

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



N° Ref :.....

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf Mila
Institut des Sciences et de la Technologie
Département de Science de la Nature et de la Vie
Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de
Master

En Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

**Etude de la cinétique de croissance
microbienne du lait cru de la région de Mila**

Présenté par : - NEMOUCHI Kenza
- KENDOULI Fadia
- GUENDOUIZ Meriem

Devant le jury composé de:

Himour Sarra	Maitre de Conférences B	Présidente
Boutellaa Saber	Maitre Assistant A	Examineur
Boubendir Abdelhafid	Maitre de Conférences A	Promoteur

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Louange à Allah, on le glorifie, on lui demande de l'aide et on lui demande pardon pour le mal de nos péchés, celui qui fut guidé personne ne peut l'égarer et celui qui est égaré personne ne peut le guider. Nous témoignons qu'il n'y a point de divinité digne d'adoration sauf Allah. L'Unique, qui n'a point d'associé et nous témoigne aussi que Mohammad est son serviteur et son messenger, que la bénédiction d'Allah soit sur lui, sa famille, ses compagnons, et tous ceux qui le suivent sur le droit chemin jusqu'au dernier jour.

Avant tous nous tenons à remercier Allah tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté et de nous avoir bénies jusqu'à la réalisation de ce travail.

*Nous tenons à remercier notre promoteur **Mr. Boubendir Abdelhafid** pour ses conseils chaleureux, son support et son bon encadrement afin de réaliser ce modeste travail.*

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury qui ont bien voulu accepter d'évaluer notre travail :

*M^{me} **Himour Sarra** d'avoir accepté de présider le jury,
Mr. Boutellaa Saber d'avoir accepté d'examiner cet humble travail*

Nous remercions tout le personnel du Laboratoire de biologie et de Microbiologie pour leur coopération avec nous

Et tous qui ont contribué de près ou de loin la concrétisation de ce travail

Merci à tous

Dédicace

Je dédie ce travail à mes plus chers êtres au monde :

A mes chers parents MEBAREK et FATIMA pour leur amour, leur tendresse, et pour leur soutien durant toutes les étapes de ma vie. J'espère qu'un jour, je pourrai leur rendre un peu de ce qui ils ont fait pour moi, que Dieu leur prête tout le bonheur.

A mon frère: SALIM merci pour son encouragement, son aide et surtout sa présence dans les moments les plus difficiles.

A ma belle-sœur : NAIMA pour son encouragement et pour son soutien moral et physique.

A ma chouchou NOUSA que Dieu leur prête tout le bonheur.

A mon fiancé KHAYREDDINE pour son encouragement, son soutien et sa présence permanent dans les moments durs.

A ma belle cousine HADJER pour ses encouragements et ses aides tout au long de ma vie.

A mes belles-sœurs KENZA et MERIEM merci de votre soutien et de m'avoir encouragée dans les moments les plus difficiles.

A mes chères amies : KARIMA, CHAHRA, AYA, MANAL, KHADIDJA, SOUMIA merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.

A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

Merci à tous de m'aider à devenir meilleur.

FIDOU



Dédicace

Je dédie ce travail à mes plus chers êtres au monde :

A mes chers parents LYAZID et FOUZIA pour leur amour, leur tendresse, et pour leur soutien durant toutes les étapes de ma vie.

A mes frères: BILEL et TAKIEDDIN merci pour leurs encouragements, leurs aides et surtout leurs présence dans les moments les plus difficiles.

A mes belles sœurs : SIHEM et MARWA pour leurs encouragements et pour leurs soutien moral et physique.

A ma très belle MAISSAM que Dieu leur prête tout le bonheur.

A mes belles-sœurs : MERIEM et FADIA merci de votre soutien et de m'avoir encouragée dans les moments les plus difficiles.

A mes chères amies : MENAL, AFAF, NESSRIN, RIMA, SARRA, CHAHRA, NORA merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.

A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

Merci à tous de m'aider à devenir meilleur.

KENZA



Dédicace

Je dédie ce travail à mes plus chers êtres au monde :

A mes chers parents FARHAT et NAIMA pour leur amour, leur tendresse, et pour leur soutien durant toutes les étapes de ma vie.

A mes frères: YAZID, ABDELHAFID et HAROUN merci pour leurs encouragements, leurs aides et surtout leurs présence dans les moments les plus difficiles.

A mes belles sœurs : AMINA, RACHDA et ZINEB pour leurs encouragements et pour leurs soutien moral et physique.

A mes belles-sœurs KENZA et FADIA merci de votre soutien et de m'avoir encouragée dans les moments les plus difficiles.

A mes chères amies : AMIRA, SOUMIA, FAYZA, SABAH, ANISSA, SAMIA, CHAFIKA merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.

A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

Merci à tous de m'aider à devenir meilleur.

MERIEM



Liste des abréviations

BL : Bactéries Lactiques.

BS : Bactéries Spécifique

CMB : Concentration Minimal Bactéricide

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice

DO: Densité optique

EA : Extrait Aqueux

FTAM : Flore Mésophile Aérobie Totale

HEO : Huiles Essentielles d'Origan

G ou λ : Le temps de génération

Lag : Le temps de latence

M(g) : La quantité de substance

MRS : Man Rogosa et Sharpe

N : Le nombre de cellules

PBC: Psychrotrophic bacterial count

UFC : Unité formant colonie

UHT: Upérisation à Haute Température.

U.V : Ultra-Violet

μ max : Le taux de croissance maximale

TPC: Total Plate Count

X_0 et X_{max} : Les densités cellulaires initiales et maximales

Liste des Tableaux

Numéro	Intitulé	Page
Tableau 1	Classification botanique de l'Origanum	5
Tableau 2	Les constituants chimiques de l'Origanum	7
Tableau 3	L'activité antibactérienne de l'extrait d' <i>Origanum vulgare</i>	9
Tableau 4	Exemples d'études de La concentration minimale inhibitrice (mg/ml) de l'extrait aqueux de l'Origan	10
Tableau 5	Les différentes bactéries isolées à partir de lait cru refroidi dans différentes études.	17
Tableau 6	Caractérisation macroscopique et microscopique et biochimique des psychrotrophes isolées du lait.	18
Tableau 7	Exemples d'altérations des denrées par des bactéries psychrotrophes	20
Tableau 8	Groupes bactériens prédominants trouvés dans le lait cru frais de différents pays en utilisant des méthodes dépendantes et indépendantes de la culture	23
Tableau 9	Groupes bactériens prédominants trouvés dans le lait cru après le stockage à froid dans différents pays en utilisant des méthodes dépendantes et indépendantes de la culture	26
Tableau 10	Les valeurs prédites des paramètres de croissance microbienne par l'équation de Gompertz obtenus en modélisant les données de dénombrement moyen des bactéries viables totales par rapport au stockage réfrigéré de trois échantillons de lait	34
Tableau 11	Concentrations, pourcentages et volumes d'EA de l'Origanum ajoutés au lait.	44
Tableau 12	Description macroscopique et microscopique des bactéries lactiques	57
Tableau 13	Les variations du pH pendant l'expérience	58
Tableau 14	Les valeurs des paramètres de croissance microbiennes de la flore totale de lait	60

Liste des Figures

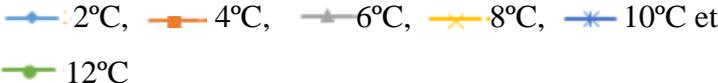
Numéro	Intitulé	Page
Figure 1	(A) Fleurs et feuilles d' <i>Origanum vulgare</i> L. (B) Fleurs d' <i>O.vulgare</i>	4
Figure 2	Caractéristiques botaniques d' <i>Origanum vulgare</i>	5
Figure 3	Aire de distribution du genre <i>Origanum</i>	6
Figure 4	Taux de croissance des bactéries psychrotrophes en fonction de la température et en comparaison avec d'autres types bactériens	15
Figure 5	Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases.	29
Figure 6	Les principales phases de la courbe de croissance bactérienne et paramètres qui les caractérisent	32
Figure 7	Nature des facteurs environnementaux agissant sur le comportement des microorganismes dans les aliments.	33
Figure 8	Courbes de croissance obtenues par modélisation avec l'équation de Gompertz données de comptage des cellules de bactéries viables totales dans des échantillons de lait de 3 vaches pendant 21 jours de stockage à 4 °C	34
Figure 9	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 	35
Figure 10	Augmentation de la TBC, PBC et PLiBC liée aux variations de température (les points du graphique représentent les logarithmes moyens des valeurs déterminées dans trois échantillons de lait différents	36
Figure 11	Dénombrements moyens de microorganismes indicateurs d'hygiène sur des échantillons de lait stockés dans différentes conditions (●: 25°C, □: 4°C; Δ: 7°C).	38
Figure 12	<i>Origanum vulgare</i> récolté dans la région de Mila à Ain El Tinn.	39

Figure 13	Les feuilles de l'Origanum	40
Figure 14	La poudre de l'Origanum.	40
Figure 15	Protocole de préparation de l'extrait aqueux du l'Origanum	42
Figure 16	La solution mère de l'extrait aqueux de l'Origanum préparée le 09/01/2019.	43
Figure 17	Site de prélèvement : EL Nechem à Grarem Gouga dans la région de Mila	44
Figure 18	Prélèvement du lait cru.	46
Figure 19	Préparation du milieu de culture.	47
Figure 20	La préparation de l'eau physiologique.	48
Figure 21	Répartition du lait dans les flacons.	49
Figure 22	Ajout de l'extrait aqueux au lait.	49
Figure 23	Préparation des séries de dilutions.	50
Figure 24	Suivie du pH pendant 10 jours.	51
Figure 25	Dénombrement des bactéries psychrotrophes.	52
Figure 26	Contrôle microbiologique de la contamination de la solution mère d'EA.	52
Figure 27	Etapes de l'analyse microbiologique	53
Figure 28	Purification des souches bactériennes.	55
Figure 29	Test de la catalase	56
Figure 30	Les variations du pH durant 10 jours de réfrigération du lait	59
Figure 31	Contrôle microbien de l'EA.	59
Figure 32	L'évolution de la croissance microbienne du lait réfrigéré.	60
Figure 33	Effet de l'ajout de l'extrait aqueux sur les paramètres de croissance microbienne: la croissance maximale (X_{max}), la vitesse maximale de croissance (μ_{max}) et le temps de générations (G).	61
Figure 34	Régression linéaire de la corrélation entre les concentrations de l'EA et la croissance microbienne maximale (X_{max}).	62

Table des Matières

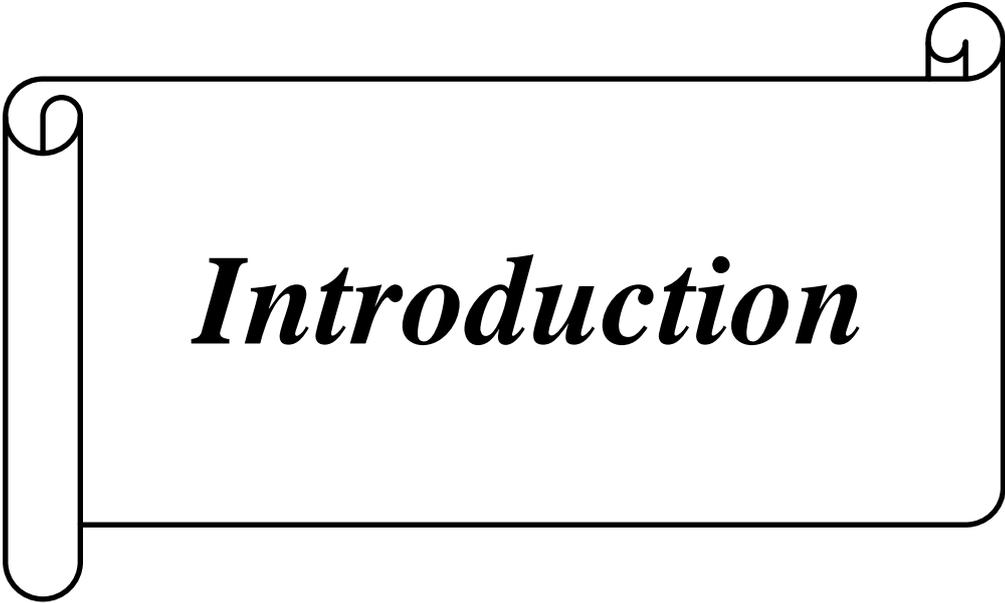
Liste des Abréviations	I
Liste des Tableaux	II
Liste des Figures	III
Introduction	1
Partie I: Recherche Bibliographique	
Chapitre I : L'Origanum	4
1. Définition.....	4
2. Morphologie	4
3. Classification	5
4. Répartition géographique	6
5. Composition chimique.....	6
6. Activités et propriétés	7
6.1. Activité antibactérienne.....	8
6.2. Mécanisme d'activité antimicrobienne des substances naturelles à l'échelle de la cellule bactérienne.	10
7. Usages de l'Origanum sp.....	12
7.1. Usages traditionnels.....	12
7.2. Usages culinaires et alimentaires.....	12
7.3. Usages cosmétiques	13
8. Autres plantes utilisées en alimentation	13
Chapitre II : Les bactéries psychrotrophes.....	14
1. Généralités	14
2. Définition et caractéristiques	15
3. Base biochimique de la croissance psychrotrophe	19

4. Enzymes thermostables produites par les microorganismes psychrotrophes	19
5. Influence des bactéries psychrotrophes sur la conservation des denrées	20
6. Contrôle de la détérioration due à l'activité des enzymes thermorésistantes	21
7. Les variations du pH de lait	21
8. Evolution des flores microbiennes lors de la réfrigération du lait.....	22
Chapitre III: La dynamique de croissance microbienne	27
1. Définition de la croissance microbienne	27
2. Les paramètres de croissance	27
3. Courbe de croissance bactérienne.....	28
4. Les phases de croissances.....	29
5. Effet des facteurs environnementaux sur la croissance microbienne	32
6. Exemples d'études de la dynamique de croissance bactérienne à froid	33

Partie II : Recherche Expérimentale

1. Matériel et Méthodes.....	39
1.1. Préparation de matériel végétal	39
1.1.1. Présentation de la zone de prélèvement.....	39
1.1.2. Séchage.....	39
1.1.3. Broyage.....	40
1.1.4. Préparation de l'extrait aqueux de l'Origanum	40
1.1.5. Préparation de la solution mère de l'extrait aqueux	43
1.2. Échantillonnage du lait	44
1.3. Analyses microbiologiques.....	46
1.3.1. Préparation du milieu de culture.....	46
1.3.2. Préparation du lait supplémenté de l'extrait aqueux.	48
1.3.3. Suivre de la cinétique de croissance microbienne	48
1.3.4. Contrôle microbiologique de la solution mère de l'EA de l'Origanum	52
1.4. Observations microscopiques	54

1.4.1. Préparation du frottis	54
1.4.2. Coloration de Gram	54
1.5. Purification des colonies.....	55
1.6. Tests enzymatiques.....	56
2. Résultats et Discussions.....	57
2.1. Résultats	57
2.1.1. Culture bactérienne.....	57
2.1.2. Contrôle du pH	58
2.1.3. Contrôle de la présence microbienne dans l'extrait aqueux	59
2.1.4. Evolution de la croissance microbienne	59
2.1.5. Détermination des paramètres cinétiques de la croissance microbienne.....	60
2.2. Discussion.....	62
Conclusion et perspectives	66
Références	67
Annexe	



Introduction

Introduction

Le lait et les produits laitiers manufacturés sont des éléments importants d'une alimentation saine et figurent parmi les aliments les plus consommés. Aliment hautement nutritif, le lait est composé de protéines, de graisses, de glucides, de calcium, de vitamines et de minéraux, offrant un environnement idéal pour la croissance de micro-organismes (Quigley *et al.*, 2013).

La contamination bactérienne des produits laitiers est une préoccupation majeure dans le monde entier (Gopal *et al.*, 2015), car la production et la consommation de produits laitiers ont considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. On sait que le lait cru abrite généralement des communautés microbiennes complexes contenant divers microorganismes (Quigley *et al.*, 2011). La microflore indigène dans le lait cru a un impact direct sur le développement ultérieur des produits laitiers (Schornsteiner *et al.*, 2014). Les micro-organismes peuvent non seulement affecter la qualité du lait et sa durée de conservation, mais également produire des enzymes extracellulaires, susceptibles de provoquer une détérioration de la qualité de la nourriture (Raats *et al.*, 2011). De plus, des compositions microbiennes anormales dans le lait pourraient causer des problèmes de santé, en ce sens que la consommation de lait cru contaminé par des agents pathogènes peut entraîner des maladies graves (McAuley *et al.*, 2012).

La pasteurisation peut affecter négativement la qualité de conservation du lait. Elle est incapable de détruire les spores de *Clostridium botulinum* et de *Bacillus cereus* et le choc thermique peut provoquer leur germination (Melini *et al.*, 2017), aussi entraîner une modification de la constitution chimique du lait qui donne un goût de cuit (Génin 1935 ; Clark *et al.*, 2008).

Le lait fraîchement tiré du pis ne contient souvent pas de populations détectables de bactéries psychrotrophes. Cependant, après la collecte du lait, les bactéries psychrotrophes se développent également lorsque la chaîne du froid est appliquée. Malgré ces microorganismes ont des températures de croissance optimales et maximales au-dessus de 15 et 20 °C, respectivement (De 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. L'inconvénient de psychrotrophe dans le lait est leur capacité à produire des lipases et des protéases extracellulaires responsables

de la dégradation du lait mais également des produits laitiers (Hantsis-Zacharov et Halpern 2007).

L'industrie laitière moderne présente des pertes jusqu'à 30% en raison de la détérioration et de la réduction de la qualité du produit causée par les bactéries psychrotrophes (Randolph 2006). D'autre part, certaines espèces de ces bactéries ont la capacité de produire des toxines et / ou de montrer une résistance aux antibiotiques et doivent donc être considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes pour l'homme (Munsch - Alatosava et Alatosava 2006; Hamatha et Banu 2010; Senesi et Gelerdi 2010).

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).

L'augmentation de la demande du consommateur pour des produits sains sans conservateurs encourage l'industrie alimentaire à valoriser les substances bioactives d'origine végétale (Grigoraş 2012). En effet, les composés phénoliques issus des végétaux et les huiles essentielles connaissent de nos jours un gain d'intérêt pour leur éventuelle utilisation comme alternatives aux substances synthétiques (Tamgno et Ngamo 2014).

De nombreux composés isolés à partir de plantes ont montré une activité antimicrobienne contre certains microorganismes les plus courants qui affectent la qualité des aliments et la durée de vie (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Parmi les plantes qui sont connues pour leur richesse en principes actifs, l'Origan de la famille des Lamiaceae (Chishti *et al.*, 2013), est une épice largement utilisée dans l'industrie alimentaire.

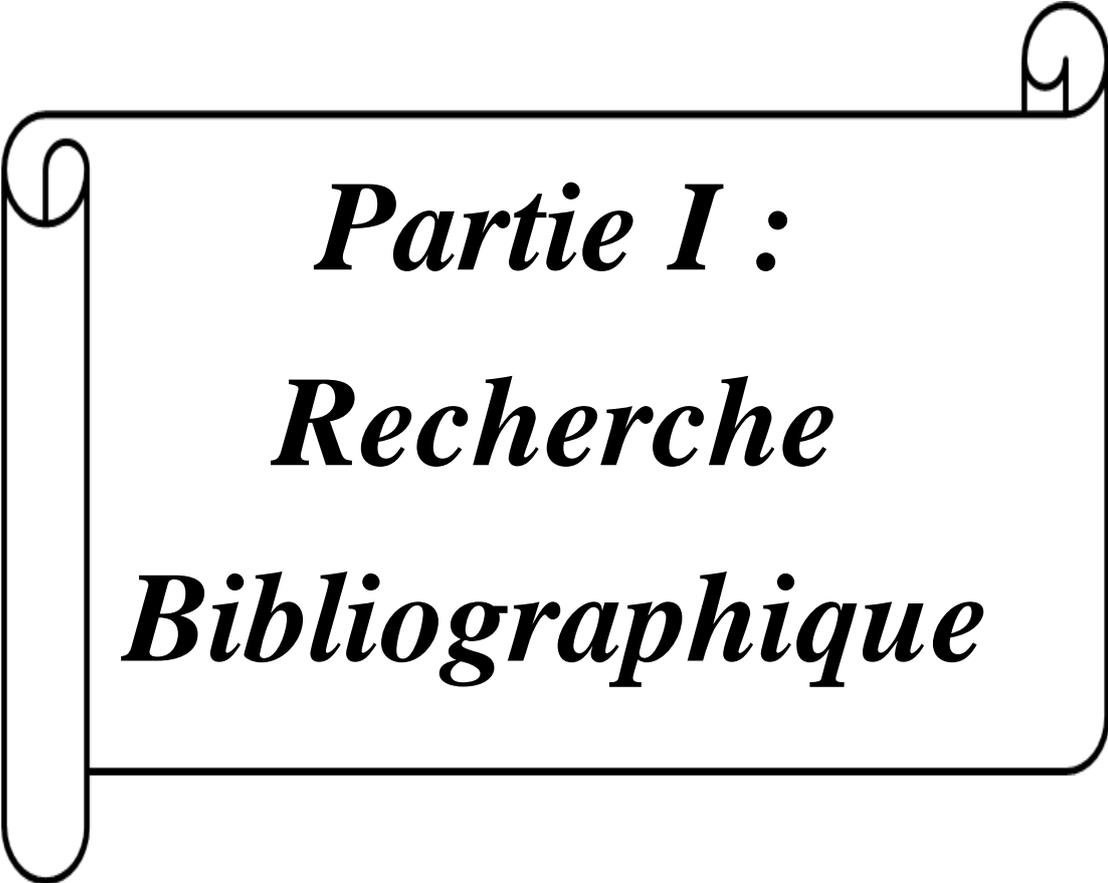
Beaucoup d'études ont été menées en milieu de culture sur l'activité antibactérienne de l'*Origanum* L. (Weerakkody *et al.*, 2010 ; Licina *et al.*, 2013 ; El Gendy *et al.*, 2015). Cependant, seulement quelques travaux rapportent l'étude de la dynamique de croissance des bactéries psychrotrophes dans le lait (Hantsis-Zacharov et Halpern 2007 ; Cempírková et Mikulová 2009 ; Boubendir *et al.*, 2016), et à notre connaissance, aucune étude n'a été conduite sur la dynamique de croissance microbienne par addition d'extrait de plantes dans le lait réfrigéré.

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

- Prolongation de la durée de vie (shelf-life) du lait réfrigéré par allongement de la phase de latence en le supplémentant par différentes concentrations de l'Extrait Aqueux (EA) d'*Origanum L.*
- Diminution de la charge microbienne finale du lait.

De ce fait les actions suivantes ont été menées dans cette étude :

- D'abord, réunir le maximum d'informations bibliographiques sur le sujet selon les données citées dans l'introduction.
- Préparation d'EA de l'*Origanum L.*
- Addition de différentes concentrations d'EA au lait.
- Conservation du lait (supplémenté d'EA et témoin) à 4°C durant 10 jours avec des prélèvements réguliers.
- Suivre de la cinétique de croissance microbienne, spécialement la flore totale viable et les bactéries lactiques.
- Calcul des paramètres cinétiques de croissance.
- Isolement et caractérisation de quelques isolats bactériens.
- Discussion des résultats et enfin conclusion et perspectives.



Partie I :
Recherche
Bibliographique



Chapitre I

Chapitre I : L'Origanum

1. Définition

Le terme Origan provient du latin *Origanum* L, lui-même issu de grec Origanon. En le décomposant étymologiquement, on trouve oros, la montagne et ganos signifie luminosité (Wogiatzi 2009). En effet, l'origan est une plante herbacée vivace appartenant à la famille des Labiales ou des Lamiaceae, (Chishti *et al.*, 2013). Le genre *Origanum* L. est adapté largement aux conditions, notamment les sols calcaires secs, rocheux et les régions chaudes et montagneuses (Kintzios 2002). Et pousse dans les régions méditerranéennes et en Asie occidentale, *Origanum vulgare* L. (Figure 1) est la plus répandue parmi toutes les espèces du genre (Goliaris *et al.*, 2002).



Figure 1. (A) Fleurs et feuilles d'*Origanum vulgare* L. (B) Fleurs d'*O.vulgare* (Fleurentin 2007).

2. Morphologie

Origanum vulgare est une plante aromatique à base de bois qui pousse à 20-30 cm de hauteur, et la saison de floraison est entre Mai à octobre (Lukas *et al.*, 2010). Les feuilles sont ovales de couleur olive (en forme d'œuf, avec extrémité plus large à la base), 10-44 mm de long et 5-25 mm de large (Figure 2), et sont opposés les uns aux autres sur la tige (Force *et al.*, 2000 ; Yazdani *et al.*, 2014). Les bords du feuilles sont lisses et les pointes varient de forme aiguë (pointue) à obtus (arrondi) (Jerković *et al.*, 2001). Le bouquet est à nombreuses fleurs tâtéés ensemble, avec des fleurs groupées en épi terminal et chaque fleur à quatre étamines (parties mâles). La corolle est couleur pourpre blanchâtre et 5-8 mm de long. Le calice a cinq sépales dedans (Yazdani *et al.*, 2014).

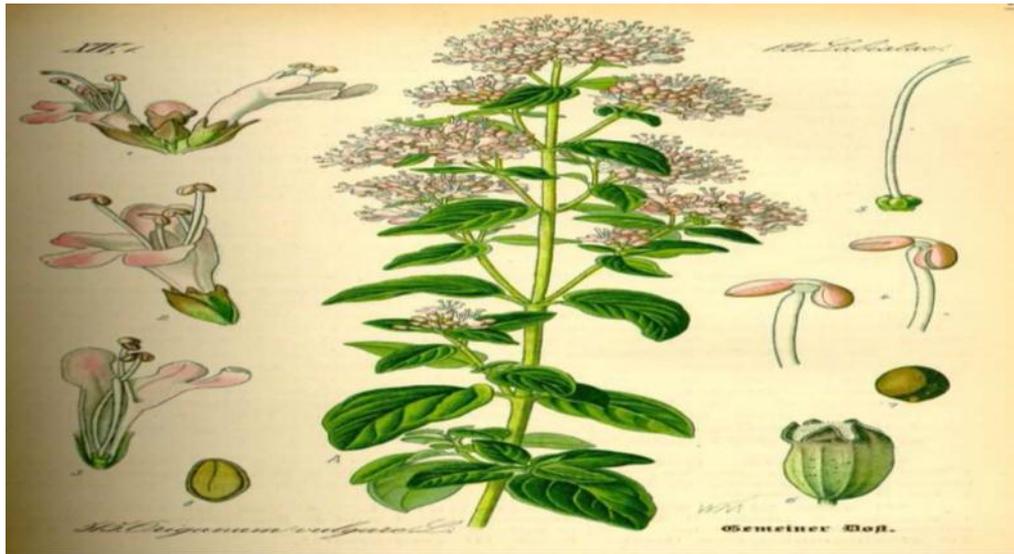


Figure 2. Caractéristiques botaniques d'*Origanum vulgare* ([http : //www.branchrouge.org/](http://www.branchrouge.org/)).

3. Classification

La classification de l'*Origanum* L. est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1: Classification botanique de l'*Origanum* L. (Guignard 1996).

Rang taxonomique	Nomenclature
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Série	Superovariées tétracycliques
Super ordre	Tubiflorales
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Sous-famille	Népétoïdées
Genre	<i>Origanum</i>
Espèce	<i>Origanum vulgare</i>

4. Répartition géographique

L'Origan pousse à l'état sauvage dans l'ouest et sud de la Turquie et autres régions méditerranéennes (Skoula et Harborne 2002) et se rencontre couramment dans toute l'Asie, Europe et nord d'Afrique (Ivask *et al.*, 2005) (Figure 3). En Inde, elle est représentée par une seule espèce, *O.vulgare* L. ssp, largement distribués dans la région tempérée de la Himalaya et arides (Baser *et al.*, 2010) et également trouvée dans d'autres endroits comme le Portugal, l'Espagne, l'Afghanistan, la Chine, le Népal, le Pakistan, le Danemark et certaines parties de la Russie (Raina et Negi 2014).



Figure 3. Aire de distribution du genre *Origanum* L. (Figueredo 2007).

5. Composition chimique

Une enquête phytochimique préliminaire révèle que ses composés chimiques sont présents dans diverses formes d'extraction d'*Origanum vulgare* (Tableau 2) comme dans l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique et huile essentielle, etc. (Alkam *et al.*, 2007).

Tableau 2 : Les constituants chimiques de l'*Origanum L.*

Familles de constituants	Constituants	Références
Huiles essentielles	thymol, carvacrol, c-terpinène, p-cymène	Koukoulitsa <i>et al.</i> (2006)
Acides phénoliques	L'acide rosmarinique Acides carboxyliques phénoliques,acide caféique	Hernandez <i>et al.</i> (2009) Nakatani.(2003)
Flavonoïdes	lutéoline et eriodictyol	Nurmi <i>et al.</i> (2006)
Constituants divers	fibres, manganèse, vitamine E, fer, calcium, acides gras oméga et tryptophane	Teixeira <i>et al.</i> (2013)

Dans une étude menée par Nurmi *et al.* (2006) sur les acides phénoliques retrouvés dans l'urine humaine après ingestion unique d'extrait d'*Origanum L.*, le constituant phénolique était l'acide rosmarinique qui représente 75% des acides phénoliques identifiés. Autres acides phénoliques, y compris l'acide protocatéchuique, l'acide p-coumarique, acide férulique, acide chlorogénique et acide gallique, étaient présents dans les extraits des quantités notablement plus faibles.

6. Activités et propriétés

Les espèces d'*Origanum L.* ont de nombreuses propriétés liées à l'importance médicale, culinaire et agricole. Parmi les propriétés liées à l'importance médicale figurent les suivantes: maladies gastro-intestinales (douleurs à l'estomac), maladies respiratoires, maladies rénales et hépatiques,etc.(Chishti *et al.*, 2013).

Par conséquent, il y a une large gamme des activités biologiques y compris antiparasitaires (Chishti *et al.*, 2013 ; El Gendy *et al.*, 2015), antibactériens, antifongiques et antiviraux (El Gendy *et al.*, 2015). *Origanum sp.* Ont également une activité antimutagène, antitumorales et cytotoxiques (Arcila-Lozano *et al.*, 2004), ainsi que des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires ,etc. (Salud Pérez *et al.*, 2011).

6.1. Activité antibactérienne

Licina *et al.* (2013) ont testé l'activité antimicrobienne in vitro de trois extraits d'*O. vulgare* contre des souches de bactéries déterminées par microdilutions (Tableau 3). L'intensité de l'activité antimicrobienne variait en fonction de l'espèce de micro-organismes et sur le type d'extrait de plante. Parmi les extraits testés, l'extrait aqueux a montré le plus grand effet inhibiteur contre les bactéries testées. Les extraits étaient plus efficaces contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Un effet significatif a été présenté contre des espèces du genre *Bacillus*, particulièrement contre *Bacillus pumilis* NCTC8241 avec CMI <0,16 mg / ml. De plus, les extraits ont démontré un fort effet antibactérien sur *Sarcinalutea*. Le plus efficace était l'extrait d'éther diéthylique. Plus loin, toutes les souches de *S. aureus* ont montré une sensibilité élevée à tous les extraits d'origan. L'extrait d'eau indiquait le meilleur effet antibactérien. Parmi testées, *S. aureus* PMFKGB12, la souche isolée des aliments, était le plus sensible. Les bactéries pathogènes telles qu'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiellapneumoniae*, *Enterococcusfaecalis*, présentait une faible sensibilité aux extraits d'origan testés. Weerakkody *et al.* (2010) testé l'activité antimicrobienne de l'eau et de l'éthanol et ils ont également remarqué une faible sensibilité à *E. coli* (CMI > 5 mg / ml).

L'extrait au méthanol des parties aériennes d'Origan ne montrent pas l'activité antimicrobienne (Sahin *et al.*, 2004) tandis que Chaudry *et al.* (2007) ont démontré une activité antimicrobienne significative en perfusion aqueuse.

Dans cette étude, l'extrait aqueux a montré une bonne activité antibactérienne. L'extrait d'eau était riche en phénols totaux et cela pourrait expliquer son activité.

Tableaux 3: L'activité antibactérienne de l'extrait d'*origanum vulgare* (Licina et al. 2013).

Espèces	L'extrait aqueux		L'extrait d'éthanol		L'extrait d'éther diéthylique	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Bacillus cereus</i>	0.3	0.3	< 0.16	0.3	0.3	0.3
<i>B. subtilis</i>	0.16	0.6	< 0.16	0.6	<0.16	0.6
<i>B. pumilis</i> NCTC8241	< 0.16	1.2	<0.3	0.3	<0.16	0.16
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	5	10	10	10	10
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	5	10	5	10	10	20
<i>Escherichia coli</i>	5	5	10	20	20	20
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2.5	2.5	10	10	10	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.5	2.5	5	5	5	10
<i>Proteus mirabilis</i>	0.3	0.3	1.2	1.2	2.5	2.5
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	0.6	0.6	1.2	1.2	1.2	1.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	5	10	20	10	10
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	5	5	20	20	10	10
<i>Sarcinalutea</i>	1.2	1.2	0.6	1.2	0.3	1.2
<i>Sallmonellaentérinas</i>	5	5	10	10	10	10
<i>S. typhimurium</i>	5	5	10	10	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.6	1.2	1.2	2.5	1.2	1.2
<i>S. aureus</i> PMFKGB12	< 0.16	< 0.16	0.3	0.3	< 0.16	0.3

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice en mg/mL.

CMB : Concentration Minimal Bactéricide en mg/mL.

Plusieurs études ont été conduites sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'*Origanum* sp., le Tableau 4 résume quelques exemples des valeurs de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Tableau 4: Exemples d'études de La concentration minimale inhibitrice (mg/mL) de l'extrait aqueux de l'Origan.

Espèces	CMI (mg/ ml)			
	R1	R2	R3	R4
<i>Bacillus cereus</i>	0.3	/	3.12	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	/	/	/
<i>Escherichia coli</i>	5	Inhibition not detected	25	200
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.5	/	/	200
<i>Proteus mirabilis</i>	0.3	/	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	Inhibition not detected	25	200
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.6	/	1.25	200
<i>Salmonella typhimurium</i>	5	inhibition not detected	/	200
<i>Listeria Monocytogenes</i>	/	inhibition not detected	3.12	/
Référence	Licina <i>et al.</i> (2013)	Teixeira <i>et al.</i> (2013)	Ramdan <i>et al.</i> (2018).	Mohanakrishnan Kandasamy <i>et al.</i> (2017).

6.2. Mécanisme d'activité antimicrobienne des substances naturelles à l'échelle de la cellule bactérienne.

En raison de l'effet secondaire des produits chimiques antimicrobiens et de la résistance que les micro-organismes pathogènes établissent contre les antibiotiques, beaucoup d'attention a été prêtée aux extraits bruts des plantes qui commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives.

Parmi ces molécules le carvacrol et thymol ont des propriétés antiseptiques, car ils perturbent la membrane bactérienne par la liaisons aux protéines membranaires (Carson *et*

al., 2002) ce qui entraîne une fuite des ions ATP et du potassium intracellulaires et augmente le potassium extracellulaire, suivi de la libération d'acides nucléiques, coagule le cytoplasme et endommage les lipides et protéines provoquant la mort cellulaire (Helander *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 2001; Bampidis *et al.*, 2005; Bakkali *et al.*, 2008).

D'autres protéines, telles que la protéine de liaison à l'ADN H-NS et les protéines ribosomales 50S L7 / L12, sont régulées à la baisse par le thymol. Cela augmente la stabilité de l'ADN bactérien et inhibe la transcription en tant que mécanisme de protection supplémentaire (Miesel *et al.*, 2003).

D'autres travaux ont suggéré aussi que le thymol est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure (Trombetta *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes sont généralement connus pour leurs propriétés redox impliquées dans le retard ou l'inhibition de l'initiation ou de la propagation des réactions en chaîne oxydantes (Majeed *et al.*, 2016).

Des recherches supplémentaires ont été réalisées sur l'activité antimicrobienne et mécanisme d'action des huiles essentielles d'Origan (HEO) (Trombetta *et al.*, 2005). Cet effet antimicrobien a été lié à la présence de groupes hydroxyle dans les composants phénoliques (Ben *et al.*, 2006). Ultee *et al.* (2002) ont montré que la présence d'un groupe hydroxyle libre délocalisé le système électronique est essentielle pour l'activité antibactérienne.

Le mécanisme antibactérien d'extrait d'*O. Vulgare* a été expliqué par la modification d'intégrité de la membrane bactérienne. Lambert *et al.* (2001) ont constaté que l'HEO avait endommagé l'intégrité de bactérienne intra-membranaire, qui a affecté le pH homéostasie et l'équilibre des ions inorganiques.

Les effets antibactériens de l'HEO ne se limitent pas à la membrane bactérienne. Le transfert de monoterpènes à la cellule bactérienne à travers la bicouche lipidique qui provoque une déstabilisation de la structure, une augmentation de la perméabilité membranaire et son interaction a également été suggéré (Sikkema *et al.*, 1994 ; Trombetta *et al.*, 2005).

7. Usages de l'*Origanum* sp.

7.1. Usages traditionnels

- L'herbe d'origan est utilisée comme remède contre les poisons narcotiques, convulsions et hydropisie (Kaul *et al.*, 1996).
- L'huile essentielle d'origan et l'extrait de feuilles sont des substances naturelles fortes, utilisées comme des agents antibactériens en raison de la concentration élevée de thymol (Vagi *et al.*, 2005).
- La circulation de la bile est stimulée par l'Origan et l'herbe aide également à soulager l'inconfort des flatulences et des excès abdominaux gaz (Nowak *et al.*, 2013).
- L'Origan a également été utilisé comme antidote contre les morsures venimeuses des serpents et des insectes (Picq *et al.*, 1991).
- L'Origan a été utilisé traditionnellement pour le traitement respiratoire, les troubles digestifs, caries dentaires et troubles des voies urinaires (Ertas *et al.*, 2005).
- *Origanum vulgare* a été utilisé en Inde pour traiter les intoxications alimentaires, ballonnements, toux, problèmes bronchiques et maux de tête (Koldaş *et al.*, 2015).
- Les herbes et les épices sont traditionnellement utilisés dans la gastronomie comme arômes, mais ils ont aussi révélé des effets bénéfiques sur la santé humaine (Chun *et al.*, 2005 ; Bland 2007).
- L'eau d'Origan aromatique, riche en carvacrol, est consommé pour réduire le taux du sang, de cholestérol et de glucose et aussi pour supprimer l'activité de tumeur (Goze *et al.*, 2010) et utilisée contre la coqueluche et convulsif toux, le rhume, la fièvre et les douleurs menstruels (Gurudatt *et al.*, 2010), ainsi utilisée comme calmant (Lans *et al.*, 2007).

7.2. Usages culinaires et alimentaires

- L'Origan bien connu sous le nom de «herbe à pizza» a été utilisé sous forme fraîche ou sèche pour améliorer la saveur et favoriser l'acceptation du produit. Il présente généralement un goût phénolique, herbacé, légèrement floral et amer, avec de légères notes citronnées. L'origan est largement utilisé dans les plats et autres aliments mexicains et nord-américains, tels que les boissons alcoolisées, les produits de boulangerie, la viande et les produits à base de viande, les condiments, les produits laitiers et les légumes

transformés. L'herbe d'origan est généralement commercialisée sous forme séchée en raison de sa durée de conservation accrue et plus puissant goût (Leung et Foster 1996).

- Les feuilles d'Origan ont été ajoutées aux sauces, salades et vermouth. L'extrait des feuilles séchées aurait également été utilisé comme des amandes, des liqueurs et des sauces de poisson (The Herb Society of america 2005 ; Chishti *et al.*, 2013).

7.3. Usages cosmétiques

- Les pommades à base d'origan sont bénéfiques pour l'infection et cicatrisation des plaies (Ivanova *et al.*, 2005).

8. Autres plantes utilisées en alimentation

Herbes de la famille des Lamiacées, principalement l'Origan (*Origanum vulgare* L.), le Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) et la Sauge (*Salvia officinalis* L.) ont été rapportés comme ayant une capacité antioxydante (Shan *et al.*, 2005; Wojdylo *et al.*, 2007).

La courte durée de conservation de la viande emballée réfrigérée rend sa commercialisation plus difficile. Quelques études ont démontré que la durée de vie et la qualité de la viande peuvent être améliorées par les antioxydants naturels ajoutés dans le pré et post-abattage. C'est-à-dire l'incorporation des antioxydants naturels dans les régimes animaux, sur la surface de la viande, ou emballage actif. Certains auteurs ont rapporté l'efficacité des extraits de Romarin et d'Origan pour réduire l'oxydation des lipides (Fasseas *et al.*, 2007; Camo *et al.*, 2008), perte de couleur et croissance microbienne (Camo *et al.*, 2008; Zinoviadou *et al.*, 2009) dans certains types de viandes.

L'huile essentielle d'Origan a un grand potentiel en tant qu'additif dans les régimes alimentaires des ruminants comme l'agneau et des moutons (Bampidis *et al.*, 2005 ; Chaves *et al.*, 2008) des poulets de chair (Pirgozliev *et al.*, 2015) pour augmenter la digestibilité du régime, favoriser la croissance des animaux et gain de poids (Calsamiglia *et al.*, 2007).



Chapitre II

Chapitre II : Les bactéries psychrotrophes

1. Généralités

Le lait cru fournit un environnement physico-chimique favorable à la multiplication d'un large spectre de micro-organismes, y compris une gamme d'espèces bactériennes psychrotrophes (principalement des membres du genre *Pseudomonas*) qui contaminent le lait lors de la collecte et / ou transformation (Pinto *et al.*, 2006; Mcphee et Griffiths 2011).

La contamination du lait cru de vache par les micro-organismes psychrotrophes est influencée par le statut sanitaire et l'hygiène des vaches laitières, l'hygiène de l'environnement dans lequel les vaches laitières sont logées, techniques de préparation et de traite, méthodes utilisées pour le nettoyage et l'assainissement de la traite des machines et réservoirs de lait, hygiène du personnel de service (Berry *et al.*, 2006; Cempírková 2007), aussi le refroidissement rapide et le stockage à froid du lait cru favorise la croissance des bactéries psychrotrophes dans le lait (Barbano *et al.*, 2006). Ils deviennent microflore dominante lors du stockage à froid du lait et leurs enzymes extracellulaires, en particulier les protéases et les lipases, contribuent à la détérioration des produits laitiers (Hantis-Zacharov et Halpern 2007).

La domination des bactéries psychrotrophes dans la population microbienne totale est encore plus prononcée lorsque le lait est produit dans de mauvaises conditions d'hygiène et / ou contient un nombre accru de cellules somatiques (Barbano *et al.*, 2006). Pour ces raisons, les bactéries psychrotrophes représentent généralement pour plus de 90% de la population microbienne totale de lait cru refroidi, fait intéressant, le lait fraîchement tiré du pis ne contient pas de populations détectables en cultures des bactéries psychrotrophes. Cependant, ces populations évoluent avec le temps dans pratiquement tout le lait cru entreposé à froid, ce qui réduit la durée de vie normale du stockage réfrigéré à moins de 5 jours (Mcphee et Griffiths 2011; Raats *et al.*, 2011).

Ainsi, on estime que l'industrie laitière moderne connaît des pertes jusqu'à 30% en raison de la détérioration et de réduction de la qualité du produit causée par les bactéries psychrotrophes (Randolph, 2006). D'autre part, certaines espèces de ces bactéries ont la capacité de produire des toxines et / ou de montrer une résistance aux antibiotiques et doit donc être considéré comme bactéries pathogènes humaines opportunistes (Munsch-Alatossava et Alatossava 2006; Hemalatha et Banu 2010; Senesi et Gelerdi 2010).

2. Définition et caractéristiques

Le terme psychrotrophes (également dénommé psychro-tolérant) fait référence aux micro-organismes capables de croître à basses températures mais qui présentent une température optimale et maximale de croissance supérieure à 15 et 20 °C, respectivement (Figure 4) (Moyer et Morita 2007), caractérisées par une croissance permettant la production de colonies sur gélose à 7°C en 10 jours (Alain *et al.*, 2007).

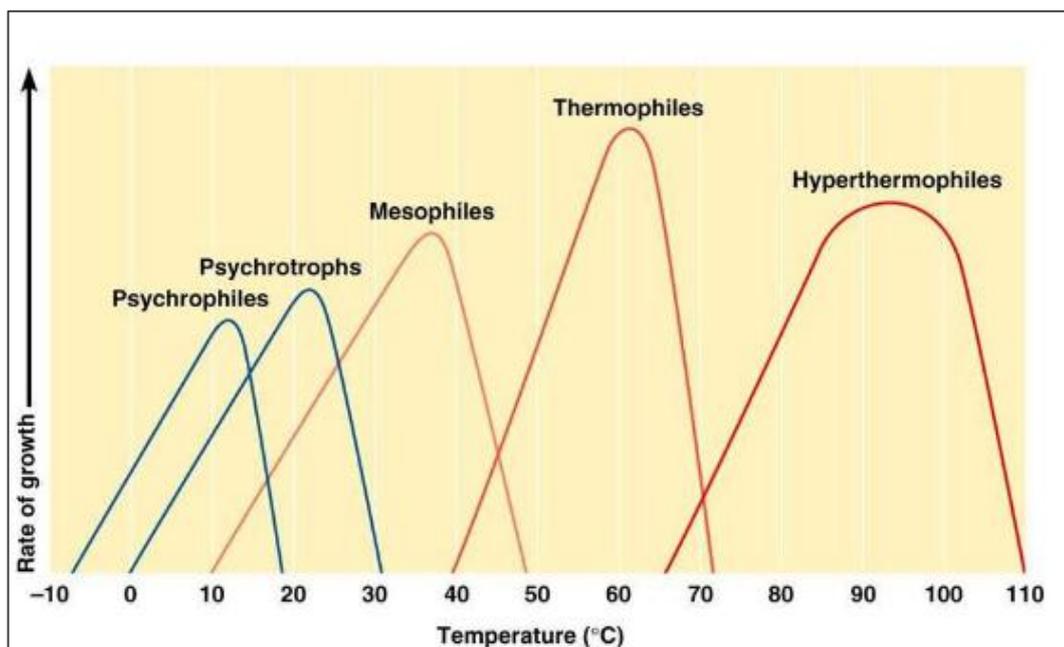


Figure 4. Taux de croissance des bactéries psychrotrophes en fonction de la température et en comparaison avec d'autres types bactériens (Lemarchand et Desbiens 2009).

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 peut également être présent dans l'air. Leur activité métabolique optimale est exprimée à des températures comprises entre 20 et 30 °C. Cependant, ils peuvent se multiplier à basses températures grâce à un enrichissement en acide gras polyinsaturé dans leur membrane. En d'autres termes, la membrane cellulaire modifiée assure une perméabilité suffisante pour la fluidité et l'activité de transport des métabolites nécessaires à la croissance et reproduction des bactéries à basse température (Samaržija *et al.*, 2012). En ce qui concerne l'influence du pH, il faut noter que la plupart des bactéries psychrotrophes sont neutrophiles. Seules font exception à cette règle les bactéries lactiques et *Listeria monocytogenes* qui tolèrent des pH acides jusqu'à une valeur limite de 5 (Bornert 2000).

Une caractéristique importante des bactéries psychrotrophes associées au lait et aux produits laitiers est leur capacité à former des exopolysaccharides et / ou des lipopeptides. Ces composants forment structurellement différents de nombreux métabolites permettant aux bactéries l'adhérence sur des surfaces solides sur lesquelles ils peuvent former un biofilm (Raaijmakers *et al.*, 2010). À savoir les cellules bactériennes dans le biofilm développent une plus grande biomasse cellulaire et avoir la capacité de se séparer temporairement du biofilm formé. Pour ces raisons, dans l'industrie laitière, la formation de biofilm peut être une difficulté à résoudre et une source durable permanente de contamination du produit par les bactéries psychrotrophes qui causent la détérioration et / ou peuvent être une voie opportuniste pathogène (Silankorva *et al.*, 2008; Simões *et al.*, 2010).

Les bactéries psychrotrophes isolées à partir du lait réfrigéré appartiennent aux genres Gram négatif et Gram positif (Tableau 5) et sont taxonomiquement classés en sept classes : Gammaprotobactéries, Bacilli et Actinobacteria sont les classes dominantes contenant entre 19 et 21 espèces, tandis que Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Flavobactéries et Sphingobacteria sont les quatre classes les moins significatives (Hantsis-Zacharov et Halpern 2007). En outre, Hantsis-Zacharov et Halpern (2007) ont isolé à partir du lait cru refroidi, environ 20% d'isolats pour lesquels ils ont supposé être de nouvelles espèces de bactéries psychrotrophes. Un nombre important de souches bactériennes isolés du lait refroidi appartiennent aux genres: *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* et les espèces *Burkholderia cepacia* (précédemment appelé *Pseudomonas cepacia*) et même d'entre eux sont considérée comme des bactéries potentiellement pathogène. À savoir, ces espèces bactériennes sont associées à infection chez l'homme et chez l'animal, notamment en cas de répression immunitaire, et ils montrent résistance aux antibiotiques (Munsch-Alatosava et Alatosava 2005 ; Svensson *et al.*, 2006; Beena *et al.*, 2011).

Tableau 5: Les différentes bactéries isolées à partir de lait cru refroidi dans différentes études.

Bactéries à Gram négatif	Bactéries à Gram positif	Références
<i>Pseudomonas</i>	<i>Streptococcus</i>	Munsch-Alatossava et Alatossava (2006)
<i>Serratia</i>	<i>Micrococcus</i>	
<i>Aeromonas,</i>	<i>Bacillus</i>	Raats <i>et al.</i> (2011)
<i>Alcaligenes,</i>	<i>Clostridium</i>	
<i>Achromobacter</i>	<i>Corynebacterium</i>	Vithanage <i>et al.</i> (2016)
<i>Acinetobacter</i>	<i>Microbacterium</i>	De Oliveira <i>et al.</i> (2015)
<i>Hafnia</i>	<i>Staphylococcus</i>	Quigley <i>et al.</i> (2013)
<i>Chryseobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	
<i>Enterobacter</i>		

Une caractérisation microscopique, macroscopique et biochimique de quelques bactéries isolées à partir de lait est présentée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Caractérisation macroscopique et microscopique et biochimique des psychrotrophes isolées du lait.

Bactérie	Aspect microscopique	Aspect macroscopique	mobilité	cat	Oxy	Référence
Acinetobacter	bacilles courts ou des coccobacilles Gram- de 1 à 1,5µm de large et de 1,5 à 2,5µm de long en formation diploïde ou en courte chaîne.	Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, convexes, translucides ou opaques, lisses, de couleur blanc-jaunâtre et d'aspect butyreux, à bord régulier, atteignant de 1 à 4 mm de diamètre	-	+	-	Pelg <i>et al.</i> (2008) Giamarellou. (2008) MC. Poly <i>et al.</i> (2007)
Pseudomonas	des bacilles gram négatif droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm de longueur	Sur gélose au sang les colonies sont lisses et bombées de 2 à 3 mm de diamètre, offrant des cercles concentriques gris-jaunes, gris-bleutés ou gris-verdâtres	+	+	+	Avril <i>et al.</i> (2000) Garrity (2005) Kékessy (1972)
Chryseobacterium	des bacilles à Gram- 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.	Sur gélose au sang, les colonies sont lisses, translucides ou opaques, circulaires, non hémolytiques, de couleur blanc grisâtre, atteignant 1 à 2 mm de diamètre.	-	+	+	Vandepitte J <i>et al.</i> (1965) Tak V <i>et al.</i> (2013) Stephen Berger. (2015) Avril JL <i>et al.</i> (1992)
Enterococcus	sont des cocci ovoïdes Gram positif 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 <i>et al.</i> (2004) Benagli <i>et al.</i> (2011)
Lactobacillus	bâtonnet long et fin, court au coccobacille à gram positif, groupés en paires ou en chaînes.	des lactobacilles sont généralement de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques.	-	-	-	Denis <i>et al.</i> (2007) Guiraud <i>et al.</i> (2004) Hammes et Vogel. (2012)

3. Base biochimique de la croissance psychrotrophe

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).

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) ont été modifiés 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).

4. Enzymes thermostables produites par les microorganismes psychrotrophes

La majorité des microorganismes psychrotrophes isolés du lait ont la capacité de produire des enzymes hydrolytiques qui décomposent les principaux composants du lait tels que les protéines, graisse et lécithine (Baur *et al.*, 2015). Plusieurs peptidases, lipases, protéinases et phospholipases produites par des bactéries psychrotrophes isolées de lait ont été décrites dans la littérature (Samaržija *et al.*, 2012).

Beaucoup de ces enzymes hydrolytiques résistent à la chaleur et conservent par conséquent une partie de leur activité après le traitement thermique appliqué dans les industries laitières telles que la pasteurisation et traitement UHT. Concernant la qualité et les aspects économiques, les enzymes hydrolytiques thermostables ont le plus important effet dans les laiteries puisque ces enzymes conduisent à des défauts de saveur et problèmes technologiques tels que la sédimentation et la gélification dans le lait UHT,

rancidité et défauts de goût dans le lait en poudre et le fromage (Sørhaug et Stepaniak 1997).

5. Influence des bactéries psychrotrophes sur la conservation des denrées

De nombreux types d'altérations des denrées dues à l'action de bactéries psychrotrophes ont été décrits. Ils sont le résultat de l'activité d'enzymes microbiennes exocellulaires et affectent, selon les cas, la consistance, la couleur, l'aspect, l'odeur et la saveur du produit. La protéolyse conduit à la formation d'acides aminés libres puis de produits de leur décarboxylation ou de leur désamination. Les amines volatiles et l'ammoniac formés sont à l'origine d'odeurs et de saveurs désagréables et exceptionnellement d'une toxicité de l'aliment. La lipolyse conduit à la libération d'acides gras libres. Elle modifie les propriétés technologiques et gustatives des graisses, avec apparition du goût de rance et favorise le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés en méthylcétones. Les modifications de la consistance du produit, notamment par production d'exopolysaccharides à l'origine par exemple d'une consistance filante des laits décrite avec les genres *Micrococcus* et *Alcaligenes*; les phénomènes d'acidification par fermentation des sucres, activité caractéristique du groupe des bactéries lactiques, soit les genres *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus*. Lors de processus hétérofermentaire, la formation de gaz, d'aldéhydes et de cétones est à l'origine de modifications du goût et de l'odeur du produit (Bornert 2000).

L'apparition de colorations, d'odeurs et de saveurs anormales, dont quelques exemples figurent dans le Tableau 7.

Tableau 7: Exemples d'altérations des denrées par des bactéries psychrotrophes (Bornert 2000).

Produit concerné	Modification constatée	Agent
Lait	Coloration bleue	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Beurre	Couleur verte	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Toutes denrées	Amertume	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
Toutes denrées	Goût fruité (de fraise)	<i>Pseudomonas fragi</i>

6. Contrôle de la détérioration due à l'activité des enzymes thermorésistantes

Réduire l'activité et / ou limiter la sécrétion des enzymes hydrolytiques résistantes de la chaleur par les bactéries psychrotrophes est un défi scientifique. Une fois que les enzymes sont formées, la réduction de leur activité par chauffage semble être très difficile. Une revue récente de Stoeckel *et al.* (2016) résume les données disponibles sur l'inactivation des protéases de *Pseudomonas* et propose des traitements thermiques pour réduire l'activité de la protéase dans le produit final pour prolonger la durée de vie des produits UHT. Pour les produits UHT destinés à exportation, le chauffage UHT associé à un préchauffage prolongé (par exemple 90-95 °C pendant 180-90 s) est suggéré pour réduire 99,99% de l'activité indigène de la plasmine de lait. Les protéases de *Pseudomonas* spectacle également un comportement irréversible d'inactivation à basse température en raison de déploiement de la structure tertiaire de l'enzyme à une température plage de 45–65 °C, le rendant susceptible à l'autoprotéolyse. Cette inactivation a été récemment montrée entre 42 et 48 °C pour une nouvelle métalloprotéase à large spécificité issue d'un *Pseudomonas spp.* isolé du lait réfrigéré (Ertan *et al.*, 2015). Cependant, cela l'effet semble beaucoup plus faible dans le lait par rapport aux systèmes tampons en raison des effets protecteurs des composants du lait, et donc une faible étape de préchauffage n'est pas efficace pour réduire suffisamment cette bactérie d'activité protéolytique. Le développement d'autres procédés de chauffage (par exemple, traitement thermique à 125-130 °C) pour de longs temps d'attente (>150 s) a été suggéré (Stoeckel *et al.*, 2016).

7. Les variations du pH de lait

Le pH du lait normal provenant d'une vache en bonne santé est compris entre 6,6 et 6,7, des valeurs de pH plus basses suggèrent la croissance de micro-organismes qui fermentent le lactose en acide lactique ou une lipolyse extensive. Cependant, des pH plus élevés dans le lait peuvent être rencontrés en période de stress physiologique pour l'animal producteur, lorsque l'équilibre minéral du lait est altéré par des modifications de la perméabilité de la barrière hémato-laiteuse (par exemple très tard dans le cycle de lactation ou pendant une infection mastitique). Le pH du lait est affecté par la température, diminuant généralement avec température croissante due aux changements de dissociation des groupes ionisables. La lipolyse peut également diminuer le pH du lait, en raison de l'hydrolyse d'esters, en particulier d'esters phosphoriques. Le chauffage du lait provoque une diminution de son pH et, à des températures <80 °C, le pH du lait diminue de manière linéaire avec

l'augmentation de la température. Les réductions de pH induites par la chaleur dans cette plage de températures sont principalement dues aux modifications de l'équilibre minéral du lait et sont largement réversibles lors du refroidissement ultérieur. La perte de CO₂ induite par la chaleur constitue une augmentation du pH compensatrice, mais elle est généralement moins importante. Traitement thermique sévère diminue encore le pH du lait, en raison de la thermolyse dégradation du lactose en acides organiques, en particulier en acide formique (Tamime 2009).

8. Evolution des flores microbiennes lors de la réfrigération du lait

Le lait cru est contaminé pendant le processus de traite, plusieurs études ont été réalisées dans le but d'identifier le microbiote prédominant présent dans le lait de vache immédiatement après la traite (Tableau 8). Bien que la région où les échantillons de lait ont été collectés et les méthodes utilisées pour l'isolement et l'identification pourrait influencer les résultats obtenus pour le microbiote prédominant dans le lait cru frais, le genre *Lactobacillus* a été identifié dans la dominante microbiote dans le lait cru français selon des méthodes à base de gélose (Vacheyrou *et al.*, 2011). *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* et *Lactobacillus casei* aussi bien que *Lactococcus lactis*, ont été également trouvés dans des échantillons de lait italiens, revêtent une importance particulière au industrie laitière (Bertazzoni Minelli *et al.*, 2004; Quigley *et al.*, 2013). *Propionibacterium freudenreichii* et *Corynebacterium* sont aussi détectés dans le lait cru dans une étude récente (Quigley *et al.*, 2013).

Par conséquent, les bactéries à Gram positif représentent les populations bactériennes les plus répandues dans le lait cru frais provenant de vaches en bonne santé et en conditions hygiéniques. Cependant certaines espèces du genre Staphylocoque et Streptocoque sont souvent détectés dans le lait cru frais aussi bien en tant que membres des Clostridiales. Tandis que Staphylocoque et Streptocoque ont été associés à une mammite (Zadoks *et al.*,2001), *Clostridium lituseburense* et *Clostridium glycolicum*, prédominant chez la vache fumier et des eaux usées de laiterie, sont associés au contamination (Liu *et al.*,2009; St-Pierre et Wright 2014).

Tableau 8 : Groupes bactériens prédominants trouvés dans le lait cru frais de différents pays en utilisant des méthodes dépendantes et indépendantes de la culture (Machado *et al.*, 2017).

Pays	Méthodes dépendantes de la culture	Méthodes indépendantes de la culture	Références
France	<p>Aérobies Mesophiles</p> <p><i>Pseudomonas</i></p> <p><i>Staphylococcus</i></p> <p><i>Acinetobacter</i></p> <p><i>Corynebacterium</i></p> <p><i>Streptococcus</i></p> <p><i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp.</p> <p><i>Lactis</i></p> <p><i>Lactobacillus paracasei</i></p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i></p>		<p>Michel <i>et al.</i>(2001)</p> <p>Vacheyrou <i>et al.</i>(2011)</p>
Italie		<p><i>Clostridium</i> spp.</p> <p><i>Clostridium glycolicum</i></p> <p><i>Lactococcus lactis</i></p> <p><i>Lactobacillus casei</i></p> <p><i>Streptococcus dysgalactiae</i></p> <p><i>Turicibacter sanguinis</i></p> <p><i>Ralstonia picketti</i></p> <p><i>Arthrobacter arilaitensis</i></p> <p><i>Corynebacterium</i></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>Enterococcus</i> spp.</p> <p><i>Enterococcus faecalis</i></p> <p><i>Leuconostoc lactis</i></p> <p><i>Macroccoccus caseolyticus</i></p> <p><i>Lactococcus lactis</i></p> <p><i>Rothia</i> spp.</p>	<p>Delbès <i>et al.</i> (2007)</p> <p>Giannino <i>et al.</i> (2009)</p>
USA		<p><i>Staphylococcus</i></p> <p><i>Streptococcus</i></p> <p><i>Corynebacter</i></p>	<p>Kable <i>et al.</i> (2016)</p>

La procédure de refroidissement puis de stockage réfrigéré du lait cru contrôle efficacement le développement des populations d'organismes de dégradation mésophiles tout en offrant un avantage sélectif pour la croissance des bactéries psychrotrophes (Barbano *et al.*, 2006; De Jonghe *et al.*, 2011; Samarzija *et al.*, 2012). Ainsi, le stockage réfrigéré du lait a été prolongé de deux à cinq jours avant le traitement thermique (O'Brien et Guinee, 2011). Selon Mcphee et Griffiths (2011), les bactéries psychrotrophes cultivable dans le lait sont représentées principalement par des genres à Gram négatif, y compris *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* et *Flavobacterium* spp., et à un nombre beaucoup plus faible par Genres Gram-positifs comprenant *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptocoque*, *lactobacille* et *Microbacterium* spp .

Certains genres ont été détectés moins fréquemment dans lait cru tel que *Kocuria* (Lafarge *et al.*, 2004; Mallet *et al.*, 2012; Hanamant et Bansilal, 2013). Selon Lafarge *et al.* (2004), *L. lactis* était l'espèce la plus fréquemment détecté dans des échantillons de lait cru français, avec certaines espèces de *Staphylocoque* espèce. Après incubation du lait cru à 4 °C pendant 24 h, la majorité des échantillons ont montré une réduction de *L. lactis* et des espèces minoritaires comme *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus pentosus* étaient en concurrence avec d'autres espèces. Malgré une grande variance des groupes prédominants trouvés dans le lait cru après la conservation au froid, Lafarge *et al.* (2004) ont noté une émergence de bactéries psychrotrophes tel que *Listeria* spp et *Aeromonas hydrophila*. Raats *et al.* (2011) ont examiné la prévalence des bactéries Gram positif et négatif dans les échantillons de lait cru récoltés à la ferme et les produits laitiers entreposés à froid, dont les échantillons de ferme ont révélés une prévalence des bactéries Gram positives (bacilles, clostridia et actinobactéries) alors que les échantillons de laiterie ont été caractérisés principalement par espèce négative (Gammaproteobacteria).

Kable *et al.* (2016) ont démontrés que les communautés microbiennes de lait cru de camions citernes en Californie (USA) étaient similaires les uns aux autres, même lorsque des échantillons ont été collectés de différents fermes, transportés à différents endroits et échantillonnés à différents moments de l'année. Étonnamment, ces auteurs ont montré que le noyau microbiote (c'est-à-dire les taxons présents dans tous les échantillons de lait) de lait cru, composé de 29 groupes taxonomiques, contenait des proportions élevées de *Streptocoque* et *Staphylocoque* et membres non identifiés de *Clostridiales*, mais pas *Pseudomonas*, qui était présent dans des proportions relativement élevées dans une partie

du lait testé mais entièrement absent. Ils ont également observé que *Pseudomonas* avec les espèces psychrotrophes du genre *Lactocoque*, *Streptocoque* et *Acinetobacter*, avait tendance à être présentes dans des proportions relativement plus élevées dans les silos de laiterie que dans les camions citernes (Tableau 9).

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

Tableau 9 : Groupes bactériens prédominants trouvés dans le lait cru après le stockage à froid dans différents pays en utilisant des méthodes dépendantes et indépendantes de la culture (Machado et al., 2017).

Pays	Méthodes dépendantes de la culture	Conditions de stockage	Références
Algérie	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Chryseobacterium indologene</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Acinetobacter guillouiae</i>	4 °C / 7 days 4 °C / 10 days 4 °C / 21 days	Boubendir <i>et al.</i> (2016)
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 days 4–10 °C / 10 days	Vithanage <i>et al.</i> (2016)
France	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>L. lactis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Kocuria rhizophila</i>	2–4°C / 24–48 h	Mallet <i>et al.</i> (2012)



Chapitre III

Chapitre III: La dynamique de croissance microbienne

1. Définition de la croissance microbienne

La croissance est une fonction qui se traduit par une augmentation ordonnée de tous les constituants cellulaires préalables à sa division. Le processus va conduire à la production de deux(ou plusieurs) cellules filles, dont le résultat finale est d'assurer la permanence de l'espèce (Paolozzi *et al.*, 2015). Chez les organismes pluricellulaires, elle conduit à une augmentation de la taille ou de la masse. Chez les micro-organismes unicellulaires qui se multiplient par scissiparité ou par bourgeonnement (bactéries et levures), elle conduit à une augmentation du nombre de cellules (Guezlane-tebibel *et al.*, 2010).

La croissance 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. Il est difficile de faire une observation rigoureuse. En effet, l'accumulation des cellules au niveau de la colonie et les modifications physico-chimiques de milieu limitent rapidement l'accroissement microbien (Guezlane-tebibel *et al.*, 2010).

2. Les paramètres de croissance

- **La concentration cellulaire**

Elle est définie comme le nombre de cellules individuelles (N) par unité de volume (ml) d'une culture.

N se mesure par numération directe des bactéries ou par numération des bactéries viables après culture (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2010).

- **La densité d'une culture**

C'est la quantité M (g) de cellules bactériennes par unité de volume d'une culture (ml).

M se mesure par pesées après dessiccation jusqu' à un poids constant ou par mesure turbidimétrique (densité optique ou DO) (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2010).

- **Le temps de latence**

Le temps de latence ou lag phase en anglais est défini par convention comme étant l'intersection de la droite correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques) avec la droite horizontale passant par la concentration initiale, X_0 (Lodge et Hinshelwood 1943).

Buchanan et Cygnarowicz (1990) ont récemment proposé de définir le temps de latence comme étant le point d'accélération maximale de la vitesse de multiplication.

- **Le taux de croissance maximum μ_{max}**

C'est le nombre de division par unité de temps t (h) $\mu = n / t$ et la pente correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques) (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2010).

- **Le temps de génération G**

C'est l'intervalle de temps entre deux divisions successives, $G = t / n$ (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2010).

C'est le temps nécessaire pour le doublement de la biomasse, c'est-à-dire pour $N / N_0 = 2$ (Pelmont 1993).

- **Croissance totale**

C'est la quantité $M(g)$ de substance bactérienne formée à la fin de la croissance par unité de volume (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2010).

3. Courbe de croissance bactérienne

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).

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 5):

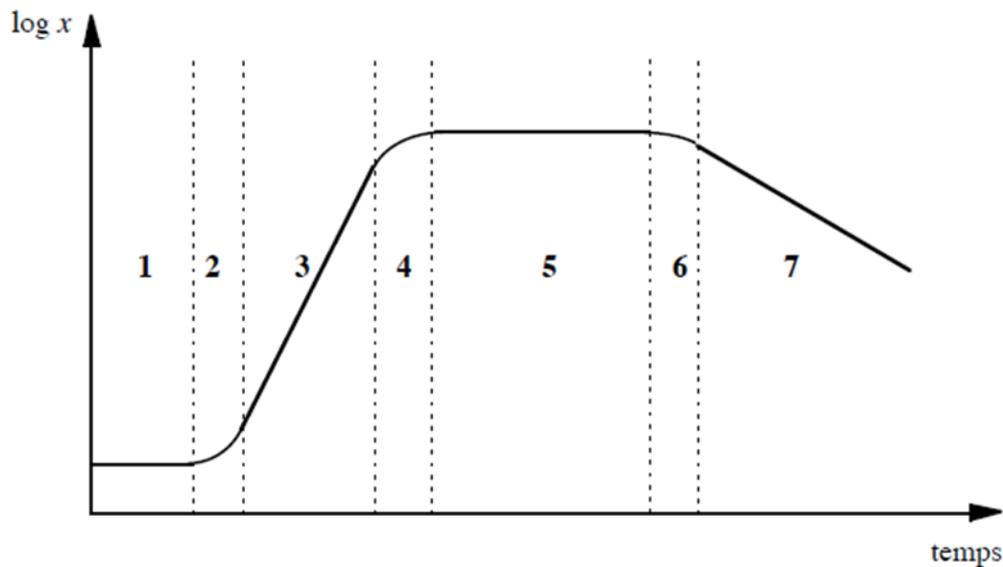


Figure 5. Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases. X représente la densité ou la biomasse de la culture. Les phases sont : (1) phase stationnaire initiale ou de latence, (2) phase d'accélération de la croissance, (3) phase de croissance (maximale) à vitesse constante, (4) phase de ralentissement de la croissance, (5) phase stationnaire maximale, (6) et (7) phases de décroissance (Buchanan 1918) cité par Augustin (2005).

4. Les phases de croissances

La croissance des populations bactériennes passe par plusieurs phases :

➤ La phase stationnaire initiale ou phase de latence

Au début, le nombre de cellules varie très peu parce que celles-ci ne commencent pas à se reproduire immédiatement après leurs introductions dans un nouveau milieu. Cette période ou les cellules ne se divisent pas, ou très peu. Les cellules ne sont toutefois pas dormantes, la population microbienne connaît une période d'activité métabolique intense, particulièrement en ce qui a trait à la synthèse de l'ADN et des enzymes nécessaires à l'utilisation des sources de carbone (Tortora *et al.*, 2010).

Elle est caractérisée par une vitesse de multiplication nulle ($\mu = 0$). Cette phase permet l'adaptation de l'inoculum requise pour que les cellules bactériennes commencent à

exploiter à son nouvel environnement de croissance. La durée de cette période dépend de la nature du milieu d'accueil, de l'état physiologique des cellules inoculées et éventuellement de la taille de l'inoculum (elle dure entre une heure et plusieurs jours) (Madigan *et al.*, 2000). Aussi sa durée dépend du rapport entre la teneur des enzymes constitutives et des enzymes inductibles, plus que ce rapport est élevé plus que la durée est courte et vice versa (Boubendir *et al.*, 2016).

➤ **la phase d'accélération ou phase d'augmentation de la vitesse de croissance**

Les bactéries commencent à se multiplier pour atteindre progressivement la vitesse maximum de croissance (μ_{max}) ($0 < \mu < \mu_{max}$) (Monod 1958).

➤ **la phase de croissance à vitesse constante maximale ou phase de croissance exponentielle**

Après la phase de latence, les cellules commencent à se diviser ; elles entrent dans une période de croissance appelée phase de croissance exponentielle (Tortora *et al.*, 2010). Elle se présente 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 (Monod 1958). C'est la période durant laquelle la reproduction cellulaire est la plus intense, et le temps de génération atteint est constant et a 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). 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 ralentissement de la croissance (décélération)**

C'est la phase de diminution de la vitesse de croissance qui progressivement devient nulle (Monod 1958).

➤ **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, l'accumulation de déchets, modification de facteurs physicochimiques tels que

l'alcalinisation ou l'acidification du milieu et le rendant impropre à la croissance des microorganismes (Monod 1958). Il ne s'agit en aucune façon d'un arrêt total du métabolisme. En fait, un certain nombre de synthèses sont encore réalisées, par exemple d'ADN et de protéines. 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 décroissance ou phase déclin

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. Ce cas est représenté par une droite, le nombre cellules détruites étant proportionnel au temps. L'inclinaison de cette droite dépend de l'espèce bactérienne et des conditions générales d'environnement (Guezlane-tebibel *et al.*, 2010).

Il vient un moment où le nombre de bactéries qui meurent dépasse le nombre de nouvelles bactéries ; la population entre alors dans la phase de déclin ou phase de décroissance logarithmique. Cette phase se poursuit régulièrement jusqu'à ce que la population ne constitue plus qu'une toute petite fraction du nombre de bactéries présentes durant la phase stationnaire, ou jusqu'à ce que toutes les cellules meurent. Chez certaines espèces, les quatre phases se déroulent en quelques jours seulement, tandis que des bactéries de diverses autres espèces peuvent survivre presque indéfiniment (Tortora *et al.*, 2010).

La cinétique de croissance des cultures bactériennes est donc essentiellement composée d'une phase de latence suivie d'une phase exponentielle puis d'une phase stationnaire. Les microbiologistes utilisent classiquement les paramètres suivants pour caractériser ces différentes phases : la densité cellulaire initiale (x_0), le temps de latence (lag), la vitesse de multiplication maximale (μ_{max}) ou le temps de génération (T_g) et la densité maximale atteinte (x_{max}) (Figure 6).

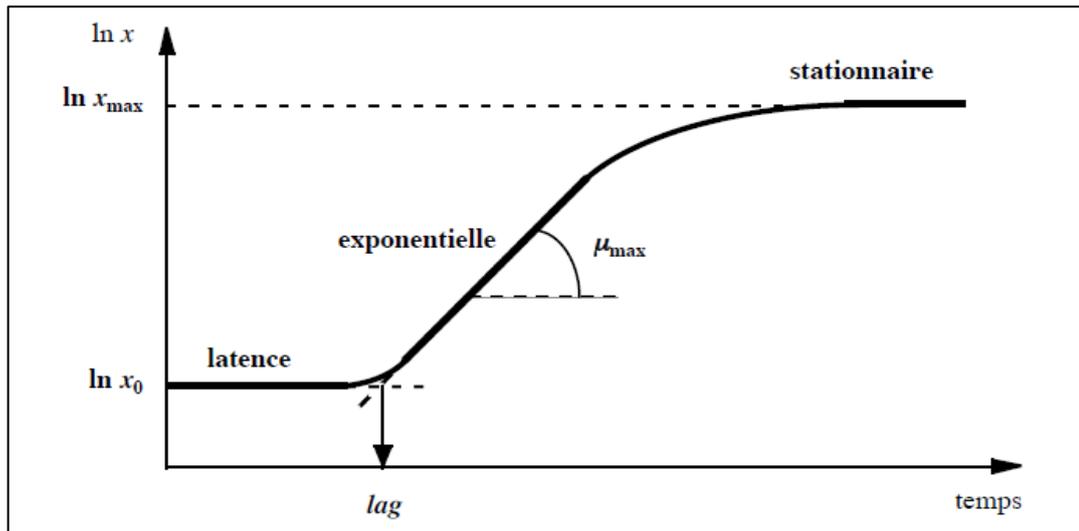


Figure 6. Les principales phases de la courbe de croissance bactérienne et paramètres qui les caractérisent: lag est le temps de latence, μ_{max} est le taux de croissance maximum, X_0 et X_{max} sont les densités cellulaires initiales et maximales (Augustin 2005).

5. Effet des facteurs environnementaux sur la croissance microbienne

Les facteurs écologiques susceptibles d'agir sur le comportement et donc la croissance des microorganismes (Figure 7) au sein des aliments sont classés en cinq groupes (Mossel et Ingram 1955 ; Mossel 1983) :

- **Les facteurs intrinsèques** : Ce sont les caractéristiques physico-chimiques d'un aliment. Ils englobent le pH, l'activité de l'eau, le potentiel d'oxydoréduction, les substances antimicrobiennes, la composition en nutriments et la structure d'aliment.
- **Les facteurs technologiques** : Ce sont les traitements délibérément appliqués aux aliments généralement dans le but de détruire la flore microbienne. Ils consistent pour l'essentiel en l'application de chaleur, de radiations U.V. ou ionisantes, de hautes pressions hydrostatiques, ou par modifications de la structure de l'aliment (émulsions).
- **Les facteurs extrinsèques** : Ils sont appliqués pendant la conservation des denrées alimentaires. Ils consistent essentiellement en l'utilisation de froid positif ou négatif et d'atmosphères modifiées.

- **Les facteurs microbiens** : Ce sont les interactions qui peuvent exister avec les autres microorganismes présents dans l'aliment. Ils peuvent favoriser ou ralentir la croissance des microorganismes étudiés.
- **Les effets combinés** : Ce sont les interactions qui peuvent exister entre les facteurs cités auparavant.

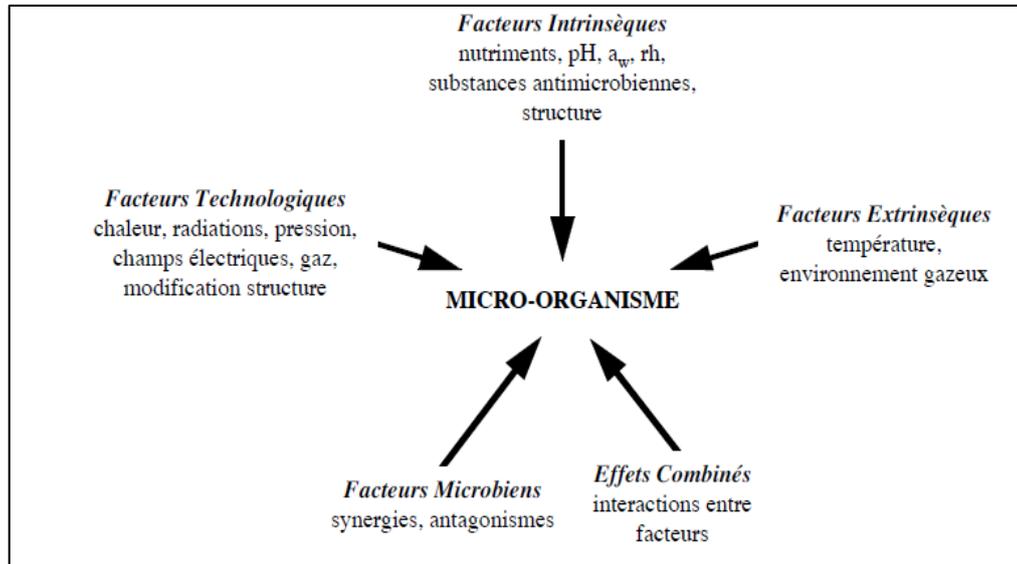


Figure 7. Nature des facteurs environnementaux agissant sur le comportement des microorganismes dans les aliments (Mossel et Ingram 1955 ; Mossel 1983).

6. Exemples d'études de la dynamique de croissance bactérienne à froid

Boubendir *et al.* (2016) ont étudiés sur le lait de vache d'une région semi-aride d'Algérie, la diversité des communautés bactériennes du lait cru durant la réfrigération et leur dynamique (Figure 8).

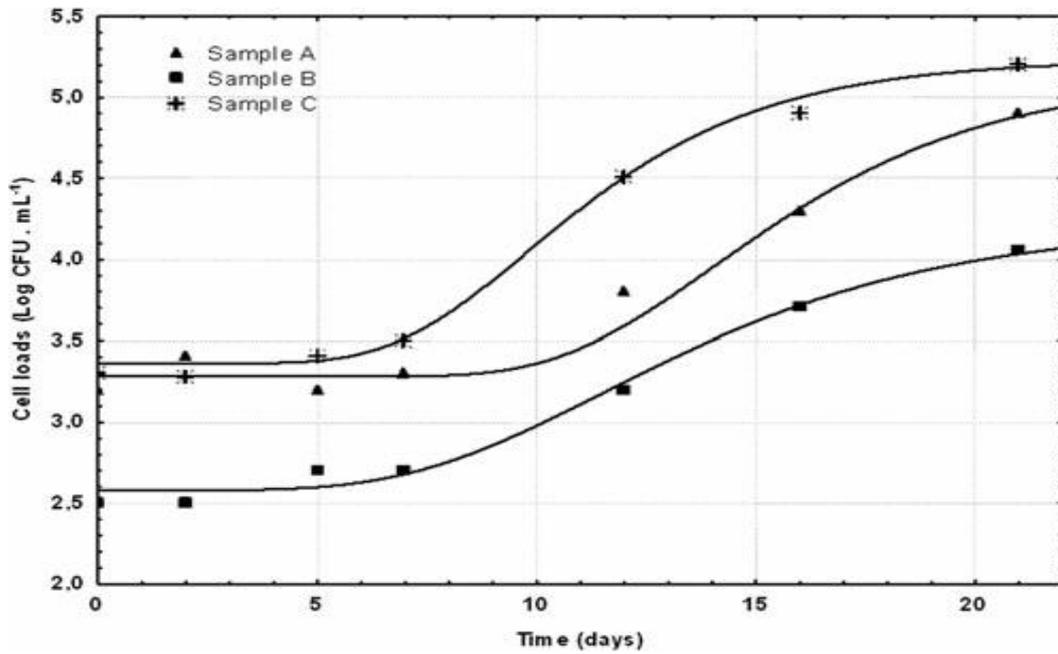


Figure 8. Courbes de croissances obtenues par modélisation avec l'équation de Gompertz des données de comptage des cellules de bactéries viables totales dans des échantillons de lait de 3 vaches pendant 21 jours de stockage à 4°C (Boubendir *et al.*, 2016).

Les 3 échantillons de lait ont été analysés pendant 21 jours en raison d'une croissance microbienne lente. Le nombre initial d'échantillons de lait, allant de 2,5 à 3,5 Log UFC.mL⁻¹. Le Tableau 10 rapporte les paramètres Gompertz obtenus :

Tableau 10 : Les valeurs prédites des paramètres de croissance microbienne par l'équation de Gompertz obtenus en modélisant les données de dénombrement moyen 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
Mean	0.18	8.11

μ_{max} : la vitesse maximal de croissance ($\Delta \text{Log UFC.mL}^{-1} \cdot \text{jour}$)

λ : le temps de génération (jours)

Aussi, Vithanage *et al.* (2016) à Victoria 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 microbiologique du lait cru provenant de trois différentes fermes laitières avec des comptes microbiens initiaux très différents (Figure 9).

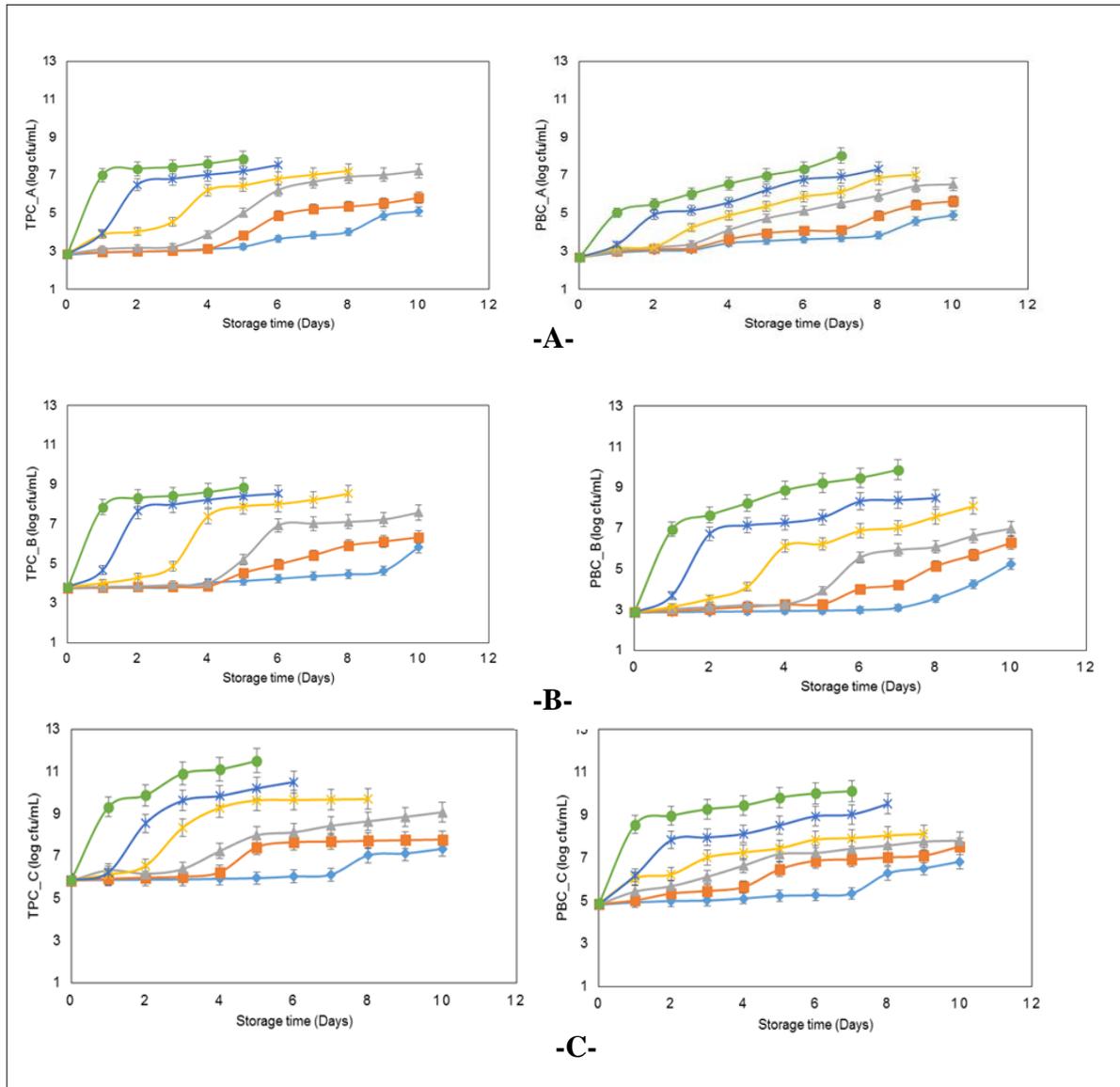


Figure 9. Effet de différentes conditions de stockage sur le nombre total de bactéries (TPC) et le nombre de bactéries psychrotrophes (PBC) des échantillons de lait cru A, B et C; stockage à 2°C, 4°C, 6°C, 8°C, 10°C et 12°C. Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne \pm SE (n = 9) (Vithanage *et al.*, 2016).

Cempírková et Mikulová (2009) ont étudiés la contamination d'échantillons en vrac de lait cru de vache (n = 491) 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 étudiée expérimentalement dans trois échantillons de lait en vrac sans conservateur et stocké à différentes températures de 4, 6, 5 et 10 °C (Figure 10).

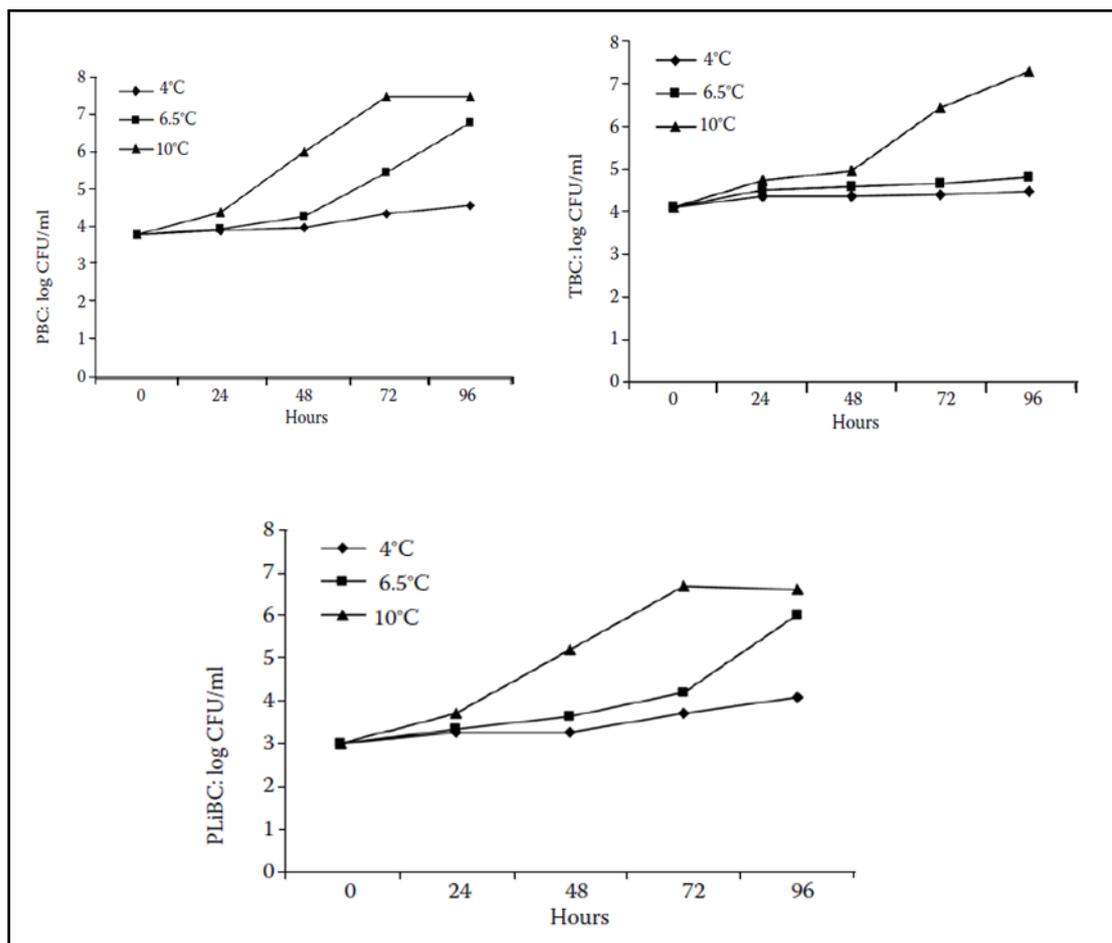


Figure 10. Augmentation de la TBC, PBC et PLiBC liée aux variations de température (les points du graphique représentent les logarithmes moyens des valeurs déterminées dans trois échantillons de lait différents). TBC - nombre total de bactéries PBC - nombre de bactéries psychrotrophes PLiBC - bactéries lipolytiques psychrotrophes (Cempírková et Mikulová 2009).

Perin *et al.* (2012) ont comparés différentes conditions de stockage du lait cru, 20 échantillons de lait cru ont été collectés et des portions de chacun ont été stockées dans des conditions de stockage différentes (4 °C pendant 48 heures, 7 °C pendant 48 heures et 25 °C pendant 4 heures). Les populations aérobies mésophiles et psychrotrophes (totales, lipolytiques et protéolytiques) ont été surveillées et les résultats ont été comparés par analyse de variance (Figure 11).

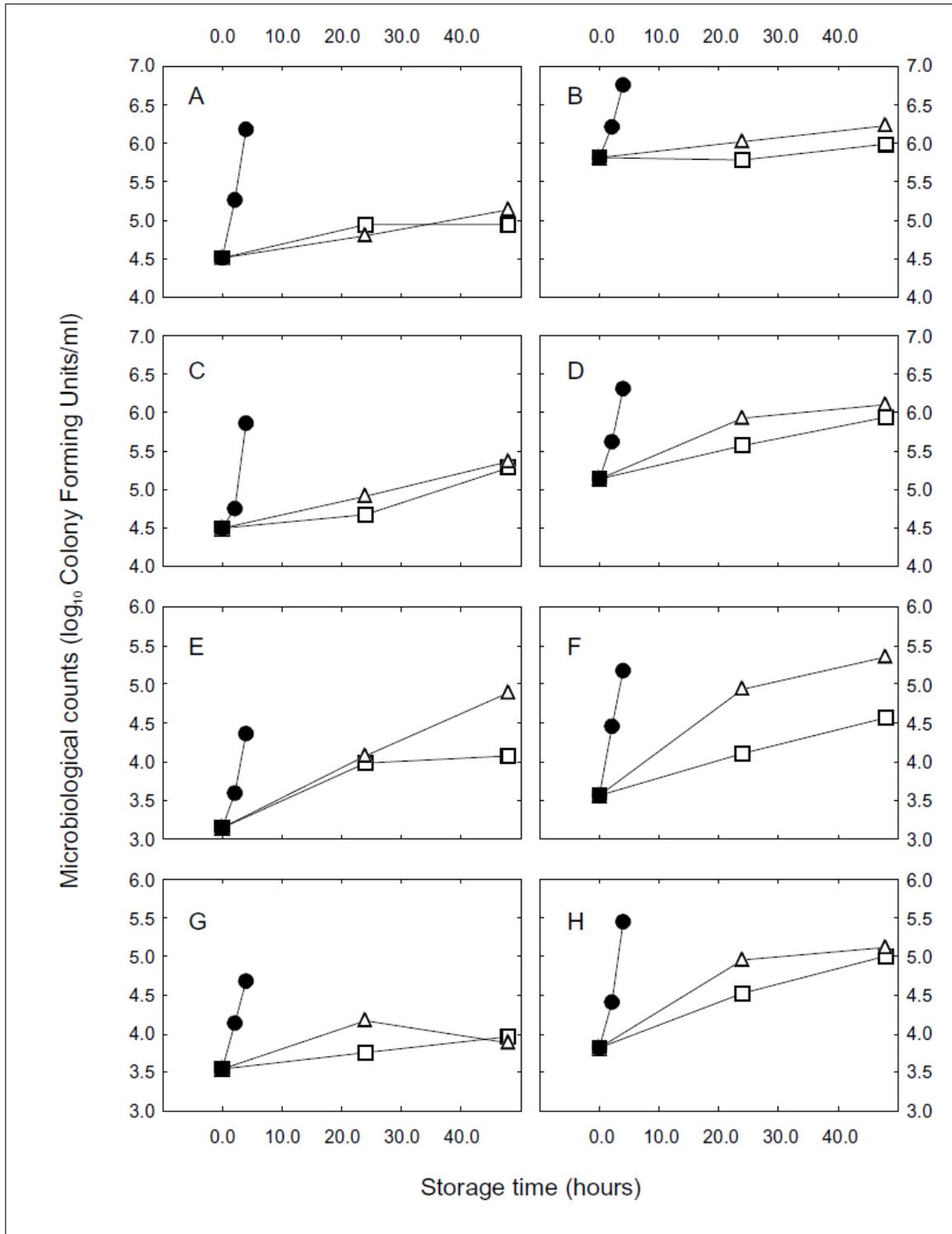
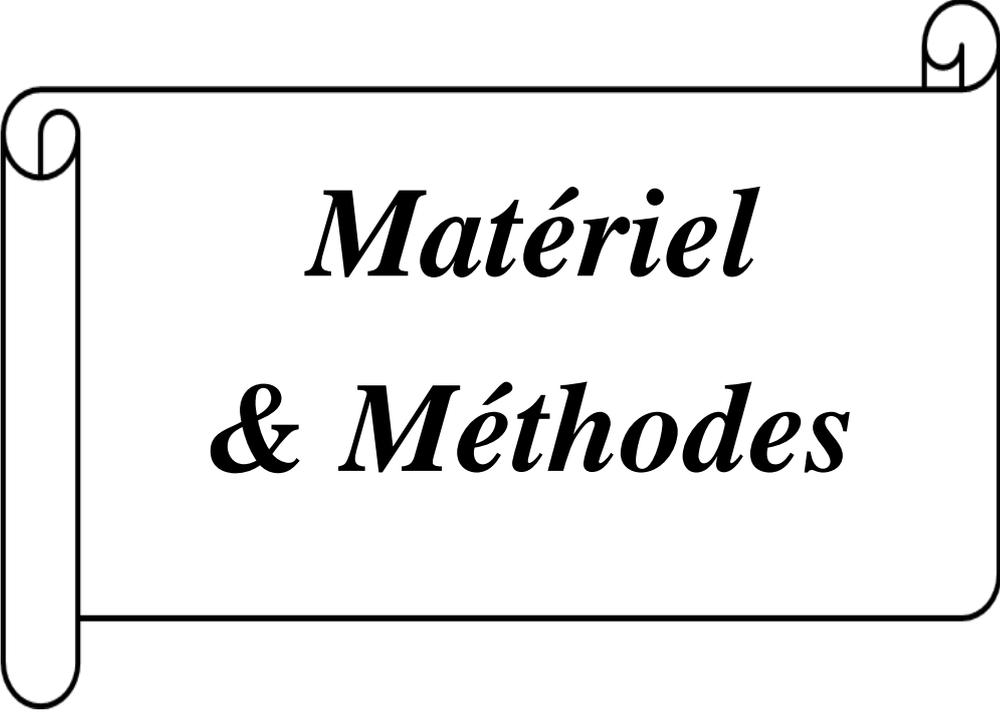


Figure 11. Dénombrements moyens de microorganismes indicateurs d'hygiène sur des échantillons de lait stockés dans différentes conditions (●: 25°C, □: 4°C; △: 7°C). Aérobies mésophiles: graphiques A et B; Psychrotrophics: graphiques C et D; Psychrotrophes lipolytiques: graphiques E et F; Psychrotrophes protéolytiques: graphiques G et H. Les échantillons dont le nombre initial de mésophiles aérobies est inférieur (côté gauche) et supérieur (côté droit) à 5 log UFC / mL (Perin *et al.*, 2012).



Partie II :
Recherche
Expérimentale



***Matériel
& Méthodes***

1. Matériel et Méthodes

L'ensemble des manipulations expérimentales ont été réalisées dans les laboratoires de Biologie du Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf de Mila.

1.1. Préparation de matériel végétal

1.1.1. Présentation de la zone de prélèvement

Le matériel végétal utilisé dans le présent travail est l'*Origanum vulgare*, il comprend comme partie aérienne des tiges et des feuilles, il a été récolté le 20.04.2018 à une température de 19°C ; dans la région de Ain Tin, Mila (Figure 12). Cette dernière est localisée dans une altitude de 666m, une latitude de 36,394539 et une longitude de 6,325700.



Figure 12. *Origanum vulgare* récolté dans la région de Mila à Ain El Tinn.

1.1.2. Séchage

Après la récolte, le matériel végétal a été débarrassé des poussières, avec élimination totale de toutes traces des tiges ou fleurs et seules les feuilles sont gardées.

Les feuilles de l'*Origanum* L. sont laissées à sécher à l'ombre pendant une semaine sur du papier propre à l'air libre, non exposées à l'humidité, sans appliquer un traitement thermique pour minimiser la perte des composants actifs. Les feuilles séchées sont stockées dans des sacs en papier propres jusqu'à utilisation (Figure 13).



Figure 13. Les feuilles de l'*Origanum L.*

1.1.3. Broyage

Les feuilles séchées de la plante ont été broyées à l'aide d'un moulin à café électrique pour l'obtention d'une poudre (Figure 14). La poudre obtenue a été emballée dans du papier propre sellé à l'abri de la lumière et de la chaleur jusqu'à utilisation.



Figure 14. La poudre de l'*Origanum L.*

1.1.4. Préparation de l'extrait aqueux de l'*Origanum L.*

- L'extrait aqueux a été préparé par ajout d'eau distillée stérile chauffée à 40-50°C en utilisant 100g de poudre de *Origanum L.* jusqu'à saturation (650 ml), avec agitation modérée à une vitesse de 50Hz continue pendant 48 heures appelée macération sous agitation.
- L'extrait obtenu a été filtré 2 fois en utilisant le papier filtre standard.
- Le filtrat obtenu a été partagé sur des boîtes de pétri pour accélérer le séchage. Le séchage a pris 15 jours; l'extrait séché a été rassemblé par une spatule et moulu en poudre fine avec un mortier.

Partie II : Recherche Expérimentale

- Ensuite, l'extrait a été pesé et stocké dans un petit récipient de verre fermé hermétiquement, ombré et stockés dans le réfrigérateur à 4 °C jusqu'à utilisation.
- L'extraction est réalisé à partir de 100g de poudre dans 650 mL d'eau distillée stérile, le mélange est filtré 2 fois et donne un rendement de 13% calculé par la règle suivante :

$$R = \frac{\text{masse de l'extrait après évaporation du solvant (g)}}{\text{masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction (g)}} \times 100$$

$$R = \frac{13 \text{ (g)}}{100 \text{ (g)}} \times 100$$

$$R = 13\%$$

Les étapes de la préparation de l'extrait aqueux sont résumées dans la Figure 15.

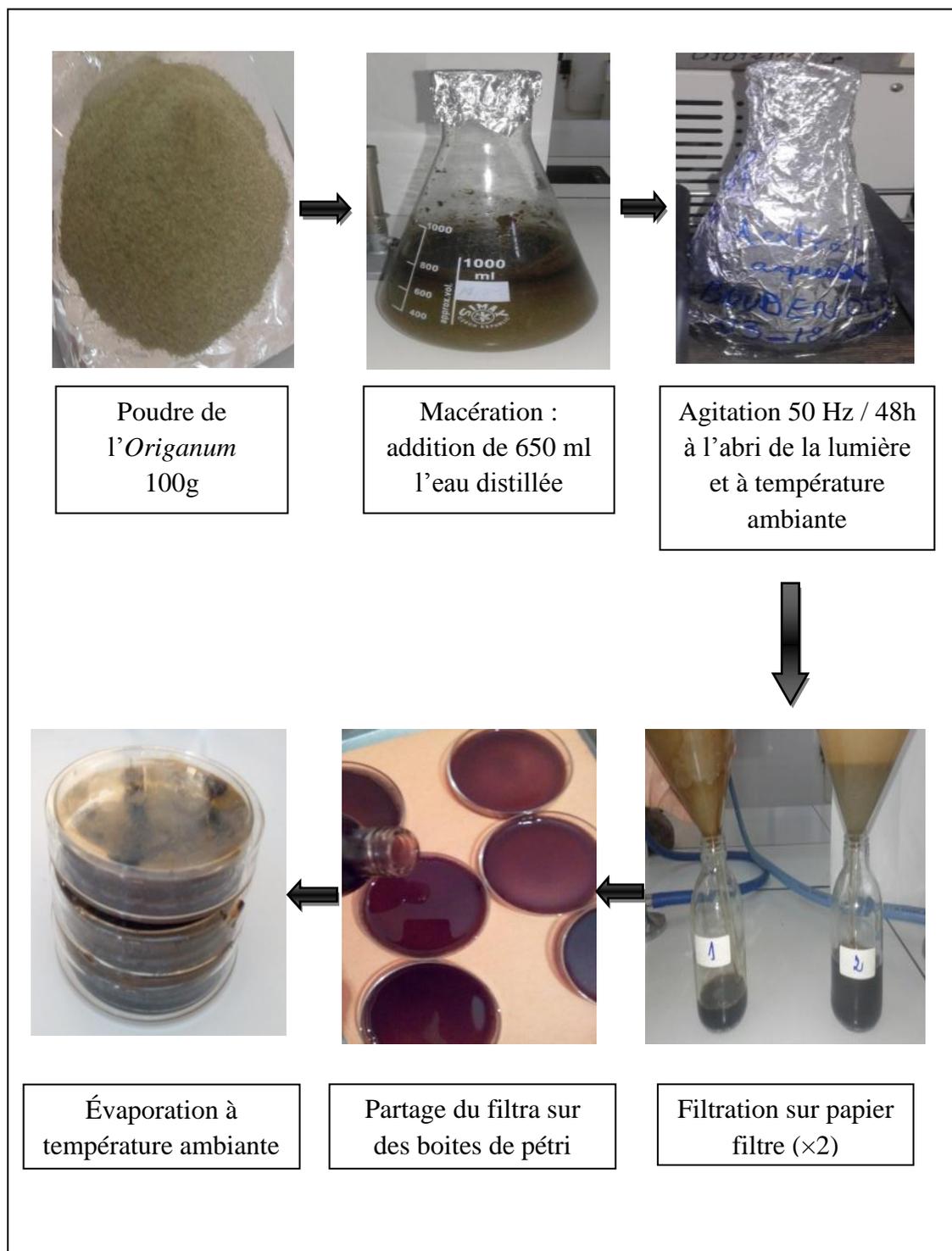


Figure 15. Protocole de préparation de l'extrait aqueux de l'*Origanum L.*

1.1.5. Préparation de la solution mère de l'extrait aqueux

A l'aide d'une balance peser 5g de l'extrait aqueux du l'*Origanum* L. séché et mélanger avec 50 mL (5 g/50 mL) d'eau distillée stérile chauffée à environ 40°C maximum dans un flacon stérile (Figure 16), puis agiter bien le mélange obtenu en utilisant le vortex. Couvrir le récipient par le papier aluminium et le conserver dans le réfrigérateur pour les prochaines utilisations.



Figure 16. La solution mère de l'extrait aqueux de l'*Origanum* L. préparée le 09/01/2019.

Selon les valeurs des CMI (voir Tableau 4, Chapitre 1), nous avons choisis la concentration 5mg/mL comme concentration de la solution mère (100%).

A partir de la concentration de départ (100%), les volumes de l'extrait ajoutés au lait sont calculés comme suit :

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$5g / 50mL^* \times V1 = 5mg/mL^{**} \times 100mL^{***}$$

* Concentration de la solution mère de l'EA

**Concentration de EA recherchée dans le lait.

***Volume réactionnel du lait supplémenté d'EA.

$$\text{Donc } 5000mg/50mL \times V1 = 5mg/mL \times 100mL$$

$$V1 = 5mL \longrightarrow 100\%$$

Ainsi de suite pour : V2, V3, V4.

V2= 3,75 mL → 75%

V3=2,5mL → 50%

V4=1,25mL → 25%.

Les valeurs des volumes ajoutés au lait sont résumées dans le Tableau 11.

Tableau 11: Concentrations, pourcentages et volumes d'EA de l'*Origanum* L. ajoutés au lait.

Concentration de EA dans le lait (mg / mL)	Volume ajouté au lait (mL)	Pourcentage (%)
1	5	100
0.75	3.75	75
0.5	2.5	50
0.25	1.25	25

1.2. Échantillonnage du lait

- **Le site de prélèvement**

Les échantillons de lait cru ont été collectés dans une ferme localisée dans la localité EL Nechem à Grarem Gouga dans la région de Mila présent un climat tempéré chaud. Cette dernière est localisée dans une altitude de 628m, une latitude de 36,572035 et une longitude de 6,341493 (Figure 17).



Figure 17. Site de prélèvement : EL Nechem à Grarem Gouga dans la région de Mila.

- **Description du site d'élevage**

Aération	Une porte et des fenêtres
Eclairage	Présent
Revêtement	Présent
Etat de propreté	Très propre

- **Les vaches laitières**

Race	Bovine laitière hybride « BLH »
Nombre total	13
Origine	Française Pie rouge (5) et Montbéliard Pie Noir (8)
Le type	Des vaches productrices de lait

- **La vache d'étude**

Age	6 années
Etat de santé	Saine
Origine	Pie noir
Fréquence de traité	Une fois par jour, matin ou soir
Quantité de lait par jour	5 litre
Alimentation	Interne : -le son -l'orge -l'avoine -le foin.

	Externe : - Origan. - Feuilles d'olivier. -Hibiscus ; Mauve (Malva Parviflora). -sella.
--	---

- **Prélèvement**

Durant l'échantillonnage, les extrémités des trayons ont été nettoyées en essuyant avec des serviettes en papier sec, les 3 premiers jets ont été éliminés et de 600 mL de lait cru ont été prélevés des quatre mamelles en déplaçant le flacon stérile ombré successivement (Figure 18). Finalement, le flacon est transféré directement à froid au laboratoire à une température de 4°C.



Figure 18. Prélèvement du lait cru.

1.3. Analyses microbiologiques

1.3.1. Préparation du milieu de culture

- **Gélose nutritive**

Relativement simplifiée, la composition de la gélose nutritive apporte les éléments nécessaires à la croissance et à la numération d'une grande variété de germes bactériens non exigeants. Les différentes étapes de la préparation du milieu sont (Figure 19):

- Selon la concentration mentionnée dans le flacon de la gélose en poudre (23 g/l), peser 23g de la poudre.
- 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.



Figure 19. Préparation du milieu de culture.

- **Gélose au sang**

Milieu de base légèrement enrichi (avec du sang de cheval) pour cultiver et isoler un large éventail de bactéries non exigeantes, le mode opératoire est :

-Préparation de la gélose nutritive.

-Chauffer dans le bain Marie jusqu'à ébullition.

-Ajouter le sang de cheval à 5% à la gélose nutritive en surfusion et agiter (gélose au sang cuit).

-Refroidissement jusqu'à 45°C.

-Ajouter 1.8 ml de la solution antibiotique (Cefazoline 20 mg /L) à 180 ml de gélose au sang cuit. L'antibiotique inhibe la croissance d'une catégorie de micro-organismes (sensibles) et permet uniquement la culture de certains genres de micro-organismes (résistants).

- **Gélose de MRS**

Abréviation en microbiologie de la gélose de Man Rogosa et Sharpe, un milieu de culture et 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.

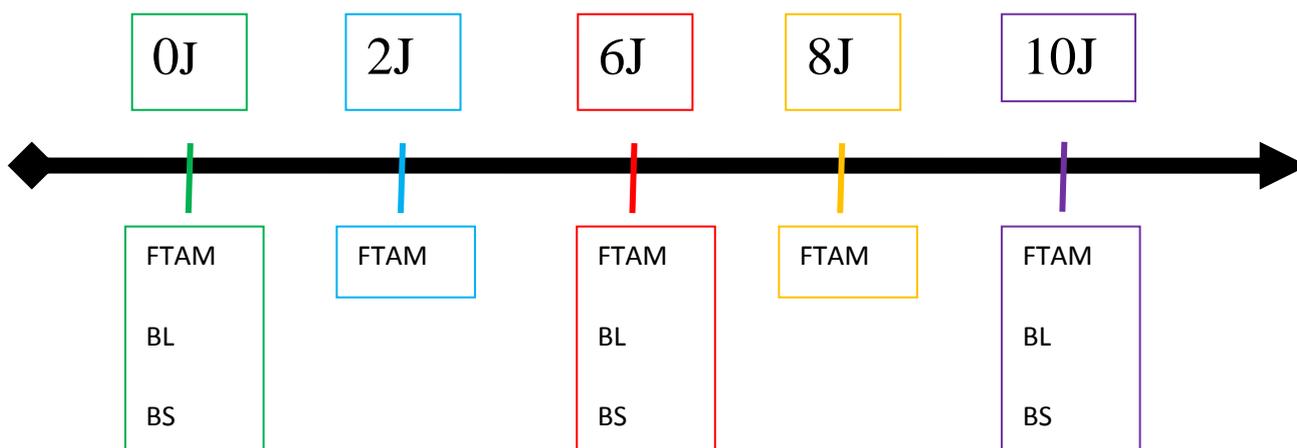
1.3.2. Préparation de l'eau physiologique

L'eau physiologique a été préparée en pesant 9 g de Na Cl dissout dans 1000 ml d'eau distillée puis stériliser (Figure 20).



Figure 20. La préparation de l'eau physiologique.

1.3.3. Suivre de la cinétique de croissance microbienne



FTAM : Flore mésophile aérobie totale

BL : Bactéries lactiques.

BS : Bactéries spécifique

Le 20.01.2019 est le premier jour de l'expérience, l'objectif du travail est de suivre l'évolution de la flore totale du lait additionné d'EA de *Origanum vulgare* et stocké à 4°C à des intervalles de temps réguliers : 0, 2, 6, 8, 10 jours. Les étapes suivantes ont été conduites dans une zone de stérilisation faite de 3 Bec Benzène:

- **Ajout de l'extrait aqueux au lait**

- Mélanger bien le flacon mère de lait cru et répartir 100 ml dans chaque 5 nouveaux flacons stériles identifiés : Témoin 0% et dilutions d'EA 100%, 75%, 50% et 25 %. Flamber le col de chaque flacon par la flamme bleu du bec avant et après l'ajout de lait (Figure 21).



Figure 21. Répartition du lait dans les flacons.

- Les volumes de l'extrait aqueux 5, 3.75, 2.5 et 1.25 ml sont ajoutés par micropipette automatique chargées d'embouts stériles pour obtenir les dilutions 100%, 75%, 50%, 25 % respectivement (Figure 22).



Figure 22. Ajout de l'extrait aqueux au lait.

- **Préparation des séries de dilutions**

- Utiliser une série de dilution de 10^{-1} à 10^{-6} pour chaque échantillon à analyser (Figure 23).
- Mélanger d'abord tendrement le flacon de lait, prélever 1 ml, ajouter à la première dilution 10^{-1} et homogénéiser quelques secondes au vortex.
- Prendre 1ml de la dilution 10^{-1} , ajouter à la 10^{-2} et refaire les mêmes actions jusqu'à la dilution 10^{-6} .



Figure 23. Préparation des séries de dilutions.

- **Culture**

- **Flore Mésophile Aérobie Totale (FTAM)**

- Préparer et identifier une série de répétitions de 03 boîtes de Pétri pour chaque série de dilution c'est-à-dire 18 boîtes au total, coder soigneusement et clairement les boîtes pour chaque dilution.
- Prélever 1 ml de la dilution et déposer au centre de la boîte, ensuite couler tendrement la gélose (refroidie à 45 °C) en masse, un flacon de gélose peut couler jusqu'à 13 boîtes de pétri. Eviter 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 à l'étuve pendant 48 h à 37°C.
- Refaire les mêmes actions à chaque intervalle d'analyse.

➤ Bactéries Lactiques

- Préparer et identifier une série de 03 boîtes de Pétri seulement pour la dilution 10^{-1} c'est-à-dire 3 boîtes au total, coder soigneusement et clairement les boîtes.
- Prélever 1 ml de la dilution 10^{-1} et déposer au centre de la boîte, ensuite couler tendrement la 1^{ère} couche de gélose en masse, attendre quelques minutes puis couler la 2^{ème} (ensemencement en double couches)
- 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 à l'étuve pendant 48 h à 37°C.

➤ Bactéries spécifiques

- Couler tendrement la gélose au sang additionnée d'antibiotique dans les boîtes de pétri.
- Prélever 0.1 ml de la dilution de lait cru et étaler en surface avec râteau.
- Laisser refroidir à température ambiante pour solidifier et fixer l'inoculum (environ 15 min).
- Incuber à l'étuve pendant 48 h à 37°C.
- Identification phénotypique (macroscopique et microscopique) des isolats bactériens.

• Suivi le pH

On mesure le pH à chaque intervalle de temps (48h) (Figure 24).



Figure 24. Suivi du pH pendant 10 jours.

- **Dénombrement**

Le nombre de dilutions à réaliser dépend de la concentration cellulaire de l'échantillon de départ. Le nombre de colonies comptées dans une boîte de pétri doit être compris entre 30 et 300 UFC/mL (Figure 25).



Figure 25. Dénombrement des bactéries psychrotrophes.

1.3.4. Contrôle microbiologique de la solution mère de l'EA de l'*Origanum L.*

Pour contrôler la contamination de la solution mère EA, une série de dilution de 10^{-1} à 10^{-5} est préparée (Figure 26), ensemencer en masse sur gélose nutritive puis incubée 48h à 37°C .

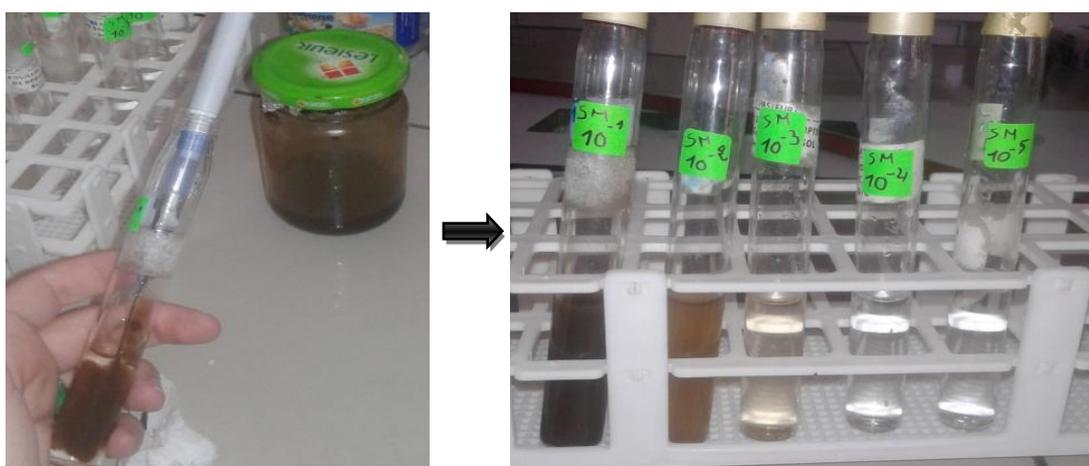


Figure 26. Contrôle microbiologique de la contamination de la solution mère d'EA.

1.4. Observations microscopiques

1.4.1. Préparation du frottis

1. Déposer une petite goutte d'eau sur une lame.
2. Flamber l'anse de platine dans la flamme du bec benzène.
3. Laisser refroidir quelques secondes (10s), en restant près de la flamme.
4. Prélever un minuscule fragment d'une colonie isolée, couvercle entrouvert et rester à proximité de la flamme.
5. Etaler le prélèvement à la surface de la lame en le dispersant dans la goutte d'eau.
Attention: flamber l'anse avant de la redéposer.
6. Laisser sécher (complètement) à l'air
7. Fixer les bactéries sur la lame en passant celle-ci rapidement dans la flamme, 3 fois.
Laisser refroidir quelques secondes après chaque passage.

1.4.2. Coloration de Gram

1. Couvrir le frottis bactérien par la solution de violet de gentiane (colorant Primaire).
2. L'excès de violet est jeté après une minute d'action (60 s).
3. Rincer avec un mince filet d'eau ; faire tomber l'eau un peu au-dessus du frottis et non directement dessus.
4. Recouvrir le frottis avec du lugol puis jeter le après quelque secondes (1 minutes).
5. Répéter ou fois jusqu' à que la pellicule mordorée n'apparais plus.
6. Décolorer la lame a l'alcool absolu goutte à goutte, en l'inclinant au-dessus de l'évier, jusqu' à que l alcool n ait plus d'action décolorante.
7. Laver à l'eau de robinet.
8. Recolorer a la fushine pendant une minute.
9. Laver à l'eau.
10. Sécher au buvard ou à l'air.
11. Observer la lame à l'huile à immersion (g : x 100).

1.5. Purification des colonies

La purification des colonies est essentielle pour caractériser une espèce individuellement. Un mélange de cellules est étalé à la surface de la gélose de sorte que chaque cellule se développe en une colonie isolée. Ces colonies isolées permettent une croissance macroscopique où visuellement un amas de micro-organismes peut être observé (Figure 28).

Après avoir prélevé aseptiquement un échantillon (près d'un bec benzène, avec une pipette pasteur stérile)

- Effectuer une série de 4 stries en évitant de passer deux fois au même endroit.

-Refermer.

-Flamber pipette pasteur.

- Effectuer une 2^{ème} série de 4 stries ; en évitant de passer deux fois au même endroit.

- Refermer.

-Flamber pipette pasteur.

- Effectuer une 3^{ème} série de 4 stries.

-Refermer.

-Incuber.

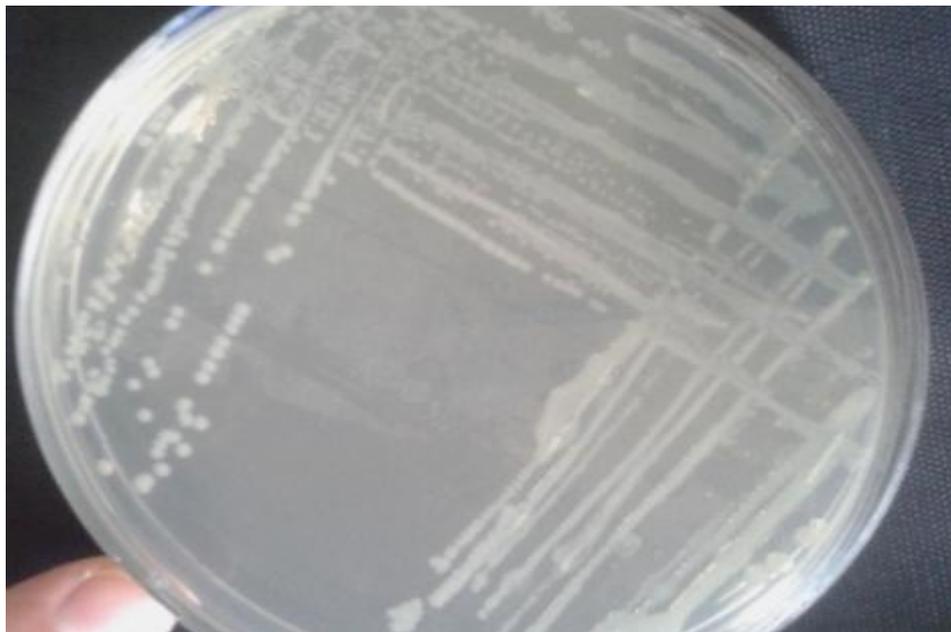


Figure 28. Purification des souches bactériennes.

1.6. Tests enzymatiques

➤ Catalase

- Placer une goutte de H_2O_2 sur une lame de verre.
- Avec une anse de platine, prélever des fragments bactériens et disperser dans le H_2O_2 .
- Observer immédiatement le dégagement de bulles d' O_2 pour une réaction positive (Figure 29).

Les bactéries possédant l'enzyme catalase peuvent transformer le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 (toxique), en H_2O et O_2 , lequel est dégagé sous forme de gaz et entraîne la formation de bulles. On les dit que la souche est « catalase + ».



Figure 29. Test de la catalase



***Résultats &
Discussion***

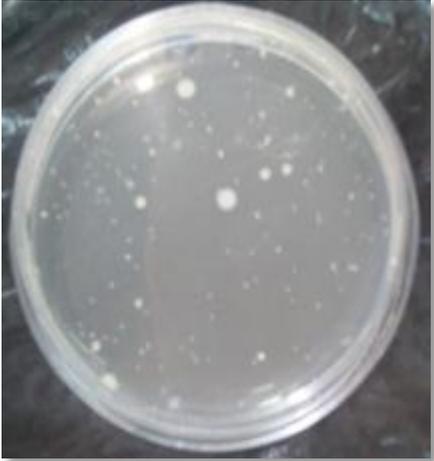
2. Résultats et Discussions

2.1. Résultats

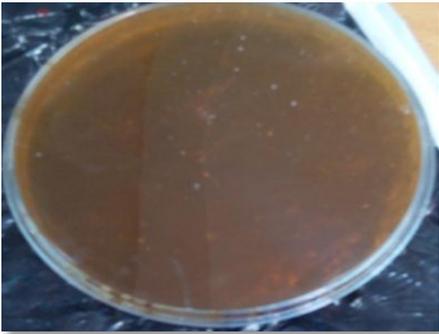
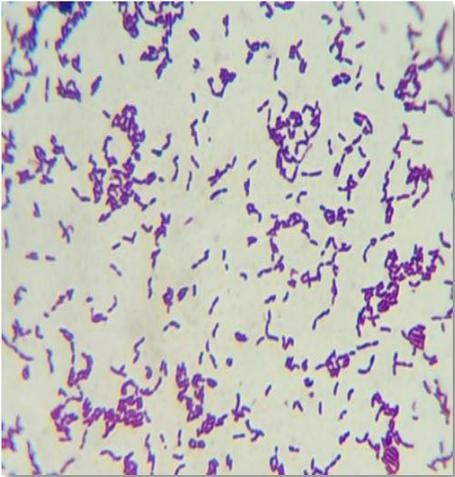
2.1.1. Culture bactérienne

Il est à rappeler que l'objectif de cette étude est le dénombrement de la flore totale se développant à froid dans le lait en présence et en absence d'extrait de plantes. Le total des échantillons de laits crus analysés donnent des cultures bactériennes positives sur gélose nutritive. L'ensemble des caractéristiques culturelles des bactéries sont décrits dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Description macroscopique et microscopique des bactéries lactiques

Flore totale aérobie mésophile sur gélose nutritive	 A photograph of a petri dish containing a nutrient agar plate. The agar surface is covered with numerous small, white, circular bacterial colonies of varying sizes, scattered across the surface.	Aspect macroscopique des colonies sur gélose nutritive. Les colonies sont de tailles différentes de 1 à 3 mm. La plupart des colonies apparaissent blanches et rondes à contour régulier (Photo réalisée au Département de Biologie au C.U de Mila).
--	---	---

Aussi, l'ensemble des caractéristiques morphologiques des bactéries lactiques se développant sur milieu M.R.S, sont regroupées dans le Tableau 12 avec une description macroscopique et microscopique :

<p>Lactobacillus sur M.R.S</p>		<p>Aspect macroscopique des colonies de Lactobacillus sur M.R.S. Les colonies sont de tailles et moyenne (1 à 2 mm) (Photo réalisée au Département de Biologie au C.U de Mila).</p>
<p>Lactobacillus : coloration de Gram</p>		<p>Les colonies sont observées par coloration de Gram au grossissement x100 à l'huile d'immersion. Les cellules sont des coccobacilles longs à Gram positif, isolés, ou associées en diplo ou en chaînettes. (Photo réalisée au Département de Biologie au C.U de Mila).</p>

2.1.2. Contrôle du pH

Les valeurs de pH obtenues sont mesurées à chaque intervalle de temps (48h), pour l'échantillon mère de lait (sans addition), l'ensemble des résultats sont résumés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Les variations du pH pendant l'expérience.

Jours	0	2	6	8	10
pH	7.27	7.23	7.19	7.13	7.23

Les valeurs de pH sont transformées en courbe (Figure 30).

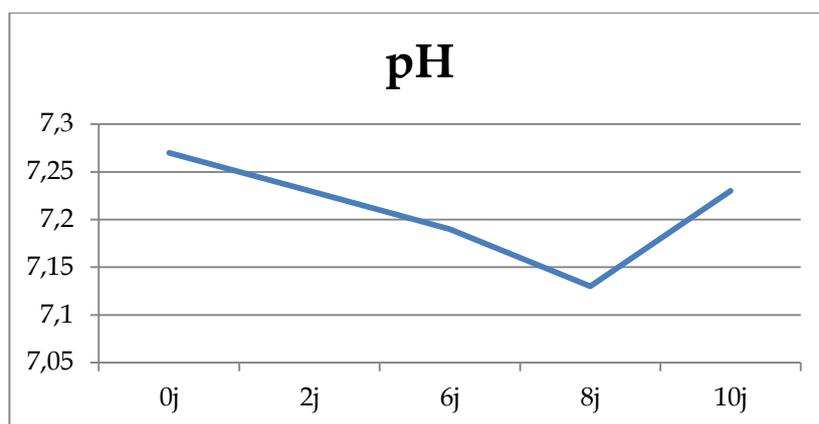


Figure 30. Les variations du pH durant 10 jours de réfrigération du lait.

2.1.3. Contrôle de la présence microbienne dans l'extrait aqueux

On observe la présence des colonies dans la dilution 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} alors que les boîtes de la dilution 10^{-1} et 10^{-2} ne manifestent pas de croissance microbienne (culture microbienne est négative) (Figure 31). On peut dire que plus que la dilution diminue plus que la croissance microbienne augmente. La flore microbienne saprophyte de plante pourrait être à l'origine de ce développement microbien.

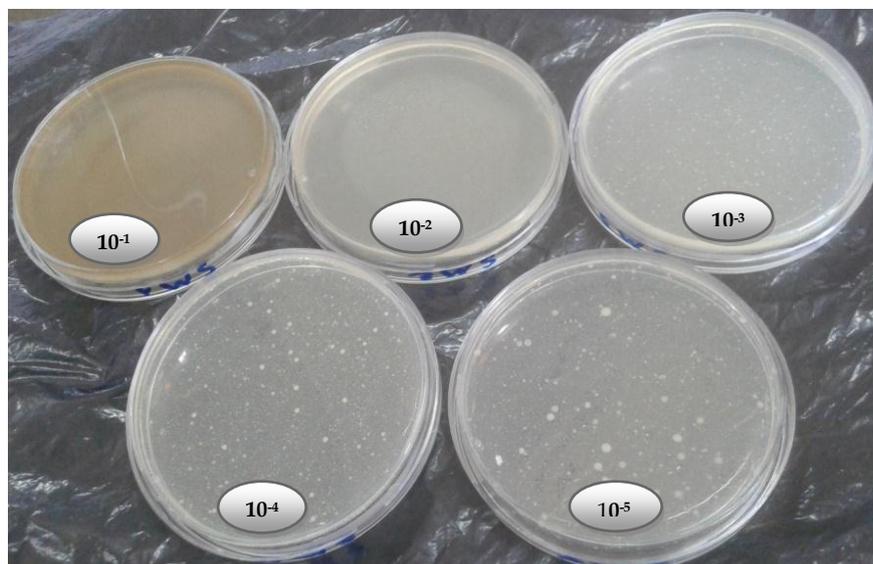


Figure 31. Contrôle microbien de l'EA.

2.1.4. Evolution de la croissance microbienne

L'évolution de la dynamique de croissance microbienne de la flore totale et des bactéries lactiques du lait conservé à 4°C a été suivie durant 10 jours, avec l'addition de différentes

concentrations d'extrait aqueux d'*Origanum vulgare*. Les prélèvements ont été réalisés à différents intervalles de temps réguliers (0, 2, 4, 6, 8 et 10 jours) ou la flore totale a été dénombrée. Pratiquement, à cause des conditions météorologiques les prélèvements ont été conduits de la manière suivante : 0, 2, 6, 8 et 10 jours. Alors que les bactéries lactiques et les bactéries spécifiques sont dénombrées aux intervalles 0, 6, 10 jours.

Les valeurs obtenues sont calculées par les moyennes de trois répétitions du dénombrement.

Les résultats de la dynamique de croissance microbienne en Log UFC . mL⁻¹ de la flore totale du lait sont présentés dans la Figure 32.

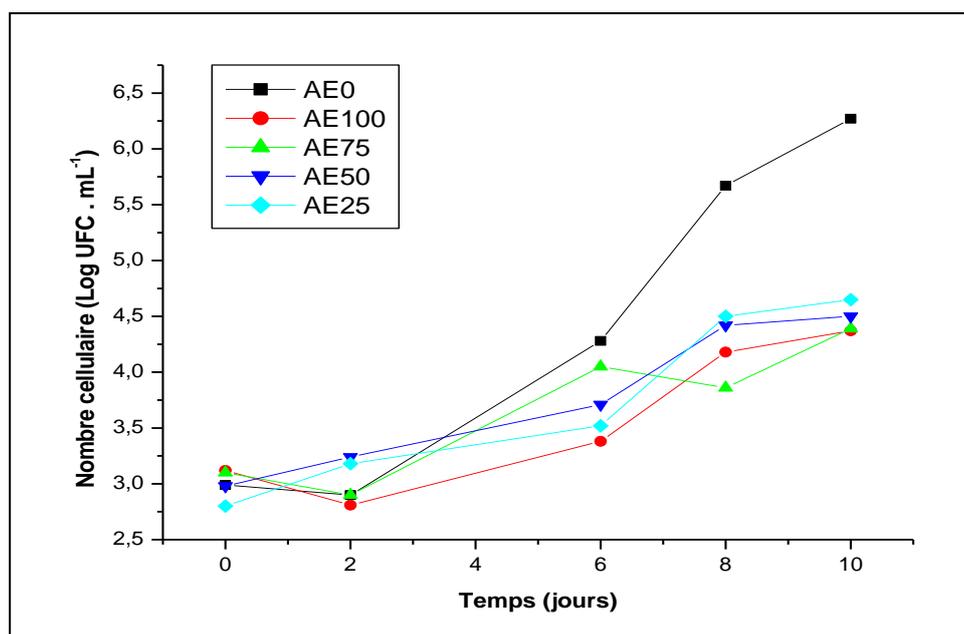


Figure 32. L'évolution de la croissance microbienne du lait réfrigéré.

2.1.5. Détermination des paramètres cinétiques de la croissance microbienne

Tableau 14: Les valeurs des paramètres de croissance microbiennes de la flore totale de lait.

%EA	X max	μ_{max}	G
0	6.297	0.712	4.128
100	4.526	0.254	4.0252
75	4.457	0.183	1.933
50	4.457	0.183	1.933
25	4.65	0.541	5.0489

X max : Niveau maximal de croissance (Log UFC.mL⁻¹)

μ_{max} : Vitesse maximale de croissance (Δ Log UFC.mL⁻¹*jour)

G : Temps de génération (Jours) = 1/ μ_{max}

Les résultats des paramètres cinétiques de croissance sont transformés en histogrammes (Figure 33).

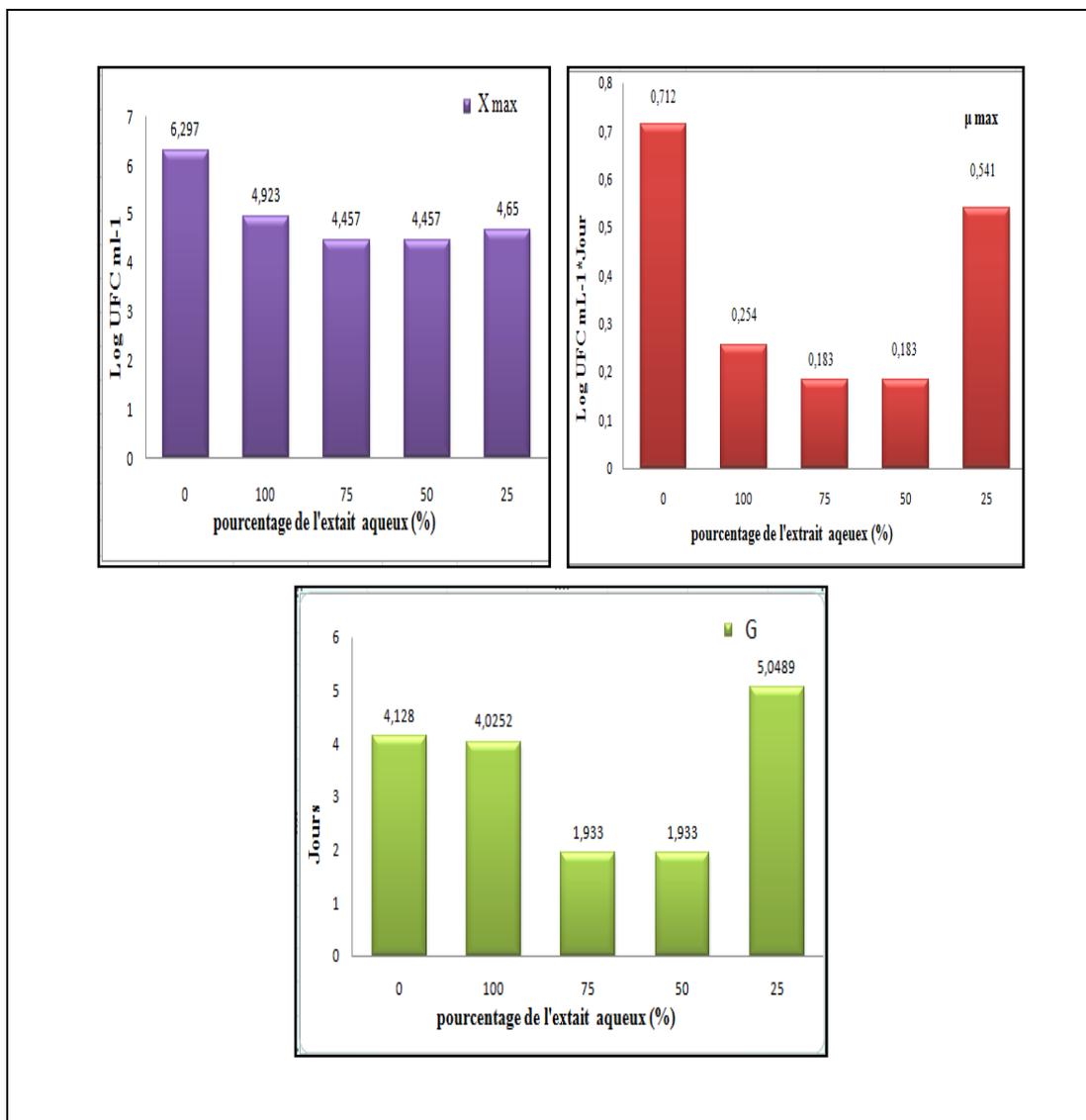


Figure 33. Effet de l'ajout de l'extrait aqueux sur les paramètres de croissance microbienne : la croissance maximale (X_{max}), la vitesse maximale de croissance (μ_{max}) et le temps de générations (G).

La concentration 25% d'EA a donné le temps de génération le plus long (5.04 jours) avec un niveau maximal (X_{max}) faible de 4,65 Log UFC. mL⁻¹ par rapport au témoin (6,29 Log UFC. mL⁻¹).

Donc la durée de vie du lait est nettement améliorée par l'ajout d'EA à 25% par rapport aux autres concentrations et au témoin.

La corrélation entre les concentrations de l'extrait aqueux et la croissance microbienne maximale (X max) est montrée dans la Figure 34.

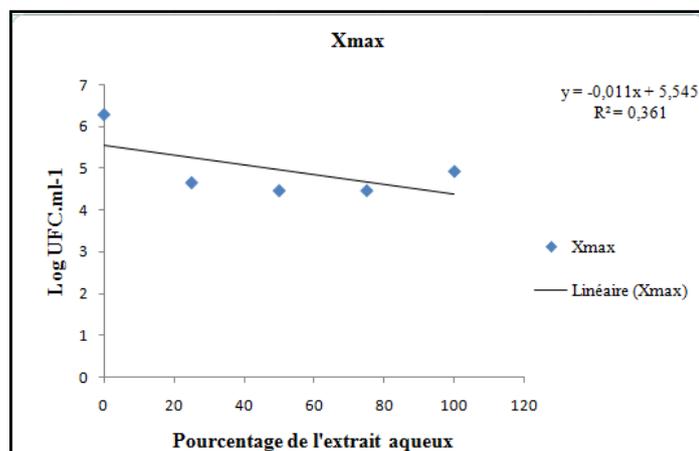


Figure 34. Régression linéaire de la corrélation entre les concentrations de l'EA et la croissance microbienne maximale (X max).

Il est noté que la régression linéaire de la corrélation entre les concentrations de l'extrait aqueux d'*Origanum* L. et les niveaux de croissance maximales ne sont pas favorablement linéaires avec une valeur de R^2 de 0,361.

2.2. Discussion

A notre connaissance, il y'a peu d'études sur la dynamique de la croissance microbienne du lait à froid, et encore sur l'effet de l'addition d'extrait de plantes sur la dynamique de croissance microbienne.

La charge microbienne initiale du lait analysé était faible (Figure 32), et inférieure à la limite d'hygiène pour les bactéries psychrotrophes dans le lait (50000 UFC. mL⁻¹) cela reflète les bonnes pratiques d'élevage agricoles, le bon statut de santé et d'environnement hygiénique des vaches laitières (Cempirkova 2007 ; Hantsis-Zacharov et Halpern 2007).

Les produits végétaux sont également utilisés depuis l'antiquité pour aromatiser des aliments, des boissons et à des fins médicinales avec plus ou moins de succès pour guérir et prévenir les maladies. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont confirmés l'efficacité des produits végétaux (Butkhop *et al.*, 2010; Negi *et al.*, 2010 ;

Tornuk *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2012 ; Bhatt et Negi 2012) et des milliers de composés ont été isolés à partir de ces plantes, qui sont revendiqués avoir des propriétés antimicrobiennes ou médicinales. L'utilisation d'extraits de plantes dont les propriétés antimicrobiennes sont connues peut avoir une grande importance pour la conservation des aliments (Edeoga *et al.*, 2005).

Les activités antimicrobiennes des extraits de plantes peuvent résider dans variété de composants différents tels que les flavonoids, les terpenoids, les phenolics, les catachol, les steroids, terpenoids, tannins. Plusieurs extraits en raison de leurs constituants phytochimiques ont montrés une activité antimicrobienne (Negi 2012). Parmi ces plantes, l'Origan qui est connue pour leur richesse en divers agents biologiquement actifs tels que les composés phénoliques exercent une propriété antimicrobienne en provoquant une inhibition enzymatique (Negi 2012 ; Siddteeqh *et al.*, 2016), le carvacrol et thymol ont des propriétés antiseptiques, car ils perturbent la membrane bactérienne par la liaisons aux protéines membranaires (Carson *et al.*, 2002), les flavonoïdes permettent le retard ou l'inhibition de l'initiation ou de la propagation des réactions en chaîne oxydantes (Majeed *et al.*, 2016).

D'autres études ont démontrés que la durée de vie et la qualité de la viande peuvent être améliorées par les antioxydants naturels ajoutés dans le pré et post-abattage. C'est-à-dire l'incorporant des antioxydants naturels dans les régimes animaux, sur la surface de la viande, ou emballage actif. Certains auteurs ont rapporté l'efficacité des extraits de Romarin et d'Origan pour réduire l'oxydation des lipides (Fasseas *et al.*, 2007; Camo *et al.*, 2008), perte de couleur et croissance microbienne dans certains types de viandes (Camo *et al.*, 2008; Zinoviadou *et al.*, 2009).

Concernant la dynamique de la croissance microbienne de la flore totale du lait, après l'ajout de différentes concentrations de l'extrait aqueux d'*Origanum* L. dans le lait cru réfrigéré à 4°C (Figure 35), on observe l'allongement de la phase de latence (le temps de génération 5.04 jours).

Boubendir et al.(2016) à Biskra en Algérie, ont trouvé un temps de génération plus long allant de 6,74 à 10,50 jours. Cette différence entre résultatssuggère l'effet des climats des régions d'étude. La région de Mila est située proche de lazone tempéré chaud et celle de Biskra dans le climat semi-aride, à ceci s'ajoute ladifférence des plantes aromatiques pâturées dans la région semi-aride et qui possèdent enmajorité des activités

antimicrobiennes confirmées, tel que *Malva sylvestris*, *Cyanodondactylon*, *Atriplex* spp., *Tamarix* spp et *Cyperus conglomeratus* (Bouaziz *et al.*, 2009; Chaudhari *et al.*, 2011; Razavi *et al.*, 2011; Abd El Raheim 2013). Ainsi les concentrations maximales de croissance microbiennes $4,65 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ est inférieures à celles rapportés par cette étude $5,25 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$.

Par contre Vithanage *et al.* (2016) à Victoria en Australie, ont trouvés une durée plus courte de la phase latence comprise entre 3 et 4 jours et les valeurs de X max entre 5,5 à $7 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$. Cempírková et Mikulová (2009) en République Tchèque et Perin *et al.* (2012) ont trouvés les valeurs de concentration microbienne (X max) : $4,5 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$, $5,30$ à $5,74 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ et des temps de génération de 48h et 15h respectivement.

Cela confirme que les extraits des plantes ont un effet de retardement de la croissance microbienne. L'extrait aqueux d'*O. vulgare* a montré la plus forte activité antibactérienne ce qui est en corrélation avec le contenu total élevé en phénols (Chaudry *et al.*, 2007 ; Licina *et al.*, 2013). Licina *et al.* (2013) ont trouvés que parmi les extraits testés d'*Origanum* L, l'extrait aqueux a montré le plus grand effet inhibiteur contre les bactéries testées.

Concernant la régression linéaire de la corrélation entre la concentration d'EA et le niveau de la croissance microbienne finale (Figure 34). L'inhibition de l'enzyme par un excès de substrat, l'inhibition du substrat, est l'un des écarts courants par rapport à la cinétique de Michaelis-Menten et signifie que la courbe de vitesse d'une réaction augmente au maximum à mesure que la concentration du substrat augmente, puis descend à zéro (inhibition complète), ou à une asymptote non nulle (inhibition partielle). L'inhibition du substrat est un phénomène extrêmement répandu dans la cinétique des enzymes et joue un rôle régulateur crucial dans un certain nombre de voies métaboliques. L'explication la plus simple de l'inhibition du substrat implique la liaison de deux molécules de substrat à l'enzyme au niveau des sites actifs et des sites inhibiteurs non catalytiques (Reed *et al.*, 2010; Yoshino et Murakami 2015).

L'effet antibactérien des composés phénoliques mobilise différent mécanismes : actions sur la membrane cellulaire et inhibition des enzymes microbiennes (Akiyama *et al.*, 2001; Rodriguez-Vaquero *et al.*, 2007).

Qu'il s'agit de bactérie Gram positive ou Gram négative, la membrane cytoplasmique bactérienne présente la même sensibilité aux composés phénoliques (Freney *et al.*, 1995). Les polyphénols pénètrent dans la cellule bactérienne et inactivent les perméases du

périplasma qui sont impliquées dans le transport des aminoacides et des polysaccharides. Cela entraîne une modification de la perméabilité cellulaire, avec une lyse de la cellule bactérienne suivi par une perte de ses constituants (Leinmüller *et al.*, 1991; Lojkowska et Holubovska 1992).

L'inhibition de l'activité enzymatique résulte de deux phénomènes, simultanés ou non. Les composés phénoliques liés aux molécules substrats rendent ces dernières moins accessibles aux enzymes en les insolubilisant ou en masquant les sites de reconnaissance enzyme-substrat. Les tannins liés aux enzymes inhibent leur activité directement par précipitation de la protéine enzymatique et en se fixant sur les sites actifs (déréconnaissance de substrat), indirectement par encombrement stérique et par la formation d'un complexe (enzyme - substrat- inhibiteur) inactif (Leinmüller *et al.*, 1991).

En conclusion, la meilleure concentration choisie de l'extrait aqueux d'*Origanum L.* ajouté au lait est de 25% surtout à cause du temps de génération allongée et du niveau de croissance bas enregistrés.



***Conclusion &
perspectives***

Conclusion et perspectives

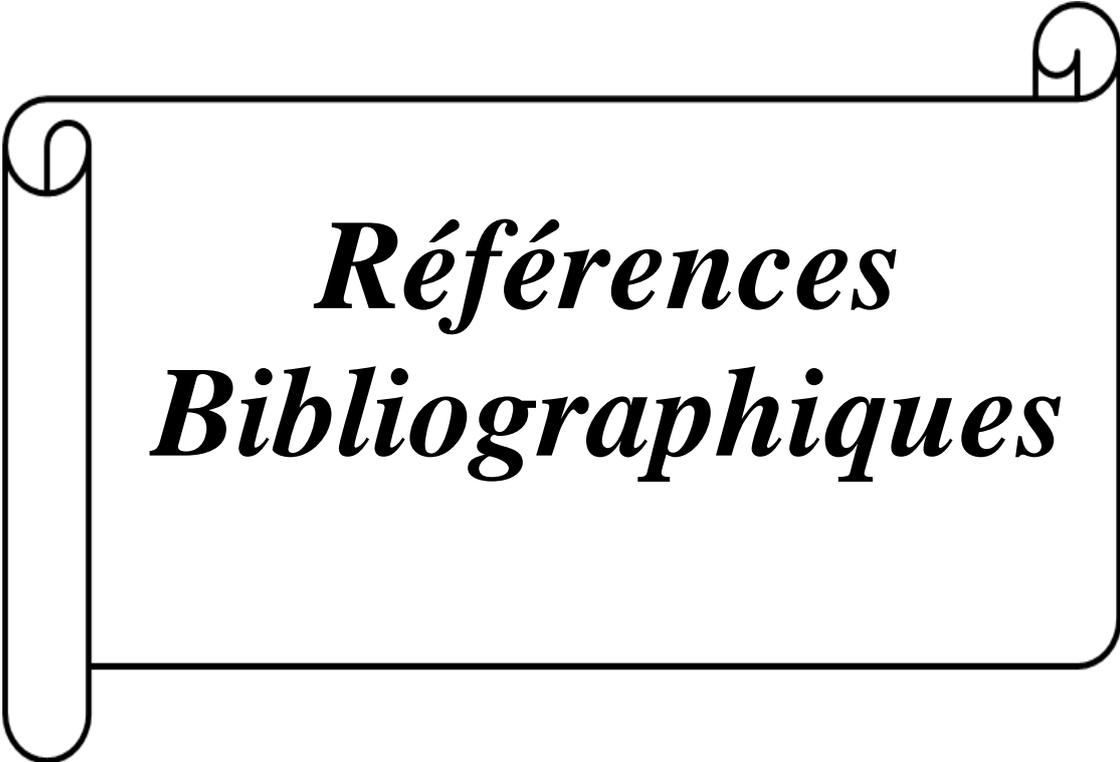
La meilleure concentration de l'extrait aqueux d'*Origanum* L. ajouté au lait est de 25% surtout à cause du temps de génération allongée et du niveau de croissance bas enregistrés.

L'extrait aqueux est de composition complexe et hétérogène, ses composants pourraient exercer une activité antimicrobienne individuelle ou combinée (synergie).

Vue la présence microbienne d'origine saprophyte remarquée dans l'EA, il est recommander en perspective de le stériliser.

Il est intéressant dans le futur de tester la qualité sensorielle du produit fini, pour voire l'influence de l'addition d'EA sur l'acceptabilité par le consommateur.

Aussi, une exploration de la composition phytochimique qualitative et quantitative de l'extrait de plante est envisagée.



***Références
Bibliographiques***

Références

A

Abd El Raheim M.D. (2013). Phytochemical content and antibacterial activity of *Atriplex nummularia* extracts. *Int J Biol Pharm Allied Sci (IJBPAS)* 2 (6):1260–1269.

Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Ooni T., Iwatsuki K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 487-491.

Alkam T., Nitta A., Mizoguchi H., Itoh A., Nabeshima T. (2007) A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A β 25–35. *Behavioural brain research*. 2007 Jun 18;180(2):139-45.

Alain B., Richer M. M ., Roustel S.(2007). *Coordination Microbiochimie et alimentation* . p75 .

Arcila-Lozano C.C., Loarca-Piña G., Lecona-Urbe S., González de Mejía E. (2004) *Oregano: properties, composition and biological activity*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 54:100-111.

Augustin J.C. (2005). *Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments*

Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. (1992). *Bactériologie clinique*. 2ème édition. Paris.

Avril J. M., Dabernat H., Monteil D. H. (2000). *Bactériologie clinique*. 3ème Ed. Ed Ellepses. Paris. 602.

B

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.* 46:446- 475.

Bampidis, V.A., Christodoulou V., Florou-Paneri P., Christaki E., Spais A.B., Chatzopoulou P.S. (2005). Effect of dietary dried *Oregano* leaves supplementation on

performance and carcass characteristics of growing lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 121:285–295.

Barbano D.M., Ma Y., Santos M.V. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science*, 89, E15–E19.

Başer K.H.C., Buchbauer G. (2010). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*, CRC Pres, Boca Raton, London, New York.

Baur C., Krewinkel M., Kranz B., von Neubeck M., Wenning M., Scherer S., et al. (2015). Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 49, 23–29.

Beena A.K., Ranjini A.R., Riya T.G. (2011). Isolation of Psychrotrophic multiple drug resistant *Pseudomonas* from Pasteurised milk. *Veterinary World* 4, 349-352.

Ben A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P. (2006) Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* 43 (2): 149 - 54.

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 (1): e16424.

Berger S. (2015). *Gideon Guide to Medically Important Bacteria*.

Berry D.P., O'Brien B., O'Callaghan E.J., Sullivan K.O., Meaney W.J. (2006). Temporal trends in bulk tank somatic cell count and total bacterial count in Irish dairy herds during the past decade. *Journal of Dairy Science*, 89, 4083–4093.

Bertazzoni Minelli E., Benini A., Marzotto M., Sbarbati A., Ruzzenente O., Ferrario R., et al. (2004). Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *Int. Dairy J.* 14, 723–736

Bhatt P., Negi P.S. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of indian borage (*Plectranthus amboinicus*) leaf extracts. *Food and Nutrition Sciences*. 3, 146–152.

Bland, E. (2007): Some like it hot: The benefits of fiery food. *The New Scientist*, 196, pp. 46–47.

Bornert G. (2000). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Rev Méd. Vét.*, 151(11):1003-1010.

Bouaziz M., Dhouib A., Loukil S., Boukhris M., Sayadi S. (2009). Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *Afr J Biotechnol* 8(24):7017–7027.

Boubendir A., Serrazanetti D.I., Hamidechi M.A., Vannini L., Guerzoni M.E. (2016). Changes in bacterial populations in refrigerated raw milk collected from a semi-arid area of Algeria. *Ann. Microbiol.* 66, 777–783.

Buchanan R.E. (1918). Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* 98, 1271-1273.

Buchanan R.L., Cygnarowicz M.L. (1990). A mathematical approach toward defining and calculating on the duration of the lag phase. *Food Microbiol.* 7, 237-240.

Butkhup L., Chowtivannakul S., Gaensakoo R., Prathepha P., Samappito S. (2010). Study of the phenolic composition of shiraz red grape cultivar (*Vitis vinifera*L.) cultivated in North-Eastern Thailand and its antioxidant and antimicrobial activity. *South African Journal of Enology and Viticulture.* 31, 89–98.

C

Calsamiglia S., Busquet M., Cardoso P.W., Castillejos L., Ferret A. (2007). Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:2580- 2595.

Camo J., Beltrán J.A., Roncalés P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science* 80:1086-1091.

Carson C.F., Mee B.J. & Riley T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1914-1920.

Catania F.S., Inay OM., Silva A.S., Pereira J.R., Tamanini R., Beloti V., et al. (2012). Refrigerated raw milk quality of a processing plant in the north of Parana after the implementation of changes imposed by NI 62 of 2011. *Semina* 33, 3171–3180.

Cempírková R. (2007). Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors. *Czech Journal of Animal Science*, 52, 387–393 .

Chalchat J.C., Pasquier B. (1998). Morphological and chemical studies of *Origanum* clones: *Origanum Vulgare* L. ssp. *Vulgare*. *Journal of Essential Oil Research*. 1998 Mar 1;10(2):119-25.

Chattopadhyay M.K. (2006). Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *J Biosci* 31:157-165.

Chaudry N. M. A., Saeed S., Tariq P. (2007). Antibacterial effects of *Oregano* (*Origanum Vulgare*) against gram negative bacilli. *Pakistan Journal of Botany*, 39, 609e613.

Chaves A.V., Stanford K., Gibson L.L., McAllister T.A., Benchaar C. (2008). Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:396-408.

Chishti S., Kaloo Z.A., Sultan P., (2013). Medicinal importance of genus *Origanum*: a review. *J.Pharmacogn.Phytother.*5(10) ,170–177.

Chun S. S., Vatter, D. A., Lin Y. T., Shetty, K. (2005): Phenolic antioxidants from clonal *Oregano* (*Origanum Vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40, pp. 809–816.

Clark S., Costello M., Drake M., Bodyfelt F.W. (2008). The sensory evaluation of dairy products. 2nd edition. Springer Science + Business Media, Inc., NY, US., pp. 573.

D

Delbès C., Ali-Mandjee L., Montel M.C. (2007). Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and –independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*73, 1882–1891.

Denis F., poly M.C., Bengen E., Quentin R. (2007). *Bactériologie médicale, techniques usuelles*. 2ème Ed. , Elsevier Masson, paris: p.417

De Oliveira G.B., Favarin L., Luchese R.H., McIntosh D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Braz. J. Microbiol.*46, 313–321.

E

Edeoga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology.* 4, 685–688.

El Gendy A., Leonardi M., Mugnaini L., Bertelloni F., Valentina VE, Simona Nardoni, et al. (2015) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt. *Industrial Crops and Products.* 67: 201-207.

Ertan H., Cassel C., Verma A., Poljak A., Charlton T., Aldrich-Wright J., et al. (2015). A new broad specificity alkaline metalloprotease from a *Pseudomonas* sp. isolated from refrigerated milk: role of calcium in improving enzyme productivity. *J. Mol. Catal. B Enzym.*113, 1–8

Ertas O.N., Guler T., Ciftci M., Darilkilic B., Simsek U.G. (2005). The effect of an essential oil mix drive from *Oregano*, clove and anise on brolier performance. *International Journal of Poultry Science*, 4(11): 879- 884.

F

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.

Fasseas M.K., Mountzouris K.C., Tarantilis P.A., Polissiou M., Zervas G. (2007). Antioxidant activity in meat treated with *Oregano* and sage essential oils. *Food Chemistry* 106:1188-1194.

Figueredo G. (2007) Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'*Origan* (lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne – Thèse. Clermont – Ferrand, France.

Fleurentin J. (2007) Les plantes qui nous soignent : Tradition et thérapeutique – Edition Ouest – France.

Fonseca P., Moreno R., Rojo F. (2011). Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. *Environ Microbiol Rep* 3:329-339.

Freney J., Flerette J., Reverdy M.E. (1995). Antisepsie et désinfection. Ed Eska. P 635.

Force M., Sparks WS., Ronzio R.A. (2000). Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of *Oregano* in vivo. *Phytotherapy Research*. 213-4.

G

Garrity G.M. (2005). The Proteobacteria -Part B: The Gammaproteobacteria. In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Génin G. (1935). Pasteurisation du lait. Ses avantages et ses inconvénients. Méthode de pasteurisation basse. *Le lait*, INRA Editions,15 (150), pp.1101-1103.

Giannino M.L., 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.

Giamarelloul H. (2008). A universal threat to public health? .*Internatinal Journal of Antimicrobial Agents.*32:106-19.

Goliaris, A.H., Chatzopoulou P.S., Katsiotis, S.T. (2002). Production of new Greek oregano clones and analysis of their essential oil. *J. Herbs, Spices & medicinal plants*, vol. 10 (1): 29-35.

Gopal N, et al. (2015). La prévalence et le contrôle de *Bacillus* et des bactéries responsables de la formation de spores dans l'industrie laitière. *De face. Microbiol.* 6 : 1418.

Goze I., Cetin A., Goze A. (2010). Investigation of effects of essential oils of *Origanum minutiflorum* O Schwarz PH Davis and *Cyclotrichium niveum* (Labiatae) plants on

angiogenesis in shell-less Chick embryo culture. *African Journal of Biotechnology* 9(14): 2156-2160.

Grigoraş C.G. (2012). Valorisation of fruits and by-products from fruits industry by bioactive compound extraction. Université d'Orléans.

Guezlane-Tebibel N., Kahlouche B., Athmani Gemouri S. (2010) *Microbiologie. Travaux pratiques*, office des publications universitaires, 3^{ème} édition corrigé n° 4973,99 p.

Guignard J.L., 1996. *Abrégés en botanique*. 10^{ème} éd. Ed. Masson, Paris. 278 p.

Guiraud J.P., Rosec J.P. (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. AFNOR: 241 p.

Gurudatt P., Priti V., Shweta S., et al. (2010). Changes in the essential oil content and composition of *Origanum Vulgare* L. during annual growth from Kumaon Himalaya. *Current Science* 98 (8):1010- 1012.

H

Hammes W P, Vogel R F.(2012). The genus *Lactobacillus*. In: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Holzappel, W H N, Wood B J. (ed), Springer Science & Business Media , vol 2, p 19.

Hanamant P.S., Bansilal G.M. (2013). Lipolytic psychrotrophic gram-positive cocci in milk and fermented milk products. *J. Environ. Res. Dev.* 8,273–279.

Hantsis-Zacharov E., Halpern M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7162–7168.

Helander I.M., Alakomi H-L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J. (1998) “Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria” *J Agric Food Chem* 146:3590–3595

Hemalatha S., Banu N. (2010). DNA fingerprinting of *Bacillus cereus* from diverse sources by restriction fragment length polymorphism analysis. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1, 136-144.

Hernandez E., Ponce-Alquicira E., Jaramillo-Flores M.E., Guerrero-legarret I. (2009). Antioxidant effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, 81:410–4174.

I

Ivanova D., Gerova D., Chervenkov T., & Yankova T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 145-150.

Ivask K., Orav A., Kailas T., Raal A., Arak E., Paaver U. (2005). Composition of the essential oil from wild marjoram (*Origanum Vulgare* L. ssp. *Vulgare*) cultivated in Estonia. *Journal of Essential Oil Research*. 17(4):384-7.

J

Jay M.J. (2005). *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. Artmed, Porto Alegre, 711 p.

Jerković I., Mastelić J., Miloš M. (2001) The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum Vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. *International journal of food science & technology*. 36(6):649-54.

K

Kable M E., Srisengfa Y., Laird M., Zaragoza J., McLeod J., Heidenreich J., et al. (2016). The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *MBio* 7:e00836-16.

Kaul VK., Singh B., Sood RP. (1996) Essential oil of *Origanum vulgare* L. from North India. *Journal of Essential Oil Research*. 8(1):101-3.

Kekessy D.A. (1972). Characterisation de pseudomonas maltophilia .Path.Microbiol.38 :17-18.Kikuzaki H., Nakatani N. (1989) Structure of a new antioxidative phenolic acid from Oregano (*Origanum vulgare* L.). Agricultural and Biological Chemistry. 53(2):519-24.

Kintzios S. E. (2002). Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios SE (Ed.) Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia*. Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles 25. Taylor and Francis/ CRC Press USA, 3–8, 236–242.

Koldaş S., Demirtas I., Ozen T., Demirci MA., Behçet L. (2015) Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. Journal of the science of food and agriculture. 95(4):786-98.

Koukoulitsa C., Karioti A., Bergonzi M.C., Pescitelli G., Di Bari L., Skaltsa H. (2006) Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* growing wild in Greece. Journal of agricultural and food chemistry. 54(15):5388-92.

L

Lafarge V., Ogier J.C., Girard V., Maladen V., Leveau J.Y., Gruss A., et al.(2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. Appl. Environ. Microbiol.70, 5644–5650.

Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G.J. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of Oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 91 (3): 453 - 62.

Lans C., Turner N., Khan T., et al. (2007). Ethno veterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 3:11.

Leinmüller E., Steingass H., Henke K.H. (1991). Tannins in ruminant feedstuffs. Ed. Metzinger. Animal Research and Developpement, 33: 9-56.

Lemarchand K., Desbiens I. (2009). revue des connaissances sur les capacités potentielles de dégradation des hydrocarbures dans l'estuaire maritime et le golfe du saint-laurent par les communautés bactériennes indigènes.P 1_ 26.

Leung A.Y., Foster S. (1996). Oregano. In: Encyclopedia of common natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics, Second edition. John Wiley, sons, Inc, New York, 398-400.

Licina B.Z., Olgica D., Stefanovic, Sava M., Vasic, Ivana D., Radojevic, Milan S., Dekic, Ljiljana R., Comic. (2013). Food Control 33 498-504.

Liu M., Wang H., Griffiths MW. (2007). Regulation of alkaline metalloproteinase promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. J. Appl. Microbiol.103, 2174–2184.

Lodge R.M., Hinshelwood C.N. (1943). Physicochemical aspects of bacterial growth. Part IX. The lag phase of *bact. Lactis aerogenes*. J. Chem. Soc. 213-219.

Lojkowska E., Holubovska M. (1992). The role of polyphenol oxidase and peroxidase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. Journal of Phytopathology, 136: 319-328.

Lukas B., Schmiederer C., Mitteregger U., Novak J. (2010) Arbutin in marjoram and oregano. Food Chemistry. 121(1):185-90.

M

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. 8:302

Madigan M.T., Martinko J.M, Parker J (ed). (2000). Brock biology of microorganisms, p 135-162. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.

Majeed M., Hussain A.I., Chatha S.A., Khosa M.K., Kamal G.M., Kamal M.A., et al. (2016) Saudi J BiolSci. 23(3):389-96.

Malacarne M., Summer A., Franceschi P., Formaggioni P., Pecorari M., Panari, G., et al. (2013). Effects of storage conditions on physico-chemical characteristics, salt equilibria, processing properties and microbial development of raw milk. Int. Dairy J.29, 36–41.

- Mallet A., Guéguen M., Kauffmann F., Chesneau C., Sesboué A., Desmasures N. (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *Int. Dairy J.* 27, 13–21.
- Mastelić J., Milos M., Jerković I. (2000) Essential oil and glycosidically bound volatiles of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Flavour and fragrance journal*. 15(3):190-4.
- McAuley C.M., Gobius K.S., Britz M.L., Craven H.M. (2012). Résistance thermique des entérocoques thermoduriques isolés du lait. *Int. J. Food Microbiol.* 154 : 162-168.
- Mcphee J.D., Griffiths M.W. (2011). Psychrotrophic bacteria *Pseudomonas* spp. In: John, W.F. (Ed). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Second Edition. Academic Press, San Diego, pp 379-383.
- Melini F., Melini V., Luziatelli F., Ruzzi M. (2017). Raw and Heat-Treated Milk : From Public Health Risks to Nutritional Quality. 3,54.
- Michel V., Hauwuy A., Chamba, J.F. (2001). La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Lait* 81,575–592.
- Miesel, L.; Greene, J.; Black, T.A. (2003) Genetic strategies for antibacterial drug discovery. *Nat. Rev. Gen.* 4, 442–456.
- Mohanakrishnan K., Sowmya N., Sumathi G., Nithyalakshmi J., Suria V. (2017). Antibacterial activity of aqueous infusion and decoction of dried leaves of oregano (*Origanum vulgare*) on clinical bacterial isolate.
- Monod J. (1958). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Thèse de 1942, 2ème édition. Hermann, Paris.
- Mossel D.A.A., Ingram M. (1955). The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Bacteriol.* 18, 232-268.
- Mossel D.A.A. (1983). Essentials and perspectives of the microbial ecology of foods. In *Food Microbiology: Advances and Prospects*. Eds. Roberts T.A., Skinner F.A. Society for Applied Microbiology Symposium Series No. 11. Academic press, London. p. 1-45.

Moyer C.L., Morita R.Y. (2007). Psychrophiles and psychrotrophs. In : Morita RY (ed.) Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. pp 1-6 .

Munsch-Alatossava P., Alatossava T. (2005). Phenotypic characterization of raw milk associated psychrotrophic bacteria. Microbiological Research 161, 334-346.

Munsch-Alatossava P., Alatossava T. (2006). The darker side of raw milk spoiling psychrotrophs. Maataloustieteen Päivät www.smts.fi .

N

Nakatani, N. (2003). Biologically functional constituents of spices and herbs. Journal of Japanese Society. Nutritional and Food Science, 56(6):389- 395.

Negi P.S., Jayaprakasha G.K., Jena B.S. (2010). Evaluation of antioxidant and antimutagenic activities of the extracts from the fruit rinds of *Garcinia cowa*. International Journal of Food Properties. 13, 1256–1265.

Negi P.S. (2012) Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology 156 7–17.

Nörnberg M.F.B.L., Friedrich R.S.C., Weiss R.D.N et al. (2010). Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. Int J Dairy Technol 63:41-46.

Nowak R., Wójciak-Kosior M., Sowa I., Sokołowska- Krzaczek A., Pietrzak W., Szczodra A., Kocjan R. (2013) HPTLC densitometry determination of triterpenic acids in *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* and *Syzygium aromaticum*. Acta poloniae pharmaceutica. 70(3):413-8.

Nurmi A., Nurmi T., Mursu J., et al. (2006). Ingestion of Oregano Extract Increases Excretion of Urinary Phenolic Metabolites in Humans. J. Agric. Food Chem. 54: 6916-6923.

O

O'brien B, Guinee T.P. (2011). Milk Seasonal effects on processing properties of cows' milk. In: Fuquay, J. W. (Ed) Encyclopedia of Dairy Sciences. Second Edition. Academic Press, San Diego, pp 598-606.

P

Paolozzi L., Liebart J.C. (2015). Microbiologie, Biologie des procaryotes et de leurs virus. paris. 512p.

Paulsen I.T., Banerjei L., Myers G. S., Nelson K. Seshadri E., Read T. D., Fouts D. E., Eisen J. A., Gill S. R., Heidelberg J. F., Tettelin H., Dodson R. J., Umayam L., Brinkac L., Beanan M., Daugherty S., DeBoy R. T., Durkin S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., Vamathevan J., Tran B., Upton J., Hansen T., Shetty J., Khouri H., Utterback T., Radune D., Ketchum K. A., Dougherty B. A., Fraser C. M. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299:2071-2074

Pelg A.Y, Seifert H, Paterson D.L.(2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Microbial Rev* ;21:538-82.

Pelmont J. (1993). Bactéries et envirement. Adaptation physiologique, presse universitaire de Grenoble. 257p.

Perin L.M., Moraes P.M., Almeida M.V., Nero L.A. (2012). Intereference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. v. 33, n. 1, 333-342 p.

Picq M., Cheav S.L., Prigent A.F. (1991) Effect of two flavonoid compounds on central nervous system. Analgesic activity. *Life sciences*. 49(26):1979-88.

Pinto C.L.O., Martins M.L., Vanetti M.C.D.(2006). Qualidade micro-biológica de leite cru refrigerado eisolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Food Sci Technol (Campinas)* 26:645-651.

Pirgozliev V., Bravo D., Mirza M.W., Rose S.P. (2015). Growth performance and endogenous losses of broilers fed wheatbased diets with and without essential oils and xylanase supplementation. *Poultry Sci.* 94:1227–1232.

Poly M.C., Martin C.L., Bingen E., Quentin.2007. *Bactériologie médicale technique usuelle.*

Q

Quigley L, et al. (2011). Approches moléculaires pour analyser la composition microbienne du lait cru et du fromage au lait cru. *Int. J. Food Microbiol.*150 : 81–94.

Quigley L.; O’Sullivan O.; Stanton C.; Beresford T.P.; Ross R.P.; Fitzgerald G.F.; Cotter P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk.*FEMS Microbiol. Rev* 37, 664–698

R

Raaijmakers J.M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 1037-1062.

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, 465–471.

Raina A.P., Negi K.S. (2014) Chemical diversity among different accessions of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* collected from Central Himalayan region of Uttarakhand, India. *Journal of Essential Oil Research.* 26(6):420-6.

Ramdan B., El Malki F., Eddarrajji K., Greche H., Nhiri M. (2018) Composition and Antibacterial Activity of Hydro-Alcohol and Aqueous Extracts Obtained from the Lamiaceae Family. *Pharmacog J.* 10(1):81-91.

Randolph H. (2006). Identifying spoilage bacteria and potential shelf- life problems. *Dairy Food/Find Article* 1-3.

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.

Razavi S.M., Zarrini G., Molavi G., Ghasemi G. (2011). Bioactivity of *Malva sylvestris* L., a medicinal plant from Iran. *Iran J Basic Med Sci* 14(6): 574–579.

Reed M.C., Lieb A., Nijhout H.F. (2010). L'importance biologique de l'inhibition du substrat: un mécanisme aux fonctions diverses. *BioEssays.*; 32 : 422–429.

Rodriguez-Vaquero M.J., Alberto M.R., Manca de Nadra M.C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18: 93-101.

S

Sahin F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., et al. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15, 549e557.

Salud P.G., Miguel Z.S., Lucina A.G., Miguel R.L. (2011) Antiinflammatory Activity of Some Essential Oils. *Journal of essential oil research.* 23: 38-44.

Samaržija D., Zamberlin Š., Pogačic T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo* 62, 77–95.

Schornteiner E., Mann E., Bereuter O., Wagner M., Schmitz-Esser S. (2014). Analyse, indépendante de la culture, de communautés microbiennes sur des croûtes de fromage à pâte dure au lait cru autrichien. *Int. J. Food Microbiol.* 180 : 88–97.

Senesi S., Ghelardi E. (2010). Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoksins. *Toxins* 2, 1690-1703.

Sezik E., Tümen G., Kirimer N., Özek T., Baser K.H. (1993) Essential oil composition of four *Origanum vulgare* subspecies of Anatolian origin. *Journal of Essential Oil Research.* 5(4):425-31.

- Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53:7749-7759.
- Siddeeqk S., Parida A., Jose M., Pai vidya. (2016). Estimation of Antimicrobial properties of Aqueous and Alcoholic Extract of *Salvadora Persica*(Miswaf) on Oral Microbial Pathogens-An Invitro Study.
- Sikkema J., de Bont J.A.M. & Poolman B., (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269(11): 8022-8028.
- Sillankorva S., Neubauer P., Azeredo J. (2008). *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage philBB-PF7A. *BMC Biotechnology*78, Open Access 1-12.
- Simões M., Simões L.C., Vierira M.J. (2010): A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* 43, 573-583.
- Skoula M., Harborne, J.B. (2002). Taxonomy and chemistry. In: Kintzios, S.E. (Ed.), *Oregano: The Genera Origanum and Lippia. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Pro. les*, 25. Taylor & Francis/CRC Press, USA, pp. 67–108.
- Sørhaug T., Stepaniak L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 35–41.
- Stoeckel M., Lidolt M., Stressler T., Fischer L., Wenning M., Hinrichs J. (2016). Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: a challenge in the production of ultra-high temperature milk products. *Int. Dairy J.* 61, 250–261.
- St-Pierre B., Wright A-D.G. (2014). Comparative metagenomic analysis of bacterial populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*98, 2709–2717
- Švec P C, Franz M AP.2004. The genus *Enterococcus*. In: *Lactic Acid Bacteria biodiversity and taxonomy*. 3 edition. P 175-211.
- Svenson B., Monthan A., Shaheen R., Andersson A.M., Salkinoja-Salonen M., Christiansson A. (2005). Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain, *International Dairy Journal* 16, 740-749.

T

Tajkarimi M. M., Ibrahim S. A., Cliver D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compound in food. *Food Control* 21, 1199–1218. 10.1016/j.foodcont.02.003.

Tak V., Mathur P., Varghese P., 2013 .Misra MCELizabethkingia meningoseptica: An emerging pathogen causing meningitis in a hospitalized adult trauma patient . *Indian Journal of Médical Microbiology*, p293-295.

Tamgno B.R., Ngamo L. (2014). Utilisation des produits dérivés du neem *Azadirachta indica* A. Juss comme alternatifs aux insecticides synthétiques pour la protection des semences de maïs et de sorgho dans la Vallée du Logone. *Sciences, Technologies et Développement* 15, 1- 8.

Tamime A .Y.2009. *Milk Processing and Quality Management*. Society of Dairy Technology,317 P.

Teixeira B., Marques A., Ramos C., Serrano C., Matos O., Neng N.R., Nogueira J. M.F., Saraiva J.A., Nunes M.L. (2013) "Chemical composition and bioactivity of different *Oregano* (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil" *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93 (11): 2707 - 14.

The Herb Society of America. (2005). *Oregano and Marjoram, an Herb Society of America guide to the genus Origanum.* , Kirtland, Ohio, USA.

Tornuk F., Cankurt H., Ozturk I., Sagdic O., Bayram O., Yetim H. (2011). Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*. 148, 30–35.

Tortora G.J. (2011). *Introduction à la microbiologie*. 2 éd- France. 624p.

Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. (2005) Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49: 2474 - 78.

U

Ultee A., Bennink M., Moezelaar R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4): 1561 - 68.

V

Vacheyrou M., Normand AC., Guyot P., Cassagne C., Piarroux R., and Bouton Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 253–262. attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *Int. Dairy J* 57, 80–90.

Vagi E., Rapavi E., Hadolin M., Vasarhelyine Peredi K., Balazs A., Blazovics A., Simandi B. (2005). Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of agricultural and food chemistry.* 53(1):17-21.

Vandepitte J., Reckless R., Seynhaeve V. (1965). Infections néonatales à *Flavobacterium meningosepticum*. *nn Soc Belge Méd Trop* .

Vithanage N.R., Dissanayake M., Bolge G., Palombo E.A., Yeager T.R., Datta N. (2016) Biodiversity of culturable 497 psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their 498 spoilage potential. *International Dairy Journal*, 57(0) 80-90.

W

Weerakkody S.N., Caffin N., Turner S.M., Dukes A.G. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected foodborne bacteria. *Food Control*, 21, 1408e1414.

Wogiatzi E., Gougoulis N., Papachatzis A., Vagelas I., Chouliaras N. (2009) Chemical composition and antimicrobial effects of Greek *Origanum* species essential oil. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 23(3):1322-4.

Wojdyło A., Oszmiański J., Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105:940-949.

Y

Yazdani E., Sendi J.J., Hajizadeh J. (2014). Effect of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. essential oils on toxicity, food consumption, and biochemical properties of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Protection Research*. 54(1):53-61.

Yoshino K., Higashi N., Koga K. (2006). Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Oregano Extract. *Journal of Health Science* 52(2): 169–173.

Yoshino M., Murakami k. (2015). Analysis of the substrate inhibition of complete and partial types. 4: 292.

Z

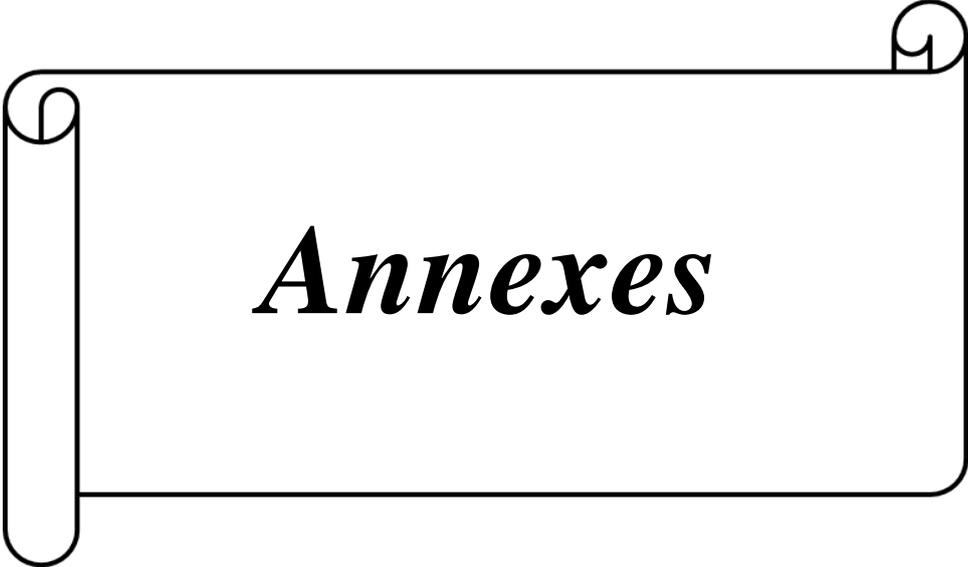
Zadoks R., Allore H., Barkema H., Sampimon O., Wellenberg G., Gröhn Y., et al. (2001). Cow-and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 84, 2649–2663.

Zeng W.C., He Q., Sun Q., Zhong K., Gao H. (2012). Antibacterial activity of water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara*. *International Journal of Food Microbiology*. 153, 78–84.

Zinoviadou K.G., Koutsoumanis K.P., Biliaderis C.G. (2009). Physico chemical properties of whey protein isolate films containing Oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science* 82:338-345.

Référence Electronique :

<http://www.branche-rouge.org/> (consulté le 24/07/2016).



Annexes

Annexe 1 : Matériel utilisés



Autoclave



Balance



Vortex



plaque chauffante



Bain marie



Etuve



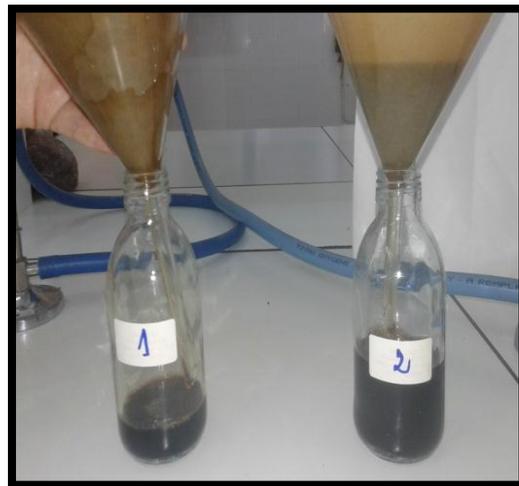
Agitateur



Bec benzène



Addition des concentrations d'EA au lait



Filtration d'EA

Annexe 2 : L'extraction de l'Origanum

Dans notre expérience nous avons faire une extraction primaire à partir de 100 g depoudre dans 650ml d'eau distillée stérile, le mélange est filtré 2 fois et donne un rendement de 13%.

**Annexe 3 : Evolution de la flore psychrotrophes du lait durant 10 jours de stockage à froid
à 4°C sans multiplication par le facteur de dilution**

	Dilution	0j			2j			6j			8j			10j		
Témoin	1,00E-01	84	117	94	80	74	73	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-02	12	12	15	13	14	13	117	179	220	300	300	300	300	300	300
	1,00E-03	3	2	1	2	1	0	20	3	0	300	300	300	300	297	300
	1,00E-04	0	1	2	0	1	1	18	1	11	19	45	50	200	187	180
	1,00E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	5	15	14	9	7	7	7
100%	1,00E-01	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-02	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-03	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-04	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-05	143	118	137	300	285	300	216	245	280	110	90	100	300	187	151
	1,00E-06	0	0	0	0	0	0	44	36	52	110	90	52	300	240	284
75%	1,00E-01	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-02	300	300	300	300	300	300	300	300	30	300	300	300	300	300	300
	1,00E-03	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-04	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-05	133	159	159	220	240	218	300	300	300	300	300	300	300	187	151
	1,00E-06	0	0	0	0	0	0	64	77	98	146	167	150	162	99	167
50%	1,00E-01	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-02	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-03	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-04	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-05	78	97	88	187	167	200	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-06	0	0	0	0	0	0	50	55	60	100	90	95	73	118	132
25%	1,00E-01	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-02	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-03	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	1,00E-04	157	197	265	300	300	30	130	111	142	300	300	300	300	300	300
	1,00E-05	28	19	22	78	75	91	67	72	38	300	300	300	300	300	300
	1,00E-06	0	0	0	0	0	0	0	4	3	310	300	290	350	325	300

Annexe 4 : Moyennes de trois répétitions du dénombrement, écarts types et valeurs de log UFC.

		0j			2j			6j			8j			10j		
Témoïn	UFC/ml	840	1170	940	800	740	730	11700	17900	22000	190000	450000	500000	2000000	1870000	1800000
	moyenne	2950			2270			51600			1140000			5670000		
	Ecartype	169,213869			37,859389			5185,55686			166433,17			101488,916		
	LogUFC	2,22843595			1,5781736			3,7147954			5,22123988			5,00641861		
100%	UFC/ml	14300000	11800000	13700000	30000000	28500000	30000000	21600000	24500000	28000000	11000000	9000000	10000000	30000000	24000000	284000000
	moyenne	39800000			88500000			74100000			30000000			824000000		
	Ecartype	1305118,13			866025,404			3204684,07			1000000			31069813,9		
	LogUFC	6,11564982			5,93753063			6,50578522			6			7,49233865		
75%	UFC/ml	13300000	15900000	15900000	22000000	24000000	21800000	64000000	77000000	98000000	146000000	167000000	150000000	162000000	99000000	167000000
	moyenne	45100000			67800000			239000000			463000000			428000000		
	Ecartype	1501110,7			1216552,51			17156145,6			11150485,8			37898988,6		
	LogUFC	6,17641272			6,08513086			7,23441972			7,04729379			7,57862762		
50%	UFC/ml	7800000	9700000	8800000	18700000	16700000	20000000	50000000	55000000	60000000	100000000	90000000	95000000	73000000	118000000	132000000
	moyenne	26300000			55400000			165000000			285000000			323000000		
	Ecartype	950438,495			1662327,69			5000000			5000000			30827476,9		
	LogUFC	5,97792402			6,22071664			6,69897			6,69897			7,48893798		
25%	UFC/ml	1570000	1970000	2650000	7800000	7500000	9100000	6700000	7200000	3800000	31000000	30000000	29000000	35000000	32500000	30000000
	moyenne	6190000			24400000			17700000			90000000			97500000		
	Ecartype	546015,873			850490,055			1835755,98			10000000			25000000		
	LogUFC	5,73720527			5,92966924			6,26381495			7			7,39794001		

Résumé

La présente étude vise à tester l'effet de l'ajout de l'extrait aqueux de plante sur la qualité microbiologique du lait en particulier la flore psychrotrophe. La cinétique de croissance microbienne a été suivie durant le stockage à froid du lait, et les paramètres de croissance ont été évalués. Les résultats ont montrés une amélioration de la stabilité du lait lors de la conservation. Ces essais pourraient des intérêts certains pour les secteurs de l'agriculture, agro-alimentaire et santé publique.

Mots clés : Psychrotrophes, conservation, lait, cinétique de croissance.

Abstract

The present study aims to test the effect of plant aqueous extract addition to milk, on microbiological quality in particular the psychrotrophic flora. The kinetic of microbial growth was followed during cold storage of milk, and growth parameters were evaluated. The results showed an enhancement of milk stability during storage. These tests could be of interest for sectors of agriculture, food industry and public health.

Key words: Psychrotrophs, storage, milk, kinetic of growth.

ملخص

الدراسة الحاضرة تهدف إلى اختبار تأثير إضافة المستخلص المائي للنبات على النوعية الميكروبيولوجية للحليب خاصة البكتيريا المحبة للبرودة. حركية النمو الميكروبي توبعت أثناء التخزين في البرودة للحليب ، وكذا تم تقييم معايير النمو الميكروبي. أظهرت النتائج تحسنا في استقرار الحليب أثناء الحفظ. هذه التجارب يمكن أن تكون لها فوائد اكيدة في قطاع الفلاحة الصناعة الغذائية التحويلية والصحة العمومية

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المحبة للبرودة، الحفظ ، الحليب حركية النمو