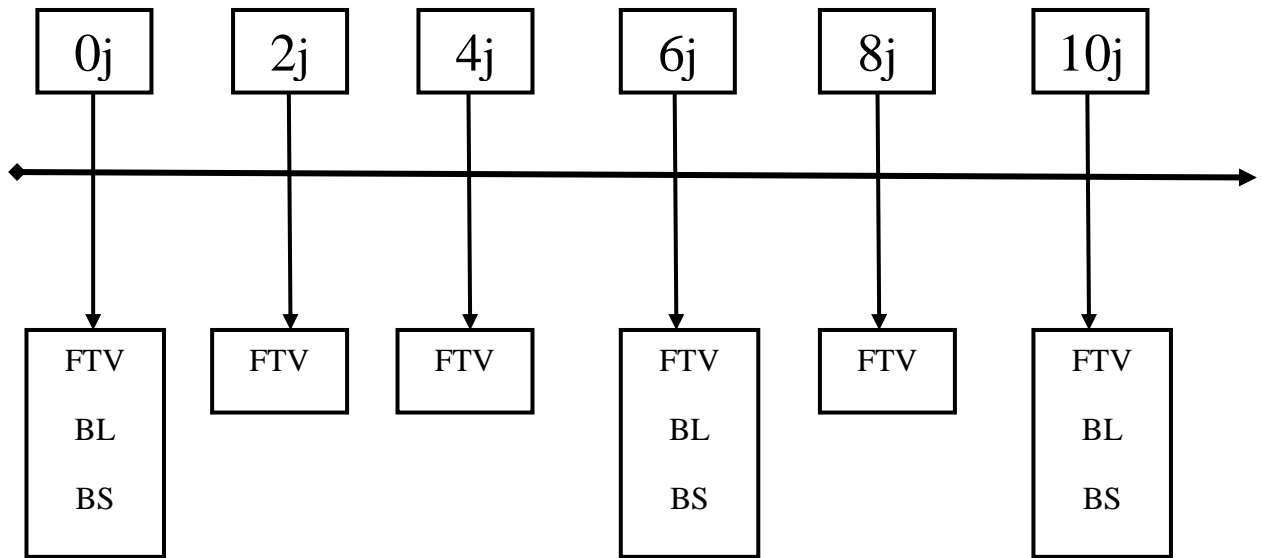
Les milieux de culture employés dans les analyses microbiologiques sont :

- **Gélose nutritive** pour l'évaluation de la flore totale viable. Peser 23 g de la poudre de gélose, dissoudre cette masse dans un volume de 1000 mL d'eau distillée avec agitation sur plaque chauffante agitée. Répartir le milieu dans des flacons en verre et placer directement à l'autoclave pour la stérilisation à une température de 121 °C pendant 10 min.
- **Gélose MRS** (Man Rogosa et Sharpe) pour l'isolement des bactéries lactiques : Pour préparer ce milieu mélanger 55,4g de MRS en poudre avec 15 g d'agar agar dans 1000 mL d'eau distillée. Répartir le milieu dans des flacons en verre et placer directement à l'autoclave pour la stérilisation.
- **Gélose nutritive au sang cuit additionnée de céfazoline**. La céfazoline est un antibiotique appartenant à la famille des céphalosporines de première génération, pour lequel *Listeria*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* et d'autres bactéries sont résistantes. Le sang est additionné lorsque le milieu gélosé est en surfusion. Les flacons sont ensuite portés au bain-marie à 75-80 °C pendant 10 minutes. La gélose nutritive est additionnée de 5 % de sang frais de cheval et d'un volume de l'antibiotique en solution. L'addition de l'antibiotique de cheval se fait au voisinage de 45-50 °C.

1.3. Contrôle de l'évolution de la flore microbienne

Le stockage à froid du lait cru après sa collecte ralentit la croissance microbienne mais favorise la sélection et la domination des populations bactériennes psychrotrophes dans la microflore du lait (De Jonghe et al., 2011). Malgré ces microorganismes ont des températures de croissance optimales et maximales au-dessus de 15 et 20 °C, respectivement (Oliveira et al., 2015), ils ont en fait la capacité de pousser à basses températures, comme 2-7 °C. Cela signifie que, avec le temps, des populations psychrotrophes peuvent se développer dans le lait et leur présence dans le microbiote de lait cru peuvent devenir un sujet de préoccupation. Cette caractéristique donne à ces microorganismes une importance par rapport à l'altération des aliments et la sécurité sanitaire, causant des pertes économiques significatives pour l'industrie alimentaire (Franciosi et al., 2011).

Les cinétiques de croissance microbiennes de la flore totale viable ont été suivies à des intervalles de temps réguliers : 0, 2, 6, 8, 10 jours, tandis que les bactéries lactiques et les bactéries spécifiques ont été suivies durant les jours 0, 6, 10 jours (Figure 15).



j: jour
 FTV : Flore totale Viable
 BL : Bactéries lactiques
 BS: Bactéries spécifiques

Figure 15. Suivi de la cinétique de croissance microbienne durant la réfrigération du lait.

✓ Préparation de la série de dilutions

Les échantillons ont été dilués dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à la dilution 10^{-5} (Guiraud et Rosec, 2004; Dellarras, 2007) :

- Mélanger tendrement le flacon de lait, prélever 1 mL, ajouter à la première dilution 10^{-1} et homogénéiser quelques secondes au vortex.
- Prendre 1 mL de la dilution 10^{-1} , ajouter à la 10^{-2} et reprendre les mêmes actions jusqu'à la dilution 10^{-5} .

✓ Coulage des boîtes et incubation

- Préparer une série de 03 boîtes de Pétri pour chaque série de dilution (3 répétitions).
- Prélever 1 mL de la dilution, déposer au centre de la boîte, ensuite couler tendrement en masse la gélose (refroidie à 45°C), éviter de couler la gélose directement sur la goutte de l'échantillon à fin de ne pas tuer les microorganismes.
- Faire des mouvements doux en forme de 8 pour homogénéiser.
- Laisser refroidir à température ambiante pour solidifier et fixer l'inoculum (environ 15 min).
- Incuber les boîtes (couvercles renversés) à l'étuve pendant 48 h à 37°C (Guiraud et Rosec, 2004).

- Refaire les mêmes actions à chaque intervalle d'analyse.

-Le nombre de colonies considéré pour le dénombrement doit être compris entre 30 et 300 par boîte de Pétri (Guiraud et Rosec, 2004). L'organigramme suivant représente le mode opératoire adopté (Figure 16).

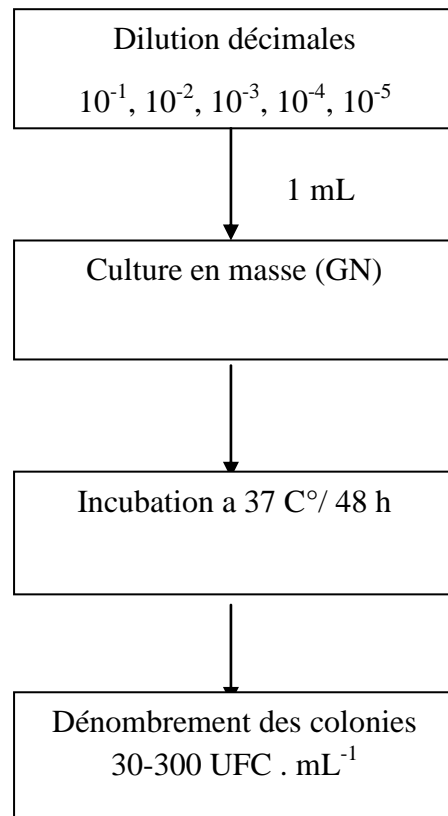


Figure 16. Etapes opératoires de l'évaluation de la flore totale viable.

1.4. Recherche des bactéries spécifiques

Des volumes de 0,1 ml des dilutions 10^{-1} ont été étalés en surface sur la gélose au sang cuit additionnée de Céfazoline. L'organigramme suivant (Figure 17) représente le mode opératoire adopté.

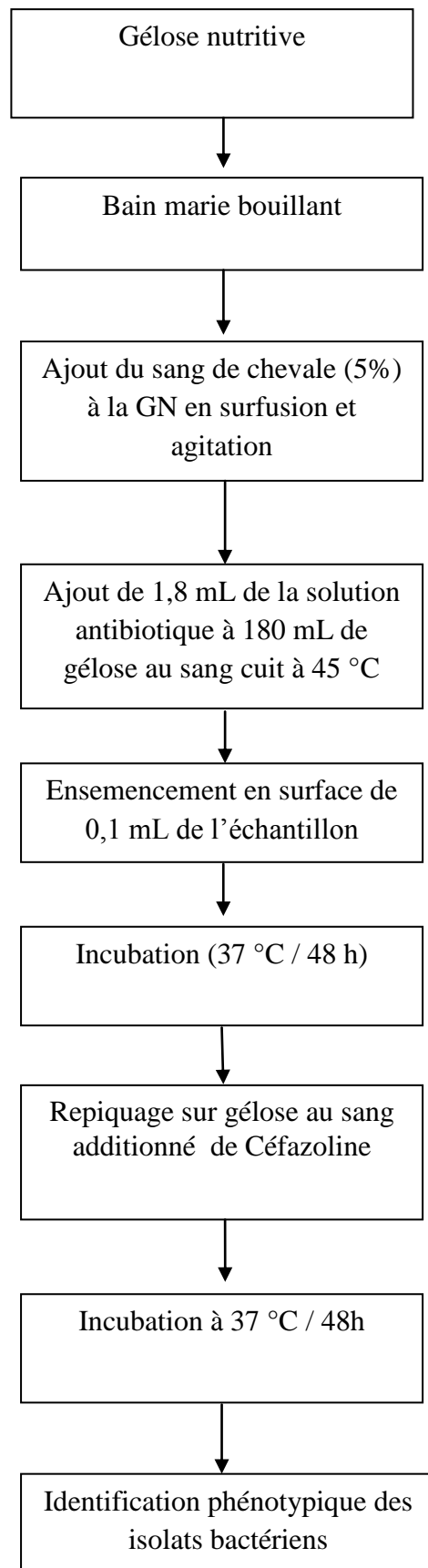


Figure 17. Mode opératoire pour l'isolement des bactéries spécifiques.

1.5. Recherche des bactéries lactiques

A partir des dilutions 10^{-1} , étaler 1 mL en masse sur la gélose MRS, les cultures ont été incubées pendant 48 h à 37 °C (Badis et al., 2004). Afin de purifier les souches, des repiquages successifs ont été effectués sur le même milieu et incubées à 37 °C pendant 48h. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures (Idoui et al., 2009). L'organigramme suivant représente le mode opératoire adopté (Figure 18).

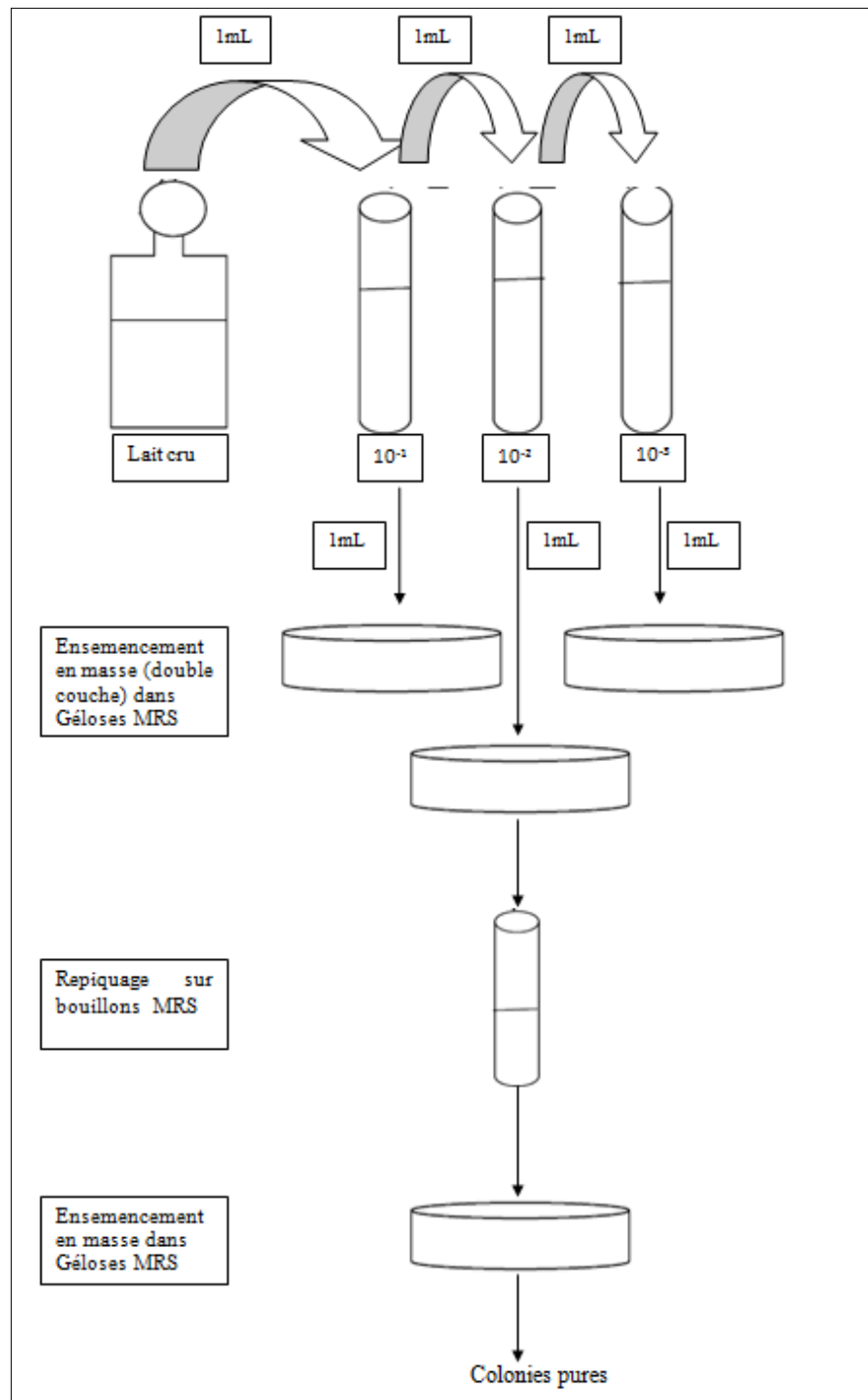


Figure 18. Mode opératoire de l'isolement des souches lactiques

1.6. Identification phénotypique des isolats

L'identification phénotypique des isolats a été réalisée en utilisant les critères morphologiques, culturels et physio-biochimiques. Les tests et examens d'identification phénotypique ayant été réalisés sont :

✓ **Examen de l'aspect macroscopique des colonies** : Pour observer la morphologie coloniale, la colonie est examinée pour sa taille, couleur, contour, texture, forme et reliefs.

✓ **Coloration de Gram** : Ce test a été réalisé sur des cultures jeunes de moins de 24 h. 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%. 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. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la Fushine. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au papier buvard et on l'examine à l'objectif (grossissement X 100) en ajoutant quelques gouttes d'huile à immersion. Les isolats ayant une coloration violette sont à Gram positif (+) tandis que ceux présentant une coloration rose sont à Gram négatifs (-) (Singleton, 1999).

✓ **Mobilité à 25 et à 37 °C sur milieu Mannitol-Mobilité** : L'ensemencement du milieu se fait par piqûre centrale à la pipette Pasteur boutonnée et chargée avec une suspension bactérienne pure, puis mis dans l'étuve à 37 °C pendant 24 heures (Le Minor, 1993)

Le Mannitol-Mobilité-Nitrate est un milieu de culture caractérisé par l'utilisation de Mannitol et de Nitrate et permet la mise en évidence ou non de la mobilité bactérienne, il permet aussi de voir le métabolisme énergétique des bactéries (Le Minor, 1993).

La présence d'une faible teneur d'agar (gélose semi-molle) rend le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale. Les germes immobiles ne poussent qu'au niveau de la piqûre central alors que les germes mobiles diffusent dans la gélose (Le Minor, 1993).

La mobilité des bactéries est déterminée par une diffusion de ces dernières au niveau de ce milieu, les bactéries sont donc mobiles (Le Minor, 1993).

S'il y a culture uniquement au niveau de la piqûre centrale, pas de déplacement des bactéries dans le milieu, et les bactéries sont donc immobiles (Le Minor, 1993).

- ✓ **Présence de catalase** : le catalase est une enzyme produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit le peroxyde d'hydrogène et libère de l'oxygène (Vezina et Lacroix, 2000). Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par Prescott et al. (2003). Elle a été mise en évidence par contact de la colonie avec une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes, un dégagement gazeux abondant (dioxygène) sous forme de mousse traduit la présence de la catalase.
- ✓ **Présence d'oxydase** : 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 oxygène atmosphérique, oxyde un colorant redox (dihydrochlorure de tétraméthyle para phénylène diamine) pour former un composé violet (Kohler et al., 2009). A partir d'une culture jeune ensemencée sur GN, une colonie est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur (Aslanzadeh, 2006) puis mise en contact avec un disque d'oxydase. Un virage de la couleur en violet indique la présence de l'enzyme oxydase chez la bactérie.
- ✓ **Production d'H₂S** (test sur milieu TSI) : Ce test permet d'observer la production de H₂S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de gaz CO₂ ou H₂ (bulles dans la gélose) (Marchal et al., 1991).
- ✓ **Activité hémolytique** : Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang de cheval. Après incubation pendant une période de 24 h à 30 °C, le type d'hémolyse a été examiné (α hémolytiques : couleur verte autour des colonies ; β hémolytique : éclaircissement autour des colonies ou γ hémolytique : le milieu n'est pas modifié) (Maragkoudakis et al., 2006).
- ✓ rouge de méthyle (test RM)
- ✓ réaction de Voges-Proskauer (test VP)
- ✓ production d'indole
- ✓ hydrolyse de l'esculine
- ✓ présence d'uréase

✓ **Contrôle du pH du lait**

Le pH du lait a été surveillé pendant le stockage du lait à 4 °C. A l'aide d'un pH-mètre on mesure le pH à chaque intervalle de temps (48h) (Madhu et al., 2012).

1.7. Conservation des souches

A partir de cultures pures jeunes de 48 h sur milieu liquide (bouillon nutritif) les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorfs à -20 °C (qui contient 70 % milieu de culture de conservation et 30% de glycérol (Euzéby, 2000)).

1.8. Identification moléculaire

Les principales étapes de l'identification génotypique que nous avons réalisées sur les différents isolats sont :

- A- Extraction de l'ADN génomique à partir des isolats bactériens.
- B- Amplification de l'ADNr 16S par PCR.
- C- Electrophorèse sur gel d'agarose.
- D- Purification des produits de PCR.
- E- Réaction de séquençage des ADNr 16 S des amplicons.
- F- Purification des produits de séquençage.
- G- Analyse bioinformatique des séquences ADNr 16 S

A. Extraction de l'ADN

La méthode utilisée pour l'extraction de l'ADN génomique est le choc thermique. Il a été effectué comme suit :

- ✓ Mettre 50 µL d'eau bi-distillée stérile dans le tube à Eppendorf.
- ✓ Suspender l'inoculum dans l'eau par une anse.
- ✓ Congeler à -20 °C pour une durée de 30 minutes.
- ✓ Décongeler pendant 5 minutes à 94 °C dans un bain-marie.
- ✓ Répéter une deuxième fois la congélation /décongélation.
- ✓ Centrifuger à 7000 rpm pendant 10 minutes.
- ✓ Prélever 2 µL du surnageant contenant de l'ADN pour réaliser la réaction d'amplification par la technique de la PCR.

Remarques et précautions prises en compte:

- ✓ La réalisation du processus du choc thermique à deux reprises permet d'améliorer l'extraction de l'ADN des bactéries.
- ✓ Si les colonies sont grandes prélever à partir d'une seule colonie.
- ✓ Si les colonies sont petites prélever plusieurs.
- ✓ Eviter de toucher les bords des tubes à Eppendorf lors du dépôt d'eau et d'inoculum.

B. Amplification de l'ADNr 16S par PCR

-Principe

C'est une méthode simple à réaliser ne nécessitant que quelques variations thermiques cycliques réalisées sur un même échantillon. L'emploi d'une ADN polymérase thermorésistante, la Taq Polymérase (issue de *Thermophilus aquavarum*) évite d'ajouter l'enzyme à chaque cycle. Elle se base principalement sur trois étapes : *dénaturation, hybridation et polymérisation*.

Connaissant la structure primaire de la séquence cible (ou de ses extrémités éventuelles), celle-ci peut être amplifiée *in vitro* par une extension convergente simultanée en utilisant des amorces spécifiques encadrant la cible à amplifier.

Les deux amorces fD1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') et Rs16 (5'TACGGCTACCTTGTTACGACTT3') sont additionnées à l'ADN (dans notre cas l'ADN16S) génomique dans des conditions d'hybridation avec la cible après sa dénaturation (séparation des deux brins sous l'effet de la température). Les deux amorces se placent en face de leurs séquences complémentaires situées sur les deux extrémités 3' des deux brins à amplifier. Leur élongation dans le sens 5' → 3' par l'ADN polymérase permet à chaque brin de la cible d'être recopié uniquement sur la zone encadrée par les deux amorces.

L'opération est reprise en plusieurs cycles. Chacun de ces cycles comprendra :

- ✓ un temps de dénaturation de l'ADN cible à amplifier,
- ✓ un temps pour l'hybridation des amorces avec les extrémités 3' de l'ADN cible (généralement > 40 °C),
- ✓ un temps nécessaire à l'extension des deux amorces.

-Préparation de la solution mixte

Pour diminuer les risques d'erreurs et de contamination nous avons préparé une solution mixte contenant tous les composants de la PCR.

Remarques :

- ✓ Les composants de la PCR (tampon Taq, dNTP, Mg Cl₂, Primers, Taq polymerase) ainsi que l'ADN génomique à amplifier sont gardés séparés dans leurs tubes respectifs dans de la glace jusqu'à la fin de la manipulation.
- ✓ A chaque fois qu'un composant de la PCR est ajouté au volume réactionnel, nous effectuons un rinçage (l'eau est le premier composant ajouté).
- ✓ Il faut à chaque fois changer d'embout.

- ✓ L'enzyme Taq polymérase est le dernier composant ajouté à la solution mixte avant la mise en contact avec l'ADN génomique à amplifier (car il constitue le substrat enzymatique).

-Amplification

Après avoir placé les tubes contenant l'ADN bactérien dans le Thermocycleur (TECHNE, Techgene), une prédénaturation à 94 °C pendant 5 minutes est entamée. Ensuite, le programme d'amplification est exécuté selon trois étapes répétées en 35 cycles :

- ✓ Dénaturation à 94 °C pendant 1 min.
- ✓ Hybridation des amorces à 50 °C pendant 1 min.
- ✓ Elongation (polymérisation) à 72 °C pendant 1 min.

Enfin, une étape d'élongation finale est réalisée à 72 °C pour 5 minutes. La taille de l'amplimère obtenu était de 700 pb pour tous les échantillons amplifiés comparativement aux marqueurs de taille utilisés.

C. Electrophorèse sur gel d'agarose

Une Electrophorèse, sur gel d'agarose à 1%, des produits de PCR a été réalisée pour confirmer la réussite de l'amplification.

Préparation du gel

- ✓ Peser 0,5 g d'agarose dans un Erlenmeyer de capacité suffisante.
- ✓ Ajouter l'agarose à 50 mL de TAE.
- ✓ Chauffer avec agitation jusqu'à ébullition et disparition du trouble.
- ✓ Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (température environ 45-50 °C).
- ✓ Ajouter 4 à 5 % de BET (2µl de BET dans 50mL TAE).
- ✓ Agiter (sans chauffer) doucement pour éviter la formation de bulles d'air.
- ✓ Préparer le moule pour le coulage du gel.
- ✓ Placer le moule sur une surface bien horizontale.
- ✓ Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur et laisser gélifier dans la cuve, le peigne mis au préalable crée des espaces pour les puits.
- ✓ Laisser refroidir 30 minutes environ avant d'enlever délicatement le peigne.
- ✓ Les puits sont placés du côté de la cathode.

Le gel est enfin prêt pour le dépôt des échantillons.

Dépôt des échantillons (produits d'amplification)

- ✓ Mélanger la solution de charge (bleu de bromophénol et glycérol) avec l'ADN sur un morceau de parafilm (2 μL d'ADN et 2 μL de la solution de charge) avec une micropipette.
- ✓ Pipeter 2 μL de ce mélange en fixant fermement la pipette avec l'autre main.
- ✓ Mélanger sur support de parafilm un volume de la solution de charge (contenant l'ADN amplifié par PCR) avec un volume donné de la solution mixte.
- ✓ Remplir les puits avec ce mélange en faisant attention à ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette.

Migration

- ✓ Fermer la cuve, brancher les fils et exercez un voltage de 70 v jusqu'à 80 v pendant 5 minutes pour permettre la sortie de l'ADN des puits.
- ✓ Ensuite, descendre à 50 v le reste de l'électrophorèse.
- ✓ Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ 30 minutes).
- ✓ Quand le témoin de migration (colorant bleu) atteint l'extrémité du gel, le courant est coupé.

Visualisation

La visualisation de l'ADN sur le gel d'agarose est réalisée grâce à un colorant fluorescent le bromure d'Ethidium (BET). Ce composé possède la propriété de s'insérer entre les paires de bases des acides nucléiques. Le gel est visualisé dans l'obscurité à l'aide d'un Transilluminateur à UV puis photographié avec un appareil numérique ou scanner.

Remarques :

- ✓ Pour observer les fragments d'acide nucléiques, utiliser les UV à $\lambda = 254\text{nm}$.
- ✓ Le gel doit être manipulé avec soin car il est très fragile.

D. Purification des produits de PCR

Élimination du Triton-X

Le Triton-X est un détergent ionique puissant qui entre dans la composition du tampon de la réaction PCR. Sa présence dans le produit d'amplification gêne le séquençage. Pour cette raison il doit être éliminé :

- ✓ Les produits d'amplification de chaque souche sont rassemblés (50 μL) dans un tube Eppendorf (de volume égale à 1,5 mL). Ensuite, le volume est complété à 360 μL par de l'eau bi-distillée stérile puis à 400 μL par NaCl 3M.

- ✓ Après ajout de 800 μL d'éthanol absolu, une congélation à -20°C pendant 30 minutes est entamée. Elle est suivie d'une centrifugation à 4°C durant 20 minutes à 10 000 rpm.
- ✓ Le surnageant est éliminé, le culot est lavé dans un volume de 1mL d'éthanol à 70% puis re-centrifugé à la même vitesse pendant 5 minutes. Ce lavage est effectué deux fois.
- ✓ Le surnageant est éliminé et le culot contenant l'ADN est séché, ensuite re-suspendu dans un volume de 20 μL de TE (pH=8) (Tris : 10mM ; EDTA : 1 mM) et conservé à 4°C .

Elimination des amorces

Dans chaque tube contenant le produit PCR conservé contenant l'ADN amplifié et les amorces, dans du TE :

- ✓ Ajouter 100 μL de la solution Magnesil Yellow (de la société Genome biotechnologie) contenant des billes fixant l'ADN.
- ✓ Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 45 secondes puis re-mélanger.
- ✓ Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.
- ✓ Récupérer les tubes du portoir magnétique et ajouter 200 μL d'éthanol à 80%.
- ✓ Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 60 secondes puis re-mélanger.
- ✓ Transférer les tubes dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant contenant les amorces.
- ✓ Récupérer les tubes du portoir magnétique puis ajouter 100 μL d'éthanol à 80% et procéder comme auparavant. Cette étape de lavage est répétée deux fois. Ensuite, les tubes sont séchés 5 à 10 minutes à température ambiante.
- ✓ Ajouter 100 μL d'une solution de water free nuclease (pour dégager l'ADN des billes).
- ✓ Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 60 secondes puis re-mélanger.
- ✓ Transférer les tubes dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes contre la paroi du tube, puis récupérer le surnageant contenant l'ADN libre amplifié dans de nouveaux tubes.
- ✓ Transférer les tubes de nouveau dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes restantes puis récupérer le surnageant dans de nouveaux tubes. Ces derniers sont conservés à 4°C .

E. Réaction de séquençage

Le séquençage est accompli sur les produits de PCR préalablement purifiés. Il est réalisé selon la technique automatisée de Sanger. Cette méthode consiste à faire une amplification

spécifique (PCR) dans laquelle ont été utilisés des didésoxynucléosides triphosphates (ddNTP) généralement marqués par des fluorochromes. L'incorporation du ddNTP par l'ADN polymérase bloque l'allongement de la molécule d'ADN en cours de copie. Nous obtenons donc une famille de fragments d'ADN synthétisés avec des longueurs différentes.

Ces fragments nucléiques sont séparés par électrophorèse selon leur longueur. Les plus petits migrent plus rapidement. Le pouvoir discriminant du gel de polyacrylamide est tel qu'il permet de différencier des brins de l'ADN ne différant en longueur que par un seul nucléotide.

La séquence de l'ADN amplifié est alors lue par un balayage automatique qui permet de distinguer grâce à des fluorochromes différentes les quatre bases A, T, C ou G.

L'utilisation de logiciels informatiques permet de fournir un tracé électrophorétique avec des couleurs différentes pour chaque base élémentaire (voir Annexes C1 et C2).

PCR de séquençage : A ce stade sont ajoutées les bases sous formes de ddNTPs qui servent à inhiber l'ADN polymérase.

Amplification

Après une prédénaturation à 96 °C pendant 5 minutes, 25 cycles successifs ont été entrepris ; chacun comprenant :

- ✓ Dénaturation à 96°C pendant 10 secondes.
- ✓ Hybridation à 55°C pendant 10 secondes.
- ✓ Elongation à 60°C pendant 4 minutes.

F. Purification des produits de séquençage

Afin d'éliminer tout le matériel nucléique (amorces, ddNTP, dNTP) qui peut gêner la lecture de la séquence, une purification est réalisée selon le protocole suivant :

- ✓ Dans un tube Eppendorf de 0,5 ml, déposer 10 µL de produit de séquence.
- ✓ Ajouter 90 µL de la solution Magnesil Green (de la société Génome biotechnologie) contenant des billes fixant l'ADN.
- ✓ Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 5 minutes puis re-mélanger.
- ✓ Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.
- ✓ Récupérer les tubes du portoir magnétique et ajouter 100 µL d'éthanol à 90%.
- ✓ Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 5 minutes puis re-mélanger.

- ✓ Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.
- ✓ Récupérer les tubes du portoir magnétique puis répéter l'étape de lavage avec l'éthanol à 90% une deuxième fois. Ensuite, les tubes sont séchés 5 à 10 minutes à température ambiante.
- ✓ Re-suspendre les particules dans 20 μ L de formamide. Laisser agir 1 à 2 minutes puis remélanger.
- ✓ Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis récupérer le surnageant contenant le formamide et les produits de séquence dans de nouveaux tubes. Le séquençage peut ainsi être effectué.

La plaque contenant les échantillons est placée dans le séquenceur. Les 16 capillaires auxquels est associée une électrode, vont être plongés dans les échantillons.

1.9. Analyse phylogénétique et dendrogrammes

Les isolats bactériens ont été identifiés et leurs séquences ont été déposées avec leurs numéros d'accès correspondants à la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les séquences ont été alignées à l'aide du programme Clustal W. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode p-distance. L'analyse phylogénétique et les dendrogrammes ont été menées à l'aide du logiciel MEGA version 7.0 (Kumar et al., 2016). Pour l'analyse de la génomique comparative des souches, les similitudes des séquences génétiques de l'ARNr 16S ont été estimées en comparant avec les espèces les plus étroitement apparentées issues d'autres zones géographiques selon la classification climatique de Kottek et al. (2006). Les individus utilisés dans la comparaison avec leurs numéros d'accès correspondants, ont été recueillis à partir de la base de données NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>): Espagne: 3; Italie: 1; Turquie: 4; Chine: 2; Sri Lanka: 1.



***Résultats &
Discussion***

2. Résultats et Discussion


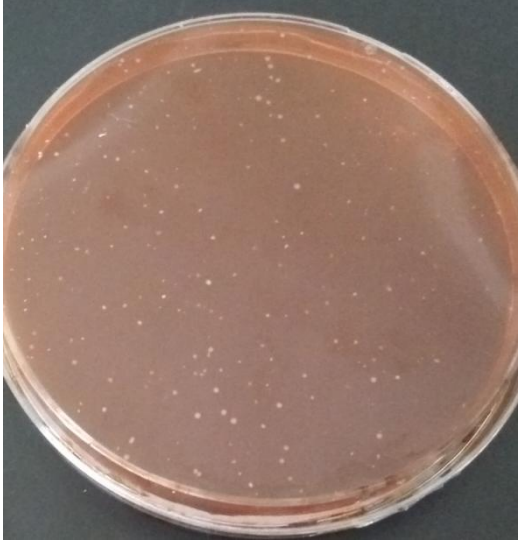
Il est à rappeler que l'objectif de cette étude est le contrôle des cinétiques de développement de la flore totale viable dans le lait cru réfrigéré à 4 °C durant 10 jours, et l'exploration de la diversité des bactéries dans le lait cru de vache collecté dans la région de Mila en Algérie. L'identification des isolats bactériens a été menée par les méthodes phénotypiques et moléculaires (ARNr16S). L'analyse phylogénétique vise à déterminer les relations évolutives sur la base du gène d'ARNr16S à la fois entre quelques taxons isolés ainsi que d'autres issues de divers géographies et climats dans le monde.

2.1. Identification phénotypique

Nous avons obtenu une gamme de colonies de tailles variables (petites, moyennes, et grandes), de couleurs différentes (blanches, jaunes, crèmes, crèmes foncées et transparentes), et de forme circulaire, plissée à striation concentrique avec un pourtour régulier ou irrégulier (Tableau 4). La diversité de l'aspect colonial en forme, couleur et taille signifierait que le lait cru serait un milieu favorable pour la croissance d'une gamme large de bactéries dont l'origine est soit lactique, soit ubiquitaire (Gargouri et al., 2013).

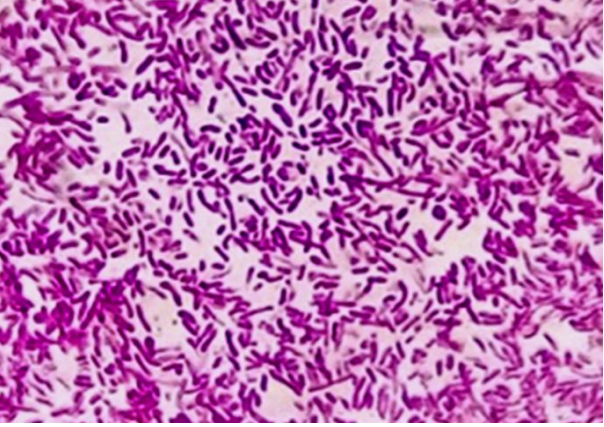


Tableau 4. Description de l'aspect cultural et macroscopique des colonies bactériennes.

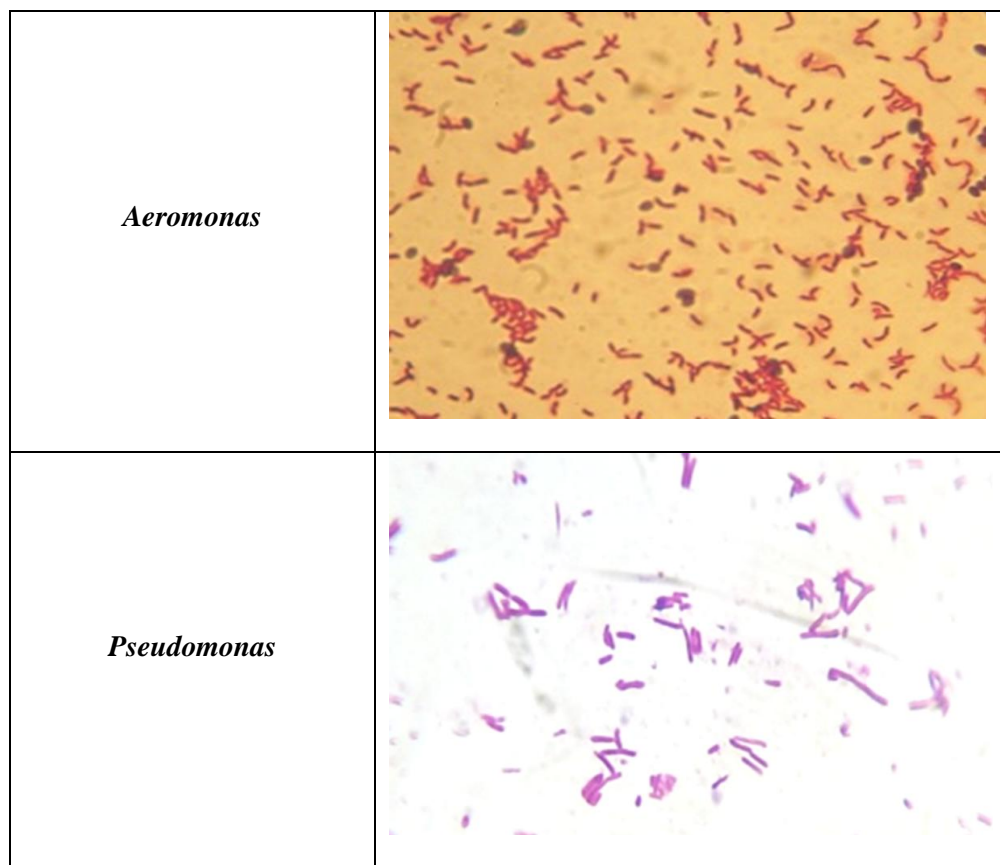
<p>Flore totale aérobie mésophile sur gélose nutritive</p>		<p>Les colonies sont de tailles différentes de 1 à 3 mm. La plupart des colonies apparaissent blanches et rondes à contour régulier.</p>
--	--	--

<p>Sur gélose au sang</p>		<p>Des colonies de tailles variables (petites et moyennes) de couleurs différentes (blanches, transparentes et crèmes) de formes circulaires avec un pourtour régulier.</p>
<p>Sur gélose au sang cuit additionnée de céfazoline</p>		<p>Par comparaison aux résultats obtenus sur le milieu sans antibiotique, il y a eu une sélection et une réduction du nombre de colonies se développant.</p>
<p>Sur milieu MRS</p>		<p>Les colonies sont de forme ronde, grande ou petite de couleur blanchâtres.</p>

L'ensemble des caractéristiques de l'aspect cellulaire microscopique des bactéries isolées à partir des échantillons positifs sont regroupées dans le Tableau 5

5. Bactéries isolées sur gélose au sang additionnée de céfazoline.

<p><i>Chryseobacterium</i></p>	
<p><i>Enterococcus</i></p>	
<p><i>Lactobacillus</i></p>	



Les résultats de la caractérisation macroscopique et microscopique de quelques isolats bactériens sont résumés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Caractérisation macroscopique et microscopique des isolats bactériens du lait cru réfrigéré.

Souches	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>Acinetobacter</i>	<p>Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, convexes, translucides ou opaques, lisses, de couleur blanc-jaunâtre, à bord régulier, atteignant de 1 à 4 mm de diamètre.</p> <p>Sur gélose au sang les colonies sont blanches, grandes rondes à contour régulier bombées et</p>	Diplobacilles à extrémités arrondies avec des formes coccoides et longues, isolés en courtes chaînettes, accompagnés de formes de cocci plus ou moins nombreuses de 1 à 1,5 μ m de largeur et de 1,5 à 2,5 μ m de longueur

	luisantes.	
<i>Chryseobacterium</i>	Sur gélose au sang, les colonies sont lisses, translucides ou opaques, circulaires, non hémolytiques, de couleur blanches grisâtres, atteignant 1 à 2 mm de diamètre	Des bacilles courts, parfois très courts, de 0,4 à 0,5 µm de large et de 0,7 à 2 µm de long, fins ou assez fins, avec une tendance au polymorphisme.
<i>Pseudomonas</i>	Sur gélose au sang les colonies sont lisses et bombées de 2 à 3 mm de diamètre et caractérisée par une odeur aromatique et la production des pigments pyocyanine et pyoverdine.	Bacilles long et fins à extrémité effilée
<i>Aeromonas</i>	Colonies de 1 à 3 mm translucides, brunâtres ou vertes au bout de 1 à 5 jours.	Les cellules sont des bacilles fins à Gram négatif légèrement incurvées
<i>Enterococcus</i>	Colonies d'environ 1 mm, nets, semi bombées, opaques, rondes à contour régulier.	Cocci de 0,6 à 1 µm en moyenne, isolées, en diplocoques et chaînettes.
<i>Lactobacillus</i>	Colonies sont généralement de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques.	Bâtonnets coccobacilles à Gram positif, groupés en paires ou en chaînettes.

Les résultats des tests d'identification réalisés sur les différents isolats sont montrés dans le Tableau 7.

Tableau 7. Les résultats des tests culturaux et biochimiques utilisés pour l'identification des bactéries présumées isolées durant le stockage à froid du lait à 4 °C. *Entr*: *Enterococcus*, *List*: *Listeria*, *Stph*: *Staphylococcus*, *Acin*: *Acinetobacter*, *Prot*: *Proteus*, *Aero*: *Aeromonas*, *Psdo*: *Pseudomonas*, *Klbs*: *Klebsiella*, *Yers*: *Yersinia*, *Baci*: *Bacillus*, *Chry*: *Chryseobacterium*.

	<i>Klbs</i>	<i>Prot</i>	<i>Yers</i>	<i>Acin</i>	<i>Aero</i>	<i>Chry</i>	<i>Psdo</i>	<i>Stph</i>	<i>Entr</i>	<i>List</i>	<i>Baci</i>
Gram	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Mobilité	-	+	-	-	+	+/-	+	-	-	(-) ¹	+
Oxydase	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
NO ₃ ⁻	+	+	+	-		-	-	NR	NR	-	+/-
Indole	-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	NR	NR	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Lactose	+	-	-	-	+	+	+/-	+	+	-	-
Mannitol	+	-	+	NR	+	-	NR	+	+	-	-
Gaz	+	+	-	NR	+		NR	+	NR	-	-
Saccharose	+	-	+	NR	+	+	+	+/-	NR	+/-	+/-
H ₂ S	-	+	-	-	+/-	NR	-	-	-	-	-
Hémolyse	NR	+	NR	NR	+	NR	NR	+	+	+	NR
VP	+	-	-	NR	NR	NR	NR	+	+/-	+	-
Esculine	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR	NR	+	+	NR
RM	-	+	+	NR	NR	NR	NR	-	+/-	+	+
Uréase	+	+	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
Citrate	+	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	+	NR	NR
ONPG	+	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
LDC	+	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
ODC	-	+/-	+/-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

1: Mobilité négative à 37 °C, + = réaction positive, - = réaction négative, +/- = réaction variable en fonction de la souche. NR: Non réalisé

2.2. Identification moléculaire

L'analyse moléculaire a été conduite par séquençage partielle du gène ARNr16S de 10 souches bactériennes. Les isolats sélectionnés pour cette analyse appartenaient principalement au genre bactérien *Enterococcus* présumé, du fait qu'il était le plus dominant parmi les populations psychrotrophes lors du stockage réfrigéré (voire les résultats après).

Les séquences de chaque échantillon examiné ont été comparées à d'autres souches de référence disponibles dans la base de données NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) à l'aide de l'outil BlastN (Tableau 8). Les détails des séquences nucléiques sont rapportés dans (Annexe A). BlastN a permis donc de comparer nos séquences à l'ensemble des séquences existantes sur GenBank. Les résultats du blasting sont les suivants :

Tableau 8. Confrontation et correspondance biomoléculaire avec GenBank.

Souche proposée par GenBank	Score	E-value	% d'identité
<i>E. faecalis</i> (MH569850)	1260	0	100
<i>E. faecalis</i> (MH569851)	1227	0	100
<i>E. faecalis</i> (MH569852)	1256	0	99,85
<i>E. faecalis</i> (MH569853)	1275	0	100
<i>E. faecalis</i> (MH569854)	1011	0	100
<i>E. faecalis</i> (MH569856)	1242	0	100
<i>E. faecalis</i> (MH569857)	1234	0	100
<i>E. faecalis</i> (MH569859)	850	0	98,94
<i>E. faecalis</i> (MH569860)	1011	0	99,82
<i>Aeromonas veronii</i> (MH569855)	1327	0	100

GenBank, via le programme BlastN réalise un alignement en utilisant ses propres séquences et propose celle qui présente la meilleure identité avec la nôtre en calculant un score qui correspond au nombre de nucléotides identiques chez les deux séquences. Ce score peut être traduit sous forme de pourcentage d'identité (%id). La valeur calculée de E-value indique la probabilité que le résultat de cet alignement a eu lieu par hasard. Donc plus cette valeur est proche du zéro et mieux c'est. Or tous les alignements ont abouti à des valeurs nulles de la E-value ; ce qui exprime que les identités retrouvées entre nos séquences et celles proposées par GenBank ne sont pas dues au hasard.

2.3. Evolution du pH

Les échantillons du lait conservés à 4 °C ont fait l'objet d'un suivi journalier de l'évolution du pH. Les valeurs obtenues du pH variaient entre 7,31 et 7,28 (échantillons A) pour le lait collecté au niveau du bassin et de 7,23 à 7,22 (échantillons B) pour le lait collecté au niveau de la montagne. Il a été rapporté que la réfrigération abaisse globalement le pH, favorisant ainsi la libération de certains résidus d'acides aminés (Tavaria et al., 2003).

L'observation de l'évolution du pH moyen (Figure 19) montre deux phases distinctes. La première de 0 à 6 jours de réfrigération, caractérisée par une légère acidification par diminution du pH de 7,31 à 6,47. La seconde phase, de 6 à 10 jours, est caractérisée par une légère alcalinisation par augmentation du pH de 6,47 à 7,28.

Bien que *Chryseobacterium*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter* ont été isolés au premiers jours (Tableau 9), le pH des échantillons de lait continue de diminuer légèrement jusqu'au sixième jour (Figure 19). Ces organismes sont des populations psychrotrophes protéolytiques communes (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007; Sitothy et al., 2011). Franciosi et al. (2011) ont montré que tous les *Flavobacteriaceae* et la moitié des biotypes *Pseudomonadaceae* présentaient une activité protéolytique sur gélose au lait même à basses températures telles que 10 °C. En outre, la capacité d'acidification du milieu était moins commune chez les *Flavobacteriaceae* et qu'aucun biotype de *Pseudomonadaceae* ne produisait d'acides.

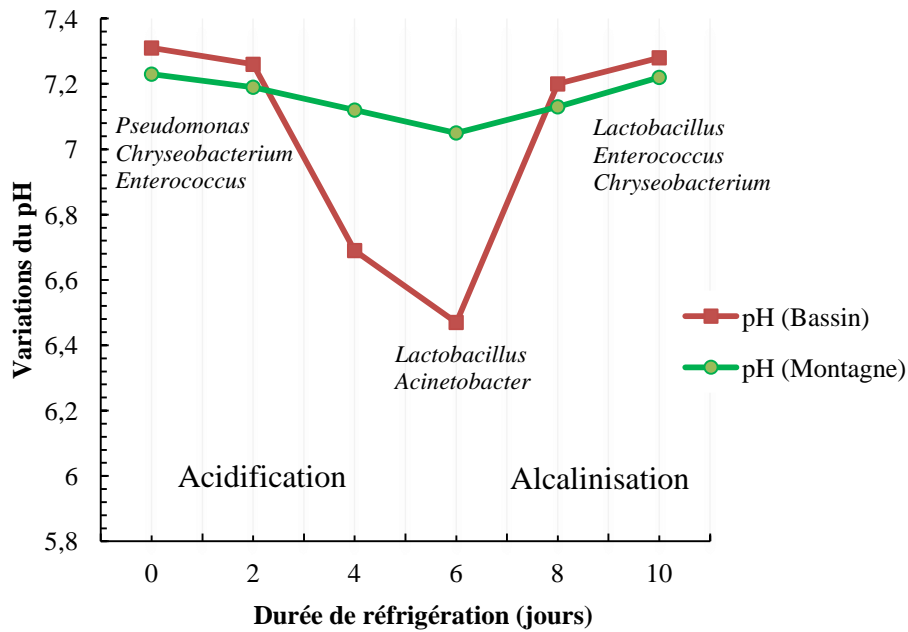


Figure 19. Variations du pH pendant la conservation à froid du lait cru à 4 °C durant 10 jours, dans deux fermes (Bassin et Montagne), avec les principaux genres bactériens isolés.

L'apparition de *Lactobacillus* après 6 jours peut être un indicateur que l'acidification fermentative est la principale activité métabolique pendant la première période de réfrigération. L'acidification du lait cru est causée par la croissance de bactéries principalement lactiques qui inhibent la prolifération des bactéries psychrotrophes (Samaržija et al., 2012). De ce fait, on peut déduire que dans la première phase de stockage réfrigéré du lait, que l'activité fermentaire acidifiante des bactéries lactiques (*Lactobacillus* et *Enterococcus*) domine par rapport à l'activité protéolytique alcalinisante des bactéries de détérioration (*Acinetobacter* et *Chryseobacterium*).

Cependant, à partir de sixième jour de réfrigération, malgré la présence de *Lactobacillus*, le pH augmente légèrement jusqu'à la fin de la période de stockage. Les populations de détérioration *Acinetobacter* et *Chryseobacterium* qui dominent la microflore, cohabitent avec *Lactobacillus* et *Enterococcus*. En considérant la tendance à l'augmentation du pH, on peut conclure que l'alcalinisation protéolytique est l'activité métabolique principale pendant la deuxième période de réfrigération. Fait intéressant, les populations de *Lactobacillus* et *Enterococcus* ont également montré un comportement psychrotrophique dans un environnement froid.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Sørhaug et Stepaniak (1997) qui suggère que l'activité enzymatique des bactéries psychrotrophes peut favoriser la croissance des bactéries lactiques qui peuvent utiliser les peptides, les acides aminés et l'ammoniac accumulés dans le lait et produits par les bactéries psychrotrophes. Dans l'étude de Manki et al. (2012), les bactéries lactiques (lactobacilles, lactocoques, leuconsotoc et entérocoques) et la flore aérobie mésophile étaient clairement les groupes dominants pour toutes les périodes de maturation.

2.4. Dynamiques de la croissance microbienne

Les changements dynamiques de la croissance microbienne du lait à 4 °C ont été suivis durant 10 jours. Les prélèvements ont été réalisés à différents intervalles de temps réguliers (0, 2, 4, 6, 8 et 10 jours). Les valeurs obtenues des moyennes de trois répétitions du dénombrement, ainsi que les écarts types ont été calculées et sont rapportées en détail dans l'Annexe B. L'ensemble des résultats de la croissance microbienne en log UFC. mL⁻¹ sont résumés dans Tableau 9.

Tableau 9. Evolution de la croissance microbienne en log UFC. mL⁻¹ de la flore totale du lait à 4 °C durant 10 jours

Jours	Ferme A (bassin)	Ferme B (montagne)
0	3,87	2,99
2	4	2,9
4	6,7	3,3
6	6,77	4,28
8	7,25	5,67
10	7,17	6,27

À la température de 4 °C, l'évolution des psychrotrophes est faible et lente durant les quatre premiers jours (Tableau 9). Puis, le taux augmente rapidement pour atteindre le seuil de 7,17 log UFC. mL⁻¹ (Ferme A) et 6,27 log UFC. mL⁻¹ (Ferme B) au bout du 10 ème jour de

conservation. Ces résultats indiquent fortement que les basses températures sont encore plus favorables pour une meilleure croissance des psychrotrophes. Selon Perko (2011), les psychrotrophes protéolytiques sont extrêmement contaminants du lait, indésirables à cause de leurs activités protéolytiques et lipolytiques.

Selon Hantsis-Zacharov et Halpern (2007), ainsi que Cempírková et Mikulová (2009), environ 15% de la population mésophile était constituée de bactéries psychrotrophes contenues dans le lait cru. Rasolofo et al. (2010) ont signalé que la population de bactéries psychrotrophes augmente à des niveaux élevés pendant le stockage au froid du lait ce qui nuise à la qualité du lait. Ribeiro Júnior et al. (2018) ont observé que lorsque les laits étaient obtenus directement après la traite, ils contenaient des comptes de moins de 25 000 UFC . mL⁻¹, alors que le compte augmente à plus de 100 000 microorganismes psychrotrophes / ml lors de la conservation durant 4 jours entre 2 et 8 °C. Le lait contenant de 100 000 à 500 000 psychrotrophes / mL ne peut être stocké plus de 2 ou 3 jours à 4 °C sans que le nombre atteigne plus de 1 à 2 millions / mL. Le lait livré deux fois par jour à l'usine de traitement avait des teneurs psychrotrophes de 400 à 17 000 UFC . mL⁻¹, qui augmentent de 4 500 à plusieurs millions / mL après réfrigération pendant 14 à 48 h (Wiking et al., 2002).

La dynamique des bactéries psychrotrophes dans le lait cru de vache stocké à 4 °C était liée à la durée de stockage et à la valeur de la contamination initiale du lait cru. La réfrigération du lait n'a pas empêché la croissance des bactéries psychrotrophes pendant 72 h et la valeur limite de 50 000 UFC. mL⁻¹ (correspond à log₁₀ = 4,70) a été dépassée après 2 jours de stockage (Lafarge et al. 2004).

Le taux de contamination microbienne du lait cru de vache est influencé par le statut sanitaire, l'hygiène des vaches laitières, l'hygiène de l'environnement dans lequel les vaches laitières sont logées et traitées, les méthodes de préparation du pis et les techniques de traite (Yabrir et al., 2018). Les mauvaises conditions de traite du lait contribuent à une augmentation du taux des bactéries psychrotrophes à hauteur de 65% (Wiking, 2002).

2.5. Traitement biomathématique

Les données moyennes relatives aux répétitions des dénombrements bactériens totaux sur milieu gélose SPC pour les échantillons de lait pendant le stockage à 4 °C ont été analysées à l'aide du modèle de Baranyi et Roberts (Baranyi et Roberts, 1994), afin d'obtenir les courbes de cinétiques de croissance microbiennes (Figure 20) et les paramètres de croissance microbienne à savoir le taux de croissance maximum (μ_{\max}), la longueur de la phase de latence (λ) et le niveau maximal de croissance microbienne atteint (X_{\max}) (Tableau 10).

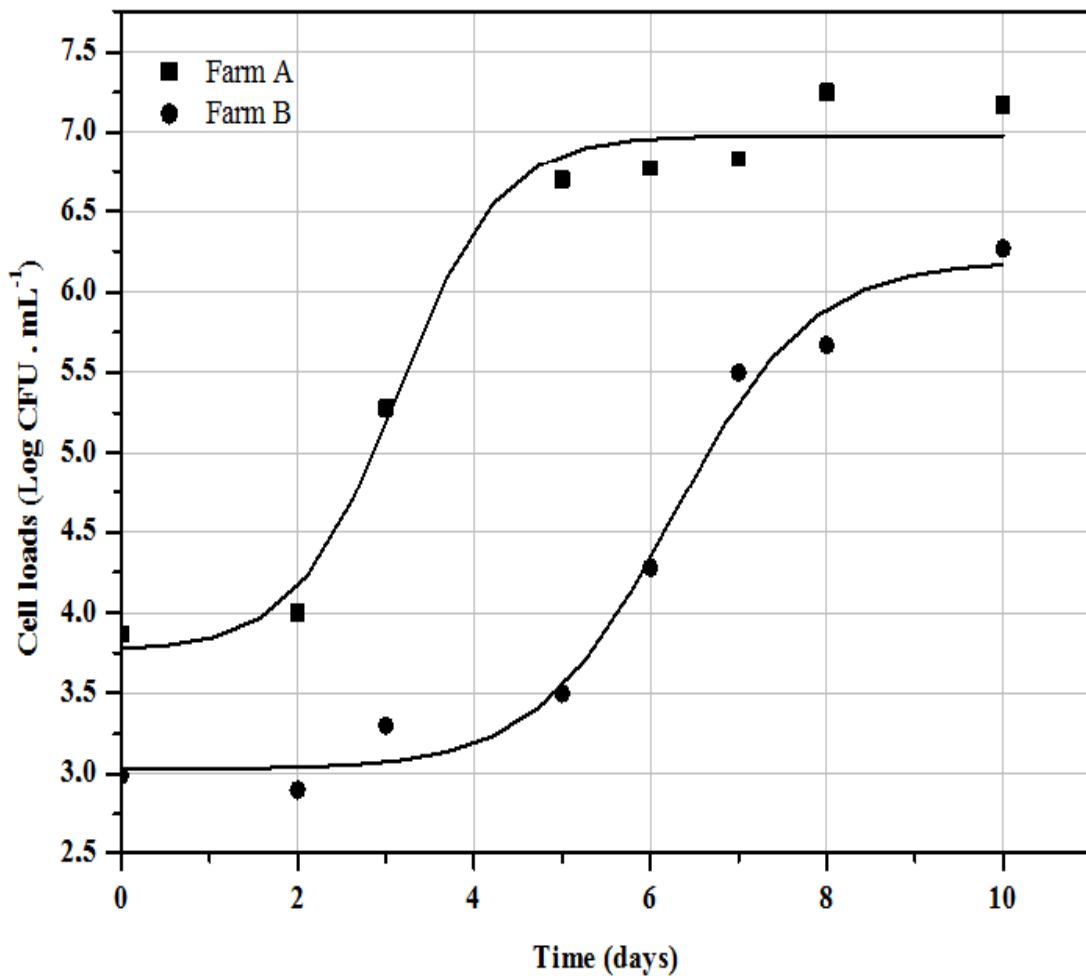


Figure 20. Courbes de croissance du nombre total des bactéries viables obtenues par le modèle de Baranyi et Roberts dans le lait réfrigéré pendant 10 jours à 4 °C, provenant de deux fermes laitières du bassin (A) et de la montagne (B) dans la région de Mila, Algérie.

Tableau 10. Paramètres de croissance microbienne obtenus par le modèle Baranyi et Roberts des données de comptage moyen de bactéries viables totales durant le stockage réfrigéré des échantillons de lait, provenant de deux fermes laitières du bassin (A) et de la montagne (B) dans la région de Mila, Algérie.

Ferme / Localisation	Coordonnées géographiques	Altitude (m)	Valeur initiale ^a	λ^b	μ_{\max}^c	X_{\max}
Ferme A (bassin)	36°27'N/6°15'E	598	3.87 ±0.11	1.20 ± 0.55	0.78 ± 0.16	7.00 ± 0.12
Ferme B (montagne)	36°34'N/6°20'E	829	2.94 ± 0.04	4.18 ± 0.22	0.73 ± 0.05	6.29 ± 0.07

^a (log UFC. mL⁻¹), ^b Durée de la phase de latence (jours), ^c Taux de croissance maximale (Δ log CFU. mL⁻¹ * jour), X_{\max} : Charge microbienne maximale (log UFC. mL⁻¹).

2.5.1. Niveau de croissance initiale

La dynamique de la croissance microbienne sur gélose agar pendant 10 jours de stockage à 4 °C est représentée sur la Figure 20, tandis que le Tableau 8 rapporte les paramètres de croissance microbienne obtenus.

Le nombre initial des bactéries psychrotrophes dans les échantillons de lait cru prélevés dans les deux fermes (Bassin et Montagne) était de 3.87 ± 0.119 et 2.94 ± 0.048 log UFC. mL⁻¹ respectivement. Ces valeurs ne dépassaient pas la limite d'hygiène (4.69 log UFC. mL⁻¹) rapportée par Cempírková et Mikulová (2009) et Gargouri et al. (2013). Cela dénote le respect des bonnes pratiques d'élevage, un bon état de santé des animaux et un environnement de ferme hygiénique appréciable. L'environnement dans lequel les vaches laitières sont hébergées et traitées influence la contamination microbienne du lait par les techniques de préparation du pis, les protocoles des traite, les procédures de nettoyage et de désinfection des trayeuses, les citernes de lait et l'hygiène du personnel. D'autres facteurs fondamentaux sont la vitesse de réfrigération du lait à la température requise et la durée de stockage (Rasolofa et al., 2010; Samaržija et al., 2012)

Le niveau présent de contamination microbienne initiale du lait cru est presque similaire à ceux signalés dans le monde. Dans le Sud Ouest de la Bohême, la charge microbienne initiale variait de 2,47 à 4,77 log UFC. mL⁻¹ (Cempírková et Mikulová, 2009), au Brésil 3,50 log UFC. mL⁻¹ (Machado et al., 2013), en Tunisie 4,11 log UFC. mL⁻¹ (Gargouri et al., 2013), en Irlande 2,84 log UFC. mL⁻¹ (O'connell et al., 2016). En Algérie, dans la région de Biskra, les valeurs de contamination initiale variaient de 2,5 à 3,5 log UFC. mL⁻¹ (Boubendir et al., 2016).

2.5.2. Niveau de croissance maximale

Les niveaux de croissance maximale (X_{\max}) atteints pendant la phase stationnaire, après 10 jours de réfrigération du lait, étaient de $7,00 \pm 0,12$ et $6,29 \pm 0,12$ log UFC. mL⁻¹ dans les fermes du bassin et montagne respectivement. La limite d'hygiène du lait (rappeler ici) a été dépassée après 2 jours dans la ferme A et plus tard après 6 jours dans la ferme B. En Slovénie, le nombre de bactéries psychrotrophes a augmenté le deuxième jour de collecte jusqu'à 4,61 log UFC. mL⁻¹ (Perko, 2011), en Tunisie, la limite d'hygiène a été dépassée après 2 jours d'entreposage frigorifique (Gargouri et al., 2013).

De plus en Espagne X_{\max} a enregistré 7,04 log UFC. mL⁻¹ après 96 h (De Garnica et al., 2011), en Irlande, le niveau des bactéries psychrotrophes atteint était de 7,00 log UCF. mL⁻¹ (Paludetti et al., 2018). Au Brésil, selon Ribeiro Junior et al. (2018) le niveau des psychrotrophes a augmenté à 5,32 log CFU. mL⁻¹. En Algérie, dans la région de Biskra, le niveau de X_{\max} atteint en phase stationnaire ne dépassait pas 5,25 log UFC. mL⁻¹ (Boubendir et al., 2016), alors que dans la région de Djelfa, le taux de psychrotrophes atteint le seuil de 5,25 log UFC. mL⁻¹ à la fin du 5^{ème} jour de conservation (Yabrir et al., 2018).

La différence dans les niveaux de croissance maximale observés dans différentes parties du monde pourrait être due aux variations de la température de refroidissement et du temps de stockage du lait; cependant, aucun des résultats n'a dépassé le seuil de la valeur moyenne de 7,00 log UFC. mL⁻¹. On peut suggérer que le substrat lait peut abriter un niveau limité de croissance microbienne malgré les variations géographiques et environnementales.

2.5.3. Phase de latence

Les temps de génération (λ) obtenus dans la présente étude allaient de $1,20 \pm 0,55$ à $4,18 \pm 0,22$ jours dans la ferme du bassin et montagne respectivement. Peu d'études ont évalué les paramètres microbiens de croissance pendant la réfrigération du lait. Cempírková et Mikulová (2009) dans le Sud-Ouest de la Bohême ont enregistré une durée de phase de latence de 2 jours. Vithanage et al. (2017) en Australie ont observés que la phase de latence des psychrotrophes se poursuit jusqu'à 3 jours. En Algérie, Boubendir et al. (2016) ont remarqué une phase de latence prolongée allant de 6,74 à 10,50 jours, tandis que Yabrir et al. (2018) ont observé une phase de latence de 3 jours. En revanche, la valeur de la phase de latence obtenue dans le lait de montagne était supérieure à celles calculées selon les modèles prédictifs de ComBase (<http://www.combase.cc>) à la température de 4 °C. Le temps de latence prédit pour *Listeria monocytogenes / innocua* est de 4,15 jours, *Aeromonas hydrophila* (3.36 jours), *Pseudomonas* (1.68 jour) et *Yersinia enterocolitica* (1,09 jour).

Il y a un retard et une limitation notables dans la croissance microbienne du lait collecté dans la ferme de montagne par rapport à celui du bassin. La différence de durée de la phase latente entre les échantillons de lait examinés dans le présent travail suggère l'influence des facteurs environnementaux et des modes alimentaire spécifiques dans les exploitations laitières. En effet, la durée de conservation des échantillons de lait prélevés à la ferme de montagne adoptant le mode d'alimentation à la fois intérieur / extérieur était allongée par rapport à celles de la ferme de bassin adoptant uniquement le mode d'alimentation intérieur. Aussi, la variation des durées de phase de latence du lait collecté différentes zones géographiques pourrait s'expliquer par la présence de molécules naturelles antimicrobiennes dans le lait et par la présence de microorganismes sélectionnés avec un potentiel antagoniste.

Les variations de la composition de la microflore du lait ont été rapportées suite à des changements dans l'environnement d'alimentation des vaches, c'est-à-dire que du pâturage intérieur vers l'extérieur, il ne peut être exclu que la nature du fourrage influence la composition de la population microbienne du lait et son activité (Michel et al., 2001). Plusieurs études liées à l'alimentation animale et à son influence sur la composition du lait ont été menées (Sanz Sampelayo et al., 2007). De nombreuses molécules bioactives de plantes broutées par les vaches également dans les zones tempérées jouent un rôle important pour la santé du ruminant et sont dotées d'une activité antimicrobienne. De plus, il a été démontré que les pâturages riches en herbes augmentent la concentration dans le lait d'une gamme de

composés volatils, tels que les terpènes (Larsen et al., 2012), et modifie également les profils d'acides gras du lait (Rubino et al., 2006).

En effet, dans la montagne de la présente étude, il y a plusieurs plantes broutées par les vaches telles que le *Thym*, *Origan*, *Romarin*, *Malva*, *Hibiscus* et les feuilles d'olivier. L'activité antibactérienne de plusieurs molécules d'origine végétale, dont le carvacrol, le thymol, l'eugénol, a été démontrée contre les pathogènes à Gram positif et à Gram négatif (Annda Baskaran et al., 2009). L'efficacité de l'eugénol, du carvacrol et du thymol pour tuer les principaux agents pathogènes de la mammite bactérienne dans le lait a été confirmée, en particulier contre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Agalactiae*, *L. monocytogenes*, et *E. coli* (Gaysinsky et al., 2007).

De plus, la vache peut brouter les feuilles d'olives qui ont montré de bon effets inhibiteurs sur les bactéries pathogènes. Darsanaki et al. (2012) ont rapporté que l'extrait de feuille d'olivier éliminait *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* et *B. subtilis*.

Les plantes du genre *Malva* ont montré une activité antimicrobienne contre une grande variété de bactéries. Des nombreuses études ont examiné l'activité antimicrobienne des extraits de *M. sylvestris* et *M. parviflora* contre des bactéries *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* (Sharifi-rad et al., 2019). Dans l'étude de Higginbotham et al. (2013), les extraits d'hibiscus se sont avérés avoir une large gamme d'activité antimicrobienne contre les bactéries, une activité antimicrobienne particulièrement démontrée contre *E. coli* et *S. aureus* à la fois dans un milieu microbiologique et dans le lait. L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* analysée sur les microorganismes du lait a présenté activité antibactérienne contre *Staphylococcus spp.*, *A. hydrophila*, *B. cereus* (Paşca et al., 2015).

2.6. Evolution des populations bactériennes psychrotrophes dans le lait de montagne

Dans le premier jour (temps 0), avant la réfrigération, les populations bactériennes étaient déjà présentes à de faibles niveaux dans le lait cru frais, elles ont été identifiées comme étant *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Enterococcus* et *Lactobacillus*. La contamination initiale par ces genres bactériens variait de 1.00 à 2.51 log UFC. mL⁻¹ (Tableau 11).

Tableau 11. Le nombre en log UFC. mL⁻¹ des bactéries psychrotrophes dans le lait réfrigéré à 4 °C pendant 10 jours, dans une ferme laitière à Hamala (montagne) dans la région de Mila, Algérie.

Genres bactériens	Jours		
	0	6	10
<i>Acinetobacter</i>	2,23	2,89	1,84
<i>Pseudomonas</i>	1	2,81	1,84
<i>Aeromonas</i>	1	2,27	2,20
<i>Chryseobacterium</i>	1,60	0,69	2,14
<i>Enterococcus</i>	2,51	3,31	4,41
<i>Lactobacillus</i>	1,84	289	4

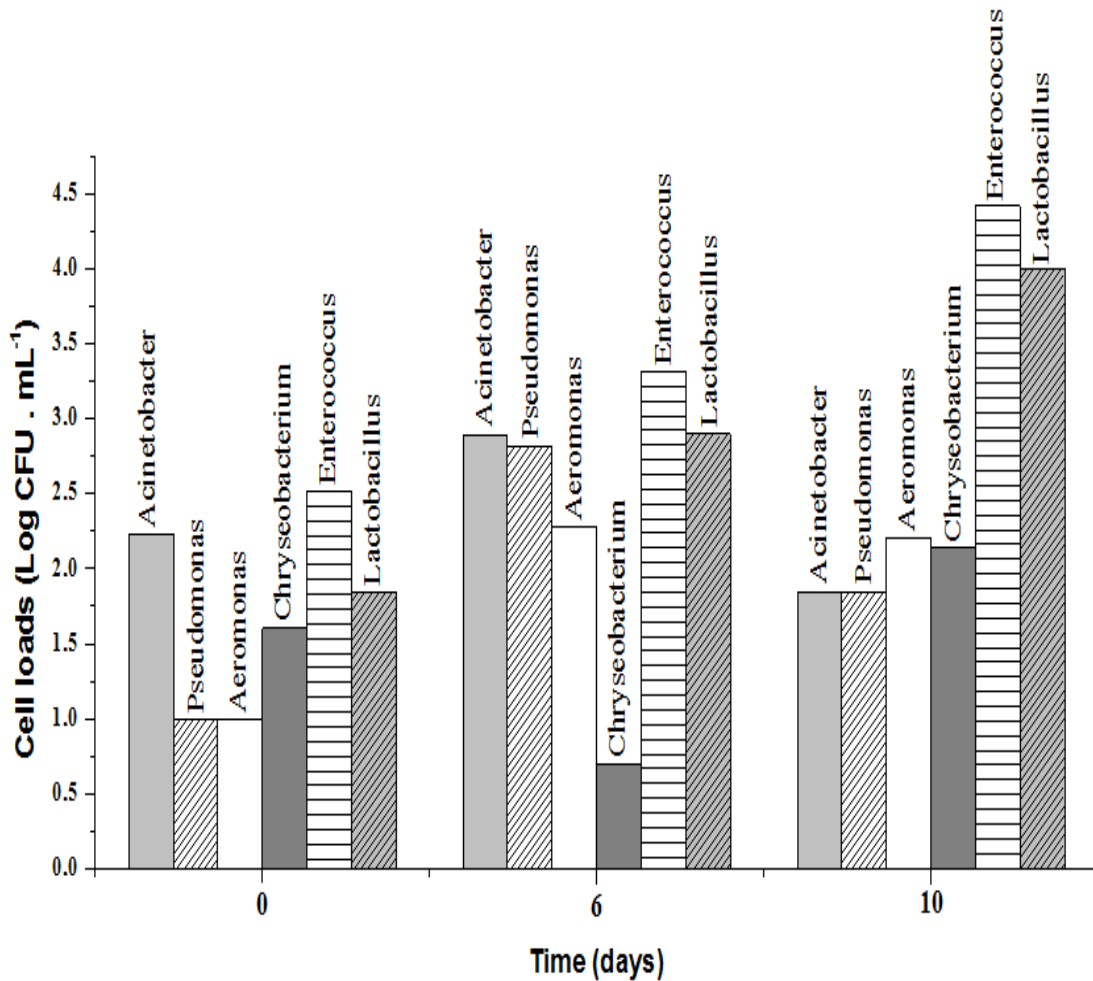


Figure 21. Evolution des populations bactériennes psychrotrophes dans le lait réfrigéré pendant 10 jours à 4 °C, provenant d'une ferme laitière dans une montagne à Hamala dans la région de Mila, Algérie.

Après 6 jours de réfrigération, on constate une augmentation du nombre de la totalité des populations bactériennes psychrotrophes sauf pour *Chryseobacterium*, la croissance microbienne maximale atteignant 3.31 log UFC. mL⁻¹ (Tableau 11) avec *Enterococcus* étant la population dominante dans le microbiote du lait cru.

A la fin de la réfrigération après 10 jours, les populations d'*Enterococcus* et de *Lactobacillus* dépassent largement en nombre les autres psychrotrophes avec 4.41 et 4.00 log UFC. mL⁻¹ respectivement. *Chryseobacterium* reprend sa croissance et atteint 2,14 log UFC. mL⁻¹ tandis que la croissance d'*Acinetobacter*, *Pseudomonas* et *Aeromonas* semble être réduite.

La composition du consortium microbien pendant la réfrigération était plus homogène par rapport à la diversité bactérienne rapportée dans le monde; de plus, l'absence de *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* et autres bactéries hémolytiques pathogènes est constatée pendant

toute la durée de réfrigération. Ce résultat contraste avec ceux rapportés par Lafarge et al. (2004) et Raats et al. (2011), qui ont identifié des espèces pathogènes telles que *Listeria* spp. et *Bacillus cereus*.

Les bactéries psychrotrophes actuelles ont été fréquemment isolées dans des environnements de lait cru et de produits laitiers réfrigérés. Elles sont capables de se multiplier au cours des différentes étapes de transformation (Raats et al., 2011; Paludetti et al., 2018). Ces bactéries pourraient être présentes dans les aliments, le fourrage, la litière, la poussière, les matières fécales et le sol, et une fois en contact avec la peau des trayons des vaches, pourraient contaminer le lait (Gleeson et al., 2013). En effet, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Facklamia*, *Corynebacterium* et *Trichococcus* sont les genres habituellement isolés au cours des premiers jours de stockage réfrigéré dans des laits non traités (Rasolofo et al., 2010; Vithanage et al., 2014). Decimo et al. (2014) ont constaté que les psychrotrophes représentent moins de 10% de la flore initiale du lait cru, et qu'après conservation à basse température, ils peuvent devenir les microorganismes prédominants, constituant jusqu'à 70% à 90% de la population microbienne.

Le genre *Acinetobacter* est omniprésent dans la nature (Gurung et al., 2013) et est considéré comme le genre bactérien prédominant dans le lait cru (Yuan et al., 2018). Les espèces d'*Acinetobacter* sont également psychrotolérantes, comme le démontre leur présence dans des habitats à basse température comme le lait cru réfrigéré (Vaz-Moreira et al., 2011).

Les populations de *Pseudomonas* sont présentes également dans le lait cru dès le premier jour à un faible niveau, et commencent à augmenter en nombre pour atteindre un maximum le sixième jour de réfrigération (Figure 21). On pense que l'adaptation au froid efficace des *Pseudomonades* psychrotrophes est liée à la possession de niveaux élevés (entre 59 et 72%) de lipides insaturés dans leurs membranes cellulaires qui confèrent la capacité de maintenir efficacement la fonctionnalité de la membrane aux températures de réfrigération (Oliveira et al., 2015). De plus, les espèces de *Pseudomonas* sont capables de proliférer dans le lait, dans un environnement où la concentration de fer libre est faible, en raison de la production du pigment fluorescent diffusible pyoverdine, qui agit comme un sidérophore, permettant aux bactéries de séquestrer efficacement le fer de la lactoferrine (Oliveira et al., 2015). De Jonghe et al. (2011) et Boubendir et al. (2015) ont examiné la croissance des *Pseudomonas* psychrotrophes dans le lait cru sous conditions de stockage prolongé. Machado et al. (2015) a

indiqué que le genre *Pseudomonas* était également considéré comme le groupe psychrotrophique prédominant à fort potentiel d'altération en Amérique, en Belgique, au Canada et en Italie.

Les genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* ont montré principalement une activité lipolytique (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007). La capacité lipolytique dépend des lipases sécrétées par ces microorganismes qui agissent principalement sur la partie α du triglycéride conférant un goût amer et un arôme désagréable, caractéristiques des acides gras à chaîne courte. L'activité protéolytique est réalisée par l'action d'enzymes appelées protéases thermorésistantes, naturellement présent dans le lait ou produit par des bactéries, en particulier le groupe psychrotrophique, agissant sur κ -caséine. L'hydrolyse de la κ -caséine provoque la déstabilisation des micelles de caséine du lait et par conséquent la coagulation et la formation de gel, rendant impossible la consommation du lait (Capodifoglio et al., 2015).

Dans cette étude, les *Aeromonas* se développent bien à basse température, ce qui confirme les résultats des travaux de Lafarge et al. (2004). Mankai et al. (2012) ont isolé *Aeromonas hydrophila* à partir de lait cru refroidi conservé à 4 °C. Le microorganisme *Aeromonas* est couramment présent dans les fermes, dans les aliments, l'eau, les matières fécales et le sol; ces organismes peuvent envahir les tissus de la mamelle; se multiplient dans les tissus mammaires et se déchargent ensuite dans le lait (Nahla, 2006).

Bien que *Chryseobacterium* a été isolé après 6 jours de réfrigération à faible niveau, il récupère de croissance au dixième jour. Les souches de *Chryseobacterium* font également partie de la population bactérienne psychrotolérantes et protéolytique qui provoque une variété de défauts dans les produits alimentaires (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007). Machado et al. (2017) ont rapporté que *Chryseobacterium* (précédemment classée dans *Flavobacterium*) apparaît également comme un membre dominant dans le lait cru réfrigéré. Ce genre est plus généralement considéré comme un habitant habituel des sols et des plantes (Bekker, 2011). Lim et al. (2011) ont rapporté que des membres du genre *Flavobacterium* présentaient des activités antagonistes contre les bactéries pathogènes humaines (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* et *Candida albicans*). Dans une autre étude sur des bactéries marines réalisée par Jayanth et al. (2011), *Flavobacterium* a démontré une inhibition contre *Staphylococcus aureus*.

Enterococcus était la population bactérienne dominante pendant toute la période de réfrigération (Figure 21), ce résultat concorde avec l'étude de (Mcauley et al., 2015). Citak et al. (2005) ont signalé qu'*E. faecalis* était l'Enterococcus prédominant dans le lait cru de

Turquie. Giannino et al. (2009) ont confirmé la présence d'*E. faecium*, *E. faecalis*, *S. thermophilus* dans le lait cru, prouvant ainsi leur importance en tant que source de la microflore de fermentation typique. De plus, *Enterococcus* est connu pour prolonger la durée de conservation et améliorer la sécurité hygiénique des denrées alimentaires car il produit des substances antimicrobiennes telles que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (entérocoques). Les bactériocines sont devenues d'un grand intérêt car elles sont fréquemment actives contre plusieurs pathogènes d'origine alimentaire à Gram positif tels que *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *C. botulinum* (Morandi et al., 2012).

De même, les populations de *Lactobacillus* ont également montré un comportement psychrotrophique en milieu froid et ont été présentes pendant toute la durée de réfrigération. Lafarge et al. (2004) ont constaté que *Lactococcus lactis* était une espèce dominante dans dix échantillons de lait cru provenant de fermes en France, et que son abondance diminuait après réfrigération. Les espèces de bactéries lactiques (LAB) présentent une activité protéolytique réduite et une très faible activité lipolytique. *Lactococcus lactis* a été confirmé comme une espèce majeure de lait cru (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007). Habituellement, *Lactobacillus* se développe comme mésophile et montre une croissance maximale à 37 °C Toqeer et al. (2006); cependant, il manifeste ici une adaptation physiologique inhabituelle à l'environnement froid. Mami et al. (2010) ont démontré qu'aucune croissance ne pouvait être détectée pour *S. aureus* après 72 h d'incubation en présence de *Lb. plantarum*. Les bactéries lactiques peuvent inhiber le développement de *L. monocytogenes* et d'autres populations de microorganismes indésirables dans les laits, cette inhibition pourrait résulter de la production d'acide lactique mais ils peuvent produire d'autres acides organiques et composés comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le dioxyde de carbone (CO₂), diacétyl (2,3-butanedione), reutéline et bactériocines (Cortés et al., 2017). Les acides organiques, en particulier l'acide lactique, sont des métabolites produits à la suite du métabolisme du sucre. Ils sont rejetés dans l'environnement en réduisant son pH (Okano et al., 2010).

2.8. Analyse phylogénétique et dendrogrammes

Toutes les souches utilisées dans l'analyse phylogénétique sont présentées dans le Tableau 12. Le nombre des souches de la présente étude est de 10 : 9 *Enterococcus faecalis* et 1 *Aeromonas veronii* ; le nombre des autres souches de rassemblees de Genbank est 11 (3 : Espagne, 4 : Turquie, 1 : Italie, 1 : Sri Lanka et 2 : Chine) (Figure 22).

Tableau 12. L'ensemble des souches utilisées dans l'analyse phylogénétique.

Souche	Numéro d'accès	Localisation	Climat	Référence
<i>E. faecalis</i>	MH569850	Algérie	Aride	Présente étude
<i>E. faecalis</i>	MH569851	Algérie	Aride	Présente étude
<i>E. faecalis</i>	MH569852	Algérie	Aride	Présente étude
<i>E. faecalis</i>	MH569853	Algérie	Aride	Présente étude
<i>E. faecalis</i>	MH569854	Algérie	Aride	Présente étude
<i>E. faecalis</i>	MH569856	Algérie	Aride	Présente étude
<i>E. faecalis</i>	MH569857	Algérie	Aride	Présente étude
<i>E. faecalis</i>	MH569859	Algérie	Aride	Présente étude
<i>E. faecalis</i>	MH569860	Algérie	Aride	Présente étude
<i>A. veronii</i>	MH569855	Algérie	Aride	Présente étude
<i>E. faecalis</i>	KC699180	Espagne	Aride	De Garnica et al., 2014
<i>E. faecalis</i>	KC699182	Espagne	Aride	De Garnica et al., 2014
<i>E. faecalis</i>	KC699179	Espagne	Aride	De Garnica et al., 2014
<i>E. faecalis</i>	KC510241	Italie	Tempéré chaud	Quintela et al., 2013
<i>E. faecalis</i>	MH819496	Turquie	Tempéré chaud	Soumission 2018/Non publiée
<i>E. faecalis</i>	MH819501	Turquie	Tempéré chaud	Soumission 2018/Non publiée
<i>E. faecalis</i>	MH819500	Turquie	Tempéré chaud	Soumission 2018/Non publiée
<i>E. faecalis</i>	MH819499	Turquie	Tempéré chaud	. Soumission 2018/Non publiée
<i>E. faecalis</i>	DQ239694	Chine	Tropical	Soumission 2005/Non publiée

<i>E. faecalis</i>	KX261530	Chine	Tropical	Soumission 2016/Non publiée
<i>E. faecalis</i>	MH779826	Sri Lanka	Tropical	Soumission 2018/Non publiée

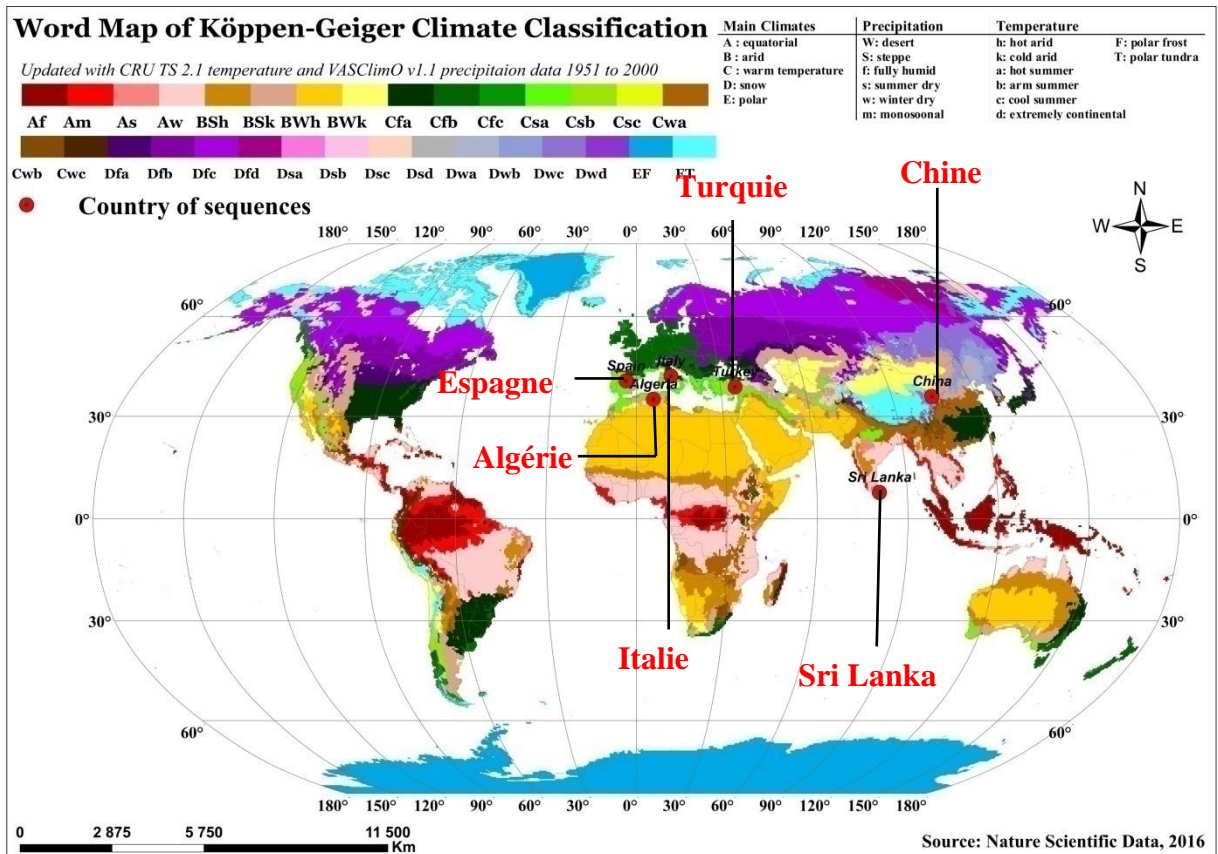


Figure 22. Carte géographique du monde montrant la situation des isolats de la présente étude et les autres isolats utilisés dans l'étude de la génomique comparative à la base du gène ARNr16S (selon la classification climatique de Koppen Geiger) (Kottek et al., 2006) modifié.

Les relations phylogénétiques entre 20 isolats bactériens psychrotrophes isolés du climat aride d'Algérie et d'autres climats sont retracées au moyen du programme MEGA7.0. Celui-ci va, réaliser les étapes suivantes :

- un alignement multiple des 20 séquences,
- calcul de la matrice des distances évolutives,
- création de l'arbre phylogénétique avec l'option du Bootstrap

4.8.1 La phylogénie de l'*Enterococcus*

Le grand groupe dominant parmi les psychrotrophes isolés dans la présente étude est celui du genre *Enterococcus* constitué essentiellement par les espèces d'*E. faecalis*, donc il a fait l'objet d'une analyse phylogénétique (Tableau 13, Figure 23). L'alignement des neuf isolats d'*E. faecalis* avec ceux de différentes géographies dans le monde, a montré que la majorité des isolats d'*E. faecalis* (7/9) de la zone aride d'Algérie présentaient une variation génétique importante (Tableau 13) par rapport aux autres géographies, exprimée par les faibles similitudes de séquences enregistrées au dessous 85,8 %, qui diminuent pour atteindre 60 %. Exceptionnellement, les deux souches (MH569852 et MH569853) présentent une similitude parfaite (100 %) avec deux isolats de la zone aride d'Espagne (KC699180 et KC699182) et ont été regroupés ensemble dans l'arbre phylogénétique.

Tableau 13. Matrice de similarité (1 - distance) à la base du gène ARNr16S des souches d'*Enterococcus faecalis* isolées à partir de lait réfrigéré dans une zone aride d'Algérie et d'autres isolats d' *E. faecalis* provenant de lait dans différentes zones géographiques du monde, avec le numéro d'accès sur Genbank, le pays et le climat correspondants du site d'isolement.

	<i>Enterococcus faecalis</i> de la présente étude								
	MH569850	MH569851	MH569852	MH569853	MH569854	MH569856	MH569857	MH569859	MH569860
<i>E. faecalis</i> dans le monde									
KC699180 ^a Espagne ^b /Aride ^c	60	60	100	100	80	60	60	80	74,3
KC699182 Espagne / Aride	60	60	100	100	80	60	60	80	74,3
KC699179 Espagne / Aride	85,8	85,8	80	80	77,2	85,8	85,8	77,2	77,2
KC510241 Italie /Tempéré chaud	77,2	77,2	80	80	68,6	77,2	77,2	68,6	62,9
MH819496 Turquie / Tempéré chaud	85,8	85,8	82,9	82,9	77,2	85,8	85,8	77,2	80
MH819501 Turquie / Tempéré chaud	85,8	85,8	82,9	82,9	77,2	85,8	85,8	77,2	80
MH819500 Turquie / Tempéré chaud	85,8	85,8	82,9	82,9	77,2	85,8	85,8	77,2	80
MH819499 Turquie / Tempéré chaud	85,8	85,8	82,9	82,9	77,2	85,8	85,8	77,2	80
DQ239694 Chine / Tropical	77,2	77,2	80	80	65,8	77,2	77,2	65,8	65,8
KX261530 Chine / Tropical	77,2	77,2	80	80	65,8	77,2	77,2	65,8	65,8
MH779826 Sri Lanka / Tropical	77,2	77,2	80	80	65,8	77,2	77,2	65,8	65,8

a : Numéro d'accès sur Genbank, b : Pays, c : Climat.

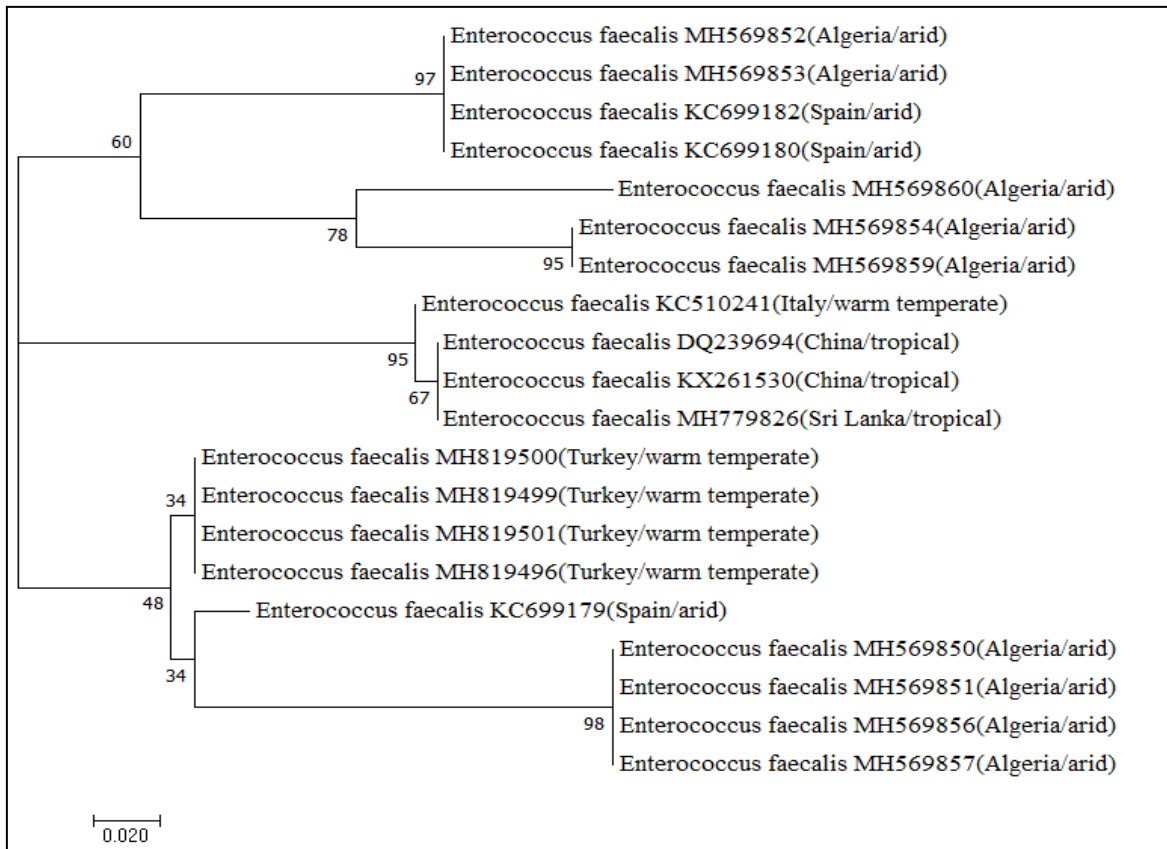


Figure 23. Arbre phylogénétique basé sur le gène ARNr 16S montrant la relation entre neuf taxons d'*Enterococcus faecalis* isolés à partir de lait cru dans une zone aride d'Algérie et des souches apparentées issus d'autres zones géographiques (GenBank). Les pourcentages bootstrap (basés sur 1000 répliquions) se réfèrent à l'analyse du maximum de vraisemblance / parcimonie maximum / jonction de voisins. Seules les valeurs supérieures à 50 % sont affichées. Les numéros d'accès, les pays et les climats sont indiqués à côté des noms des taxons.

Sept souches d'*E. faecalis* (MH569850, MH569851, MH569854, MH569856, MH569857, MH569859 et MH569860) ont montré des similitudes de séquences inférieures à 97% (3% de distance). Ces résultats suggèrent que les isolats peuvent représenter une nouvelle espèce à l'intérieur du genre caractérisé. Il a été manifestement confirmé que les organismes partageant une similarité de séquence du gène ARNr 16S inférieure à 97 % pourraient indiquer que l'isolat représente une nouvelle espèce et ne peut donc pas être considéré comme des membres de la même espèce (Stackebrandt et Goebel, 1994; Vandamme et al., 1996; Stackebrandt et Ebers, 2006).

En Italie, sept souches atypiques d'*Enterococcus* ont été isolées à partir d'un fromage artisanal sicilien, leurs séquences génétiques d'ARNr 16S présentaient des similitudes de

séquence inférieures à 97 % avec d'autres espèces décrites du genre *Enterococcus*, ces souches ont été proposées comme nouvelle espèce d'*Enterococcus* avec le nom de *E. italicus* sp. nov (Fortina et al., 2004). En outre, *Enterococcus lactis* sp. nov a été proposé pour d'autres souches d'*Enterococcus* atypiques isolées de fromages italiens au lait cru (Morandi et al., 2012).

L'étroite relation évolutionnaire des isolats avec ceux d'Espagne pourrait être due à la géographie et climat proches de ces zones arides. Whitlock (2014) a mentionné une relation significativement positive entre les réponses écologiques découlant de la diversité génétique adaptative et les niveaux des organisations de la communauté et de l'écosystème. Selon Talbot et al. (2017), à l'intérieur d'espèces de large distribution, des populations distinctes sont exposées à divers processus évolutifs. Les individus qui sont géographiquement proches sont généralement plus similaires génétiquement que les individus éloignés. De plus, la réponse de populations distinctes à diverses pressions sélectives peut conduire à l'adaptation aux conditions environnementales locales.

Les entérocoques occupent une variété de niches écologiques, y compris le tractus gastro-intestinal des animaux et des humains. Parmi les bactéries lactiques associées à l'alimentation, ils constituent le groupe le plus controversé. Ils ont un caractère psychrotrophique et ont démontré de remarquables capacités d'adaptation aux environnements défavorables, notamment l'adaptabilité à différents substrats de croissance, à haute température et à forte salinité (Quigley et al., 2013). En raison de leur grande variabilité et en fonction de la souche, les entérocoques peuvent être considérés comme des organismes altérants ou pathogènes, et des souches apparemment sûres dont certains probiotiques revêtent une importance particulière dans la technologie alimentaire, comme dans la fabrication de viande et de produits laitiers (Quigley et al., 2013; Quintela-Baluja et al., 2013).

De plus, malgré l'origine géographique commune d'*E. faecalis* de la zone aride Algérienne, une variation génétique importante (Tableau 13) et plusieurs Sub-clusters (Figure 24) sont observés à l'intérieur de ce gisement, suggérant la richesse des écosystèmes arides en termes de biodiversité et de physiologie des souches d'*E. faecalis*.

Tableau 14. Matrice de similarité (1 - distance) à la base du gène ARNr16S des souches d'*Enterococcus faecalis* isolées à partir de lait réfrigéré dans une zone aride d'Algérie

<i>E. faecalis</i> d' Algérie	<i>Enterococcus faecalis</i> de la présente étude								
	MH569850 ^a	MH569851	MH569852	MH569853	MH569854	MH569856	MH569857	MH569859	MH569860
MH569850		100	60	60	82,8	100	100	62,8	62,8
MH569851	100		60	60	82,8	100	100	62,8	62,8
MH569852	60	60		100	80	60	60	80	74,3
MH569853	60	60	100		80	60	60	80	74,3
MH569854	62,8	62,8	80	80		62,8	62,8	100	85,7
MH569856	100	100	60	60	62,8		100	62,8	62,8
MH569857	100	100	60	60	62,8	100		62,8	62,8
MH569859	62,8	62,8	80	80	100	62,8	62,8		86
MH569860	62,8	62,8	74,3	74,3	85,7	62,8	62,8	86	

a : Numéro d'accès sur Genbank

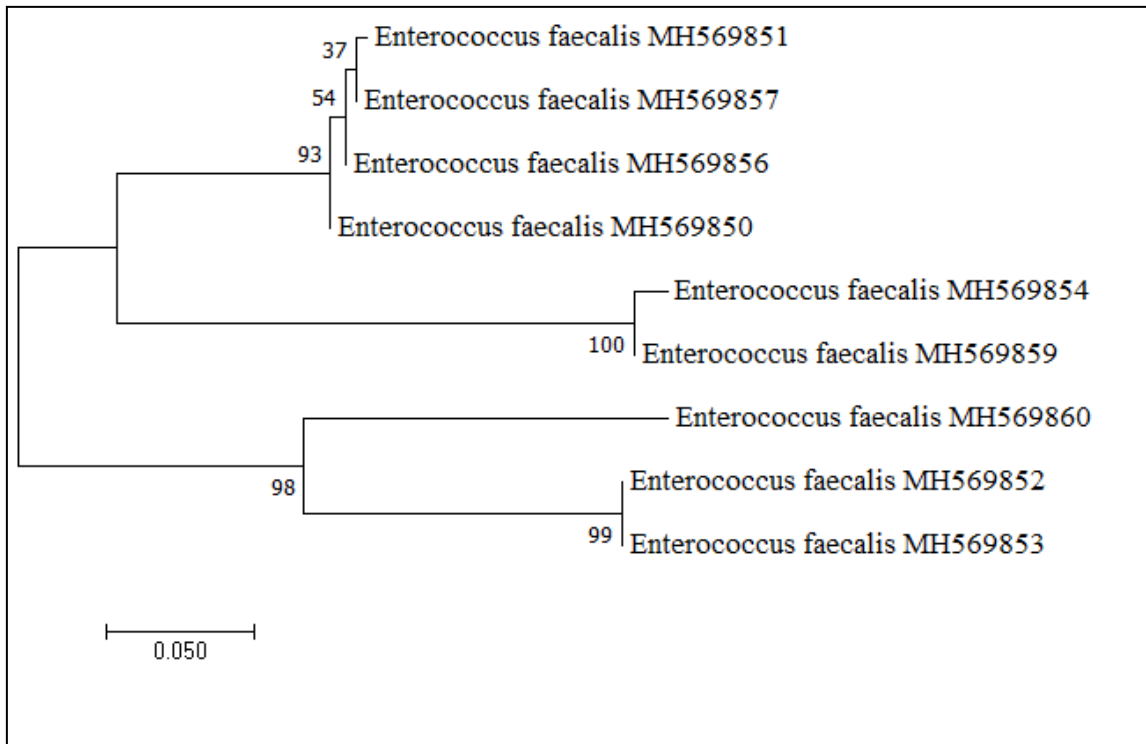


Figure 24. Arbre phylogénétique basé sur le gène ARNr 16S montrant la relation entre neuf taxons d'*Enterococcus faecalis* isolés à partir de lait cru dans une zone aride d'Algérie. Les pourcentages bootstrap (basés sur 1000 répliques) se réfèrent à l'analyse du maximum de vraisemblance / parcimonie maximum / jonction de voisins. Les numéros d'accès sont indiqués à côté du nom des taxons.



Conclusion

Conclusion générale

Le stockage à froid du lait à environ 4 °C provoque des changements dans les populations microbiennes, il est confirmé ici que la réfrigération du lait favorise la sélection des populations bactériennes psychrotrophes qui deviennent la microflore dominante dans le consortium microbien du lait de bactéries psychrotrophes. Le temps de stockage peut être un facteur important affectant le nombre des psychrotrophes et même la qualité des produits laitiers finaux. Nous signalons que le stockage prolongé du lait cru affecte la qualité microbienne du lait cru et le plus grand effet peut être observé après 4 jours de stockage à 4 °C. Surveiller les populations psychrotrophiques lors de la réfrigération peut offrir un outil sensible et efficace pour indiquer les niveaux de détérioration et la flore pathogène.

Dans la présente étude, les changements dynamiques de la croissance microbienne du lait cru réfrigéré récolté de la région de Mila en Algérie ont été observés durant 10 jours de stockage réfrigéré. La croissance microbienne observée est limitée et elle est caractérisée par une diversité mineure plus homogène par rapport aux données de la littérature sur la biodiversité du lait qui se réfèrent généralement aux échantillons de lait des zones tempérées et humides.

Il est remarqué aussi qu'il existe un retard de croissance microbienne notable dans le lait de montagne caractérisée par une phase de latence prolongée par rapport à celle du bassin. Cette durée de conservation prolongée suggère à la fois la présence de molécules bioactives antimicrobiennes issues des plantes pâturées par les vaches à l'extérieur de la ferme et à la sélection géographique de microorganismes à potentiel antagoniste évoluant dans la microflore du lait.

La biodiversité bactérienne observée dans le microbiote du lait analysé dans ce travail était plus homogène par rapport aux compositions microbiennes variables du lait rapportées dans différents pays et régions. Cette limitation du nombre d'espèces microbiennes suggère que le consortium microbien habitant le lait pourrait jouer un rôle antagoniste contre la prolifération d'autres micro-organismes. En effet, les nombreuses populations habitant le lait cru produisent plusieurs antimicrobiens impliquant des bactériocines, des antifongiques, du peroxyde d'hydrogène et des acides organiques. L'effet antagoniste bien discuté dans la littérature des genres bactériens *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Chryseobacterium* peut conférer une protection du lait contre la contamination et la diffusion des bactéries pathogènes habituelles nous démontrons que la combinaison de bactéries lactiques (LAB) (*L. plantarum*, *L. casei*, *E. faecalis*, etc.) inhibait la croissance de *Staphylococcus saprophyticus*, *S. equorum* et *L.*

monocytogenes. De plus *Enterococcus* peut offrir des opportunités comme un bioprotecteur afin d'améliorer la sécurité hygiénique des produits laitiers crus par l'inhibition de la croissance des contaminants, car il produit des substances antimicrobiennes telles que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (entérocoques). Les bactériocines sont devenues d'un grand intérêt car elles sont fréquemment actives contre plusieurs pathogènes d'origine alimentaire tels que *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *C. botulinum*. L'installation d'un équilibre dynamique dans le microbiote du lait réfrigéré entre l'ensemble des populations bactériennes pourrait être en faveur d'une durée de vie plus longue et d'une protection contre les bactéries pathogènes et les agents d'altération.

Ces résultats préliminaires pourraient encourager et motiver les recherches sur l'addition directe des extraits de plantes et/ou de microorganismes en tant que biopréservateurs pour améliorer la sécurité du lait et sa durée de conservation.

Les populations bactériennes psychrotrophes ont été identifiées comme *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Enterococcus* et *Lactobacillus*. *Enterococcus*. Dans le premier jour (temps 0), avant la réfrigération, les populations bactériennes étaient déjà présentes à de faibles niveaux dans le lait cru frais. Après 6 jours de réfrigération, on constate une augmentation du nombre de la totalité des populations bactériennes psychrotrophes sauf pour *Chryseobacterium*. A la fin de la réfrigération après 10 jours, les populations d'*Enterococcus* et de *Lactobacillus* dépassent largement en nombre les autres psychrotrophes et *Enterococcus* constitue le plus grand groupe composé de 9 taxons, avec *Enterococcus faecalis* étant les espèces prédominantes.

A travers l'étude de la génomique comparative, les séquences du gène ARNr16S d'*E. faecalis* ont été comparées avec des souches semblables de différentes géographies et climats dans le monde en utilisant les ressources bioinformatiques de NCBI. Les observations des variations génétiques ont montré que sept souches *E. faecalis* (MH569850, MH569851, MH569856, MH569856, MH569857, MH569859 et MH569860) ont enregistré des similitudes de séquences inférieures à 97 %, ce qui conduit à l'hypothèse que les isolats pourraient représenter une nouvelle espèce du genre *Enterococcus*. Selon la littérature, les organismes partageant la similarité de séquence du gène de l'ARNr16S de moins de 97%, pourrait indiquer que l'isolat représente une nouvelle espèce.

Les deux souches *E. faecalis* (MH569852 et MH569853) présentent une similitude parfaite (100%) avec deux isolats de la zone aride de l'Espagne (KC699180 et KC699182) et ont été regroupés ensemble dans l'arbre phylogénétique. La relation évolutive étroite des isolats

Algériens avec ceux d'Espagne pourrait être due au rapprochement géographique et au climat aride dominant dans ces deux régions.

Aussi, il à souligner est que malgré les souches de l'aride Algérien sont de la même aire géographique, ils ont manifesté des pourcentages de similarités différents, ceci suggèrent la richesse des écosystèmes arides en terme de biodiversité et physiologie d'*Enterococcus*.

L'intérêt de la phylogénétique est taxonomique par excellence, il nous permet de quantifier les distances évolutives entre les taxa bactériens exprimées par des pourcentages de distances et similarités. Aussi, il est important à noter que l'analyse de la matrice des distances évolutives est cruciale pour l'étude des parentés et ceci par rapport aux arbres.

Malgré que l'analyse phylogénétique a permit d'observer la variabilité génétique des isolats bactériens, de confirmer leur caractères atypiques et de proposer de nouvelles espèces comme candidats dans la taxonomie, les tests d'hybridations ADN/ADN sont nécessaires en perspectives pour confirmer les hypothèses évoquées.



*Références
Bibliographiques*

Références

1. Ananda Baskaran S, Kazmer G W, Hinckley L, Andrew S M, and Venkitanarayanan K (2009) Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *J. Dairy Sci* 92: 1423–1429.
2. Alavi P, Starcher MR, Thallinger GG, Zachow C, Müller H, Berg G (2014) *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC Genomics* 15: 482–496.
3. Azizi F, Mohammad B, Najafi H and Mohammad R (2017) The biodiversity of *Lactobacillus spp.* from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. *AMB Expr* 176: 1-10.
4. Aslanzadeh (2006) Biochemical profile-based microbial identification system. Assessment related to microbial food contamination. *Revue d'Epidemiologie*.
5. Augustin JC, Rosso L, Carlier V (1999) Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *J. Microbiol. Methods* 38: 137–146.
6. Augustin JC, Carlier V (2000) Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiology* 56: 29–51.
7. Augustin JC, Garry P (2005) Comportement de *Listeria monocytogenes* dans les produits de charcuterie. Fédération Française des Industriels Charcutiers, Traiteurs, Transformateurs de Viandes, 26 p.
8. Badisa A, Guetarnib D, Moussa Boudjemac B, Hennic DE, Kihal M (2004) Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology* 21: 579–588.
9. Baranyi J, Mc Clure PJ, Sutherland JP, Roberts TA (1993) Modeling bacterial growth responses. *J Ind Microbiol* 12: 190-194.
10. Baranyi J, Roberts TA (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol* 23: 277-294.
11. Baranyi J, Ross T, McMeekin TA, Roberts, TA (1996) Effects of parameterization on the performance of empirical models used in 'predictive microbiology'. *Food Microbiol.* 13: 83-91
12. Baranyi J, Pin C (1999) Estimating Bacterial Growth Parameters by Means of Detection Times. *Applied and environmental microbiology* 65(2) : 732–736
13. Beckering CL, Steil L (2002) "Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*." *Journal of Bacteriology* 184(22): 6395-6402.

14. Bekker A (2011) Growth and spoilage characteristics of *Chryseobacterium* species in milk. Magister Scientiae thesis -Food Microbiology University of the Free State, South Africa.
15. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O (2011) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. PloS One 6: e16424.
16. Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S & Guéguen M (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactobacillus genus. Int J Food Microbiol 126: 278–285.
17. Bornert G. (2000). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. Rev Méd. Vét., 151(11):1003-1010.
18. Boubendir A, Elabed S, Hamidechi M A, Yahia1 A, Koraichi S (2015) Interactions in milk psychrotrophic bacterial populations. J of Food Safety and Food Quality 66 : 160-166.
19. Boubendir A, Serrazanetti DI, Hamidechi MA, Vannini L, Guerzoni ME (2016) Changes in bacterial populations in refrigerated raw milk collected from a semi-arid area of Algeria. Ann Microbiol 66: 777-783.
20. Bouymajane A, Filali FR, Oulghazi S3, Ed-dra A, Benhallam F, El Allaoui A, Anissi J, Sendide K, Ouhmidou B, Moumni M (2018) Occurrence, molecular and antimicrobial resistance of Enterococcus spp. isolated from raw cow's milk trade by street trading in Meknes city, Morocco. GERMS 8 : 77-84.
21. Brisou J, Prevot AR 1954 Etudes de systematique bacterienne. X. Revision des especes reunies dans le genre Achromobacter. Ann Inst Pasteur 86:722–728.
22. Buchanan RL, Phillips JG (1990) Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot 53: 370-376.
23. Buchanan RL, Whiting RC, Damert WC (1997) When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. Food Microbiol 14: 313-326.
24. Capodifoglio E, Vidal AMC, Lima JAS, Bortoletto F, D'Abreu LF, Gonçalves ACS, Vaz ACN, Balieiro JCC, and Netto AS (2015) Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. Isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. J. Dairy Sci TBC :1–10.
25. Cempírková R, Mikulová M (2009) Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. Czech J Anim Sci 54: 65-73.

26. Chen C, -Cheng Lai C, Ling Huang H, -Yu Huang W et al (2019) Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae . *Front. Microbiol.* 10:789.
27. Chattopadhyay MK (2006) Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *J Biosci* 31:157-165.
28. Citak S, Yucel N and Mendi A (2005) Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. *J of Food Processing and Preservation* 29: 183–195.
29. Coppa M, Verdier-Metz I, Ferlay A, Pradel P, Didienne R, Farruggia A, Montel MC, Martin B (2011) Effect of different grazing systems on upland pastures compared with hay diet on cheese sensory properties evaluated at different ripening times. *Int Dairy J* 21:815–822.
30. Cortés CG, Suárez H, Buitrago G, and -Moreno CD (2017) Isolation and evaluation of the antagonist activity of lactic acid bacteria in raw cow milk. *Agronomía Colombiana* 35 : 357-364
31. Darsanaki RK, Aliabadi MA, Rokhi ML, Nourbakhsh M, Raeisi G (2012) Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Ann Biol Res* 3: 4189-4191.
32. Decimo M, Morandi S, Silveti T, Brasca M (2014) Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *J Food Sci* 79: 2081-2090.
33. De Garnica ML, Santos JA, Gonzalo C (2011) Influence of storage and preservation on microbiological quality of silo ovine milk. *J Dairy Sci* 94: 1922-1927.
34. De Garnica ML, Saez-Nieto JA, Gonzalez R, Santos JA and Gonzalo C (2014) Diversity of gram-positive catalase-negative cocci in sheep bulk tank milk by comparative 16S rDNA sequence analysis. *Int Dairy J* 34 : 142-145.
35. De Jonghe V, Coorevits A, Van Hoorde K, Messens W, Van Landschoot A, De Vos P, Heyndrickx M (2011) Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl Environ Microbiol* 77: 460-470.
36. Delhalle L, Daube G, Adolphe Y, Crevecoeur S, Clinquart A (2012) Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments .*Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16 (3) : 369-381.
37. Dellarras C (2007) Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. France .Lavoisier. ISBN : 978- 2- 743060945- 8. 462 p.
38. Denis F, poly MC, Bengen E, Quentin R (2007) Bactériologie médicale techniques usuelles. 2ème Ed. , Elsevier Masson, paris: p.417

39. Dogan B, Boor KJ (2003) Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl Environ Microbiol* 69: 130–8.
40. Ercolini D, Russo F, Ferrocino I, Villani F (2009) Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol* 26(2):228–31.
41. Euzéby J (2008) Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside, the IJSEM. *Int J Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1515.
42. Faith J, et al (2007) Large-scale mapping and validation of *Escherichia coli* transcriptional regulation from a compendium of expression profiles. *PLoS Biol.* 5:54 66.
43. Feng GD, Yang SZ, Wang YH, Deng MR, Zhu HH (2014) *Acinetobacter guangdongensis* sp. nov., isolated from abandoned lead–zinc ore *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:3417-3421.
44. Fortina MG, Ricci G, Mora D and Manachini PL (2004) Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. . *Int J of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1717–1721.
45. Franciosi E, De Sabbata G, Gardini F, Cavazza A, Poznanski E (2011) Changes in psychrotrophic microbial populations during milk creaming to produce Grana Trentino cheese. *Food Microbiol* 28: 43-51.
46. Gargouri A, Hamed H, Elfeki A (2013) Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis. *J Food Sci* 78: M1405-M1411.
47. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TM (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, release 5.0. New York.
48. Giannino ML, Marzotto M, Dellaglio F, Feligini M (2009) Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int J of Food Microbiology* 130: 188–195.
49. Gleeson D, O'Connell A and Jordan K (2013) Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk tank milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 52: 217–227.
50. Guezlane-Tebibel N, Kahlouche B, Athmani Gemouri S (2010) *Microbiologie. Travaux pratiques*, office des publications universitaires, 3^{ème} édition corrigé 4973 : 99 pp.
51. Guiraud JP, Rosec JP (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. AFNOR: p.241
52. Gurung M, Nam HM, Tamang MD (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea. *J Dairy Sci*, 96:1997- 2002.

53. Hantsis-Zacharov E, Halpern M (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl Environ Microbiol* 73: 7162-7168.
54. Hantsis-Zacharov E, Senderovich Y, Halpern M (2008) *Chryseobacterium bovis* sp. nov., isolated from raw cow's milk . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 : 1024–1028.
55. Higginbotham KL, Burris K, Zivanovic S, Davidson P M, and Stewart CN (2013) Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in a microbiological medium and milk of various fat concentrations. *J of Food Protection*,77(2) : 262–268
56. IdouiT, Boudjerda J, Leghouchi E, ET Karam NE (2009) Lactic acid bacteria from sheep's Dhan'', a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*. 60: 177-183.
57. Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. CLIN. Microbiol* 45: 2761–2764
58. Jay MJ (2005) *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. Artmed, Porto Alegre, 711 pp.
59. Jayanth K, Jeyasekaran G, Jeya Shakila R (2002) Isolation of marine bacteria, antagonistic to human pathogens. *Indian Journal of Marine Sciences* 31(1) 39-44.
60. Kohler C, Musser DJ, Dumas NB (2009) Identification of aerobic Gram negatif bacteria. In Goldman E. et Green L.H.(editeurs). *Practical Hand Book of Microbiology*. CRC press Taylo et Francis Group NY, USA. p 67.
61. Kottke M, Grieser J, Beck C, Rudolf B and Rubel F(2006) World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *J Meteorol. Z* 15: 259-263.
62. Kumar S, Stecher G and Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870–1874.
63. Lafarge V, Ogier JC, Girard V, Maladen V, Leveau JY, Gruss A, Delacroix-Buchet A (2004) Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl Environ Microbiol* 70: 5644-5650.
64. Larsen MK, Hymøller L, Brask-Pedersen DB, Weisbjerg MR (2012) Milk fatty acid composition and production performance of Danish Holstein and Danish Jersey cows fed different amounts of linseed and rapeseed. *J Dairy Sci* 95(7):3569–3578
65. Le Minor L, Richard C (1993) *Laboratory methods for the identification of enterobacteria*. Institut Pasteur: Paris, France 217:M .

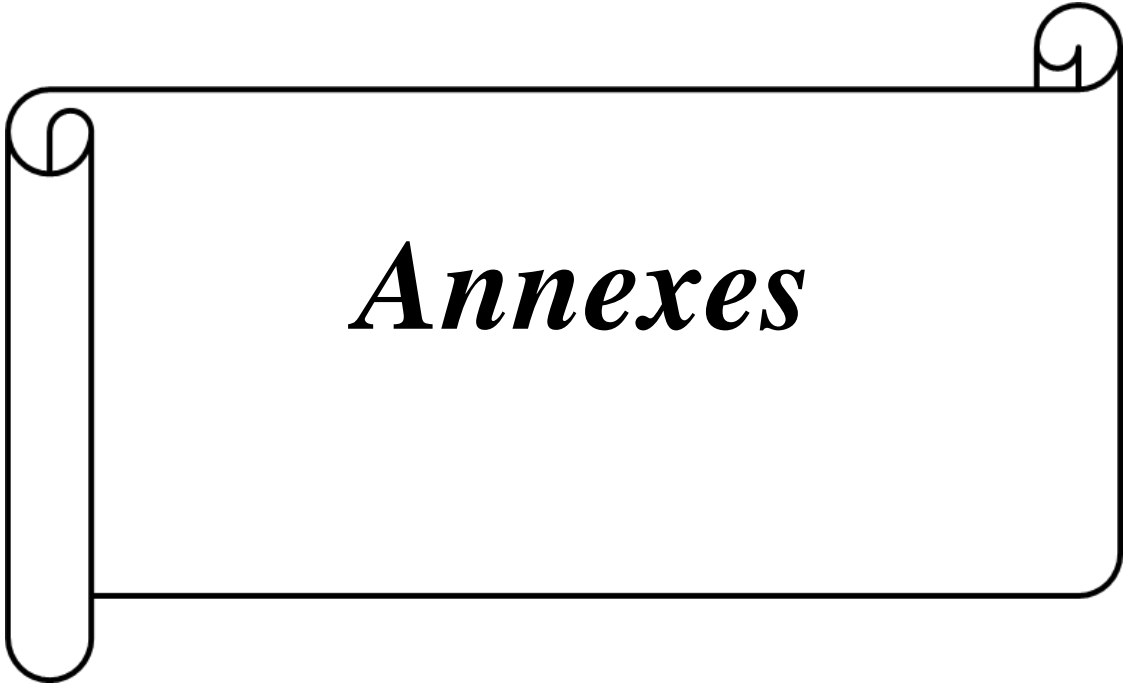
66. Lim CS, Oh YS, Lee JK, Park AR, Yoo JS, Rhee SK and Roh DH (2011) *Flavobacterium chungbukense* sp. nov., isolated from soil. *Int J Systematic and Evolutionary Microbiology* 61 : 2734–2739.
67. Looney WJ, Narita M, et Mühlemann K (2009) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infection Diseases*. 9: 312-323.
68. López S et al (2004) Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *Int. J. Food Microbiol* 96: 289-300.
69. Machado SG, Bazzoli DMS, Vanetti MCD (2013) Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk. *Int Dairy J* 29: 8-14.
70. Machado SG, Baglinière F, Marchand S, Van Coillie E, Vanetti MCD, De Block J, Heyndrickx M (2017) The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. *Front Microbiol* 8: 1-22.
71. Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000) *Brock biology of microorganisms*, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ. 3: 135-162.
72. Mami A, Hamedi AR, Henni J, Kerfouf A, Kihal M (2012) Screening of autochthonous *Lactobacillus* species from Algerian raw goats' milk for the production of bacteriocin-like compounds against *Staphylococcus aureus*. *Afr J Biotechnol* 11: 4595-4607.
73. Maravic A, Skocibusic M, Samanic Ivica, Puizina J (2013) Profile and multidrug resistance determinants of *Chryseobacterium indologenes* from seawater and marine fauna. *World J Microbiol Biotechnol* 29:515–522.
74. Marchand S, Heylen K, Messens W, Coudijzer K, DeVos P, Dewettinck K, Herman L, De-Block J, Heyndrickx M (2009) Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environ Microbiol* 11(2):467–82.
75. Marroki A, Zúñiga M, Kihal M, Martínez G (2011) characterization of *lactobacillus* from algerian goat's milk based on phenotypic, 16srDNA sequencing and their technological properties. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 158-171
76. Mankai M, Boulares M, Ben Moussa O, Karoui R, Hassouna M (2012) The effect of refrigerated storage of raw milk on the physicochemical and microbiological quality of Tunisian semihard Gouda-type cheese during ripening. *Int J Dairy Technol* 65: 250-259
77. Mcauley CM, Britz ML, Gobius KS, and Craven HM (2015) Prevalence seasonality and growth of Enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia. *J. Dairy Sci.* 98: 8348–8358

78. Mcphee JD, Griffiths MW (2011) Psychrotrophic bacteria *Pseudomonas* spp. In: John, W.F. (Ed). Encyclopedia of Dairy Sciences. Second Edition. Academic Press San Diego, pp 379-383.
79. Michel V, Hauwuy A, and Chamba J F (2001) La flore microbienne de laits crus de vache diversité et influence des conditions de production. Lait 81: 575-592.
80. Morandi S, Cremonesi P, Povolo M and Brasca M (2012) Enterococcus lactis sp. nov., from Italian raw milk cheeses. Int J Systematic and Evolutionary Microbiology 62 : 1992–1996.
81. Nahla TK (2006) Study on mesophilic *Aeromonas* in milk and some milk products in Port Said city. J Appl Sci Res 11: 1037-1041.
82. Moore E, Kruger A, Hauben L, Seal S, De Baere R, De Wachter K, Timmis K, Swings J (1997) 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intrageneric relationship of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. FEMS Microbiol Lett 151:145-153.
83. O'connell A, Ruegg PL, Jordan K, O'brien B, Gleeson D (2016) The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. J Dairy Sci 99: 3367-3374.
84. Okano K, Tanaka T, Ogino C , Fukuda H, Kondo A (2010) Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85: 413-423
85. Oliveira GB, Favarin L, Luchese RH, McIntosh D (2015) Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?. Braz J Microbiol 46: 313-321.
86. Paludetti LF, Jordan K, Kelly AL, Gleeson D (2018) Evaluating the effect of storage conditions on milk microbiological quality and composition. Irish J Agr Food Res 57: 52-62.
87. Paşca C, Mărghitaş LA, Dezmirean D, Bobiş O, Bonta V, Mărgăoan R, Chirilă F, Fit N (2015) The assessment of the antibacterial activity of some plant extracts on normal and pathogenic microflora from milk. Anim Sci Biotechnol 48: 166-172.
88. Perko B (2011) Microbiological quality of raw milk. Mljekarstvo 61: 114-124.
89. Phadtare S (2004) "Recent developments in bacterial cold-shock response." Current Issues in Molecular Biology 6: 125-136.
90. Prescott LM, Harley JP, Klein A (2003) Microbiology Ed : De Bock. Paris (france) 128 (2): 28-29.
91. Quigley L, O'sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD (2013) The complex microbiota of raw milk. J Dairy Sci 96: 4928-4937.

92. Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No IC, Morandi S, Alnakip ME, Caamaño-Antelo S, Barros-Velázquez J, Calo-Mata P (2013) Characterization of different food-isolated *Enterococcus* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 34: 2240-2250.
93. Raats D, Offek M, Minz D, Halpern M (2011) Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiol* 28(3):465–71.
94. Rajwar A, Sahgal M (2016) Phylogenetic relationships of fluorescent pseudomonads deduced from the sequence analysis of 16S rRNA, Pseudomonas-specific and rpoD genes. *Biotech* 80:1-10.
95. Rasolofo EA, St-gelais D, Lapointe G, Roy D (2010) Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *Int J Food Microbiol* 138: 108-118.
96. Ribeiro Júnior JC, De oliveira AM, Silva FG, Tamanini R, De oliveira ALM, Beloti V (2018) The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *J Dairy Sci* 101: 75-83.
97. Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, Vander Lelie D, Dow JM (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7(7):514–525.
98. Rosso L, Lobry JR, Bajarad S, Flandrois JP (1995) Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 610-616.
99. Samaržija D, Zamberlin Š, Pogacic T (2012) Psychrotrophic bacteria and milk quality. *Mljekarstvo* 62: 77-95.
100. Sanz Sampelayo MR, Chilliard Y, Schmidely P, Boza J (2007) Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *SmallRumin. Res.* 68: 42–63.
101. Sharifi rad J, Lalanne GM, Alvarez AJH, Taheri Y, SHaheen SH, Kregiel D, Antolak H, Pawlikowska E, Jokanovic MB, Rajkovic J, Hosseinabadi T, Masic BL, Baghalpour N, Mohajeri M, Martins N (2019) *Malva* species: Insights on its chemical composition towards pharmacological applications *phytotherapy Research.* 1–22.
102. Shivaji S, Reddy GSN, Suresh K, Gupta P, Chintalapati S, Schumann P, Stackebrandt E, Matsumoto GI (2005) *Psychrobacter vallis* sp. nov. and *Psychrobacter aquaticus* sp. nov., from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:757-762

103. Silveti T, Morandi S, Brasca M (2014) Biopreservation potential of *Enterococcus faecalis* isolated from Italian traditional raw milk cheeses. *J Food* 12: 210-217.
104. Sitohy M, Mahgoub S, Osman A (2011) Controlling psychrotrophic bacteria in raw buffalo milk preserved at 4 °C with esterified legume proteins. *LWT - Food Sci Technol* 1-6.
105. Sorhaug T, Stepaniak L (1997) Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 35-40
106. Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846-849.
107. Stackebrandt E, Ebers J (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 33:152-155.
108. Švec P C, Franz M AP(2004) The genus *Enterococcus*. In: *Lactic Acid Bacteria biodiversity and taxonomy*. 3 edition. P 175-211.
109. Talbot B, Chen TW, Zimmerman S, Joost S, Eckert AJ, Crow TM, Semizer-Cuming D, Seshadri C, Manel S (2017) Combining Genotype, Phenotype, and Environment to Infer Potential Candidate Genes. *Journal of Heredity*. 108: 207-216.
110. Tavaría FK, Franco I, Carballo FJ, Xavier Malcata F (2003) Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal* 1-8.
111. Toqeer A, Kanwal R, Avub N (2006) Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cermoris* and *Lactobacillus acidophilus* isolated from camel milk. *J Biotechnol* 5: 481-488.
112. Vancanneyt M, Zamfir M, Devriese L. A, Lefebvre K., Engelbeen K, Vandemeulebroecke K., Amar M, De Vuyst L, Haesebrouck F and Swings J (2004) *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *Int J Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2175–2179.
113. Vandamme P, Bernardet JF, Segers P, Kersters K, Holmes B (1994) New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 44:827-831.
114. Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J (1996) Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematics *Microbiol Rev* 60: 407–438.
115. Vaz-Moreira I, Novo A, Hantsis-Zacharov E, Lopes AR, Margarita G, Nunes OC, Manaia C and Halpern M (2011) *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. *Int J Systematic and Evolutionary Microbiology* 61 : 2837–2843

116. Visca P, Seifert H and Kevin. JT (2011) *Acinetobacter* Infection – an Emerging Threat to Human Health. *IUBMB Life*, 63 : 1048–1054.
117. Vithanage NR, Dissanayake M, Bolge G, Palombo EA, Yeager TR, Datta N (2016) Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *Int. Dairy J* 57: 80-90
118. Vithanage NR, Dissanayake M, Bolge G, Palombo EA, Yeager TR, Datta N (2017) Microbiological quality of raw milk attributable to prolonged refrigeration conditions. *J Dairy Res* 84: 92-101.
119. Vyletřlova M, Hanuš O, Urbanova E, Kopunecz P (2000) The occurrence and identification of psychrotrophic bacteria with proteolytic and lipolytic activity in bulk milk samples at storage in primary production conditions. *Czech J Anim Sci* 45: 373-383.
120. Weber M, Schünemann W, Fuß J, Kampfer P and Lipski A (2018) *Stenotrophomonas lactitubi* sp. nov. and *Stenotrophomonas indicatrix* sp. nov., isolated from surfaces with food contact. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:1830–1838.
121. Whiting RC, Buchanan RE (1993) Letter to the editor: a classification of models in predictive microbiology. A reply to K.R. Davey. *Food Microbiol* 10: 175-177.
122. Whitlock R (2014) Relationships between adaptive and neutral genetic diversity and ecological structure and functioning: a meta-analysis. *Journal of Ecology*. 102: 857-872.
123. Wiking L, Frøst MB, Larsen LB, Nielsen JH. 2002. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. *Milchwissenschaft* 57:190–4.
124. Yabrir B, Zobiri A, Laoun A, Titouche Y, Chenouf NS, Ranebi D, Isselnane S, Mati A (2018) Bacteriological behavior of ewe's raw milk collected in Algerian area steppe and refrigerated at 4°C or 7°C. *Livestock Res Rural Dev* 30(2). <http://www.lrrd.org/lrrd30/2/byab30023.html>.
125. Yang HC, Im WT, Kang MS, Shin DY, Lee ST (2006) *Stenotrophomonas koreensis* sp.nov., isolated from compost in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:81-84.
126. Yuan L, Sadiq FA, liu TJ, LI Y, GU J , Yang HY (2018) Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes. *J Zhejiang Univ-Sc B* 19:630-642.



Annexes

Annexe A

Composition de milieu de culture

Milieu MRS (De Man Rogosa et sharpe, 1960)

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
Kh ₂ po	42 g
Mgso ₄	0,25 g
Mnso ₄	0,05 g
Agar-agar	15 g
Cystéine-Hcl	0,5 g
Eau distillée	1000mL
pH	6,8

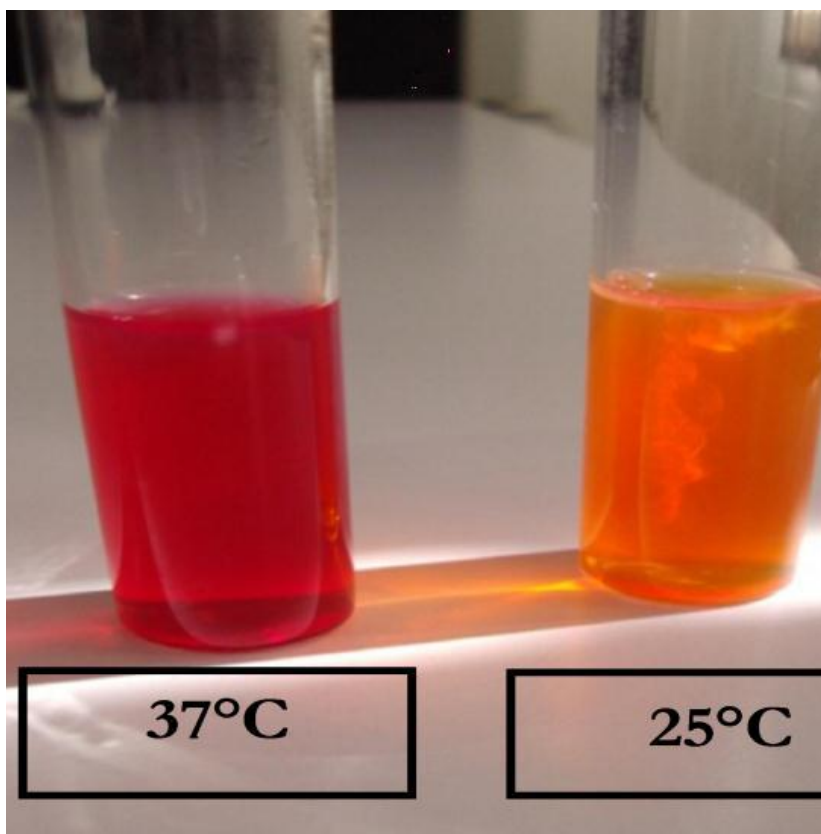
Gélose nutritif

Peptone	5 g
Extrait de levures	2,5 g
Glucose	1 g
Agar-agar	15 g
pH=	7,2

Annexe B : Analyses bactériologiques



Teste de la catalase. Le dégagement gazeux est en faveur de la présence de l'enzyme catalase dans le métabolisme respiratoire bactérien



Recherche de la Mobilité sur gélose Mannitol mobilité à 25 et 37°C



Caractère hémolytique de *Aeromonas*. mis en évidence sur gélose au sang.

Tableau 1. Evolution de la croissance microbienne en UFC. mL^{-1} de la flore totale du lait à 4°C durant 10 jours.

Jours	Résultats de la croissance en UFC . mL^{-1}	
	Ferme A	Ferme B
0	7333.33	983.33
2	352 00	756.66
4	189 000	113 300
6	5 066 667	19 200
8	6 700 000	473 333.33
10	14 666 667	1 890 000

Tableau 1: Moyennes de trois répétitions du dénombrement, écarts types et valeurs de log UFC.

		0j			2j			4j			6j			8j			10j		
T1	UFC/ml	7600	7300	7100	12300	12100	10800	50000000	55000000	60000000	6300000	7400000	4000000	1,6E+07	1,5E+07	2,5E+07	17700000	8400000	17900000
	moyenne	7333,33			35200			165000000			5900000			1,9E+07			14666667		
	Ecartype	251,66			814,45			5000000			1734935			5828379			5428014		
	LogUFC	3,87			4,08			6,7			6,77			7,25			7,17		
T2	UFC/ml	840	1170	940	800	740	730	7300	73000	33000	17700	17900	22000	470000	450000	50000	2000000	1870000	1800000
	moyenne	983,33			756,66			113300			19200			473333,33			1890000		
	Ecartype	169,21			37,85			33108,35			2426,93			25166,11			101488,92		
	LogUFC	2,99			2,90			3,3			4,28			5,67			6,27		

Annexe C : Biologie moléculaire

1. *Enterococcus faecalis* strain 13B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH569850.1

[GenBank Graphics](#)

>MH569850.1 *Enterococcus faecalis* strain 13B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCA
GCAAACGCACTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCT
TTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCA
TTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGG
AAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTGCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTC
AGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAA

2. *Enterococcus faecalis* strain 15B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH569851.1

[GenBank Graphics](#)

>MH569851.1 *Enterococcus faecalis* strain 15B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
TAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
TCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGACAAAGTG
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCG
AGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAG
ACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGC
AACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACACCACGAGAGTTTGTAAC
ACCCGAAGT

3. *Enterococcus faecalis* strain 4M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH569852.1

[GenBank Graphics](#)

>MH569852.1 *Enterococcus faecalis* strain 4M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACAC
TTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGA
AAGGCGCTTTCGGGTGTCRCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGT
TTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAAC
GTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA
GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTG
GAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTG
TAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGG

4. *Enterococcus faecalis* strain 10M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH569853.1 Algeria

[GenBank Graphics](#)

>MH569853.1 *Enterococcus faecalis* strain 10M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
TGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACAC
TTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGA
AAGGCGCTTTCGGGTGTCRCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGT
TTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAAC
GTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC
AGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATT
GGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATATGGAGGACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA
CTGACGCTGAGGCTCGAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT

5. *Enterococcus faecalis* strain 2M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH569854.1 Algeria

[GenBank Graphics](#)

>MH569854.1 *Enterococcus faecalis* strain 2M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCRCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAA
CTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCG
AGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCACCGGGGAGGGT

CATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAKATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG
GTCTGT

6. *Enterococcus faecalis* strain D70 1G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH569856.1 Algeria

[GenBank Graphics](#)

>MH569856.1 *Enterococcus faecalis* strain D70 1G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACG
CATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTC
GGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTG
GGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAA
CGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGA
TTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
CACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA
GAGTTTGTAACACCC

7. *Enterococcus faecalis* strain E70 7G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH569857.1

[GenBank Graphics](#)

>MH569857.1 *Enterococcus faecalis* strain E70 7G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGC
ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCG
GGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG
GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGG
GCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAAC
GAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGAT
TGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
ACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAG
AGTTTGTAACA

8. *Enterococcus faecalis* strain G71 6M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH569859.1

[GenBank Graphics](#)

>MH569859.1 *Enterococcus faecalis* strain G71 6M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
CRCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAKCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGA
AAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC
CTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGWAACTGGGASACTT
GAGTGCAGAAGAGGASAGTGSAATTCCATGTGTAGCG
```

9. *Enterococcus faecalis* strain h71 11M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH569860.1 MH569860

[GenBank Graphics](#)

>MH569860.1 *Enterococcus faecalis* strain h71 11M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
GGATAACAACCTTGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCA
TAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCRCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGT
GAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTA
GTAACCTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA
AGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCACCGGGG
AGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGCGCAAGGCGGCT
CTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGG
```

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol. 72, 2021



Dynamic changes of psychrotrophic bacterial populations in Algerian refrigerated raw cow milk

BOUCHAIR K Laboratory of Natural Sciences and Materials, University Centre Abdelhafid Boussouf, Mila, Algeria

BOUBENDIR A Laboratory of Natural Sciences and Materials, University Centre Abdelhafid Boussouf, Mila, Algeria

SERRER A Laboratory of Natural Sciences and Materials, University Centre Abdelhafid Boussouf, Mila, Algeria

<https://doi.org/10.12681/jhvms.26764>

Copyright © 2021 K BOUCHAIR, A BOUBENDIR, A SERRER



To cite this article:

BOUCHAIR, K., BOUBENDIR, A., & SERRER, A. (2021). Dynamic changes of psychrotrophic bacterial populations in Algerian refrigerated raw cow milk. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 72(1), 2773-2780. doi:<https://doi.org/10.12681/jhvms.26764>

Dynamic changes of psychrotrophic bacterial populations in Algerian refrigerated raw cow milk

K. Bouchair , A. Boubendir , A. Serrer 

Laboratory of Natural Sciences and Materials, University Centre Abdelhafid Boussouf, Mila, Algeria

ABSTRACT: The aim of the present study is to evaluate the microbial dynamic changes in raw cow milk during refrigeration. Milk samples were collected from two dairy farms situated in basin and mountain areas in the region of Mila, Algeria. Cold storage of milk samples at 4 °C was used to promote psychrotrophic microbial growth during 10 days. The microbial flora of milk was determined by culture methods and the identification of bacterial isolates was carried using cultural, morphological and biochemical criteria. The variations in total viable count and kinetic parameters of microbial growth were analyzed during refrigeration using Baranyi and Roberts Model. The initial microbial counts ranged from 2.94 ± 0.04 to 3.87 ± 0.11 log CFU * mL⁻¹ and the maximum growth did not exceed 7.00 ± 0.12 log CFU * mL⁻¹. The hygienic limit was surpassed after 2 days in the basin farm and later after 6 days in mountain farm. The generation time varied from 1.20 ± 0.55 to 4.18 ± 0.22 days in the basin farm and mountain farm respectively. The psychrotrophic bacterial populations were identified as *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Enterococcus* and *Lactobacillus*. The notable delay in microbial growth in milk from the mountain farm compared to the one from basin could be related to indoor/outdoor feeding mode adopted in mountain opposed to indoor feeding in the basin farm. This prolonged shelf-life suggests the possible presence of antimicrobial molecules coming from plants grazed around the farm and the selection in the microbiota of some microbial species with antagonist potential.

Keywords: raw cow milk, refrigerated storage, microbial growth parameters, psychrotrophic bacterial populations, shelf-life

Corresponding Author:

A. Boubendir, Laboratory of Natural Sciences and Materials, University Centre Abdelhafid Boussouf, Mila. RP.26. Mila, 43000, Algeria
E-mail address: a.boubendir@centre-univ-mila.dz

Date of initial submission: 03-05-2020
Date of revised submission: 27-08-2020
Date of acceptance: 30-08-2020

INTRODUCTION

In many parts of the world milk and dairy products are indispensable constituents of human nutrition and play an important role in human health and the development of life (FAO, 2013; Quigley et al., 2013). The prolonged storage of milk by refrigeration favors the growth of psychrotrophic bacteria, this category of microorganisms have become a fundamental limitation for dairy products shelf-life (De Jonghe et al., 2011). Initially, they account for less than 10% in refrigerated raw milk, than they evolve as the major microorganisms constituting more than 70% to 90% of the microbiota (Decimo et al., 2014). Particularly, psychrotrophs by their proteases and lipases extracellular enzymes play a leading role in the deterioration of dairy products (Cempirková and Mikulová, 2009).

Numerous bacterial strains were isolated from refrigerated milk, they belong to the genera *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Listeria* and *Enterococcus* (Lafarge et al., 2004; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007a; Boubendir et al., 2011). The majority of psychrotrophic bacteria are known for the spoilage of milk and dairy products. However, some species can be considered as human pathogenic bacteria by producing toxins and / or showing resistance to antibiotics (Samaržija et al., 2012). Dynamic changes of psychrotrophic flora in milk during 24 h of refrigeration (Lafarge et al., 2004) and in creamed milk from different geographical origins (Franciosi et al., 2011) have been investigated. Vyletělva et al. (2000) evaluated microbial growth dynamics of mesophilic and psychrotrophs in cow's raw milk in different times of storage and temperatures. Gargouri et al. (2013) confirmed that the dynamics of psychrotrophic bacteria counts (PBC) in cow's raw milk conserved at 4 °C was linked to storage time and the initial contamination value. Interesting relationships were elucidated between the geographical origin of milk and both genetic diversity and antimicrobial activity, suggesting the profound correlation between the region and some genotypic and metabolic conducts of milk microbiota (Silvetti et al., 2014).

The data on milk microbial dynamics during refrigeration particularly in Algeria is missing, thus the aim of the present study is to evaluate the dynamics of microbial growth during all the time of milk refrigeration in two dairy farms, one in the basin and the other in the mountain of Mila, Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Milk sampling

Raw milk samples were collected from two dairy farms located in the region of Mila (Algeria) at the locality of El-Kherba (36° 27'N / 6° 15'E) in the basin and Hamala (36° 34'18 "N / 6° 20'24) in the mountain. In the basin (farm A), the cows feed only inside principally on silage, barley, oats and hay, while in the mountain (farm B), the cows feed both inside and outside, the prevalent plants grazed around this farm were *Thymus*, *Origanum*, *Malva*, *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Olea* leaves (Ouelbani et al., 2016). At each farm, five raw milk samples were collected from healthy cows "Française Frisonne Pie noir". The teat ends were cleaned by wiping using dry paper towels, the preliminary jets were discarded and 25 mL of raw milk sample were directly collected from each of the four teats (i.e., a total of 100 mL per cow) and transferred to the laboratory into individual sterile flasks at 4 °C.

Enumeration of microorganisms

Raw milk samples were processed as soon as they arrived to the laboratory. They were analyzed immediately at the first (time 0) day and at different times (2, 4, 6, 8 and 10 days) over 10 days of refrigerated storage at 4 °C. Serial dilutions (10^{-1} - 10^{-5}) were prepared for each sample; 1 ml of each dilution was placed on Sterile Standard Plate Count (SPC) agar, a standard medium corresponding to the American Public Health Association formulation for milk, water, food and dairy products (Oxoid CM0463). Plates were incubated at 37 °C for 48 h, those with the number of colonies 30 to 300 were considered for counting. All the experiments were performed in three replications per milk sample at each time point and results were expressed as mean values. To control the occurrence of hemolytic bacteria as indicators of probable pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* and *Staphylococcus aureus*, 0.1 ml from the dilution 10^{-1} were also plated on 5% (v/v) horse blood Columbia agar added with Cefazolin at 20 mg * L⁻¹ (Sandoz GmbH, Kundl, Austria), plates were incubated for 48 h at 37 °C (Boubendir et al., 2016). The enumeration of *Lactobacillus* was carried by adding 1 mL of the dilution 10^{-1} to sterile dishes, and liquefied MRS Agar (45°C) is poured into the dish and mixed carefully. Once the medium is solidified, a new layer of uninoculated MRS Agar is poured on the surface to make a layer-plate; the plates were incubated for 48 h at 37 °C.

Identification

At each sampling time (0, 6 and 10 days), colonies with different morphologies (color, shape, and size) were selected and purified by streaking on the same medium. The identification of the presumed bacteria was realized using cultural, morphological and biochemical criteria. The main identification tests used were: Gram staining, mobility (at 25 and 37 °C), catalase presence, oxidase presence, methyl red test (MR test), indole production, Voges-Proskauer reaction (VP test), nitrate reduction, H₂S production (TSI test), urease presence, aesculin hydrolysis and hemolytic activity.

Data analysis

Mean data relative to the repetitions of total bacterial counts on SPC agar medium for milk samples during storage at 4 °C were analyzed using Baranyi and Roberts Model (Baranyi and Roberts, 1995) in order to obtain the microbial growth parameters, i.e., maximum growth rate (μ_{\max}), lag phase length (λ) and maximum cell load attained (X_{\max}).

RESULTS AND DISCUSSION

Microbial dynamic changes during refrigeration of milk

The dynamics of microbial growth on SPC agar during 10 days of storage at 4 °C are shown in Figure 1, while Table 1 reports the parameters of microbial growth obtained. The initial number of psychrotrophic bacteria in raw milk samples collected from the two farms (A and B) were 3.87 ± 0.11 and 2.94 ± 0.04

log CFU * mL⁻¹ respectively. These values did not exceed the hygienic limit (4.69 log CFU * mL⁻¹) reported by Cempírková and Mikulová (2009) and Gargouri et al. (2013). This denotes the respect of good farming practices, good health state of animals and appreciable hygienic farm environment. The environment where dairy cows are housed and milked influences the microbial contamination of milk by udder preparation techniques, milking machines protocols, the procedures of cleaning and disinfecting milking machines, milk tanks and the hygiene of personnel. Other principal factors are the refrigeration rate of the milk at the required temperature and the time of storage (Rasolofo et al., 2010; Samaržija et al., 2012). The present level of initial microbial contamination of raw milk was almost similar to those reported in other farms globally. The initial contamination of cow's raw milk from mountain farms and foothills areas of Southern and Western Bohemia, registered the mean value of 3.46 log CFU * mL⁻¹ at different temperatures (4, 6.5 and 10 °C) (Cempírková and Mikulová, 2009). Another study in Brazil observed an initial PBC of 3.5 log CFU * mL⁻¹ in the raw milk sample stored at 7 °C (Machado et al., 2013). In the region of Sfax (Tunisia) the level of PBC in raw milk was 2.89 CFU * mL⁻¹ after one day of cold storage at 4 °C (Gargouri et al., 2013). In Ireland the mean value of initial contamination of milk at different temperatures (2, 4 and 6 °C) was 2.87 log CFU * mL⁻¹ (O'connell et al., 2016). In the semi-arid area of Algeria (region of Biskra), the initial PBC in raw milk refrigerated at 4 °C ranged from 2.5 to 3.5 log CFU * mL⁻¹ (Boubendir et al., 2016).

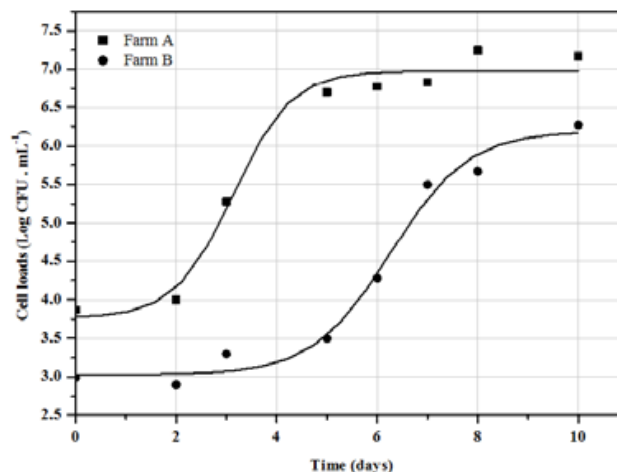


Figure 1. Growth curves of total viable bacteria count obtained by Baranyi and Roberts Model in milk refrigerated during 10 days at 4 °C, from two dairy farms in the basin (A) and mountain (B) in the region of Mila, Algeria

Table 1. Microbial growth parameters obtained by Baranyi and Roberts Model of mean count data of total viable bacteria over refrigerated storage of milk samples, from two dairy farms in the basin (A) and mountain (B) in the region of Mila, Algeria

Farm / Location	Geographical coordinates	Altitude (m)	Initial value ^a	λ ^b	μ_{\max} ^c	X_{\max}
Farm A (Basin)	36°27'N/6°15'E	598	3.87 ± 0.11	1.20 ± 0.55	0.78 ± 0.16	7.00 ± 0.12
Farm B (Mountain)	36°34'N/6°20'E	829	2.94 ± 0.04	4.18 ± 0.22	0.73 ± 0.05	6.29 ± 0.07

^a (log CFU * mL⁻¹), ^b Lag phase length (days), ^c Maximum growth rate (Δ log CFU * mL⁻¹ * day), X_{\max} : Maximum cell load (log CFU * mL⁻¹)

The maximum growth levels (X_{\max} value) reached during the stationary phase, after 10 days of milk refrigeration, were 7.00 ± 0.12 and 6.29 ± 0.07 log CFU * mL⁻¹ in farm A and B respectively. The hygienic limit of milk was surpassed after 2 days in farm A and later after 6 days in farm B. In Slovenia, the PBC augmented on the second day of collection up 4.61 log CFU * mL⁻¹ (Perko, 2011), and in Spain registered 7.04 log CFU * mL⁻¹ (De Garnica et al., 2011). In Tunisia, the hygienic limit was surpassed after 2 days of cold storage (Gargouri et al., 2013). In Ireland the PBC level reached was 7.00 log CFU * mL⁻¹ (Paludetti et al., 2018). In Brazil, according to Ribeiro Junior et al. (2018) the amount of psychrotrophs augmented to 5.32 log CFU * mL⁻¹. In Algeria at the region of Biskra, the X_{\max} level attained in the stationary phase did not exceed 5.25 log CFU * mL⁻¹ (Boubendir et al., 2016), while in the region of Djelfa, the level of psychrotrophs attained the threshold of 5.25 log CFU * mL⁻¹ at the end of the 5th day of conservation (Yabrir et al., 2018). The difference in maximum growth levels observed in different parts of the world could be due to the variations in the temperature of cooling and storage time of milk.

The generation times (λ values) obtained in the present study ranged from 1.20 ± 0.55 to 4.18 ± 0.22 days in farm (A) and (B) respectively. Few studies evaluated the microbial parameters of growth during milk refrigeration. Cempírková and Mikulová (2009) in Southern and Western Bohemia registered a lag phase length of 2 days; Vithanage et al. (2017) in Australia have observed that the lag phase of psychrotrophs continues to 3 days. In Algeria, Boubendir et al. (2016) remarked an extended lag phase ranging from 6.74 to 10.50 days, while Yabrir et al. (2018) observed a lag phase of 3 days. On the other hand, the value of lag phase length obtained in milk from mountain was higher than those calculated according to ComBase predictive models (<http://www.combase.cc>) at the temperature of 4°C. The predicted lag time

for *Listeria monocytogenes / innocua* was 4.15 days, *Aeromonas hydrophila* (3.36 days), *Pseudomonas* (1.68 days) and *Yersinia enterocolitica* (1.09 days).

The notable delay in microbial growth registered in milk collected from the mountain farm compared to the one from basin suggests the influence of specific environmental factors in dairy farms. The shelf-life of milk samples collected from the mountain adopting inside/outside feeding mode was elongated compared to the one of basin adopting only inside feeding mode. Indeed, the variations of milk microflora composition have been linked to changes in cow feeding environment. The microbial composition of milk and its activity is influenced by grazing from inside to outside and the nature of forage (Sanz Sampelayo et al., 2007). The variation in durations of lag phase in refrigerated raw milk collected from different geographies could be explained by the presence of antimicrobial natural molecules in milk. Numerous bioactive molecules of plants grazed by cows have a fundamental role for rumen health and display an antimicrobial activity. Furthermore, the concentration in milk of a variety of volatile compounds, such as terpenes is enhanced when cows are grazing in herb-rich pasture (Michel et al., 2001; Larsen et al., 2012).

The delay in microbial growth observed in the mountain farm could be related to the possible presence of antimicrobial molecules coming from the plants grazed around the farm. A variety of bioactive molecules including thymol, carvacrol, eugenol derived from plants, demonstrated antibacterial against both gram-positive and gram-negative pathogens (Ananda Baskaran et al., 2009). The antagonist effect of carvacrol, eugenol, and thymol against the main bacterial mastitis pathogens in milk was demonstrated, particularly against *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and *S. dysgalactiae* (Gay-sinsky et al., 2007; Ananda Baskaran et al., 2009).

According to Darsanaki et al. (2012), the cow

can graze olive leaves with a confirmed inhibitory effect against pathogenic bacteria. Olive leaves aqueous extract exhibited antimicrobial activity against *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *B. subtilis*. Also, *Malva* plant with *M. sylvestris* and *M. parviflora* extracts, have demonstrated antimicrobial activity against a large variety of pathogenic bacteria such as *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* (Sharifi-Rad et al., 2019). In addition, *Hibiscus* extracts have shown a good antimicrobial activity in microbiological medium and in milk, especially against *S. aureus* and *E. coli* (Higginbotham et al., 2013). *Rosmarinus officinalis* essential oil has demonstrated antibacterial activity on milk microorganisms against *Staphylococcus spp.*, *Bacillus cereus* and *Aeromonas hydrophila* (Paşca et al., 2015).

The evolution of psychrotrophic bacterial populations in mountain milk

The evolution of psychrotrophic bacterial populations in mountain milk stored at 4 °C during 10 days

is reported in Figure 2. In the first day (time 0), before refrigeration, the bacterial populations were initially detected at low levels in fresh raw milk, they were identified as *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Enterococcus* and *Lactobacillus*, the initial population microbial load varied from 1.00 to 2.51 log CFU * mL⁻¹. After 6 days of refrigeration, a rise in the number of the totality psychrotrophic bacterial populations is remarked except for *Chryseobacterium*, the maximum microbial growth reached 3.31 log CFU * mL⁻¹ with *Enterococcus* being the dominant population in the microbiota. At the end of refrigeration after 10 days, *Enterococcus* and *Lactobacillus* populations surmount largely in number the others psychrotrophs with 4.41 and 4.00 log CFU * mL⁻¹ respectively. The *Chryseobacterium* regains growth and attained 2.14 log CFU * mL⁻¹, while the growth of *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Aeromonas* seems to be reduced. However, the absence of *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* and other hemolytic pathogenic bacteria is remarked during all the time of refrigeration.

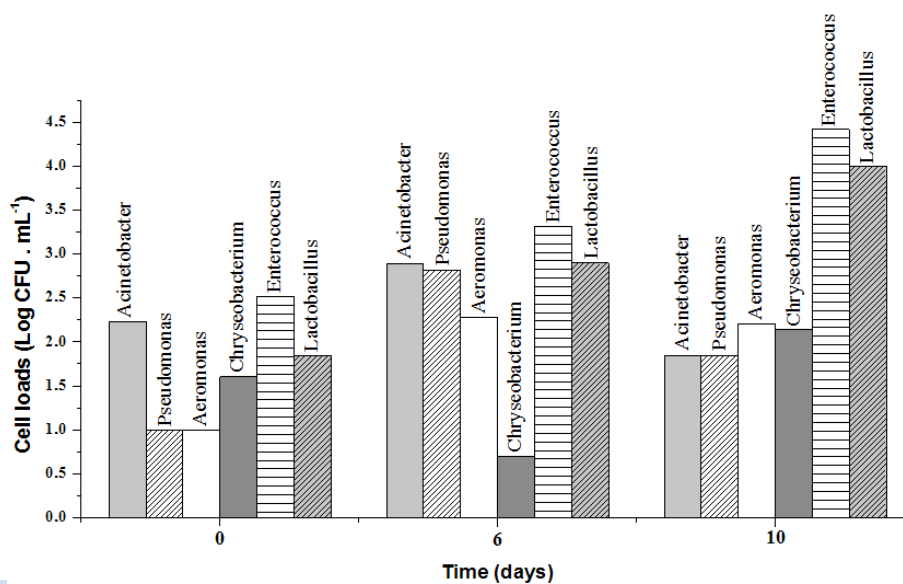


Figure 2. The evolution of psychrotrophic bacterial populations in mountain milk stored at 4°C during 10 days in the region of Mila, Algeria

Psychrotrophic bacteria were frequently isolated in cooled milk and dairy products environments, their origin can be from forage, feed, bedding material, faeces and soil, dust; when in contact with cow's teat skin the milk may be contaminated (Gleeson et al., 2013). Usually in untreated milks, *Pseudomonas* and

Acinetobacter genera are isolated during the first days of cold storage (Rasolofo et al., 2010; Vithanage et al., 2014), and both exhibit essentially lipolytic activity (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007a). According to Gislene et al. (2015), the genus *Pseudomonas* is detected in raw milk during the first day at a low level,

however the numbers of *Pseudomonas* increase after 6 days of refrigeration. The genera *Acinetobacter* and *Pseudomonas* are recognized as the major psychrotrophic groups in refrigerated raw milk with high spoilage potential (Machado et al., 2015; Yuan et al., 2018).

In this study *Aeromonas* grow well at low temperature, this finding is in accordance with the results of Lafarge et al. (2004). Also, Mankai et al. (2012) isolated *Aeromonas hydrophila* from refrigerated raw milk conserved at 4 °C. This genus can contaminate milk by infecting the udder tissues and multiplying in mammary tissues (Nahla, 2006). Similarly, *Chryseobacterium* strains are part of the psychrotolerant and proteolytic microflora that causes numerous defects in food products (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007b; Machado et al., 2017). This genus is commonly regarded as a usual resident of soils and plants and is known for its aptitude to degrade toxic plant composites, comprising polyphenols (Lopez et al., 2004; Bekker, 2011). The members of the genus *Chryseobacterium* demonstrated antagonistic activities against human pathogenic bacteria such as *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhi* and *S. aureus* (Lim et al., 2011).

Enterococcus was the dominant bacterial population during all the period of refrigeration; this finding is in accordance with the study of Mcauley et al. (2015). In Turkey, Citak et al. (2005) showed that *E. faecalis* was the major *Enterococcus* in raw milk. Giannino et al. (2009) registered the presence of *E. faecalis*, *E. faecium* in raw milk, establishing their essential role as origin of the typical fermenting microflora. Furthermore, enterococci are used to prolong the shelf-life and enhance the hygienic safety of food since they produce antimicrobial substances for example lactic acid, bacteriocins (enterocins) and hydrogen peroxide. Nevertheless, the presence of virulence factors and the emergence of multiple resistance to antibiotics among enterococci in food isolates require a careful safety evaluation before biotechnical use (Franz et al., 2007). Bacteriocins incite a great attention being commonly active against numerous gram-positive food borne pathogens such as *Clostridium botulinum*, *L. monocytogenes* and *S. aureus* (Morandi et al., 2012).

Lactobacillus population manifests here an unusual physiological adaptation to cold environment manifesting a psychrotrophic behavior at low temperature and was present all the period of cold storage. Usu-

ally, *Lactobacillus* grows as mesophilic and shows a maximum growth at 37 °C (Toqeer et al., 2006). Mami et al. (2012) demonstrated that *Lb. plantarum* can inhibit the growth of *L. monocytogenes*, *S. aureus* and other populations of undesirable bacteria in milk. This inhibition could result from the production of organic acids, especially lactic acid, which reduce pH environment, hydrogenous peroxide (H₂O₂), diacetyl (2, 3-butanediona), reuterin, bacteriocins and carbon dioxide (CO₂) (Gutiérrez-Cortés et al., 2017).

CONCLUSION

There is a notable delay in microbial growth in milk collected from the mountain farm adopting inside/outside feeding mode compared to the one from basin adopting only inside feeding. This prolonged shelf-life suggests the possible presence of antimicrobial bioactive molecules from plants grazed by cows outside the farm and the selection in the microbiota of some microorganisms with antagonist potential. The dynamic changes of bacterial populations habiting refrigerated milk could be in favor of long shelf-life and safety against pathogenic bacteria and spoilage agents. Taking into consideration the reinforcement of the data for the implementation a predictive model, the period of time will be prolonged and other measurements will be achieved in future works. Also, the exploration of other bacteria inhabiting refrigerated milk, the typing of the isolates using molecular tools and their kinetic study during all the time of refrigeration could be further developed.

ACKNOWLEDGMENT

The authors express gratitude to all colleagues at the Laboratory of Natural Sciences and Materials, University Centre Abdelhafid Boussouf, Mila, Algeria, for their considerable assistance. The study was financially supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, Project PRFU number D01N01CU430120180001.

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors have any conflicts of interest to declare regarding this work.

REFERENCES

- Ananda Baskaran S, Kazmer GW, Hinckley L, Andrew SM, and Venkatarayanan K (2009) Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *J Dairy Sci* 92: 1423-1429.
- Baranyi J, Roberts TA (1995) Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* 26: 199-218.
- Bekker A (2011) Growth and spoilage characteristics of *Chryseobacterium* species in milk. Magister Scientiae thesis -Food Microbiology University of the Free State, South Africa.
- Boubendir A, Hamidechi MA, Mostakim M, El Abed S, Ibsouda S, Koraiçh I (2011) Incidence of *Listeria spp.* and other psychrotrophic bacteria in raw bovine milk in the North East of Algeria. *Rev Med Vet-Toulouse* 162: 265-269.
- Boubendir A, Serrazanetti DI, Hamidechi MA, Vannini L, Guerzoni ME (2016) Changes in bacterial populations in refrigerated raw milk collected from a semi-arid area of Algeria. *Ann Microbiol* 66: 777-783.
- Cempirková R, Mikulová M (2009) Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech J Anim Sci* 54: 65-73.
- Citak S, Yucel N, Mendi A (2005) Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. *J Food Process Pres* 29: 183-195.
- Darsanaki RK, Aliabadi MA, Rokhi ML, Nourbakhsh M, Raeisi G (2012) Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Ann Biol Res* 3: 4189-4191.
- Decimo M, Morandi S, Silveti T, Brasca M (2014) Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *J Food Sci* 79: 2081-2090.
- De Garnica ML, Santos JA, Gonzalo C (2011) Influence of storage and preservation on microbiological quality of silo ovine milk. *J Dairy Sci* 94: 1922-1927.
- De Jonghe V, Coorevits A, Van Hoorde K, Messens W, Van Landschoot A, De Vos P, Heyndrickx M (2011) Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl Environ Microbiol* 77: 460-470.
- FAO (2013) Milk and Dairy Products in Human Nutrition. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Franciosi E, De Sabbata G, Gardini F, Cavazza A, Poznanski E (2011) Changes in psychrotrophic microbial populations during milk creaming to produce Grana Trentino cheese. *Food Microbiol* 28: 43-51.
- Franz CM, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 31: 293-310.
- Gargouri A, Hamed H, Elfeki A (2013) Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis. *J Food Sci* 78: M1405-M1411.
- Gaysinsky S, Taylor TM, Davidson PM, Bruce BD, Weiss J (2007) Antimicrobial efficacy of eugenol microemulsions in milk against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Protect* 70: 231-237.
- Giannino ML, Marzotto M, Dellaglio F, Feligini M (2009) Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* 130: 188-195.
- Gislène B, Favarin L, Luchese RH, McIntosh D (2015) Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?. *Braz J Microbiol* 46: 313-321.
- Gleeson D, O'connell A, Jordan K (2013) Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk tank milk. *Irish J Agr Food Res* 52: 217-227.
- Gutiérrez-Cortés C, Suárez H, Buitrago G, Moreno CD (2017) Isolation and evaluation of the antagonistic activity of lactic acid bacteria in raw cow milk. *Agronomía Colombiana* 35: 357-364.
- Hantsis-Zacharov E, Halpern M (2007a) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl Environ Microbiol* 73: 7162-7168.
- Hantsis-Zacharov E, Halpern M (2007b) *Chryseobacterium haifense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2344-2348.
- Higginbotham KL, Burris K, Zivanovic S, Davidson PM, Stewart CN (2013) Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in a microbiological medium and milk of various fat concentrations. *J Food Protect* 77: 262-268.
- Lafarge V, Ogier JC, Girard V, Maladen V, Leveau JY, Gruss A, Delacroix-Buchet A (2004) Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl Environ Microbiol* 70: 5644-5650.
- Larsen MK, Hymøller L, Brask-Pedersen DB, Weisbjerg MR (2012) Milk fatty acid composition and production performance of Danish Holstein and Danish Jersey cows fed different amounts of linseed and rapeseed. *J Dairy Sci* 95: 3569-3578.
- Lim CS, Oh YS, Lee JK, Park AR, Yoo JS, Rhee SK, Roh DH (2011) *Flavobacterium chungbukense* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2734-2739.
- Lopez MJ, NICHOLS NN, DIEN BS, MORENO J, BOTHAST RJ (2004) Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 125-131.
- Machado SG, Bazzolli DMS, Vanetti MCD (2013) Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk. *Int Dairy J* 29: 8-14.
- Machado SG, DA Silva LA, Bazzolli DMS, Heyndrickx M, Costa PM, Vanetti MCD (2015) *Pseudomonas spp.* and *Serratia liquefaciens* as Predominant Spoilers in Cold Raw Milk. *J Food Sci* 80: M1842-M1849.
- Machado SG, Baglinière F, Marchand S, Van coillie E, Vanetti MCD, De block J, Heyndrickx M (2017) The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. *Front Microbiol* 8: 1-22.
- Mami A, Hamed AR, Henni J, Kerfouf A, Kihal M (2012) Screening of autochthonous Lactobacillus species from Algerian raw goats' milk for the production of bacteriocin-like compounds against *Staphylococcus aureus*. *Afr J Biotechnol* 11: 4595-4607.
- Mankai M, Boulares M, Ben Moussa O, Karoui R, Hassouna M (2012) The effect of refrigerated storage of raw milk on the physicochemical and microbiological quality of Tunisian semihard Gouda-type cheese during ripening. *Int J Dairy Technol* 65: 250-259.
- Mcauley CM, Britz ML, Gobius KS, Craven HM (2015) Prevalence seasonality and growth of Enterococci in raw and pasteurized milk in Victoria, Australia. *J Dairy Sci* 98: 8348-8358.
- Michel V, Hauwuy A, CHAMBA JF (2001) Raw cow milk microflora: diversity and influence of conditions of production. *Dairy Sci Technol* 81: 575-592.
- Morandi S, Cremonesi P, Povo M, Brasca M (2012) *Enterococcus lactis* sp. nov from Italian raw milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 1992-1996.
- Nahla TK (2006) Study on mesophilic *Aeromonas* in milk and some milk products in Port Said city. *J Appl Sci Res* 11: 1037-1041.
- O'connell A, Ruegg PL, Jordan K, O'brien B, Gleeson D (2016) The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. *J Dairy Sci* 99: 3367-3374.
- Ouelbani R, Bensari S, Mouas TN, Khelifi D (2016) Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). *J Ethno Pharm* 194: 196-218.
- Paludetti LF, Jordan K, Kelly AL, Gleeson D (2018) Evaluating the effect of storage conditions on milk microbiological quality and composition. *Irish J Agr Food Res* 57: 52-62.
- Paşca C, Mărghitaş LA, Dezmirean D, Bobiş O, Bonta V, Mărgăoan R, Chirilă F, Fit N (2015) The assessment of the antibacterial activity of some plant extracts on normal and pathogenic microflora from milk. *Anim Sci Biotechnol* 48: 166-172.
- Perko B (2011) Microbiological quality of raw milk. *Mjekarstvo* 61: 114-124.
- Quigley L, O'sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD (2013) The complex microbiota of raw milk. *J Dairy*

- Sci 96: 4928-4937.
- Rasolofoa EA, St-gelais D, Lapointe G, Roy D (2010) Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *Int J Food Microbiol* 138: 108-118.
- Ribeiro Júnior JC, De oliveira AM, Silva FG, Tamanini R, De oliveira ALM, Beloti V (2018) The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *J Dairy Sci* 101: 75-83.
- Samaržija D, Zamberlin Š, Pogacic T (2012) Psychrotrophic bacteria and milk quality. *Mljekarstvo* 62: 77-95.
- Sanz Sampelayo MR, Chilliard Y, Schmidely P, Boza J (2007) Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res* 68: 42-63.
- Sharifi Rad J, Lalanne GM, Alvarez AJH, Taheri Y, SHaheen SH, Kregiel D, Antolak H, Pawlikowska E, Jokanovic MB, Rajkovic J, Hosseini-abadi T, Masic BL, Baghalpour N, Mohajeri M, Martins N (2020) Malva species: Insights on its chemical composition towards pharmacological applications. *Phytother Res* 34: 546-567.
- Silvetti T, Morandi S, Brasca M (2014) Biopreservation potential of *Enterococcus faecalis* isolated from Italian traditional raw milk cheeses. *J Food* 12: 210-217.
- Toqeer A, Kanwal R, Avub N (2006) Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cermoris* and *Lactobacillus acidophilus* isolated from camel milk. *J Biotechnol* 5: 481-488.
- Vithanage NR, Yeager TR, Jadhav SR, Palombo EA, Datta N (2014) Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. *Int J Food Microbiol* 189: 26-38.
- Vithanage NR, Dissanayake M, Bolge G, Palombo EA, Yeager TR, Datta N (2017) Microbiological quality of raw milk attributable to prolonged refrigeration conditions. *J Dairy Res* 84: 92-101.
- Vyletélava M, Hanuš O, Urbanova E, Kopunecz P (2000) The occurrence and identification of psychrotrophic bacteria with proteolytic and lipolytic activity in bulk milk samples at storage in primary production conditions. *Czech J Anim Sci* 45: 373-383.
- Yabrir B, Zobiri A, Laoun A, Titouche Y, Chenouf NS, Ranebi D, Issel-nane S, Mati A (2018) Bacteriological behavior of ewe's raw milk collected in Algerian area steppe and refrigerated at 4°C or 7°C. *Livestock Res Rural Dev* 30(2). <http://www.lrrd.org/lrrd30/2/byab30023.html>
- Yuan L, Sadiq FA, Liu TJ, LI Y, GU J, Yang HY (2018) Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes. *J Zhejiang Univ-SC B* 19: 630-642.

Présentée pour l'obtention du Diplôme de Doctorat LMD

Etude de la dynamique et phylogénétique des populations bactériennes psychrotrophes du lait cru récolté dans la région de Mila**Résumé**

Afin d'évaluer les changements dynamiques du consortium microbien du lait cru de vache pendant la réfrigération, explorer la diversité des bactéries psychrotrophes et déterminer les relations évolutives entre les taxons sur la base du gène ARNr16S, des échantillons de lait cru ont été collectés dans deux fermes laitières situées dans le bassin et une montagne de la région de Mila en Algérie. Le stockage à froid des échantillons de lait à 4 °C a été utilisé pour promouvoir la croissance microbienne des psychrotrophes pendant 10 jours. La flore microbienne du lait a été cultivée par les méthodes de culture dépendante et l'identification des isolats bactériens a été conduite par les méthodes phénotypiques à la base des critères culturels, morphologiques et biochimiques ; de plus quelques isolats bactériens ont fait l'objet d'une identification moléculaire par séquençage partiel du gène ARNr16S. Les variations du nombre total viable et les paramètres cinétiques de la croissance microbienne ont été analysées durant la réfrigération à l'aide du modèle Baranyi et Roberts.

Les comptes microbiens initiaux dans les échantillons de lait cru prélevés dans les deux fermes (bassin et montagne) étaient de $3,87 \pm 0,11$ à $2,94 \pm 0,04$ log UFC. mL⁻¹ respectivement, et la croissance maximale ne dépassait pas $7,00 \pm 0,12$ log UCF. mL⁻¹. La limite d'hygiène a été dépassée après 2 jours dans la ferme du bassin et plus tard après 6 jours dans la ferme de montagne. Le temps de génération variait de $1,20 \pm 0,55$ à $4,18 \pm 0,22$ jours dans la ferme du bassin et la ferme de montagne respectivement. Le retard notable en croissance microbienne dans le lait de la ferme de montagne par rapport à celui du bassin pourrait être lié au mode d'alimentation intérieur / extérieur adopté en montagne opposé à l'alimentation à l'intérieur seule dans la ferme du bassin. Cette durée de conservation prolongée suggère à la fois la présence de molécules bioactives antimicrobiennes issues des plantes pâturées par les vaches à l'extérieur de la ferme de montagne et à la sélection géographique de microorganismes à potentiel antagoniste évoluant dans la microflore du lait. Les populations bactériennes psychrotrophiques ont été identifiées comme *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Enterococcus* et *Lactobacillus*. *Enterococcus* constitue le plus grand groupe composé de 9 taxons, avec *E. faecalis* étant l'espèce prédominante.

L'analyse de la génomique comparative sur la base des séquences du gène ARNr16S des souches *E. faecalis* isolées avec ceux de différentes géographies et climats dans le monde a été menée. Les observations des variations génétiques ont montré que sept souches *E. faecalis* (MH569850, MH569851, MH569854, MH569856, MH569857, MH569859 et MH569860) ont enregistré des similitudes de séquences inférieures à 97%, ce qui conduit à l'hypothèse que les isolats pourraient représenter une nouvelle espèce du genre *Enterococcus*.

Mots clés: lait cru de vache, réfrigération, paramètres de croissance microbienne, populations bactériennes psychrotrophes, phylogénie, durée de conservation.

Abstract

In order to evaluate the consortium microbial dynamic changes of raw cow's milk during refrigeration, explore the diversity of psychrotrophic bacteria and determining the evolutionary relationships between taxa on the basis of the 16S rRNA gene, raw milk samples were collected in two dairy farms situated in basin and mountain areas in the region of Mila, Algeria. Cold storage of milk samples at 4 °C was used to promote psychrotrophic microbial growth during 10 days. The microbial flora of milk was determined by culture methods and the identification of bacterial isolates was carried using cultural, morphological and biochemical criteria. In addition some bacterial isolates have been the subject of a molecular identification by partial sequencing of the 16S rRNA gene. The variations in total viable count and kinetic parameters of microbial growth were analyzed during refrigeration using Baranyi and Roberts Model. The initial microbial counts ranged from 2.94 ± 0.04 to 3.87 ± 0.11 log CFU * mL⁻¹ and the maximum growth did not exceed 7.00 ± 0.12 log CFU * mL⁻¹. The hygienic limit was surpassed after 2 days in the basin farm and later after 6 days in mountain farm. The generation time varied from 1.20 ± 0.55 to 4.18 ± 0.22 days in the basin farm and mountain farm respectively. The notable delay in microbial growth in milk from the mountain farm compared to the one from basin could be related to indoor/outdoor feeding mode adopted in mountain opposed to indoor feeding in the basin farm. This prolonged shelf-life suggests the possible presence of antimicrobial molecules coming from plants grazed around the farm and the selection in the microbiota of some microbial species with antagonist potential. The psychrotrophic bacterial populations were identified as *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Enterococcus* and *Lactobacillus*. *Enterococcus* constitutes the largest cluster composed of 9 taxa, with *E. faecalis* being the predominant species. The comparative genomic analysis on the basis of 16S rRNA gene sequence of *E. faecalis* isolates with related strains from different geographies and climates was performed. The observations of the genetic variations showed that seven *E. faecalis* strains (MH569850, MH569851, MH569854, MH569856, MH569857, MH569859 and MH569860) registered similarities of sequences less than 97%, which lead to the hypothesis that the isolates could represent a novel species of the genus *Enterococcus*.

Key words: raw cow milk, refrigeration, microbial growth parameters, psychrotrophic bacterial populations, Phylogeny, shelf-life