



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique  
UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et  
des Sciences de la Terre et de l'Univers  
Département d'Agronomie

Laboratoire de Microbiologie  
Appliquée à l'Agroalimentaire,  
et à l'Environnement

مخبر الميكروبيولوجيا  
التطبيقية للأغذية والبيئة



# ***THESE***

*Présentée par*  
**Meryem BENAHMED**

*En vue de l'obtention du diplôme de*  
**Doctorat en Agronomie**

*Option : Nutrition*

**Thème : Caractérisation de la flore aérobie sporulée mésophile inféodée à la  
poudre de lait importée et commercialisée en Algérie.**

*Présentée devant le jury composé de :*

<b>AMRANI Sidi Mohamed</b>	<b>Professeur Univ. Tlemcen</b>	<b>Président</b>
<b>BARKA Mohamed Salih</b>	<b>MCA Univ. Tlemcen</b>	<b>Examineur</b>
<b>BENMECHERNE Zineb</b>	<b>Professeur Univ. Oran 1.</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>KIHAL Mebrouk</b>	<b>Professeur Univ. Oran 1.</b>	<b>Examineur</b>
<b>MOUSSA-BOUDJEMAA Boumedine</b>	<b>Professeur Univ. Tlemcen</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>LEGUERINEL Ivan</b>	<b>Professeur Univ. Brest (France)</b>	<b>Co-directeur de thèse</b>

**Année universitaire 2019-2020**

## *Remerciements*

En tout premier lieu, Louange et Gloire à ALLAH, le Miséricordieux et le Tout Puissant, pour la force, l'intelligence et la patience qu'il m'a accordées pour dépasser toutes les difficultés et accomplir ce travail.

Au terme de ce travail, il m'est difficile d'établir la liste complète des personnes à remercier. Remercier individuellement, c'est prendre le risque d'oublier : oublier les petites mains qui m'ont aidé un jour, oublier les personnes qui m'ont rendu service, oublier les personnes qui m'ont donné conseil, oublier les personnes qui ont participé à mon épanouissement par un sourire, un mot, une discussion et parfois quelques années partagées.

Je voudrai quand-même citer quelques noms :

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse **M. B. MOUSSA BOUDJEMAA**, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mon travail. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de cette période de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, et de son efficacité certaine que je n'oublierai jamais. Soyez assuré, monsieur, de ma profonde gratitude.

Je remercie vivement mon co-directeur de thèse **M. I. LEGUERINEL**, Professeur à l'Université de Brest Occidentale (UBO) et Directeur du Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie microbienne (LUBEM) Quimper, France pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter mes réflexions.

J'exprime mes remerciements à **M. S. AMRANI**, Professeur à l'Université de Tlemcen pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Je suis très honorée à remercier par la présence mon jury de thèse, à savoir, **M. S. BARKA**, Maître de conférence Classe A à l'université de Tlemcen; Mme **Z. BENMCHERNENE**, Professeur à l'université d'Oran 1 et également **M. M. KIHAL**, Professeur à l'université d'Oran 1 pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être membres de mon jury de thèse.

Je remercie également tous les membres de l'équipe de recherches du LUBEM à Quimper de l'Université de Brest (France) pour leur confiance et les moyens qu'ils ont mis à ma disposition pour réaliser ce travail dans les meilleures conditions. En particulier, Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance au **Dr Anne-Gabrielle MATHOT**, **Dr Florence POSTOLLEC** et **Dr Patrick LE CHEVALIER** qui ont partagé avec moi leurs connaissances et leur expériences en techniques de biologie moléculaire. J'ai beaucoup appris auprès d'eux dans ce domaine.

Pour tous les moments que j'ai partagés avec eux, j'adresse un immense Merci à mes camarades membres de l'équipe N°4 du LAMAABE « Sécurité Microbienne des Aliments et Process agroalimentaires » que dirige Pr B. Moussa Boudjemâa ainsi qu'à tous les membres du laboratoire LAMAABE en particulier **Mme Hassain Hafida** directrice du laboratoire.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont manifesté leur soutien et aidé dans ce travail **sans leur contribution, il m'aurait été impossible de mener à bien ce projet.**

Je remercie chaleureusement ma famille et mes amies pour leur soutien moral ininterrompu, leurs conseils et leurs encouragements qui m'ont été bien utiles durant la réalisation de ma thèse.

***Merci à tous de me permettre de tourner cette page et d'ouvrir une autre pour me projeter dans de nouveaux défis ...***

***Meryem.***

## Table des Matières

<b>Remerciements</b>	<b>i</b>
<b>ملخص</b>	<b>iii</b>
<b>Résumé</b>	<b>iv</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>Index des figures</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>ix</b>
<b>Introduction Générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Première partie : Revue Bibliographique.....</b>	<b>3</b>
<b>I.    Le secteur de la poudre de lait.....</b>	<b>4</b>
1. Rappels de technologie de production de la poudre de lait.....	4
2. L'Algérie et le marché mondial de la poudre de lait.....	8
3. Utilisation de la poudre de lait en industrie laitière Algérienne.....	10
4. Les problèmes posés par l'utilisation de la poudre de lait.....	12
<b>II.    Flore aérobie sporulée inféodée à la poudre de lait.....</b>	<b>13</b>
1. Microbiologie générale de la poudre de lait.....	13
2. Les bacilles aérobies formant des spores isolés à partir de la poudre de lait.....	14
3. Conditions environnementales influençant la croissance des spores aérobies isolées des poudres de lait.....	17
4. Evolution des spores durant le processus de fabrication de la poudre de lait.....	19
5. Incidence des bactéries aérobies formant des spores sur les poudres de lait.....	20
5. 1. La production de toxines.....	20
5. 2. La production des enzymes d'altération.....	21
5. 3. La thermorésistance des bactéries aérobies sporulées.....	25
5. 4. La formation de biofilm.....	26
<b>Deuxième partie : Matériel et méthodes.....</b>	<b>30</b>
<b>I.    Méthodologie des prélèvements.....</b>	<b>31</b>

<b>II.</b>	<b>Dénombrement de la flore mésophile totale et la flore sporulée</b>	
	<b>aérobie mésophile totale.....</b>	<b>33</b>
<b>III.</b>	<b>Identification phénotypique et biochimique des bactéries aérobies</b>	
	<b>thermorésistantes.....</b>	<b>33</b>
	1. Isolement et purification des isolats.....	33
	2. Description phénotypique et Biochimique des isolats.....	34
<b>IV.</b>	<b>Identification moléculaire des isolats.....</b>	<b>35</b>
	1. Extraction d'ADN.....	35
	2. Typage moléculaire M13 RAPD.....	38
	3. Séquençage de l'ADNr 16S.....	39
	4. Séquençage du gène PanC des souches du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	40
<b>V.</b>	<b>Etude de la thermorésistance des souches représentatives.....</b>	<b>41</b>
	1. Préparation des suspensions sporales.....	41
	2. Détermination de la thermorésistance de certaines souches	
	représentatives.....	43
<b>VI.</b>	<b>Etude de l'activité enzymatique des souches représentatives.....</b>	<b>45</b>
	1. Test de l'Activité protéolytique.....	45
	2. Test d'Hydrolyse de l'amidon.....	45
	3. Test de mise en évidence de la lécitinase.....	45
<b>Troisième partie : Résultats et discussion.....</b>		<b>47</b>
<b>I.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>47</b>
	1. Dénombrement de la population microbienne et sélection des isolats.....	48
	2. Description phénotypique et Biochimique des isolats.....	50
	3. Identification moléculaire des isolats.....	54
	4. Thermorésistance des spores représentatives des profils dominants.....	59
	5. Activité enzymatique des souches représentatives des profils dominants.	64
<b>II.</b>	<b>Discussion des résultats.....</b>	<b>69</b>
<b>Conclusion Générale.....</b>		<b>77</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		<b>80</b>
<b>Valorisations des travaux de la these .....</b>		<b>94</b>
<b>Annexe.....</b>		<b>97</b>

## ملخص

تعتبر الجزائر ثاني أكبر مستورد لمسحوق الحليب في العالم حيث تعتمد صناعة الألبان بها بشكل أساسي على المواد الخام المستوردة خاصة مسحوق الحليب. بالمقابل نجد أن بوردرة الحليب هذه اضافة الى بقية منتجات الألبان المجففة قابلة للتلوث و بشكل متكرر بالبكتيريا الهوائية التي تشكل أبواغ وعلى رأسها جنس *Bacillus*. تقاوم هذه الأبواغ درجات حرارة المعالجة العالية وتلتصق بأسطح الفولاذ المقاوم للصدأ، حيث تنمو وتتكاثر عند توفر الظروف الملائمة وتقوم بتشكيل الأغشية الحيوية. بمجرد تشكل غشاء حيوي ناضج تنفصل الأبواغ وتقوم مع الخلايا النباتية بتلويث المنتج السائل المتدفق عليها. وهكذا فان *Bacillus spp.* قد يسبب التلف و / أو التسمم الغذائي بسبب طبيعته السامة والممرضة، والإنزيمات التي يقوم بإنتاجها وطرحها خارج الخلية. كنتيجة يتم إهدار كمية كبيرة من الحليب ومنتجات الألبان كل عام. في الجزائر قلة الجودة الملاحظة في الحليب المبستر المعاد تشكيله خير مثال على ذلك. على خلاف المعلوم يتخثر هذا المنتج بعد يومين أو حتى في نفس اليوم.

في هذا السياق، تم إجراء توصيف خواص الأبواغ الهوائية المتكاثرة في درجة الحرارة المتوسطة في مسحوق الحليب المستورد المسوق في الجزائر. تم جمع 21 عينة من مسحوق الحليب من 10 أصول مختلفة. تم إجراء تحليل لعزل مسحوق الحليب على أساس التسلسل RAPD-M13 و *S rRNA* 16. تميزت مجموعات تطور السلالات بتسلسل الجين *panC*. كما تم إجراء تقييم للنشاط الإنزيمي والمقاومة الحرارية للعزل التمثيلي.

كشفت التحليل الجزيئي عن 17 مجموعة. كانت مجموعات *Bacillus cereus* المجموعات الثانية والثالثة والرابعة هي المجموعات الجينية الرئيسية. أثبتت النتائج أيضا تواجد *Bacillus cereus* في جميع المساحيق التي تم تحليلها كما أظهرت مجموعات *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus* نشاط تحلل بروتيني مرتفع بالإضافة إلى قيم  $D_{95}^{\circ C}$  تتراوح من 1 إلى 9 دقائق وقيم  $z$  بين 6.5 و 18.6 درجة مئوية.

**الكلمات المفتاحية:** مسحوق الحليب، الجزائر، العصيات، الأبواغ، المقاومة الحرارية، النشاط الإنزيمي.

## Résumé

L'Algérie est le deuxième plus grand importateur de lait en poudre dans le monde. Son industrie laitière fonctionne principalement sur la base de matières premières importées, principalement la poudre de lait. Cependant, la poudre de lait et les produits laitiers déshydratés sont connus pour être fréquemment contaminés par des bactéries aérobies sporulées principalement du genre *Bacillus*. Ces spores résistent à des températures de traitement élevées et adhèrent aux surfaces en acier inoxydable, où elles germent dans des conditions de croissance favorables et forment des biofilms. En raison du potentiel de bio-transfert d'un biofilm mature, les spores et les cellules végétatives se détachent et contaminent le produit liquide qui s'écoule dessus. Ainsi, *Bacillus* spp. peut provoquer une altération et/ou une intoxication alimentaire en raison de sa nature toxigène et pathogène, et des enzymes extracellulaires. En conséquence, une grande quantité de lait et de produits laitiers est gaspillée chaque année. La qualité précaire du lait pasteurisé en Algérie en est une illustration. Ce produit coagule après deux jours ou même dans la même journée.

Dans ce contexte, une caractérisation de la flore aérobie mésophile inféodée à la poudre de lait importée commercialisée en Algérie a été réalisée. Pour cela, 21 échantillons de poudre de lait provenant de 10 origines différentes ont été collectés. Une analyse des isolats de poudres de lait basée sur le séquençage RAPD-M13 et 16SrRNA a été effectuée. Les groupes phylogénétiques ont été distingués par le séquençage du gène *panC*. Une évaluation de l'activité enzymatique et de la thermorésistance des isolats représentatifs a également été effectuée.

L'analyse moléculaire a révélé 17 groupes. Les groupes II, III et IV de *Bacillus cereus* étaient les principaux groupes phylogénétiques. *Bacillus cereus* a été présente dans la totalité des poudres analysées. Les groupes *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* ont démontré une activité protéolytique élevée ainsi que des valeurs  $D_{95\text{ °C}}$  allant de 1 à 9 minutes et des valeurs  $z$  entre 6,5 et 18,6 °C.

**Mots clés :** Poudre de lait, Algérie, *Bacillus*, Spores Aérobie Mésophile, Thermorésistance, Activité enzymatique.

## Abstract

Algeria is the second largest importer of milk powder in the world. Its dairy industry operates mainly based on imported raw material, namely milk powder. However, milk powder and dehydrated milk products are known to be frequently contaminated by spore-forming aerobic bacteria, mainly of the genus *Bacillus*. These spores are resistant to high processing temperatures and adhere to stainless steel surfaces, where they germinate under favourable growth conditions and form biofilms. Due to the bio-transfer potential of a mature biofilm, the spores and vegetative cells detach and contaminate the liquid product flowing over it. Thus, *Bacillus* spp. can cause food spoilage and/or intoxication due to its toxinogenic and pathogenic nature and extracellular enzymes. As a result, a large amount of milk and dairy products is wasted each year. The precarious quality of pasteurized milk in Algeria is an illustration of this. This product coagulates after two days or even within the same day.

In this context, a characterization of the mesophilic aerobic flora inferred in the imported milk powder marketed in Algeria was carried out. For this purpose, 21 samples of milk powder from 10 different origins were collected. An analysis of milk powder isolates based on RAPD-M13 and 16S rRNA sequencing was performed. Phylogenetic groups were distinguished by the sequencing of the *panC* gene. An evaluation of the enzymatic activity and heat resistance of representative isolates was also performed.

Molecular analysis revealed 17 groups. *Bacillus cereus* groups II, III and IV were the main phylogenetic groups. *Bacillus cereus* was present in all powders analysed. The *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* groups demonstrated high proteolytic activity with D 95°C values ranging from 1 to 9 min and z-values between 6.5 and 18.6°C.

**Keywords:** Milk powder, Algeria, *Bacillus*, Aerobic Mesophilic Spores, Thermoresistance, Enzymatic activity.

## Index des Figures

<b>Figure 1 :</b>	Processus de fabrication de la poudre de lait entier agglomérée.....	<b>5</b>
<b>Figure 2 :</b>	Procédé d'atomisation à multiple effets.....	<b>6</b>
<b>Figure 3 :</b>	Évolution des importations algériennes de laits en poudre de 2005 à 2019.	<b>9</b>
<b>Figure 4:</b>	Origines des importations algériennes de lait en poudre et de produits laitiers entre 2006 et 2015.....	<b>10</b>
<b>Figure 5:</b>	Origines des échantillons de la poudre de lait (PDL) analysée.....	<b>32</b>
<b>Figure 6 :</b>	Étapes d'extraction de l'ADN génomique des isolats obtenus des échantillons de la poudre de lait.....	<b>37</b>
<b>Figure 7:</b>	Étapes de la préparation de la suspension sporale.....	<b>42</b>
<b>Figure 8 :</b>	Étapes du protocole d'inactivation thermique des spores bactériennes par la méthode des capillaires.....	<b>44</b>
<b>Figure 9 :</b>	Aspect général de la technique des tests enzymatiques.....	<b>46</b>
<b>Figure 10 :</b>	Dénombrement des spores mésophiles des différentes poudres de lait importées et commercialisées en Algérie.....	<b>48</b>
<b>Figure 11 :</b>	Distribution des fréquences de contamination par charge en spores.....	<b>48</b>
<b>Figure 12 :</b>	Aspect macroscopique de différentes souches après purification par repiquages successifs.....	<b>50</b>
<b>Figure 13 :</b>	Observation microscopique d'un isolat présumé <i>Bacillus</i> spp., provenant d'un échantillon de poudre de lait, après coloration de Gram (A) et coloration au vert de Malachite (B).....	<b>51</b>
<b>Figure 14 :</b>	Résultats de différenciation des isolats par le test de lait au tournesol.....	<b>53</b>
<b>Figure 15 :</b>	Dendrogramme construit à partir de profils représentatifs après analyse des empreintes RAPD d'isolats sporulés obtenus de poudres de lait importées et commercialisées en Algérie.....	<b>55</b>
<b>Figure 16 :</b>	Groupes RAPD représentant les différents isolats étudiés.....	<b>56</b>
<b>Figure 17 :</b>	Occurrence des bacilles aérobies formant des spores isolées des différentes poudres de lait.....	<b>57</b>
<b>Figure 18 :</b>	Cinétique d'inactivation thermique des spores de <i>Bacillus cereus</i> C9 ; <i>B. cereus</i> C10 et <i>B. cereus</i> C1.....	<b>60</b>
<b>Figure 19 :</b>	Cinétique d'inactivation thermique des spores de <i>B. subtilis</i> T6, <i>B. amyloliquefaciens</i> A1 et <i>B. licheniformis</i> L5.....	<b>61</b>
<b>Figure 20 :</b>	Cinétique d'inactivation thermique des spores de <i>Géobacillus toebii</i> G1..	<b>62</b>

<b>Figure 21 :</b>	Résultats du test de l'activité protéolytique.....	<b>64</b>
<b>Figure 22 :</b>	Résultats du test de l'activité amylolytique.....	<b>64</b>
<b>Figure 23 :</b>	Résultats du test de l'activité de lécitinase.....	<b>65</b>

## Index des Tableaux

<b>Tableau 1 :</b>	Les bactéries aéro-anaérobies facultatives formant des spores identifiées dans les poudres de lait.....	<b>15</b>
<b>Tableau 2 :</b>	Valeurs cardinales des paramètres de croissance de certaines bactéries aérobies sporulées.....	<b>18</b>
<b>Tableau 3 :</b>	Diverses caractéristiques des enzymes obtenues à partir d'espèces de Bacillus.....	<b>23</b>
<b>Tableau 4 :</b>	Thermorésistance des bactéries sporulées isolées du lait ou de la poudre de lait.....	<b>26</b>
<b>Tableau 5 :</b>	Volumes des réactifs dans le mix PCR.....	<b>38</b>
<b>Tableau 6 :</b>	Paramètres de la PCR.....	<b>39</b>
<b>Tableau 7 :</b>	Types des profils RAPD des spores mésophiles isolées des différentes poudres de lait commercialisées en Algérie.....	<b>58</b>
<b>Tableau 8 :</b>	Valeurs de $D_T^\circ$ et valeurs z enregistrées durant la cinétique de destruction des spores représentatives isolées des poudres de lait commercialisées en Algérie.....	<b>63</b>
<b>Tableau 9 :</b>	Semi-quantification des activités protéolytiques, amolytiques et lécitinase des bactéries formants des spores isolés des poudres de lait commercialisées en Algérie.....	<b>65</b>

## Liste des abréviations

<b>h</b>	heures
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>μL</b>	microlitre
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>a<sub>w</sub></b>	Activité de l'eau
<b>D<sub>T°C</sub></b>	Durée de traitement thermique à la température T nécessaire pour réduire une population microbienne d'un log décimal
<b>g</b>	gramme
<b>kg</b>	kilogramme
<b>M</b>	Molaire
<b>Max</b>	Maximum
<b>Min</b>	minimum
<b>mL</b>	millilitre
<b>mM</b>	milliMolaire
<b>Opt</b>	Optimum
<b>PDL</b>	Poudre de Lait
<b>sec</b>	seconde
<b>UWP</b>	protéines de lactosérum non dénaturées
<b>UFC / mL</b>	Unité Formant Colonie/ millilitre
<b>V/V</b>	Volume/ volume
<b>WPNI</b>	Whey protein nitrogen index = Indice d'azote des protéines de lactosérum
<b>mg g<sup>-1</sup></b>	milligramme/ gramme

## **Introduction Générale**

Le lait cru est généralement paucimicrobien, s'il est produit dans de bonnes conditions hygiéniques et que la mamelle de la femelle laitière est saine et non contaminée. En revanche, sa richesse en nutriments et son pH neutre offrent des conditions idéales pour la croissance de nombreux microorganismes. Divers facteurs environnementaux peuvent alors favoriser la contamination du lait tels le sol, l'air, l'eau, la litière, les aliments, les fèces, le matériel de traite et les contenants de stockage et de transport. Le lait cru peut alors être contaminé par une flore microbienne très diverse: des agents pathogènes (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, etc.), des micro-organismes d'altération (coliformes et spores de bactéries mésophiles et thermophiles) et des champignons. D'autres peuvent être bénéfiques (certains lactobacilles et bifidobactéries et certaines levures et moisissures).

Parmi la flore de contamination du lait cru, la présence de spores bactériennes revêt un intérêt particulier. Ces spores peuvent persister et se retrouver dans les produits laitiers finaux comme les poudres de lait.

La présence et la persistance des spores dans le lait et les produits laitiers dépendent du niveau initial de contamination du lait cru et des divers traitements pouvant lui être appliqués.

Les spores bactériennes sont indicatrices du statut de qualité et de sécurité des poudres laitières. Leur résistance aux conditions environnementales comme les températures élevées, le faible pH et la faible activité d'eau les rend bien adaptées pour résister aux conditions de fabrication des poudres laitières. Rominus et al (2006) ont rapporté la survie de spores bactériennes thermophiles dans des échantillons de poudre de lait de plus de 90 ans.

Ainsi, les spores constituent une menace pour la qualité et la sécurité des produits laitiers avec des conséquences quant à la viabilité économique de l'industrie laitière notamment l'industrie des poudres de lait et des autres produits laitiers et alimentaires secs.

La présence de bactéries formant des spores dans les poudres laitières ne provoque généralement pas d'altération car les spores présentes n'ont pas d'activité métabolique et la croissance des cellules végétatives est inhibée en raison d'une trop faible activité d'eau. Cependant, leur croissance peut reprendre lorsque des conditions favorables sont rencontrées.

Les spores des bacilles aérobies sont particulièrement problématiques en raison de leur thermorésistance, de leur capacité à produire diverses enzymes et de leur capacité à former des biofilms sur les surfaces des équipements laitiers.

Un grand intérêt est porté aux spores inféodées à l'environnement laitier et ces deux dernières décennies ont été marquées par des recherches approfondies s'y rapportant dans de nombreuses régions du monde, en particulier en Europe et en Océanie, en Chine et en Amérique latine (Murphy *et al.*, 1999 ; Rückert *et al.*, 2004 ; Scott *et al.*, 2007 ; Reginensi *et al.*, 2011 ; Sadiq *et al.*, 2016).

En Algérie, deuxième importateur de poudre de lait dans le monde, le lait et les produits laitiers reconstitués ou recombinaison dominent le marché. La qualité du lait en poudre principalement sa contamination par les bactéries aérobies sporulées pose de nombreux problèmes en industrie laitière algérienne, la qualité précaire du lait recombinaison pasteurisé conditionné en sachet en est la parfaite illustration.

Dans ce contexte et à notre connaissance, il n'existe pas de travaux scientifiques traitant du sujet des bactéries aérobies sporulées dans les poudre de lait importée en Algérie.

Ce travail se veut donc une contribution –au côté des autres travaux internationaux- à l'étude de la biodiversité et des caractéristiques importantes des spores bactériennes qui préoccupent l'industrie laitière afin d'attirer l'attention des autorités algériennes sur ce sérieux problème.

Cette étude vise les objectifs suivants :

1. Identifier la flore bactérienne aérobie mésophile formant des spores dans les poudres de lait importées et commercialisées en Algérie par quelques méthodes de biologie moléculaire et en évaluer la biodiversité ;
2. Etudier la thermorésistance et caractériser l'inactivation thermique de certaines souches représentatives, en déterminant leurs valeurs  $D_T$  et  $z$  ;
3. Evaluer la capacité de certaines souches représentatives à produire des enzymes responsables d'altération au niveau de la poudre de lait et des produits laitiers ;
4. Sensibiliser les autorités et les professionnels algériens pour qu'ils prennent en considération les critères de spores dans les transactions liées à la poudre de lait.

Pour ce faire, la thèse a été structurée en trois parties : la première partie est consacrée à une revue bibliographique à jour sur le sujet, une deuxième partie consacrée à la présentation de la méthodologie et aux techniques utilisées, enfin, les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans une troisième et dernière partie.

## **Première Partie:**

### **Revue bibliographique**

#### **I. Le secteur de la poudre de lait**

1. Rappels de technologie de production de la poudre de lait
2. L'Algérie et le marché mondial de la poudre de lait
3. Utilisation de la poudre de lait en industrie laitière Algérienne
4. Les problèmes posés par l'utilisation de la poudre de lait

#### **II. La flore aérobie sporulée inféodée à la poudre de lait**

1. Microbiologie générale de la poudre de lait
2. Les bacilles aérobies formant des spores isolées à partir de la poudre de lait
3. Conditions environnementales influençant la croissance des spores bactériennes aérobies
4. L'évolution des spores durant le processus de fabrication de la poudre de lait
5. Incidence des bactéries aérobies formant des spores sur les poudres de lait
  5. 1. La production de toxines
  5. 2. La production des enzymes d'altération
  5. 3. La thermorésistance des bactéries aérobies sporulées
  5. 4. La formation de biofilm

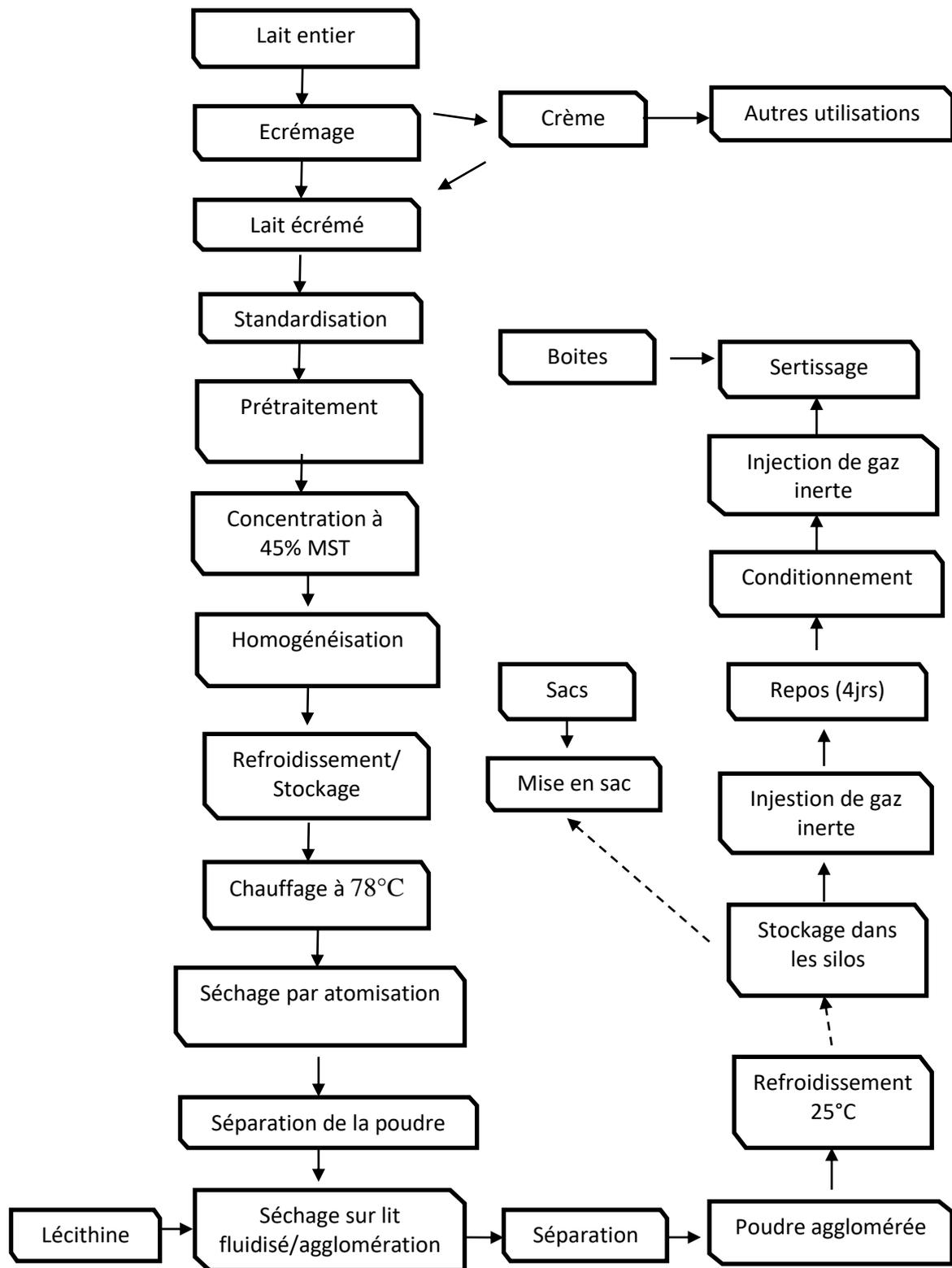
## I. Le secteur de la poudre de lait

### I.1. Rappels de la technologie de production de la poudre de lait

Le séchage permet au lait de conserver sa valeur nutritive et ses caractéristiques sensorielles pendant de longues périodes ( $\approx 3$  ans dans le cas de la poudre de lait écrémé). La réduction du volume du lait (75 à 80%) obtenue par évaporation et séchage contribue à faire de la poudre de lait l'un des produits laitiers les plus commercialisés au niveau international. En 2018, au niveau mondial, les exportations ont été de 2,65 millions de tonnes de poudre de lait écrémé et 2,52 millions de tonnes de poudre de lait entier (Economie laitière en chiffre 2020 CNIEL). En se recombinaut avec l'eau, la poudre peut retrouver une forme proche de sa forme liquide d'origine et être utilisée par la suite dans diverses applications de consommation et d'ingrédients (Hill et Smythe, 2012).

La fabrication du lait en poudre implique une série d'étapes continues ou semi-continues associées à des variables de processus qui affectent l'efficacité du processus et la qualité du produit fini (O'Callaghan et Cunningham, 2005). **La figure 1** illustre les étapes de fabrication de la poudre de lait entière.

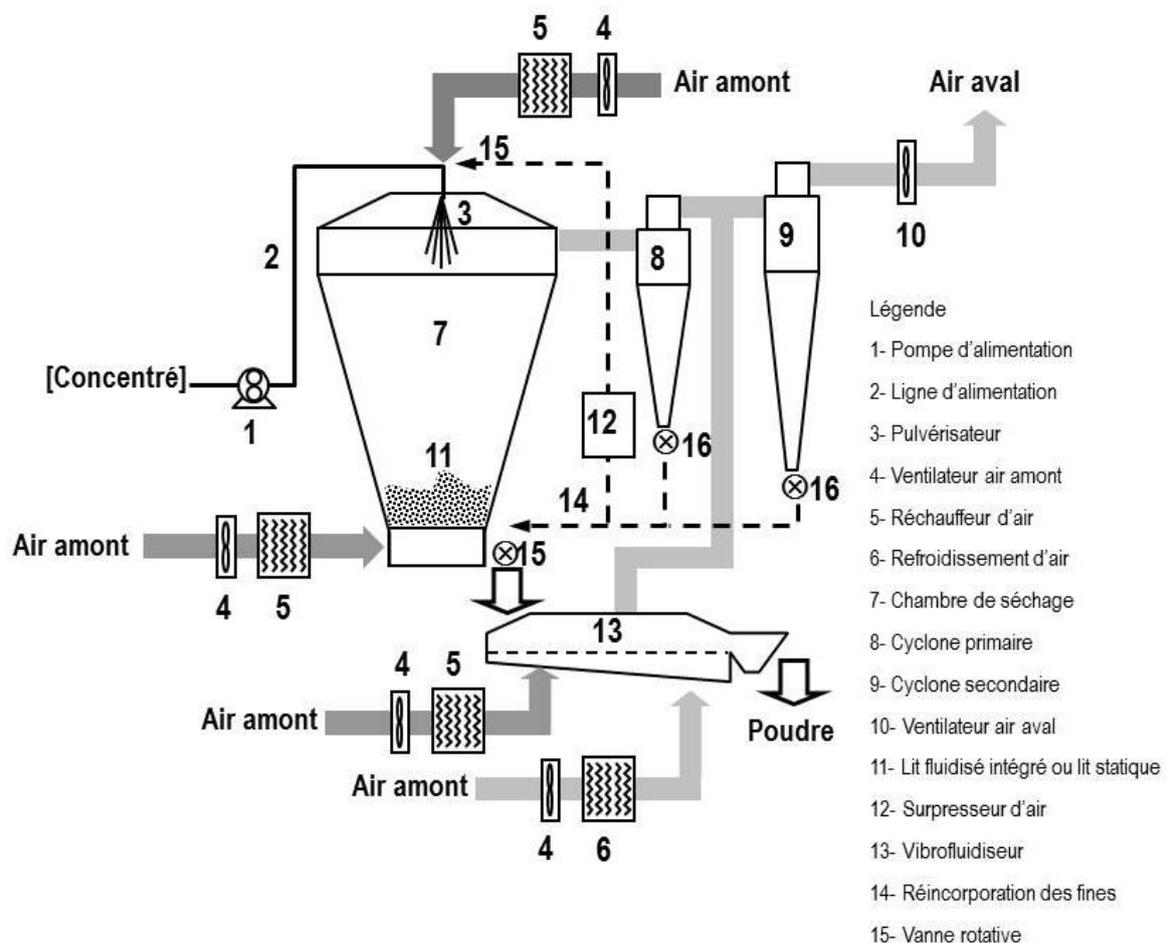
Les premières étapes du processus de production de la poudre de lait impliquent la séparation du lait cru en lait écrémé et en crème par écrémage par centrifugation. La teneur en matière grasse est standardisée par élimination ou par ajout ajusté de crème. La teneur en lactose du lait peut être ajustée par addition de lactose cristallin afin d'obtenir la proportion protéine / glucides souhaitée dans le produit final. Une fois les produits standardisés, ils sont pasteurisés pour faciliter la conservation. Si du lait entier en poudre est produit, une étape d'homogénéisation est incluse avant le séchage pour disperser et stabiliser les globules gras. Le lait est ensuite concentré par des évaporateurs à effets multiples jusqu'à un niveau de d'extrait sec d'environ 45 à 50%. Alternativement à la concentration par évaporation, le lait écrémé peut être partiellement concentré par ultrafiltration pour obtenir non seulement l'élimination de l'eau mais aussi la concentration des protéines dans la fabrication des poudres de lait de spécialité appelées "concentrés de protéines du lait". Les laits concentrés sont ensuite séchés par atomisation ou sur séchoir à rouleau pour obtenir des poudres.



**Figure 1.** Processus de fabrication de la poudre de lait entier agglomérée  
(Walstra *et al.*, 2006).

Deux principales méthodes sont utilisées pour le séchage dans l'industrie laitière : le séchage au rouleau et le séchage par pulvérisation ou atomisation.

Dans le séchage par atomisation, le lait est d'abord concentré par évaporation, puis séché dans une tour d'atomisation. Au cours de la première étape du séchage, l'eau en excès, sous forme libre entre les particules des solides secs, est évaporée. Dans la dernière étape, l'eau contenue dans les pores et les capillaires des particules solides est également évaporée (Baylan *et al.*, 2003). La **figure 2** illustre le procédé d'atomisation à multiple effets.



**Figure 2.** Procédé d'atomisation à multiple effets (Jeantet *et al.*, 2006, Schuck 2011).

Le séchage par atomisation est la méthode la plus courante de déshydratation du lait et des produits laitiers. Il implique une élimination rapide de l'humidité, conduisant à la formation de lactose amorphe, qui forme une matrice continue dans laquelle les protéines, les globules gras et les cellules d'air se dispersent (Shrestha *et al.*, 2008). La technologie de séchage par atomisation, combinée à d'autres procédés unitaires, joue un rôle important pour répondre aux demandes du marché en matière de poudres présentant un large éventail de

propriétés fonctionnelles (Kelly *et al.*, 2002). La technologie de séchage par atomisation implique la transformation de l'émulsion de lait en un grand nombre de petites gouttelettes qui sont exposées à un courant d'air chaud rapide lorsqu'elles tombent dans la chambre de pulvérisation. À mesure que l'eau s'évapore des gouttelettes, celles-ci se transforment en particules de poudre (Birchal *et al.*, 2005). La première étape est relativement rapide, tandis que la dernière demande plus d'énergie et de temps. Le produit sera sensiblement affecté par la chaleur si ce séchage est effectué de telle manière que les particules de lait soient en contact avec les surfaces chaudes de transfert de chaleur - comme dans le cas du séchage sur rouleaux (Baylan *et al.*, 2003).

Trois types de poudre de lait sont connus sur le marché : le lait en poudre écrémé, entier et la poudre de lait instantanée.

Le lait écrémé en poudre est le type de lait en poudre le plus courant. Chaque domaine d'application a ses propres exigences spécifiques en matière de lait en poudre. Si la poudre doit être mélangée à de l'eau dans du lait reconstitué pour la consommation, elle doit être facilement soluble et avoir le bon goût et la bonne valeur nutritive (Baylan *et al.*, 2003)

Le procédé de fabrication de la poudre de lait écrémé consiste à chauffer le lait écrémé (appelé préchauffage), à concentrer les solides du lait écrémé par évaporation jusqu'à 45-50% de solides totaux, à chauffer le concentré de lait écrémé, puis à sécher par pulvérisation le concentré de lait pour produire une poudre. En fonction de l'intensité du traitement thermique, le lait en poudre est classé dans des catégories liées aux combinaisons température-temps auxquelles le lait écrémé a été exposé avant l'évaporation et le séchage. Une température élevée dénature les protéines du lactosérum, le pourcentage dénaturé augmentant avec l'intensité du traitement thermique. Le degré de dénaturation est normalement exprimé par l'indice d'azote des protéines de lactosérum (WPNI) en milligrammes de protéines de lactosérum non dénaturées (U.W.P.) par gramme de poudre. Le lait écrémé en poudre est classé en trois types sur la base de l'indice WPNI, qui est corrélé aux conditions de séchage par pulvérisation : poudre à basse température (70 °C/15 sec, WPNI >6,0 mg g<sup>-1</sup> u.w-p), poudre à température moyenne (85 °C/20 sec, WPNI 5-6,0 mg g<sup>-1</sup> u.w-p) et poudre à haute température (~135 °C/30 sec, WPNI <1,4 0 mg g<sup>-1</sup> u.w-p) (Bylund *et al.*, 2003).

Le lait entier en poudre: dans sa fabrication, il est soumis à une série de processus tels que l'agitation, le pompage, le chauffage, la concentration, l'homogénéisation et le séchage par pulvérisation (Ye *et al.*, 2007). Le lait entier en poudre, contrairement au lait écrémé en

poudre, n'est pas classé par catégorie. Le lait destiné au lait entier en poudre est normalement pasteurisé à 80 – 85°C pour inactiver la plupart des enzymes lipolytiques qui, autrement, dégraderaient la matière grasse du lait pendant le stockage. Ces traitements provoquent un certain nombre d'interactions physiques et chimiques entre les composants du lait (Ye *et al.*, 2007). Le lait entier en poudre a une durée de conservation maximale d'environ 6 mois. Cela s'explique par le fait que le lipide contenu dans la poudre s'oxyde pendant le stockage, ce qui entraîne une détérioration progressive du goût (Baylan *et al.*, 2003).

Lait instantané en poudre : il existe également des méthodes spéciales pour la production de lait écrémé et de lait entier en poudre ayant une très bonne solubilité - connu sous le nom de poudre instantanée. Cette poudre a une granulométrie plus importante, sous l'influence de l'agglomération, que la poudre de pulvérisation normale et se dissout instantanément, même dans l'eau froide (Baylan *et al.*, 2003).

## **I.2. L'Algérie et le marché mondial de la poudre de lait**

L'Algérie est le plus gros consommateur de lait en Afrique du Nord. En effet, le lait occupe une place importante dans l'alimentation de la population algérienne. Cela est dû aux traditions de consommation, à la valeur nutritionnelle du lait, à sa substitution aux viandes relativement onéreuses et au soutien de l'État, qui sont autant de paramètres qui ont stimulé la consommation de lait. La production laitière algérienne n'est pas suffisante pour répondre aux besoins de l'industrie laitière. Cette dernière est complètement déconnectée du secteur agricole. Seule une petite partie des besoins en lait est couverte par la production de fermes laitières Algériennes (Kacimi-El-Hassani 2013). L'industrie laitière algérienne opère principalement à partir de matières premières importées, de lait en poudre et de matières grasses laitières anhydres. Ces résultats expliquent pourquoi l'Algérie est le deuxième importateur de lait en poudre (Barrientos et Soria, 2019 ; Workman 2019).

Les besoins en lait et produits laitiers algériens sont considérables. La consommation de lait par les algériens est passée rapidement de 54 litres par personne et par an en 1970 à 112 litres par personne et par an en 1990, atteignant 120 litres en 2013 (Kacimi-El-Hassani 2013). Selon les statistiques du ministère Algérien de l'Agriculture et du Développement rural, la consommation domestique atteint 5 milliards de litres de lait par an et la production domestique est estimée à 2,5.109 litres (Algérie Press Service 2015).

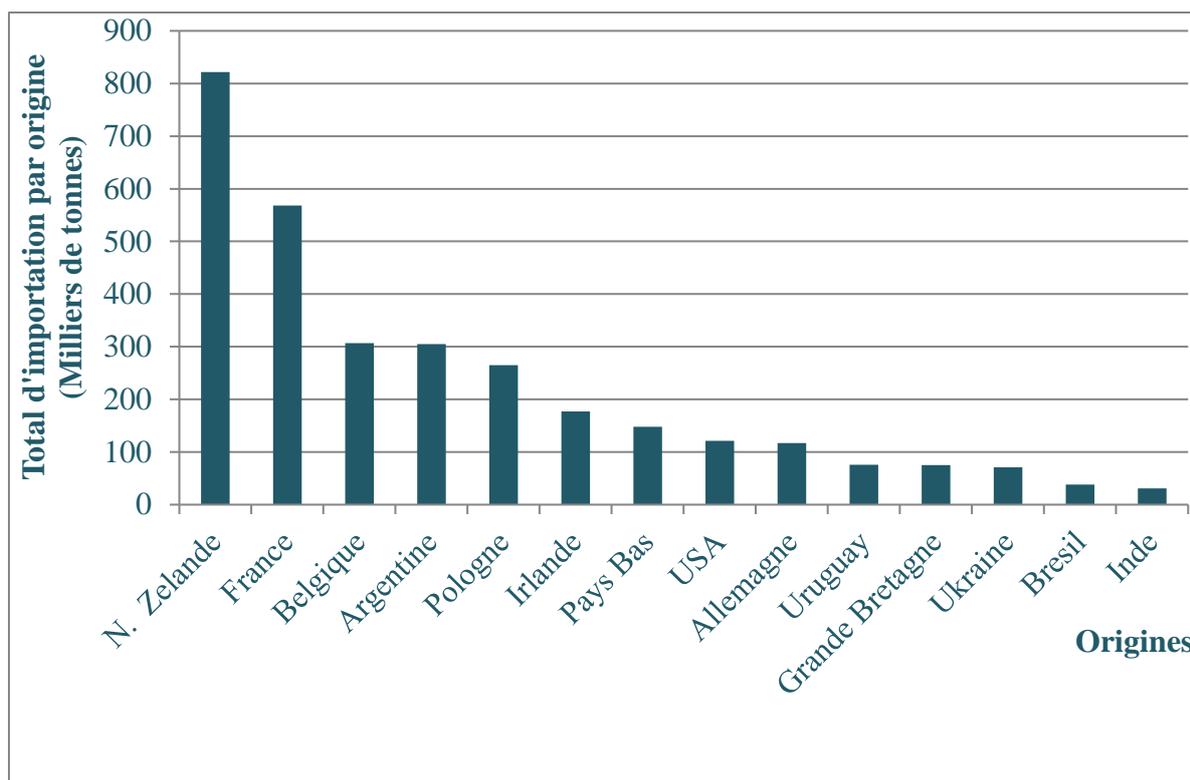
Ainsi, des milliards de litres de lait sont importés chaque année, principalement sous la forme de lait en poudre. L'évolution des importations algériennes de lait en poudre entre 2005 et 2019 est représentée sur **la figure 3**.



**Figure 3.** Évolution des importations algériennes de laits en poudre de 2005 à 2019  
(Source : CNIS, 2020).

Les pays européens dont la Pologne, l'Irlande et la Belgique ont été les principaux fournisseurs de lait en poudre pour l'Algérie. Ces trois pays, ralentissant les exportations vers l'Algérie. Ainsi, l'importation de lait Algérien s'est tournée vers la Nouvelle-Zélande, l'Ukraine et les États-Unis, augmentant la diversité des origines de la poudre de lait.

**La figure 4** représente les origines des importations de la poudre de lait en Algérie entre 2006 et 2015 selon les données du Centre national d'informatique et de statistiques douanières, Algérie.



**Figure 4.** Origines des importations algériennes de lait en poudre et de produits laitiers entre 2006 et 2015 (Source CNIS, 2016).

### I.3. Utilisation de la poudre de lait en Industrie laitière algérienne

En Algérie l'industrie laitière occupe une position de leader dans le secteur agroalimentaire public avec une valeur de production estimée en 2017 à plus de 3 milliards de Litres par an, cependant les poudres de lait restent largement dominantes dans la fabrication des produits laitiers reconstitués et recombines, principalement, le lait pasteurisé, les laits UHT, les laits concentrés, la crème, les glaces, les fromages frais, les laits fermentés (leben et yoghourt) et les desserts laitiers.

Les poudres de lait sont également utilisées comme ingrédients dans de nombreux produits alimentaires manufacturés dans lesquels les composants des produits laitiers, par exemple la matière grasse, les protéines, le lactose, les sels de lait, contribuent aux propriétés souhaitées du produit alimentaire. Les poudres de lait jouent un rôle nutritionnel en tant que source de nutriments et rôles fonctionnels physiques en contribuant à la texture et à l'attrait sensoriel du produit alimentaire final (Chandan et Kilara, 2011).

En Algérie, la structure de production par niveau de taille est asymétrique : 28% des usines installées sont de très petites laiteries (moins de 7.000 Litres/jour) et 20% de grandes

laiteries (plus de 100.000 litres/jour). Or, ce potentiel de production est sous-utilisé, puisque 50% des entreprises fonctionnent à moins de leur capacité installée ; 80% des entreprises fonctionnent à moins de 75% de leur capacité de production installée et seulement 20% travaillent à pleine utilisation. Il s'agit d'un trait caractéristique des entreprises alimentaires en Algérie qui ont fortement investi en capacité mais sans égard à la taille du marché.

Le nombre des entreprises de l'industrie du lait et des produits laitiers enregistrées au niveau du fichier du Centre national du registre de commerce (CNRC) était de 778 sociétés en 2016, selon l'étude de Kaci et Yahiaoui (2017) qui précise que 173 laiteries seulement sont répertoriées par la base de données de l'Office national interprofessionnel du lait (ONIL).

Ces entreprises laitières, où le poids du secteur privé est prépondérant avec 98% des entreprises, sont de création récente, puisque seulement 22% existaient avant l'année 2000, avance cette étude qui précise que 73% des laiteries en exploitation sont implantées au nord du pays.

L'étude révèle aussi que les effectifs employés par les laiteries en activité sont estimés à 14.400 employés directs, soit une moyenne de 105 employés par laiterie, ajoutant que cette ressource humaine est dominée par les exécutants (63%), maîtrise (25%) et encadrement (12%).

Une majorité de laiteries (64%) adhère au programme du lait subventionné de l'ONIL et produisent le lait pasteurisé conditionné à partir de la poudre de lait importée par l'Office, tandis que 25% commercialisent du lait cru local pasteurisé ou stérilisé, et 11% seulement produisent du lait UHT (Ultrat Haute Température) et ses dérivés à partir des matières importées et non subventionnées.

Une large gamme de produits est commercialisée par ces entreprises, comme le lait en poudre, le lait liquide pasteurisé et conditionné en sachet, le lait liquide stérilisé (UHT), les laits fermentés (Yaourts, L'ben et Raib), les laits gélifiés, les laits combinés (lait aromatisé, lait chocolaté) et les boissons lactées (jus au lait).

Sur le plan de la consommation, les produits laitiers occupent la 4ème position dans la hiérarchie des dépenses alimentaires des ménages (8% des dépenses alimentaires), soit une moyenne de 4.304 Dinar Algérien par an (DA/an), dont près de 39% pour le lait en sachet et 29% pour les autres laits (concentré, caillé), tandis que le reste porte sur les produits dérivés, selon l'étude qui cite aussi les chiffres d'une enquête de l'Office nationale des statistiques (ONS) réalisée en 2011.

L'étude montre, par ailleurs, que le niveau moyen de consommation par habitant des produits laitiers en 2015 était de 66,1 litres/an de lait conditionné en sachet et boîte, 16,7

litres/an des autres laits (UHT et en poudre), 4,8 litres/an de lait frais, 2 litres/an de lait acidulé, soit un total de 87,6 litres/an.

S'agissant des importations du lait de consommation ou la poudre de lait pour la transformation, issu des importations, sous toutes formes (poudre de lait, lait en poudre), elles avaient atteint plus de 370.000 tonnes en 2015, note l'étude qui souligne que ces importations sont en moyenne de 107 milliards de DA/an (1,07 milliard de dollars) contre des exportations marginales vers la Libye ou la Mauritanie (618.135 dollars) (Kaci et Yahiaoui 2017).

#### **I.4. Les problèmes posés par l'utilisation de la poudre de lait**

Les défauts signalés dans la littérature et qui ont été résumés par Hammer et Babel (1957) ne sont presque jamais trouvés à l'heure actuelle, en raison des améliorations de la technologie des procédés et le contrôle des laboratoires par l'industrie. En revanche, les défauts microbiens peuvent être divisés en : a) celles qui sont dues à des organismes de haute résistance à la chaleur qui survivre à un traitement thermique légèrement inadéquat et (b) ceux qui gagnent entrée après traitement thermique, et qui sont généralement de faible résistance thermique. La plupart des formes résistantes à la chaleur sont des espèces du genre *Bacillus*, bien qu'une espèce occasionnelle du genre *Clostridium* ait été rencontrée. Le *Bacillus coagulans* et le *Bacillus stearothermophilus* peuvent causer une coagulation acide et une légère odeur et saveur de fromage, et "aigre-douce". Ces organismes se développent mieux à 37°C et plus, et à des températures de stockage élevées et toujours un refroidissement insuffisant est des facteurs de ce type de détérioration. *Bacillus subtilis* provoque un caillé non acide, qui peut ensuite être digéré en un liquide avec un goût amer. Le coagulum formé par le *Bacillus megaterium* est accompagnée de gaz et d'une odeur de fromage.

La production de gaz associés à la putréfaction et une odeur de sulfure d'hydrogène ont été a été signalé comme étant causé par un *Clostridium* sp., mais ce type de défaut est très rare. Les boîtes de conserve gonflées sont beaucoup plus souvent causées par un produit chimique action sur le métal de la canette ou par remplissage excessif des canettes avec du froid le lait, qui se développe ensuite sur le chauffage.

La contamination consécutive au chauffage peut entraîner une plus grande variété de défauts. Les fuites dans la fermeture hermétique du récipient peuvent être dues à une fermeture incorrecte, une corrosion ultérieure ou des dommages mécaniques pendant manipulation ultérieure ; même une fuite momentanée peut permettre une entrée. De tels

problèmes devraient être rares ; mais s'ils surviennent, alors les conséquences peuvent être graves (Robinson 2002).

## **II. Flore aérobie sporulée inféodée la poudre de lait**

### **II.1. Microbiologie générale de la poudre de lait**

En raison de la demande accrue dans le marché mondial et le marché Algérien sur les produits laitiers, y compris les poudres de lait qui sont incorporées dans des formulations laitières et alimentaires, il est important de connaître le microbiote associé afin d'optimiser la sécurité et la qualité de ce produit. L'origine de la contamination par des bactéries nuisibles varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation.

Parlant des bactéries pathogènes, les poudres de lait sont très sensibles à la contamination par *Staphylococcus aureus*. Xing et al. (2016) ont signalé la prévalence de cette bactérie dans une usine de transformation de lait de chèvre en poudre. *Staphylococcus aureus* se développe bien dans le lait reconstitué et produit des entérotoxines staphylococciques qui entraînent une entérototoxicose (Bogdanovicova et al., 2017). *Salmonella enterica*, autre bactérie pathogène, a également été signalée comme étant présente dans des poudres de lait (Cahill et al., 2008). La présence de ces agents pathogènes sensible à la chaleur reflète une contamination post traitement dans des conditions d'hygiène insuffisantes (Sadiq et al., 2018).

Les bactéries anaérobies facultatives ont aussi été signalées dans les poudres de lait à savoir : *Klebsiella oxytoca* (Buehner et al., 2015), *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter muytjensii* (Sonbolet et al., 2013), *Citrobacter freundii*, *Enterobacter hormaechei* (Giammanco et al., 2011), et *Cronobacter sakazakii* ex. *Enterobacter sakazakii* (Fang et al., 2015 ; Sonbol et al., 2013 ; Jacobs et Hammer, 2011). Il convient de noter que les infections associées avec le *Cronobacter sakazakii* tuent 40-80% des nourrissons en cas de consommation de poudres infantiles contaminées (Nazarowec-White et Farber 1997).

Outre les bactéries pathogènes sensibles à la chaleur, l'industrie laitière doit faire face à des défis dus à la présence de spores bactériennes dans la poudre de lait et dans les produits laitiers. Les études ont rapporté la présence des bactéries anaérobies formant des spores dans les poudres de lait, comme le *Clostridium halophilum* (Buehner et al., 2015), *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cochlearium*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium lundense*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sporogènes*,

*Clostridium tyrobutyricum* (Barash *et al.*, 2010). *Clostridium botulinum* qui est très rarement isolé du lait cru, il a été enregistré par Brett *et al.* (2005) dans la poudre de lait infantile. *Clostridium botulinum* est le problème de sécurité le plus grave pour les poudres de lait infantiles ; sa neurotoxine est considérée comme la plus puissante toxine d'origine naturelle (Dhaked *et al.*, 2010).

## **II.2. Les bacilles aérobies formant des spores isolés à partir de la poudre de lait**

Les bacilles aérobies formant des spores sont particulièrement problématiques en raison de leur capacité à produire des spores hautement thermorésistantes et des enzymes responsables d'altération (Sadiq *et al.*, 2016 ; Lücking *et al.*, 2013) et la formation de biofilms sur les surfaces au sein des usines de fabrication de produits laitiers (Marchand *et al.*, 2012 ; Flint *et al.*, 2001). **Le tableau 1.** résume les bactéries sporulées aérobies ou anaérobies facultatives qui ont été détectées dans les poudres de lait dans le monde entier. Les espèces du genre *Bacillus* sont considérées comme les principaux contaminants bactériens des poudres de lait, suivies par les espèces appartenant aux genres *Geobacillus* et *Anoxybacillus*.

**Tableau 1. Les bactéries aéro-anaérobies facultatives formant des spores identifiées dans les poudres de lait.**

Bactéries contaminantes	Références
<i>Aeribacillus pallidus</i>	Miller <i>et al.</i> , 2015; Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	Yuan <i>et al.</i> , 2012
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	Ronimus <i>et al.</i> , 2003; Rueckert <i>et al.</i> , 2005; Reginensi <i>et al.</i> , 2011; Yuan <i>et al.</i> , 2012 ; Sadiq <i>et al.</i> , 2016; VanderKelen <i>et al.</i> , 2016
<i>Anoxybacillus spp.</i>	Miller <i>et al.</i> , 2015; Trmcic <i>et al.</i> , 2015; Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus aerophilus sensu lato</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus altitudinis</i>	Buehner <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	VanderKelen <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus cereus sensu lato</i>	Reyes <i>et al.</i> , 2007; Kumari et Sarkar 2014 ; Buehner <i>et al.</i> , 2015; Miller <i>et al.</i> , 2015; Sadiq <i>et al.</i> , 2016; Zhang <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus circulans</i>	Ruckert <i>et al.</i> , 2004; Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus clausii</i>	Miller <i>et al.</i> , 2015; Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus coagulans</i>	Ruckert <i>et al.</i> , 2004; Ronimus <i>et al.</i> , 2006 ; Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ronimus <i>et al.</i> , 2003; Rueckert <i>et al.</i> , 2005; Ronimus <i>et al.</i> , 2006; Reginensi <i>et al.</i> , 2011; Yuan <i>et al.</i> , 2012; Buehner <i>et al.</i> , 2015; Miller <i>et al.</i> , 2015; Sadiq <i>et al.</i> , 2016; VanderKelen <i>et al.</i> , 2016 ; Zain <i>et al.</i> , 2016.
<i>Bacillus megaterium</i>	Reginensi <i>et al.</i> , 2011; Buehner <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus pumilus</i>	Ruckert <i>et al.</i> , 2004; Reginensi <i>et al.</i> , 2011; Buehner <i>et al.</i> , 2015; Miller <i>et al.</i> , 2015; Sadiq <i>et al.</i> , 2016; VanderKelen <i>et al.</i> , 2016 ; Zain <i>et al.</i> , 2016.
<i>Bacillus shackletonii</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016a

**Tableau 1, suite. Les bactéries aéro-anaérobies facultatives formant des spores identifiées dans les poudres de lait**

<i>Bacillus sonorensis</i>	Buehner <i>et al.</i> , 2015; Sadiq <i>et al.</i> , 2016a
<i>Bacillus subtilis sensu lato</i>	Ronimus <i>et al.</i> , 2003; Rueckert <i>et al.</i> , 2005; Ronimus <i>et al.</i> , 2006 ; Reginensi <i>et al.</i> , 2011; Miller <i>et al.</i> , 2015; Sadiq <i>et al.</i> , 2016 ; Zain <i>et al.</i> , 2016.
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	Hammer <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	Yuan <i>et al.</i> , 2012 ; Miller <i>et al.</i> , 2015; Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Yuan <i>et al.</i> , 2012
<i>Brevibacillus brevis</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Geobacillus spp.</i>	Miller <i>et al.</i> , 2015; Trmcic <i>et al.</i> , 2015
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Ronimus <i>et al.</i> , 2003; Rueckert <i>et al.</i> , 2005; Yuan <i>et al.</i> , 2012 ; Buehner <i>et al.</i> , 2015; Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Geobacillus thermoleovorans group</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016; VanderKelen <i>et al.</i> , 2016
<i>Laceyella sacchari</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Lysinibacillus spp.</i>	Miller <i>et al.</i> , 2015
<i>Oceanobacillus spp.</i>	Buehner <i>et al.</i> , 2015
<i>Paenibacillus cookii</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	Zain <i>et al.</i> , 2016
<i>Paenibacillus macerans</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Paenibacillus spp.</i>	Miller <i>et al.</i> , 2015
<i>Sporosarcina contaminans</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016

### **II.3. Conditions environnementales influençant la croissance des spores aérobies isolées des poudres de lait**

Les principaux facteurs environnementaux qui affectent la croissance des bactéries sporulées sont la température, le pH et l'activité de l'eau (McClure 2006). En tenant compte le facteur température ces bactéries peuvent être classés en trois catégories : mésophiles, psychotolérants et thermophiles. *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* et *Bacillus subtilis* représentent les espèces mésophiles formatrices de spores qui sont détectées dans divers produits laitiers, y compris les poudres de lait (Lukášová *et al.*, 2001 ; Tatzel *et al.*, 1994 ; Phillips et Griffiths 1990). La croissance de ces bactéries pourrait être caractérisée par les valeurs cardinales ( $X_{min}$ ,  $X_{opt}$ ,  $X_{max}$ ). **Le tableau 2.** résume les valeurs cardinales des facteurs influençant la croissance de certaines bactéries aérobies sporulées.

**Tableau 2. Valeurs cardinales des paramètres de croissance de certaines bactéries aérobies sporulées.**

Souches	Valeurs cardinales de la croissance des bactéries sporulées									
	pH			Temps (°C)			a <sub>w</sub>			NaCl (%)
	Min	Opt	Max	Min	Opt	Max	Min	Opt	Max	
<i>Bacillus cereus</i>	4.3 <sup>(2)</sup>	6-7 <sup>(2)</sup>	9.3 <sup>(2)</sup>	3 <sup>(1)</sup>	30-37 <sup>(2)</sup>	55 <sup>(2)</sup>	0.92 <sup>(2)</sup>	0.99 <sup>(2)</sup>		Croissance max à 5%
<i>Bacillus subtilis</i>	4.5 <sup>(3)</sup>	–	8.5 <sup>(12)</sup>	10 <sup>(4)</sup>	–	45-55 <sup>(12)</sup>	0.90 <sup>(5)</sup>	–	–	Croissance à 7% <sup>(12)</sup>
<i>Bacillus licheniformis</i>	4.5 <sup>(3)</sup>	–	8.5 <sup>(12)</sup>	5-10 <sup>(6)</sup>	–	50-55 <sup>(12)</sup>	0.89-0.91 <sup>(7)</sup>	–	–	Croissance à 7% <sup>(12)</sup>
<i>Bacillus pumilus</i>	5.2 <sup>(3)</sup>	–	8.5 <sup>(12)</sup>	4-7 <sup>(8)</sup>	–	50-55 <sup>(12)</sup>	0.95 <sup>(5)</sup>	–	–	Croissance à 7% <sup>(12)</sup>
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	5 <sup>(9)</sup>	–	7 <sup>(10)</sup>	40 <sup>(11)</sup>	55 <sup>(11)</sup>	65-68 <sup>(12)</sup>	0.93 <sup>(5-11)</sup>	–	–	Pas de Croissance à 7% <sup>(12)</sup>
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	8 <sup>(10)</sup>	–	10.5 <sup>(10)</sup>	30-45 <sup>(10)</sup>	55 <sup>(10)</sup>	75 <sup>(10)</sup>	–	–	–	Pas de Croissance à 7% <sup>(12)</sup>
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	–	–	–	20 <sup>(12)</sup>	–	45-55 <sup>(12)</sup>	–	–	–	Pas de Croissance à 7% <sup>(12)</sup>

<sup>(1)</sup>Drobniewski (1993) ; <sup>(2)</sup>Anses (2011) ; <sup>(3)</sup>Lindsay et al. (2000a) ; <sup>(4)</sup> Shapton and Shapton (1991) ; <sup>(5)</sup> Troller et Christian (1978) ; <sup>(6)</sup> Gibson et Gordon (1974) ; <sup>(7)</sup> Alzamora et al. (1995) ; <sup>(8)</sup> Meer et al. (1991) ; <sup>(9)</sup>Hill et Fields (1967) ; <sup>(10)</sup>Mcclure (2006) ; <sup>(11)</sup> Kotzekid (2014).

## II.4. Evolution des spores durant le processus de fabrication des laits en poudre

Le lait cru et l'environnement de la ferme peuvent contenir jusqu'à  $10^4$  ufc / mL de spores et sont considérés comme les principales sources de contamination du lait (Coorevits *et al.*, 2008, Scheldeman *et al.*, 2005). Cependant, pour garantir la stabilité des produits laitiers pendant de longues périodes à température ambiante, des procédés thermiques basés sur des températures élevées sont couramment utilisés dans l'industrie laitière (Prevost *et al.*, 2010). Les spores bactériennes peuvent survivre à des températures industrielles élevées. En générale, les traitements thermiques sont insuffisants pour inactiver la totalité des bactéries sporulées (Hornstra *et al.*, 2009). Dans le cas de la poudre de lait et après la standardisation du lait, la pasteurisation inactive les cellules végétatives mais présente un effet limité sur les spores bactériennes. La concentration de lait dans l'évaporateur est un danger critique pendant le processus de séchage du lait ; l'eau est éliminée par ébullition à basse pression. Les températures d'évaporation sont inférieures à 66-68°C afin de ne pas diminuer la qualité de la poudre de lait. Cette plage de température n'inactive pas les spores bactériennes mais plutôt favorise leur développement. Cela amène que la concentration en spores bactériennes dans les poudres de lait est plus élevée que dans le lait cru du fait que les spores sont concentrées pendant le processus de production de la poudre de lait (Hill et Smythe, 2012). La présence de fortes concentrations de ces sporogènes diminue la qualité du lait en poudre et est un indicateur de mauvaises pratiques de fabrication et de faibles niveaux d'hygiène dans la plante (Sadiq *et al.*, 2016).

Les spores bactériennes pourraient adhérer aux surfaces en acier et former des biofilms. Ensuite, les spores bactériennes peuvent recontaminer les produits laitiers pendant le processus de fabrication (Flint *et al.*, 2001).

Murphy et al. (1999) ont isolé *Bacillus licheniformis* et *Geobacillus stearothermophilus* du préchauffeur tubulaire et de l'évaporateur avant le séchage du lait. En 2007, Scott et al. ont isolé *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus* spp. à partir du préchauffeur (échangeur de chaleur à plaques) et de l'évaporateur dans une usine de traitement de poudre de lait. Murphy et al. (1999) ont enregistré une augmentation croissante de nombre des spores dans les évaporateurs en 4 heures et une contamination significative du système d'évaporation après 8 heures. Scott et al. (2007) ont constaté que le nombre de spores augmente à la fois dans le préchauffeur et l'évaporateur de 9 à 18 heures pendant les cycles de traitement de la poudre de lait entier. Après l'évaporation, le séchage par pulvérisation

n'élimine pas les spores bactériennes. Dans la chambre de pulvérisation, la température d'entrée de l'air est proche de 200°C et la température de sortie de l'air proche de 90°C. Cependant, les températures à l'intérieur et à la surface des gouttelettes de lait concentré varient entre la température du thermomètre humide, proche de 50°C, et la température de l'air de sortie. De plus, le passage des particules de lait dans la chambre de pulvérisation est rapide, en quelques secondes, de sorte que leurs dommages thermiques sont limités (Schuck *et al.*, 2005).

## **II.5. Incidence des bactéries aérobies formant des spores sur les poudres de lait.**

La contamination des poudres de lait par les bacilles mésophiles ou thermophiles ne fait pas l'objet d'une attention suffisante en Algérie, contrairement à d'autres pays du monde, il n'existe pas de législation limitant la présence de *Bacillus* dans les poudres de lait. Par ailleurs, la présence de bactéries aérobies sporulées dans les poudres de lait importées pose de graves problèmes de sécurité et de qualité. *Bacillus* spp. produisent des toxines et des enzymes d'altération qui provoquent des défauts structurels, chimiques et sensoriels réduisant la durée de conservation des poudres de lait et des produits laitiers.

### **II.5.1. Production de toxine**

Certaines bactéries aérobies du genre *Bacillus* sont connues pour provoquer des intoxications alimentaires par la production de toxines. Les espèces les plus courantes responsables de ces intoxications sont des souches de *B. cereus* qui présentent des phénotypes et des effets pathologiques très différents (Logan et De Vos, 2009). *Bacillus cereus* peut provoquer deux types de syndromes d'intoxication alimentaire : un type émétique et un type diarrhéique. Le symptôme émétique est causé par le céréulide, un dodécadepsipeptide cyclique thermostable codé par les gènes CES (Ehling-Schulz *et al.*, 2005 ; Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Le symptôme diarrhéique est causé par trois entérotoxines thermolabiles : l'hémolysine BL, l'entérotoxine non hémolytique et la cytotoxine K. L'hémolysine BL est transcrite à partir des gènes hblA (codant pour B), hblC (codant pour L2) et hblD (codant pour L1) organisés en un seul opéron (Bhunia 2008). Le complexe d'entérotoxine non hémolytique (NHE) est codé par les gènes nheA, nheB et nheC, et est également organisé dans un opéron (Granum *et al.*, 1999). La protéine cytotoxine K (cytK) est qualifiée hautement cytotoxique, considérée comme le principal facteur de virulence dans la diarrhée nécrotique et hémolytique de *Bacillus cereus* (Lund *et al.*, 2000).

Outre *Bacillus cereus*, les espèces de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* et *Bacillus licheniformis* ont des gènes codant pour les entérotoxines (Beatties et Williams, 1999). Taylor et al. (2005) ont noté que les souches de *Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus* et *Bacillus simplex* produisent des toxines thermostables qui présentent des caractéristiques physiques similaires à celles du céréulide, la toxine émétique de *Bacillus cereus*. Cependant, Luking et al. (2013) ont rapporté que la cytotoxicité n'a été détectée que chez *Bacillus cereus*, ce qui suggère que le risque d'intoxication alimentaire par des spores aérobies thermorésistantes autres que celles du groupe *Bacillus cereus* est plutôt faible. Egalement, il convient de signaler que dans le monde entier, *Bacillus cereus* a été impliqué dans diverses intoxications alimentaires (Aouadhi *et al.*, 2013 ; Bennett *et al.*, 2013 ; Merzougui *et al.*, 2013 ; Al-Abri *et al.*, 2011 ; Bottone 2010 ; Delmas *et al.*, 2010 ; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Toutefois, les intoxications alimentaires associées à *Bacillus* peuvent être confondues avec les intoxications alimentaires à *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens* en raison de symptômes similaires (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Cela conduit à une sous-estimation du nombre de cas d'intoxication alimentaire causés par *Bacillus*.

### **II.5.2. Production d'enzyme d'altération**

De nombreuses études ont noté que les *Bacillus* spp. produisent une variété d'enzymes extracellulaires, y compris des amylases, des hémolysines, des lécitinases, des phospholipases, des protéases, des bêta-lactamases et des sphingomyélinases (Mehta *et al.*, 2019 ; Arslan *et al.*, 2014 ; Lücking *et al.*, 2013 ; De Jonghe *et al.*, 2010 ; Logan et De Vos 2009 ; Molva *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2004 ; Celestino *et al.*, 1997). La présence et la croissance de ces espèces ainsi leurs enzymes associées affectent principalement la qualité du lait et des produits laitiers.

Il est important de rappeler la faible activité de l'eau de la poudre de lait qui varie de 0,25 à 0,35 pour la poudre de lait entier (Baechler *et al.*, 2005) et de 0,32 à 0,43 pour la poudre de lait écrémé (Shrestha *et al.*, 2008). Ces faibles teneurs en activité de l'eau dans les poudres de lait limitent considérablement la croissance microbienne et les activités enzymatiques. En raison de leur nature relativement fragile, la stabilité des enzymes est fortement influencée par l'activité de l'eau (Acker 1969). La plupart des enzymes et des protéines doivent maintenir leur conformation pour rester actives. Ce qui explique l'importance du maintien des niveaux critiques de l'activité de l'eau pour préserver la qualité des aliments.

Cependant, des études ont suggéré que les changements dans les poudres de lait pendant le stockage ne sont pas seulement causés par des réactions chimiques (*Stapelfeldt et al.*, 1997 ; Renner 1988), mais sont également dus à une faible activité enzymatique (Chen 2000 ; Celestino *et al.*, 1996). Dans la poudre de lait, la faible activité de l'eau explique l'absence des formes végétatives des cellules bactériennes, mais leurs enzymes peuvent être actives (Chen *et al.*, 2003). La plupart des réactions enzymatiques sont ralenties lorsque l'activité de l'eau est inférieure à 0,80. Cependant, certaines réactions se produisent même à des teneurs très faibles en activité d'eau (Labuza 1970). Les recherches menées par Chen et al. (2004) ont montré que la lipolyse peut se produire dans des poudres de lait entier ayant une activité d'eau de 0,30 ; après un stockage de 2 semaines à 37°C, les niveaux d'acides gras libres à chaîne courte dans les poudres dépassent les valeurs seuils sensorielles dans le lait entier en poudre reconstitué à 125 g L<sup>-1</sup>. Une fois la teneur de l'activité de l'eau augmente pour arriver à 0,80 dans les produits laitiers recombinaés, les activités enzymatiques augmentent et les spores bactériennes germent puis se développent pour que les cellules végétatives des bactéries sporulées produisent de nouveau des enzymes extracellulaires.

Les problèmes du goût et les défauts de texture des produits laitiers ont été attribués à l'activité enzymatique (Ray 2004). L'organisme d'altération le plus important dans l'industrie laitière est *Bacillus cereus*, qui provoque des défauts de "crème liquide" dus à l'activité de la lécitinase et de "caillage doux" dus à l'activité protéolytique (Heyndrickx et Scheldeman, 2002). En outre, la détérioration lipolytique du lait engendre aussi des défauts de goût qui sont associés à la dégradation de la matière grasse. Les acides gras libres se libèrent et donnent naissance à des saveurs désagréables, telles que des saveurs rances, butyriques, savonneuses et astringentes (Bhunja 2008). L'activité enzymatique peut être influencée par divers facteurs à savoir la température et le pH. **Le tableau 3** regroupe les enzymes produites par les espèces de *Bacillus* ainsi les facteurs influençant l'activité enzymatique.

**Tableau 3.** Diverses caractéristiques des enzymes obtenues à partir d'espèces de *Bacillus*

Types d'enzyme	Origine	T °C <sup>Min</sup>	T °C <sup>opt</sup>	T °C <sup>max</sup>	pH <sup>min</sup>	pH <sup>opt</sup>	pH <sup>ma</sup>	Références
lipase	<i>Bacillus sp.</i> <b>REF</b>	10	60	80	4	9	11	Gori et al. (2011)
lipase	<i>Bacillus sp.</i> <b>REF</b>	30	60	70	4	5.5-7.2	9.5	sugihara et al (1991)
lipase	<i>Bacillus sp. Thermophilic</i> <b>REF</b>	–	60-65	–	–	8.5	–	Nawani et al. (2006)
lipase	<i>Bacillus cereus</i> <b>REF</b>	30	40	60	NM	7.5	NM	El-Shafei et Rezkallah (1997)
lipase	<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	–	55	–	6,5	8.5	9.5	Kumar et al. (2005)
lipase	<i>Bacillus coagulans</i> ZJU318	40	45	60	7	9	10	Lianghua et Liming (2005)
lipase	<i>Bacillus licheniformis</i> (clone) <b>REF</b>	30	60	80	6	9	14	Kaur et al. (2016)
lipase	<i>Bacillus licheniformis</i> VSG1	20	55	70	8	9	12	Sangeetha et al. (2010)
lipase	<i>Bacillus subtilis</i> (clone) <b>REF</b>	37	43	47	7	8.5	9.5	Ma et al. (2006)
lipase	<i>Bacillus subtilis</i> 168	15	35	55	6	10	12	Lesuisse et al. (1993)
lipase	<i>Bacillus thermoleovorans</i> ID-1	–	70-75	–	–	7.5	–	Lee et al. (1999)
<b>Protease</b>	<i>Bacillus sp.</i> <b>REF</b>	–	50-55	–	6	11.12	12	Kumar et al. (1999)
<b>Protease</b>	<i>Bacillus cereus</i> HUTBS62	25	80	100	4.8	6.8	10.8	Aqel et al. (2012)
<b>Protease</b>	<i>Bacillus cereus</i> MCM B-326	25	55	65	6	9	12	Nilegaonkar et al. (2007)
<b>Protease</b>	<i>Bacillus licheniformis</i> <b>REF</b>	–	55	65	–	9	–	Al shehri et al. (2004)
<b>Protease</b>	<i>Bacillus licheniformis</i> VSG1	20	45	70	5	9	12	Sangeetha et al. (2010)
<b>Protease</b>	<i>Bacillus subtilis</i> <b>REF</b>	20	40	80	–	14	–	Badhe et al. (2016)
<b>Protease</b>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> B-1172 (clone)	–	90	100	5	9	11	Iqbal et al. (2014)

<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 (Thermophilic)	40	90	100	6	8.5	12	Vieira de Carvalho et al. (2008)
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<i>Bacillus sp.</i> <i>REF</i>	–	70	–	–	9	–	Lin et al. (1998)
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<i>Bacillus sp.</i> BKL20	–	60-70	–	4	7	12	Kubrak et al. (2010)
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<i>Bacillus sp.</i> PN5	30	90	110	4	10	12	Saxena et al. (2007)
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<i>Bacillus sp.</i> YX-1	30	45	70	4	5	11	Liu et Xu (2007)
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<i>Bacillus licheniform</i> TSI-14	50	70	90	5	7	9	Shukla et Singh (2015)
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 121	30	40	55	6.6	7.1	8.6	Raul et al. (2014)
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 5934	35	70	90	4	7	11	Fincan et Enez. (2014)
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<i>Anoxybacillus sp</i> YIM 342	30	80	90	3	9	11	Zhang et al. (2016)

La température optimale pour l'activité de la protéase produite par *Bacillus licheniformis* (Al Shehri et Mostafa, 2004) et *Bacillus cereus* (Nilegaonkar *et al.*, 2007) a été signalée comme étant de 55°C, même si Sangeetha *et al.* (2010) ont signalé une température optimale de 45°C pour une protéase produite par la souche VSG1 de *Bacillus licheniformis*. Une température optimale inférieure de 40°C a été signalée pour *Bacillus subtilis* (Badheet *et al.*, 2016). Pour *Geobacillus*, Iqbal *et al.* (2014) signalent une température optimale de 90°C pour la protéase produite par *Geobacillus stearothermophilus* B-1172.

Une température comprise entre 55°C et 60°C a été signalée comme étant la température optimale pour l'activité lipasique produite par un certain nombre d'espèces de *Bacillus* telles que *Bacillus licheniformis* (Kaur *et al.*, 2016 ; Sangeetha *et al.*, 2010). Des températures élevées de 70°C à 90°C ont été signalées comme étant la meilleure pour l'activité de  $\alpha$ -amylase par *Bacillus licheniformis* TSI-14 (Shukla et Singh, 2015) et *Anoxybacillus* sp YIM 342 (Zhang *et al.*, 2016). En revanche, une température optimale de 40°C a été signalée par Raul *et al.* (2014) pour *Bacillus subtilis* MTCC 121. Un pH moyen affecte tous les processus enzymatiques et le transport de divers composants à travers la membrane cellulaire. Comme la force motrice des protons en chimie est affectée par une valeur de pH moyenne, il est possible que dans une plage de pH optimale, l'efficacité métabolique relative soit élevée. Il s'agit donc d'un paramètre important à prendre en considération (Sharma *et al.*, 2017).

### **II.5.3. Thermorésistante des bactéries sporulées isolées de la poudre de lait**

Les spores de *Bacillus* spp. sont considérées comme les formes microbiennes les plus difficiles à inactiver dans l'industrie laitière. Cependant, différents traitements thermiques peuvent être utilisés lors de la fabrication de lait en poudre ou lors de la fabrication de produits laitiers tels que le lait pasteurisé et UHT, le fromage ou le yaourt. Au cours de ces processus, les populations de spores bactériennes vont évoluer, diminuer ou augmenter en fonction de leur thermorésistance et de leurs capacités de croissance. En fonction de l'intensité requise, les traitements thermiques pourraient affecter négativement la qualité des produits laitiers. Il est donc nécessaire de connaître la thermorésistance des spores bactériennes pour optimiser les processus de traitement thermique (Eijlander *et al.*, 2011 ; Hornstra *et al.*, 2009). **Le tableau 4** décrit les valeurs D (temps de réduction décimale) et les valeurs z généralement rapportées pour l'inactivation thermique de certaines souches de *Bacillus*.

**Tableau 4.** Thermorésistance des bactéries sporulées isolées du lait ou de la poudre de lait.

Souches	D <sub>T</sub> minute			z °C
	100 °C	121 °C	140 °C	
<i>Bacillus cereus</i>	5 (1) 5.5 (2) 2.0- 5.4 (7) 2.06(10) 1.45*(11)			10 (1) 9.4 (5) 9.7 (2) 12.8 (10) 40.7* (11)
<i>Bacillus subtilis</i>	11 (1) 13.3 (2) 2.13 (10)	0.1 (4)		7 (1) 7.4 (2) 15.7 (10)
<i>Bacillus licheniformis</i>	13 (1) 13.5 (2) 4-8 (3) 5.6 (10)	0.135 (2)		6 (1-2) 16.8 (10) 8 *(12) 7.88**(12)
<i>Bacillus pumilus</i>	0.83(10)			9.7 (8-10)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	3000 (2)	4-5(1)	0.9 (8)	7(1-2) 7.54*(12) 7.89**(12) 9.1(8)
<i>Bacillus sporothermodurans</i>		0.32- 0.57(9)	3.4-7.9 (8)	13.1-14.2 (8)

(1)Ingram (1969) ; (2)Briggs (1996) ; (3)Brown (2000) ; (4)Jacob et al. (1973) ;(5)shehata et collin (1972); (7)wong et al. (1988) ; (8)Humer (1998) ; (9)Meler et al. (1996) ; (10)Janstova et Lukasova (2001) ; (11)Evelyn et al. (2016) ; (12)Behringer et Kessler (1992).(\*)in skim milk, (\*\*) skim concentrated milk.

La résistance à la chaleur des spores peut varier d'une espèce à l'autre et même entre les souches d'une même espèce (Berendsen *et al.*, 2014). Différentes espèces de *Bacillus* sont capables de former des spores très résistantes à la chaleur qui peuvent survivre aux régimes de chauffage couramment utilisés pour la conservation des aliments (Scheldeman *et al.*, 2006).

#### II.5.4. Formation de Biofilm

À partir de la poudre de lait utilisée dans l'industrie laitière, les bactéries sporulées contaminent les chaînes de transformation du lait et les produits laitiers, soit sous forme de cellules végétatives, de spores ou d'amas détachés biofilm qui adhèrent aux composants de surface (Gopal *et al.*, 2015). L'acier inoxydable est utilisé pour les équipements des usines de

fabrication de produits laitiers en raison de sa résistance mécanique, de sa résistance à la corrosion et de sa longévité.

Le genre *Bacillus* est fréquemment détecté dans les biofilms courants de l'industrie laitière. Les biofilms développés à partir de ces organismes sont définis comme des biofilms de processus (Flint *et al.*, 1997). Les spores aérobies thermophiles / thermoduriques identifiées dans les produits laitiers et dans leur usines de fabrication appartiennent aux genres *Bacillus* et *Geobacillus*. *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* et *Geobacillus* sp. (Principalement *G. stearothermophilus*) ont été fréquemment identifiés dans les biofilms des produits laitiers (Shaheen *et al.*, 2010 ; Burges *et al.*, 2009 ; Scott *et al.*, 2007 ; Parkar *et al.*, 2001 ; Murphy *et al.*, 1999 ; Flint *et al.*, 1997). En ce qui concerne *Anoxybacillus flavithermus*, des publications antérieures ont démontré ses capacités de formation de biofilms et se sont concentrées sur la physiologie des biofilms matures (18 h) liée à l'effet de différents régimes de nettoyage (Parkar *et al.*, 2003).

Sharma et Anand (2002) ont montré que plus de 12% du microbiote se développant dans les biofilms des plantes laitières appartenait à *Bacillus cereus*. Les fortes propriétés d'adhérence des spores de *Bacillus cereus* ont été attribuées au caractère hydrophobe de son exosporium, qui peut varier selon les espèces, et à la présence d'appendices à la surface des spores (Faille *et al.*, 2001). Un biofilm plus épais de *Bacillus cereus* se développe à une interface air-liquide, par rapport à un système immergé. Cela suggère que le biofilm de *B. cereus* peut se développer en particulier dans les systèmes de stockage et de tuyauterie industriels qui sont en partie remplis pendant le fonctionnement ou lorsque le liquide résiduel est resté après un cycle de production (Wijman *et al.*, 2007). La formation d'un biofilm par *Bacillus cereus* est considérée davantage comme une stratégie de survie que comme un facteur de virulence (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Il a été étudié par de nombreux auteurs en référence à différents substrats tels que l'acier inoxydable, le polypropylène, le plastique et la laine de verre (Houry *et al.*, 2010 ; Elhariry 2008). Parmi les différents stades physiologiques de *Bacillus cereus* les spores ont le plus grand potentiel dans les biofilms formés (Pagedar et Singh, 2011). Les spores peuvent parfois atteindre jusqu'à 90% du nombre total de spores viables dans le biofilm (Wijman *et al.*, 2007). En outre, l'adhérence de *Bacillus cereus* aux surfaces en acier inoxydable augmente avec une augmentation de la température, une augmentation du pH et dans le temps (Pena *et al.*, 2014). La formation de biofilm peut même être observée à basse température. Kumari et Sarkar (2014) ont constaté que parmi 144 isolats de lait, de fromage et de crème glacée, la majorité (71-90%) des isolats étaient capables de

former un biofilm même à 4°C, tandis que dans le beurre, 100% des isolats étaient positifs. *Bacillus cereus* a besoin de composants laitiers supplémentaires tels que des tensioactifs naturels et des phospholipides pour coloniser les équipements en acier inoxydable, car il a été démontré par Shaheen et al. (2010) que certaines souches de *Bacillus cereus* peuvent former un biofilm dans le lait entier mais pas dans le lait dilué à l'eau, probablement en raison de la présence de composés tensioactifs dans le lait entier, comme le phospholipide qui est un composé tensioactif présent dans les globules gras du lait entier.

*Bacillus subtilis*, bacilles mésophiles, peut développer différents types de biofilms selon les conditions de culture, notamment des biofilms de colonies à l'interface air-solide, des pellicules flottantes à l'interface air-liquide et des biofilms submergés à l'interface liquide-solide. *Bacillus subtilis* est utilisée comme bactérie modèle formant des spores pour étudier la formation et la structure des biofilms (Si et al., 2016).

En revanche, *Bacillus licheniformis* a rarement été étudié pour sa capacité à former des biofilms robustes (Randrianjatovo et al., 2015 ; Pasvolsky et al., 2014). Gbalou et al. (2017) ont effectué une analyse in situ des biofilms de *Bacillus licheniformis*. Cette étude a donné un nouvel aperçu de l'interconnexion complexe des principaux composants de l'EPS qui régulent l'adhérence et l'agrégation de la matrice chez les *Bacillus licheniformis*.

Zhao et al. (2013) ont étudié les biofilms formés par des spores thermophiles dans l'industrie laitière. Les souches de *Geobacillus* les plus puissantes isolées pour la formation de biofilms appartiennent aux espèces *Geobacillus stearothermophilus* et *Geobacillus thermoglucosidans*. Les espèces de *Geobacillus* ont une plus grande capacité à former des biofilms aux interfaces air-liquide plutôt qu'aux surfaces immergées. Le *Geobacillus thermoglucosidans*, qui produit des spores thermostables, a besoin de composés protéolytiques provenant d'autres organismes de dégradation pour former des biofilms (Zhao et al., 2013). Flint et al. (2001) ont examiné le développement de biofilms de *G. stearothermophilus* sur de l'acier inoxydable en présence de lait. *Geobacillus stearothermophilus* a pu former des biofilms après une période d'incubation d'environ 6 heures en utilisant un réacteur de laboratoire à flux continu. Après 12 heures, le biofilm contenait jusqu'à  $10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup>.

Doyle et al. (2015) ont déclaré que *Geobacillus stearothermophilus* provoque une contamination persistante à long terme des lignes de transformation des produits laitiers car ils forment un biofilm sur les surfaces en acier inoxydable des équipements de transformation. Il est difficile d'éliminer les bacilles thermophiles en raison de leur large gamme de températures de croissance, de leur taux de croissance rapide, de la résistance de leurs spores à la chaleur et aux biocides et de leur capacité à former des biofilms (Parkar *et al.*, 2003 ; Flint *et al.*, 2001). *Geobacillus* sp. est connu pour être parmi les contaminants les plus courants des poudres de lait et est capable de survivre à la pasteurisation industrielle du lait cru et, par la suite, ses spores adhèrent aux surfaces et germent pour former des biofilms, ce qui entraîne la détérioration des produits laitiers (Seale *et al.*, 2012 ; Murphy *et al.*, 1999). Une grande capacité d'attachement et de formation de biofilms de *Geobacillus stearothermophilus* a été signalée (Jindal *et al.*, 2016).

La formation d'un biofilm par *Anoxybacillus flavithermus* a été observée par Burgess et al. (2009) qui ont démontré que la formation et la sporulation d'un biofilm peuvent se produire très rapidement, en 6-8 heures, avec des concentrations de spores dans le biofilm allant de 10% à 50% sur les comptes viables totaux. Cette observation importante montre que la présence de spores dans le biofilm pourrait considérablement augmenter sa résistance au nettoyage et aux températures élevées dans un environnement de transformation laitière.

Les cellules bactériennes de biofilms sont plus résistantes aux biocides et aux processus de nettoyage que les bactéries planctoniques. Leur élimination de l'industrie laitière est donc un défi (Srey *et al.*, 2013). Les bactéries aérobies sporulées comme *Bacillus cereus* et *Geobacillus* sp. sont impliquées dans la formation de biofilm dans différentes surfaces de transformation laitière, ce qui augmente leur résistance aux procédures de nettoyage et de désinfection (Kumari et Sarkar, 2016). De plus, ces biofilms se détachent de la surface et se dispersent, colonisant les environnements de transformation et entraînant la contamination des produits finis. Le détachement de Biofilm peut se produire par trois processus différents - (i) l'érosion qui se produit en raison des forces de cisaillement fluid ; (ii) l'abrasion, qui est le résultat de la collision de particules et (iii) l'envasement, qui peut être défini comme la perte instantanée de grandes parties ou de la totalité de biofilm (Garny *et al.*, 2008 ; Morgenroth 2003). Le biofilm peut être à l'origine de divers dangers potentiels pour l'industrie laitière. Il est essentiel que les entreprises maintiennent de bonnes pratiques d'hygiène et des stratégies strictes de surveillance et de contrôle de biofilm (Shaheen *et al.*, 2010 ; Flint *et al.*, 1997 ; McGuire et Kirtley, 1989).

## Deuxième partie :

### Matériel et méthodes

- I. Méthodologie des prélèvements**
- II. Dénombrement de la flore sporulée aérobie mésophile totale**
- III. Identification phénotypique et biochimique des bactéries aérobies thermorésistantes**
  1. Isolement et purification des isolats
  2. Description phénotypique et Biochimique des isolats
- IV. Identification moléculaire des isolats**
  1. Extraction de l'ADN génomique des isolats
  2. Typage moléculaire des isolats par la M13 RAPD
  3. Séquençage de l'ADNr 16S des isolats
  4. Séquençage du gène PanC des souches du groupe *Bacillus cereus*
- V. Etude de la thermorésistance des souches représentatives**
  1. Préparation des suspensions sporales
  2. Détermination de la thermorésistance de certaines souches représentatives
- VI. Etude de l'activité enzymatique des souches représentatives**
  1. Test de l'Activité protéolytique
  2. Test d'Hydrolyse de l'amidon
  3. Test de mise en évidence de la lécitinase

## **I. Méthodologie des prélèvements**

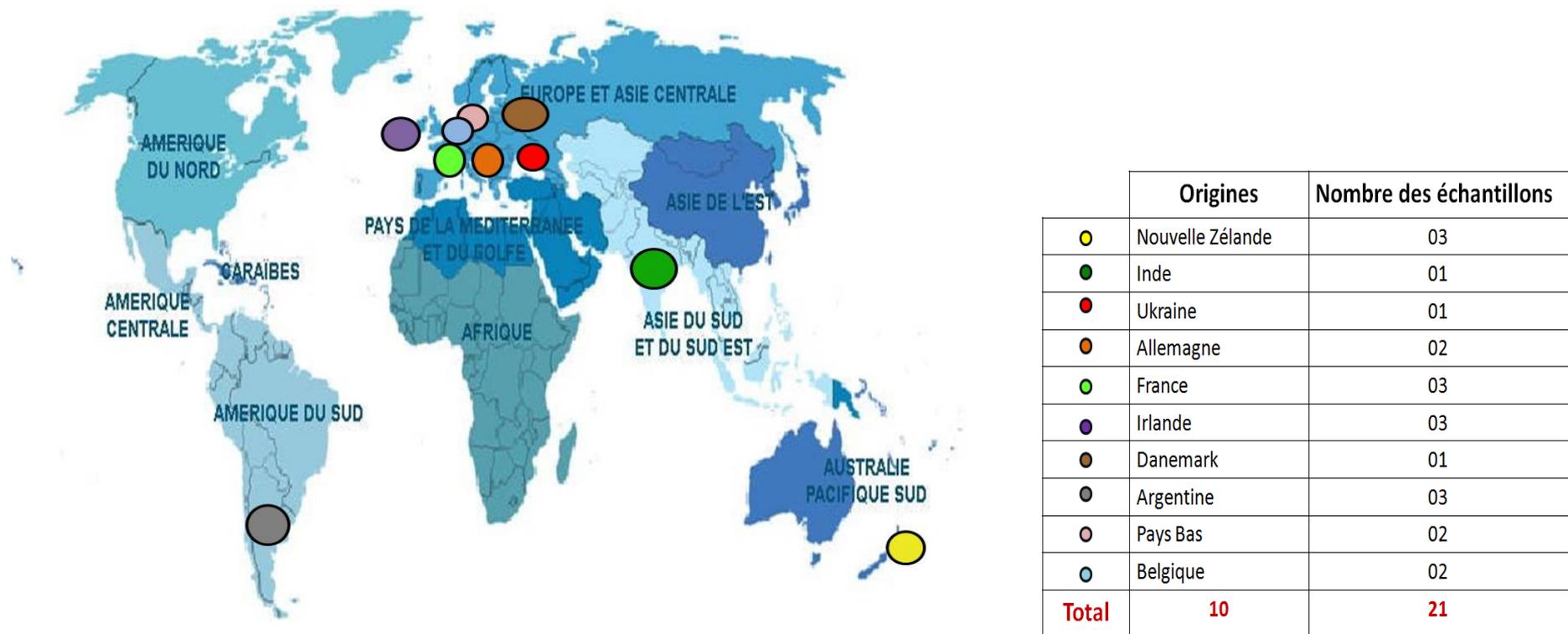
Le travail expérimental a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire et à l'Environnement (LAMAABE, Université de Tlemcen), au Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM, Quimper, Université de Bretagne Ouest, France) et au laboratoire de Biologie moléculaire de l'ADRIA développement (Association de Développement de la Recherche Industrie-Agriculture, Quimper, France).

Vingt et un (21) échantillons de poudre de lait importée et commercialisée en Algérie, provenant de dix origines différentes, ont été collectés durant les deux années 2014 et 2015. Les échantillons ont été obtenus auprès des laiteries de la région de la wilaya de Tlemcen (Algérie) et auprès du laboratoire vétérinaire régional de la même wilaya.

La liste et les provenances des échantillons sont données par la figure 5. Il s'agit de poudre de lait écrémé et de poudre de lait entier conditionnée dans des sacs de 25 kg.

Une quantité de 250 g de la poudre de lait a été prélevée aseptiquement et mise dans des sachets stériles. Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans une glacière. Pour la traçabilité, les échantillons ont été étiquetés de manière à avoir les informations suivantes : origine de la poudre, taux de la matière grasse, N° de lot, marque, fournisseur, date de fabrication, date de péremption, date et lieu de prélèvement.

Les échantillons ont alors été stockés au réfrigérateur à une température d'environ 4°C. En parallèle des doubles d'échantillons ont été stockés au congélateur.



**Figure 5.** Origines des échantillons de poudres de lait (PDL) analysés.

## II. Dénombrement de la flore sporulée aérobie mésophile totale

Dix (10) grammes de poudre de lait ont été dilués dans 90 mL de la solution de Ringer (Merck, Darmstadt/ Allemagne) diluée au quart obtenant ainsi la solution mère. On fait subir à celle-ci un traitement thermique à 80°C pendant 10 min, puis elle est refroidie aussi rapidement que possible dans un bain d'eau glacée. Une fois refroidie la solution mère, on réalise rapidement, une série de dilutions allant jusqu'à 10<sup>-5</sup>. De chaque dilution, deux fois 100 µL sont prélevés etensemencés en surface dans deux boites de Pétri contenant le milieu Plate Count Agar (PCA) (Biokar Diagnostics, Beauvais/France) puis incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures (Reginensi *et al.*, 2011). Les boites contenant entre 15 et 150 colonies ont été prises en compte pour le dénombrement.

**Le nombre des spores est calculé de la manière suivante :**

$$\frac{\sum C}{VmL(n_1 + 0.1n_2)xd_1}$$

$\sum C$  : Somme des colonies sur toutes les boites retenues de deux dilutions successives et contenant entre 15 et 150 colonies ;

**VmL** : Volume de l'inoculum appliqué à chaque boite en mL ;

**n<sub>1</sub>** : Nombre de boites retenues à la première dilution ;

**n<sub>2</sub>** : Nombre de boites retenues à la deuxième dilution ;

**d<sub>1</sub>** : Taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

A titre indicatif, le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale a été effectué de même que le dénombrement de la flore sporulée aérobie mésophile totale mais sans traitement thermique à 80°C pendant 10 min.

## III. Identification phénotypique et Biochimique des bactéries aérobies thermorésistantes

### III.1. Isolement et purification des isolats

A partir des boîtes de Petri utilisées pour le dénombrement, des colonies d'aspect différent ont été sélectionnées pour l'isolement avec un maximum de 3 colonies par boîte pour éviter autant que possible les doublons. Chaque colonie isolée a été ensemencée sur un bouillon Cœur-cervelle (BHIB, Difco 0037) et incubée à 30°C - 37°C pendant 24 h. A partir de ces jeunes cultures, on ensemence par stries des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (Biokar Diagnostics, Beauvais/France).

Le passage sur milieu liquide puis solide est renouvelé au moins deux fois pour l'obtention d'isolats purs.

### III.2. Description phénotypique et Biochimique des isolats

#### ▪ Description macroscopique

Les colonies pures obtenues après 24 heures d'incubation à 30°C- 37°C sur la gélose nutritive sont décrites sur le plan macroscopique : leur taille, leur forme et contour, leur couleur et leur brillance sont notés.

#### ▪ Morphologie microscopique

La morphologie microscopique et le mode d'arrangement des cellules ainsi que le type pariétal des isolats ont été déterminés sur des cultures jeunes fixées sur lame et colorées selon la technique de Gram. Seules les formes bacillaires sont retenues pour la suite du travail.

Les formes sporulées ont été mises en évidence sur les cultures âgées de plus de cinq jours après coloration simple au bleu de méthylène ou au vert de Malachite. Le principe de la coloration au vert de Malachite repose sur l'utilisation combinée de l'action de la chaleur et une forte concentration du colorant (Guiraud 2012). L'observation microscopique a été effectuée à l'objectif x100, la lame étant recouverte d'huile à immersion.

#### ▪ Description Biochimique

**Le test de production de la catalase** a été effectué par la mise en contact d'une ou deux colonies de chaque isolat à tester avec une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. La décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase est illustrée par un dégagement gazeux sous forme de mousse. L'équation de la décomposition est la suivante :  
$$2\text{H}_2\text{O}_2 \text{ (péroxyde d'hydrogène)} \xrightarrow{\text{catalase}} 2\text{H}_2\text{O} \text{ (eau)} + \text{O}_2 \text{ (Oxygène)} \text{ (Delarras 2007).}$$

**La recherche du cytochrome c-oxydase**, une enzyme catalysant une réaction durant laquelle l'oxygène est réduit en eau ou en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La mise en évidence de la présence de cette enzyme est effectuée en déposant une ou deux colonies pures sur des lames 4 zones réactionnelles (DrySlide™). Après environ 30 secondes, une coloration violette foncée apparaît sur le disque indiquant que le test oxydase est positif.

**Test du lait au tournesol** : la différenciation des isolats obtenus en fonction de leur action sur le lait notamment sa fermentation, sa réduction, la formation de caillé et la formation de gaz est réalisée grâce au test du lait au tournesol. La teinture de tournesol qui est un indicateur d'oxydo-réduction et de pH, est incorporé dans le lait. La fermentation du lactose du lait avec production d'acide lactique est mise en évidence quand la teinture de tournesol passe du mauve au rose. Si la production d'acide lactique est importante, les caséines, peuvent précipiter entraînant la formation d'un caillé. Chez certaines souches, le caillé se rétrécit et un exudat se forme à la surface. Le caillé acide est mis en évidence par l'inversement du tube. Le caillé reste alors en place. Certaines bactéries produisent une enzyme qui agit sur la caséine et, en présence d'ions calcium, forme un paracaséinate insoluble appelé caillé enzymatique. Contrairement au caillé acide, il s'agit d'un caillé semi-solide qui s'écoule lentement lorsque le tube est renversé. L'hydrolyse de la caséine entraîne la libération de grandes quantités d'ammoniac qui rend le milieu alcalin avec une odeur désagréable, la teinture de tournesol aura donc une couleur mauve. Une incubation prolongée aboutit à une clarification du lait due à une hydrolysée poussée de la caséine en peptides et en acides aminés. Le liquide surnageant opaque, qui ressemble à du petit-lait, prend une couleur brune (Aryal 2018).

Le lait au tournesol est préparé comme suit : Lait écrémé en poudre (100 g), teinture de tournesol (0,5 g), sulfite de sodium (0,5 g), 1000 mL eau distillée, pH 6,8. Les résultats sont obtenus après 5 à 7 jours d'incubation à 30°C.

#### **IV. Identification moléculaire des isolats**

##### **IV. 1. Extraction de l'ADN des isolats**

L'extraction de l'ADN bactérien a été effectuée selon le protocole décrit par Sambrook et Russel (2001). Les étapes du protocole d'extraction utilisé sont représentées sur la Figure 6 (page suivante)

L'ADN génomique total a été préparé à partir de 1,5 mL de souches bactériennes qui ont été cultivées sur bouillon BHI 24 heures à 30°C. Les pellets des souches ont été obtenus par centrifugation à 5000 g pendant 5 min après addition de 1.5 mL de Tris EDTA (TE 0.1 X).

La lyse cellulaire a été réalisée par addition de 0.2 mL d'une solution de lyse (2.5 mg / mL de lysozyme dans 10 mM de Tris-HCl (pH : 7), 20% de saccharose) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) et après incubation pour 45 min à 37°C. Ensuite, 0.5 mL de la solution de lyse (10 mM de Tris-HCl, pH 8 ; 1 mM EDTA ; 500 µg/mL protéinase K ; 1% SDS) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 min.

La précipitation des protéines a été réalisé par l'addition de 0.7 mL du phénol chloroforme. Le mélange a été centrifugé à 15000 g pendant 20 min et 0.6 mL de la phase aqueuse ont été récupérés. Par la suite, 200 µL de la solution acétate de Na 3M, pH=5.2 et 400 µL d'alcool isopropylique ont été ajouté. Après un repos de 30 minutes à -20°C, le mélange a été centrifugé à 10000 g pendant 10 minutes. Le culot a été lavé par 0.5 mL d'éthanol à 70%, puis centrifugé pendant 5 minutes à 10000 g.

L'ADN génomique obtenu a été purifié à l'aide du DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen France SAS). Le spectrophotomètre NanoDrop 2000 UV-Visible à spectre complet (A280) (Thermo Scientific™, Fisher Scientific SAS - Illkirch –France) a été utilisé pour quantifier et évaluer la pureté de l'ADN obtenu



**Figure 6.** Etapes d'extraction de l'ADN génomique des isolats obtenus des échantillons de la poudre de lait.

## IV.2. Typage moléculaire des isolats par la M13 RAPD

La technique RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) a été mise au point par l'équipe de William (William *et al.*, 1990). Elle est basée sur la réaction d'amplification en chaîne (PCR) de séquences prises au hasard d'ADN génomique. Son principe consiste à utiliser une seule amorce. Cette amorce joue à la fois le rôle d'amorce sens et anti-sens, qui peut s'hybrider avec ses séquences complémentaires dans toute partie du génome (Huybens *et al.*, 2009).

Le typage moléculaire des isolats par la technique RAPD-PCR a été réalisé au niveau du laboratoire de Biologie moléculaire de l'ADRIA développement (Quimper, France).

L'amorce testée est la M13 dont la séquence spécifique est: GAGGGTGGCGGCTCT (5' → 3').

Le volume final du Mix est égal à 50 µL. Il contient de l'ADN calibré à 10 ng/µL, du mélange de dNTPs (nucléotides), du MgCl<sub>2</sub>, de l'amorce, du diméthyl sulfoxyde et de l'ADN polymérase. **Le tableau 5** résume les volumes dans le mix PCR.

**Tableau 5.** Volumes des réactifs dans le mix de la PCR

Réactifs	Volumes
Amorce M13 RAPD	1.0 µL
Mix de dNTP	1.5µL
Tampon Standard Taq 10X	5.0µL
MgCl <sub>2</sub>	7.0µL
Taq DNA polymérase	0.2µL
ADN extrait calibré	10.0µL
H <sub>2</sub> O (QSP 50 µL)	25.3µL

Les cycles thermiques ont été réalisés dans un thermocycleur CFX96, selon le programme RT 403 RAPD Bacillus. Les différents paramètres de la PCR sont représentés dans **le tableau 6**.

**Tableau 6.** Paramètres de la PCR utilisée pour l'identification moléculaire des isolats de la poudre de lait

Cycle	Objectif	Etapes	Température (° C)	Durée (mn : sec)	Répétitions
1	Dénaturation	1	94	06 : 00	1
2	Amplification	1	94	01 : 00	40
		2	45	00 : 20	
		3	72	02 : 00	
3	Extension	1	72	10 : 00	1
4	Conservation	1	10	∞	1

Les produits obtenus par l'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (P/V) dans le tampon TBE 1X, en présence de marqueurs de poids moléculaire (Marker IV).

À chaque 10 µL d'échantillon d'ADN amplifié, 2 µL du Bleu de charge sont additionnés. Après homogénéisation, on dépose le mélange dans un puits correspondant du gel. Dans les deux puits des extrémités du gel, on dépose 20 µL du marqueur de poids moléculaire. La migration est réalisée à 100 V à la température ambiante pour une durée d'environ 4 heures.

La révélation se fait sous UV, on introduit le gel dans une solution de Bromure d'Ethydium (BET) pendant 30 min, on le rince avec de l'eau distillée avant sa visualisation. Chaque fragment d'ADN amplifié donne une bande sur le gel. Une photo du gel est réalisée grâce à l'analyseur d'image **Image Lab**.

La taille des produits d'amplification est vérifiée par comparaison avec la taille des séquences du marqueur. Le logiciel **BIONUMERICS** est utilisé pour étudier la similitude des profils.

### IV.3. Séquençage de l'ARNr 16S des isolats

Le gène 16S code la sous-unité 16S de l'ARN ribosomial (ARNr) et est essentiellement utilisé en raison de sa structure très conservée dans toutes les bactéries. En effet, il est constitué d'une succession de domaines conservés, sites de complémentarité pour les amorces universelles utilisées pour le séquençage de ce gène, et d'autres portions de séquences propres à un groupe de bactéries, nommées séquences signatures (espèce, genre, famille).

Le choix de l'ARNr 16S plutôt que 23S ou 5S est d'ordre technique (taille du gène, nombre d'informations) et, surtout, les banques de données de séquences du gène 16S sont aujourd'hui très développées. Enfin, l'identification est plus fiable.

Ainsi, l'identification des isolats par séquençage du gène 16SrRNA a été utilisée pour consolider les résultats de PCR en temps réel et pour étudier la présence potentielle d'autres espèces non ciblées par les biopuces PCR.

La lyse des colonies a été réalisée après un court battage de billes dans 200 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA de sodium, pH 8,0). Les gènes 16SrRNA bactériens ont été amplifiés en utilisant les amorces universelles w18 et w002 (Godon *et al.*, 1997). Des extraits purifiés ont été séquencés par Biofidal (Vaulx-en-Velin, France). Des séquences d'au moins 600 pb ont été comparées à des séquences connues dans la GenBank avec l'algorithme BLAST avancé (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). L'identification des isolats a été attribuée lorsqu'une homologie d'au moins 98% a été obtenue.

#### **IV.4. Séquençage du gène PanC des souches du groupe *Bacillus cereus***

Pour distinguer les groupes phylogénétiques de *B. cereus*, la séquence partielle du gène panC a été utilisée de la même manière que celle indiquée par (Guinebretière *et al.*, 2010). L'amplification PCR panC a été réalisée en utilisant un ensemble d'amorces pour l'identification des groupes de I à VI, à savoir 5'-TYGGTTTTGTYCCAACRATGG-3' et 5'-CATAATCTACAGTGCCTTTCG-3' comme amorces sens et anti-sens respectivement. La PCR a été réalisée dans un système de détection PCR en temps réel CFX96 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) avec une première étape de dénaturation à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles de 15 s à 94°C, 30 s à 55°C et 30 s à 72°C, et une prolongation finale de 7 min à 72°C (Guinebretière *et al.*, 2008).

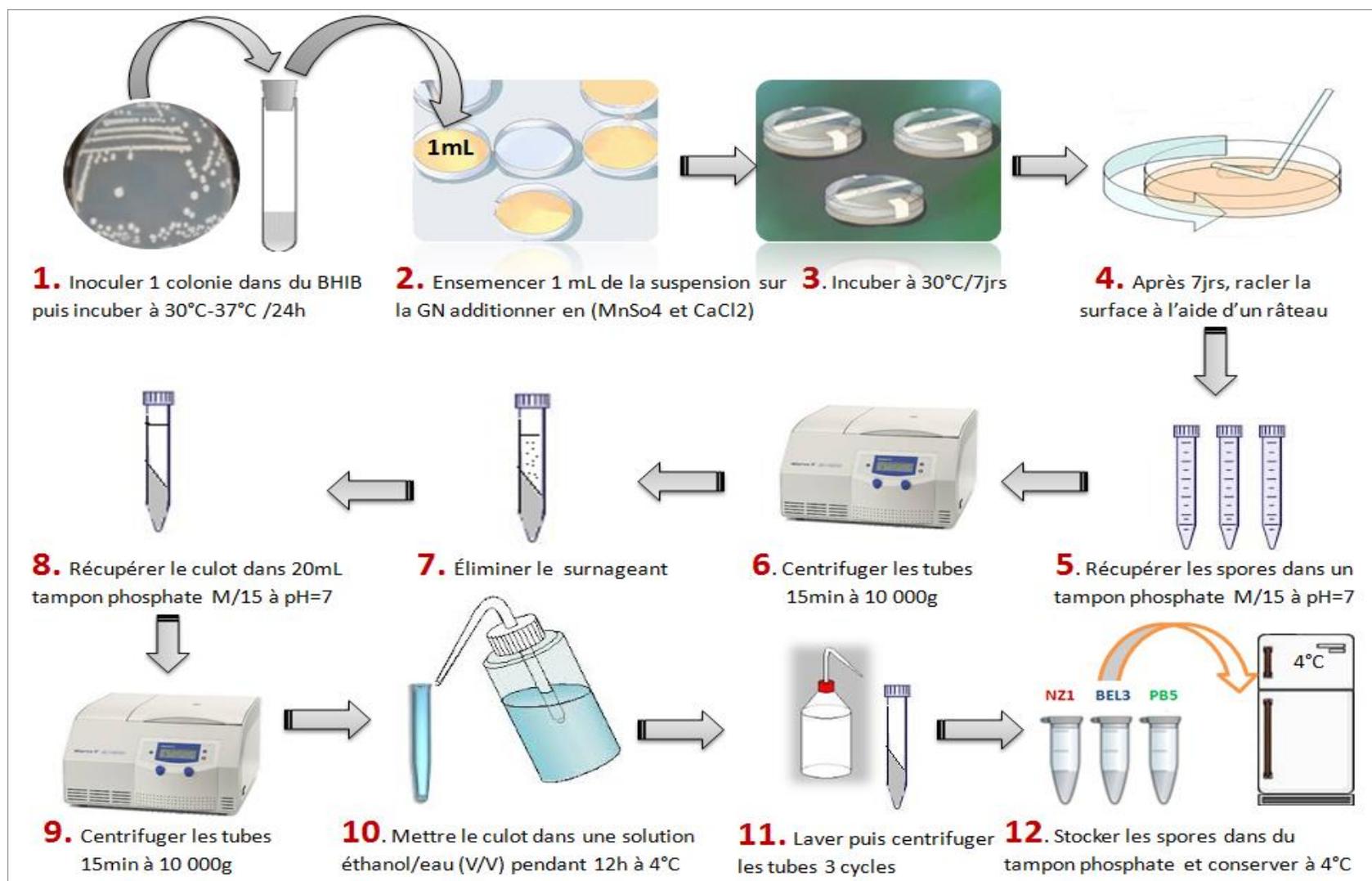
Pour établir l'identité de la souche, les séquences de gènes ont été comparées à la base de données disponible à l'aide de l'outil en ligne BLAST avec le lien suivant (<http://symprevius.eu/software/>).

## V. Etude de la thermorésistance des souches représentatives

### V.1. Préparation de la suspension sporale

Les souches de *Bacillus* isolées ont été pré-cultivées à 37°C pendant 24 h dans du bouillon de cœur-cerveille BHI (Difco 0037). La pré-culture a été utilisée pour inoculer une gélose nutritive (Biokar Diagnostics, Beauvais / France) additionnée de sel ( $\text{MnSO}_4$  40 mg L<sup>-1</sup> et  $\text{CaCl}_2$  100 mg L<sup>-1</sup>). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 5 à 7 jours. Les spores ont ensuite été recueillies en raclant la surface de la gélose, en suspension dans de l'eau distillée stérile et lavées trois fois par centrifugation (10000 g pendant 15 min) (Bioblock Scientific, modèle Sigma 2-16 PK). Le culot a été remis en suspension dans 10 mL d'eau distillée mélangée à l'éthanol (V/V) (Baril *et al.*, 2012).

La suspension obtenue a été maintenue à 4°C pendant 12 heures afin de réduire le nombre des formes végétatives des bactéries. Pour éliminer les traces de l'alcool la suspension a été lavée trois fois à l'eau distillée stérile à l'aide de la centrifugation. La suspension finale (1 culot d'environ 1 mL) contenant plus de 99% de spores, a finalement été distribuée dans des microtubes Eppendorf stériles et conservée à 4°C. Les différentes étapes de la préparation de la suspension sporale sont indiquées sur **la figure 7**.



**Figure 7.** Etapes de la préparation de la suspension sporale.

## V.2. Détermination de la thermorésistance de certaines souches représentatives

Afin d'estimer la thermorésistance des spores, la cinétique de survie a été déterminée à l'aide de la méthode des tubes capillaires. Pour ce faire, 10  $\mu\text{L}$  de la suspension sporale ont été dilués dans 9 mL de bouillon nutritif (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Les tubes capillaires de 200  $\mu\text{L}$  (Hirschman Laborgerate, Eberstadt, Allemagne) ont ensuite été remplis par 100  $\mu\text{L}$  de suspension de spores, scellés, et soumis à un traitement thermique à trois températures différentes dans un bain thermostatique de glycérol/eau (80/20, V/V). Après le temps de chauffage ciblé, les tubes capillaires ont été refroidis dans un bain d'eau/de glace, lavés à l'éthanol, et leurs extrémités ont été brûlées et cassées (Baril *et al.*, 2012).

Enfin, le contenu des tubes capillaires a été versé dans un tube par rinçage avec 1 mL de tryptone sel eau (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) **voir figure 8.**



1. Dilution de la suspension de spores dans du bouillon nutritif refroidi.



2. Introduction de 100  $\mu$ L de la suspension de spores diluée au centre des capillaires calibrés.



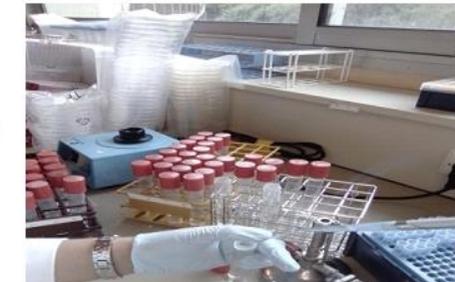
3. Soudure des extrémités des capillaires à la flamme.



3. Traitement thermique des capillaires à différents barèmes temps/température



5. Refroidissement des capillaires dans un bain d'eau glacée.



6. Les capillaires sont vidés par 1 mL de TSE.



7. Réalisation des dilutions décimales dans du TSE.



8. Ensemencement de 1 mL en profondeur de la GN.



9. Dénombrement après incubation à 37 °C pdt 24 h.

**Figure 8.** Etapes du protocole d'inactivation thermique des spores bactériennes par la méthode des capillaires.

Le paramètre de sensibilité à la chaleur  $z$  est l'augmentation de la température qui réduit le temps de chauffage d'un facteur de 10 avec la même efficacité létale (Ball 1923). Pour les souches étudiées. La valeur  $z$  correspond à l'inverse négatif de la valeur de la pente et peut être calculée comme suit :

$$z = \frac{(t_2 - t_1)}{\log \left( \frac{DT_1}{DT_2} \right)}$$

Avec  $t$  : temps ;  $T$  : température (°c)

## **VI. Etude de l'activité enzymatique des souches représentatives**

Un test semi-quantitatif a été utilisé pour évaluer les activités d'hydrolyse d'amidon, de protéolyse et de lécitinase des isolats sélectionnés. À cette fin, les isolats ont d'abord été placés sur une gélose BHI et incubés pendant une nuit à 37°C.

### **VI.1. Test de l'activité protéolytique.**

Une seule colonie a été ensemencée sur une gélose au lait (gélose nutritive contenant 5% de caséine), puis incubée à 37°C pendant 48 h.

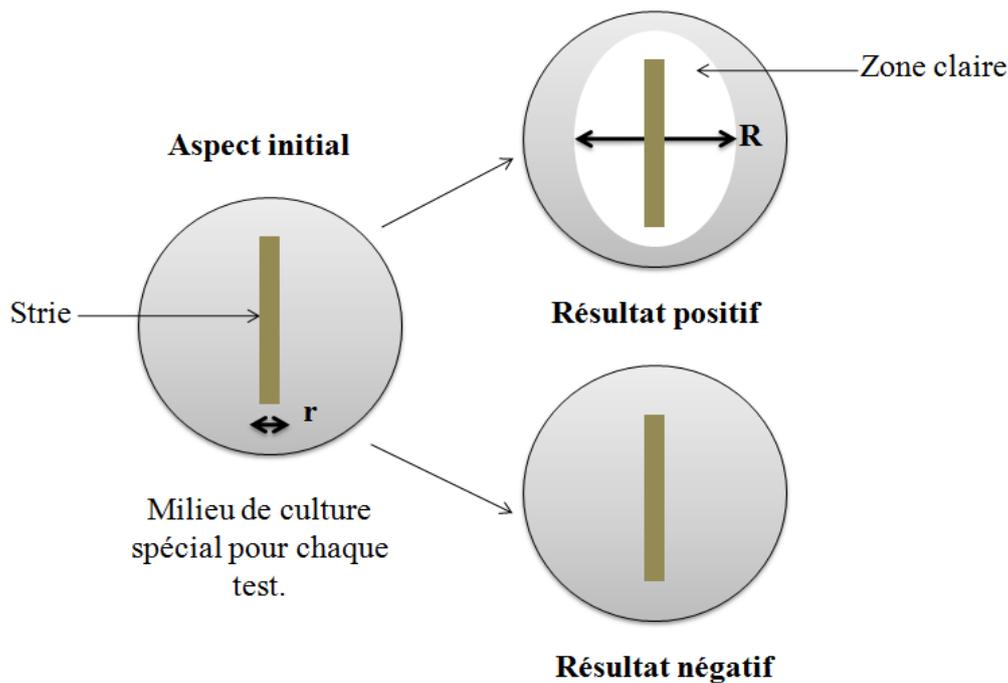
### **VI.2. Test d'hydrolyse de l'amidon.**

Une seule colonie a été ensemencée en une strieau centre d'une boîte contenant la gélose nutritive (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) aditionnée de 1% d'amidon. Après une incubation à 37°C pendant 24 h, les boîtes ont été recouvertes de Lugol (Joffin et Leyral 2001).

### **VI.3. Test de mise en évidence de la lécitinase.**

Une seule colonie a été ensemencée sur gélose trypticase soja avec du jaune d'œuf stérile dilué à la moitié dans de l'eau physiologique (concentration finale 10% ou 2,5 mL pour 25 mL de milieu) et incubée à 37°C pendant 24 h (Joffin et Leyral, 2001).

**La figure 9.** Représente un aspect général de la technique des tests enzymatiques.



**Figure 9. Aspect général de la technique des tests enzymatiques.**

$r$ : largeur de la colonie ;  $R$ : largeur de la zone de lyse.

L'indice d'activité enzymatique a été déterminé par le rapport de la largeur de la zone de lyse ( $R$ ) sur la largeur de la colonie ( $r$ ).

Une échelle de l'intensité de l'activité enzymatique à quatre niveaux a été utilisée :

- 1) (-) a été attribuée aux boîtes sans zone claire autour de la croissance.
- 2) **Faible activité enzymatique** : a été attribuée aux plaques dont l'indice d'activité enzymatique  $R/r$  était de  $\leq 1,50$ .
- 3) **Activité enzymatique modéré** : a été donnée aux plaques ayant un indice d'activité enzymatique  $R/r$  compris entre 1,51 et 2,50.
- 4) **Activité enzymatique élevée** : a été donnée aux plaques ayant un indice d'activité enzymatique  $R/r \geq 2,50$ .

## **Troisième Partie :**

### **Résultats et Discussion**

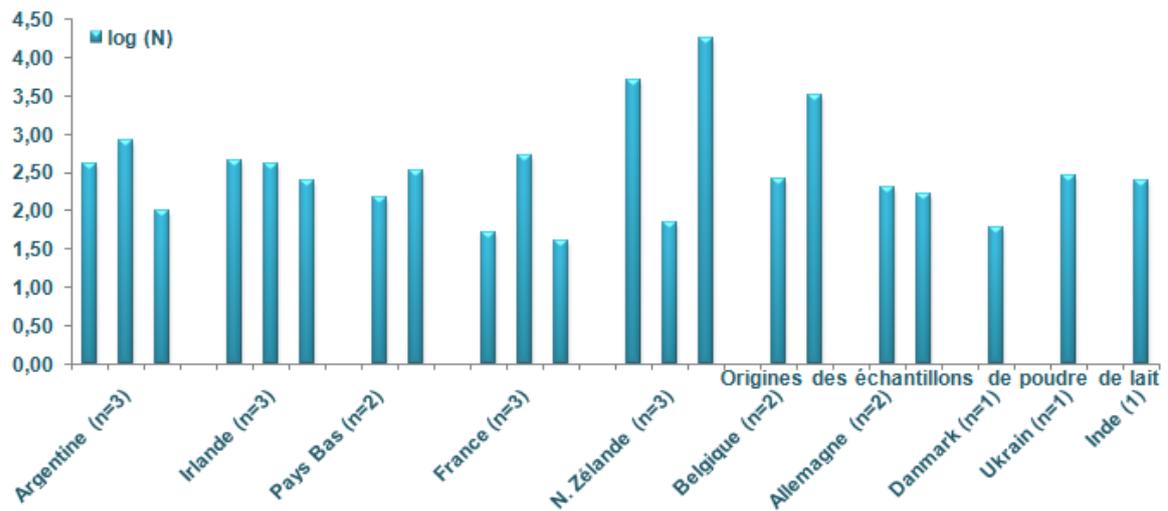
- I. Dénombrement de la population microbienne et sélection des isolats**
- II. Description phénotypique et Biochimique des isolats**
- III. Identification moléculaire des isolats**
- IV. Etude de la thermorésistance des souches représentatives**
- V. Activité enzymatique des souches représentatives**

# I. Résultats

## I. 1. Dénombrement de la population microbienne et sélection des isolats

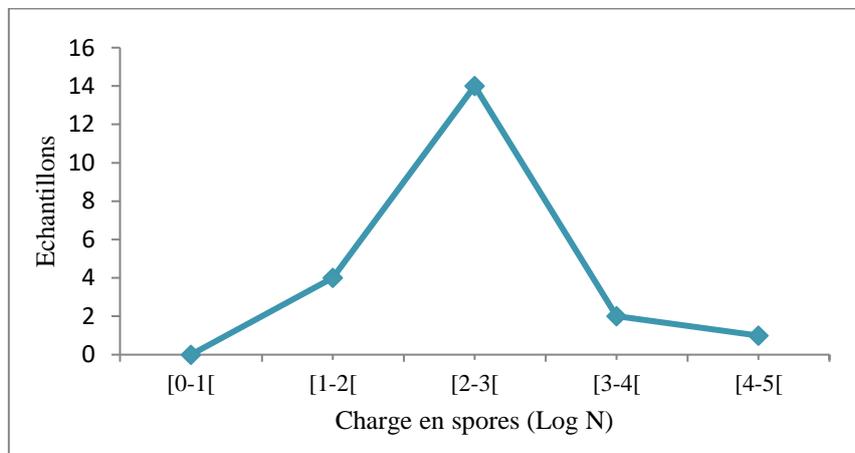
Avant d'effectuer le dénombrement des spores mésophile, dans un travail préliminaire, la flore aérobie mésophile totale de la plupart des échantillons de poudre de lait a été dénombrée. Celle-ci était comprise entre  $10^3$  et  $10^7$  ufc/g. Ce résultat préliminaire nous a encouragés à entamer notre travail sur les spores mésophiles inféodées aux poudres de lait.

Le dénombrement des spores mésophiles a donné lieu aux résultats qui sont représentés par la figure 10.



**Figure 10.** Dénombrement des spores mésophiles des différentes poudres de lait importées et commercialisées en Algérie.

La charge en spores la plus fréquente est comprise entre  $10^2$  et  $10^3$  spores/g. Quatorze (14) échantillons rentrent dans cet intervalle. La figure ci-dessous illustre cette fréquence.



**Figure 11.** Distribution des fréquences de contamination par charge en spores.

Les échantillons les plus contaminés sont deux (2) échantillons de la Nouvelle Zélande et un (1) échantillon d'origine Belge ( $4,9 \cdot 10^3$   $1,7 \cdot 10^4$  et  $3,2 \cdot 10^3$  spores/g respectivement), tandis que les poudres d'origines française et danoise étaient les moins chargées en spores (de 40 à 60 spores/g).

Pour les origines dont on a disposé de trois échantillons les résultats varient de 100 à 800 spores/g (Argentine), de 40 à 530 spores/g (France), de 240 à 440 spores/g (Irlande) et de 70 à 17 800 spores/g (Nouvelle Zélande).

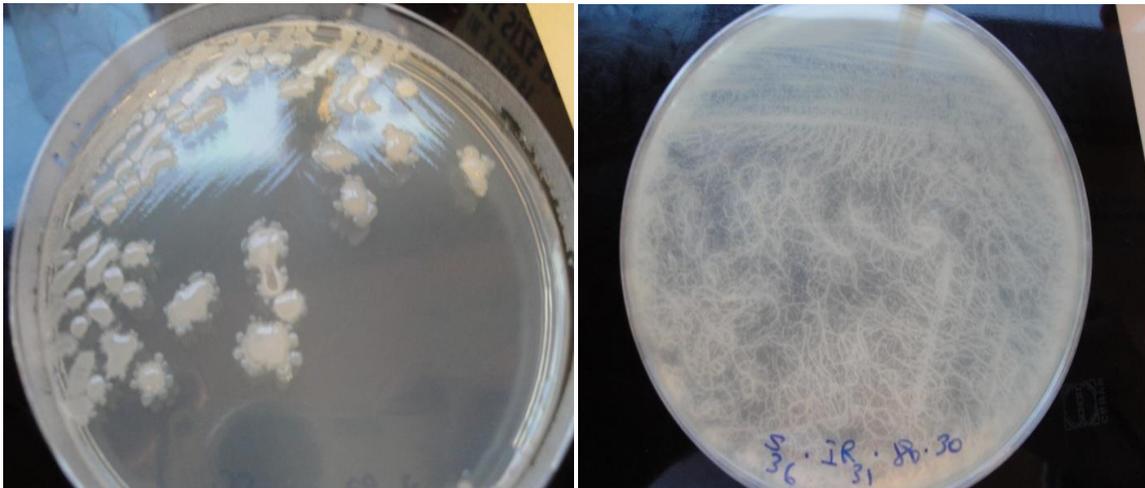
## I. 2. Description phénotypique et biochimique des isolats

L'examen macroscopique des colonies a montré que celles-ci avaient différents aspects. Si la couleur est généralement blanche, la forme, la taille et l'aspect sont différents. La figure 12 illustre les différents types de colonies observées.



Aspet de colonie 1

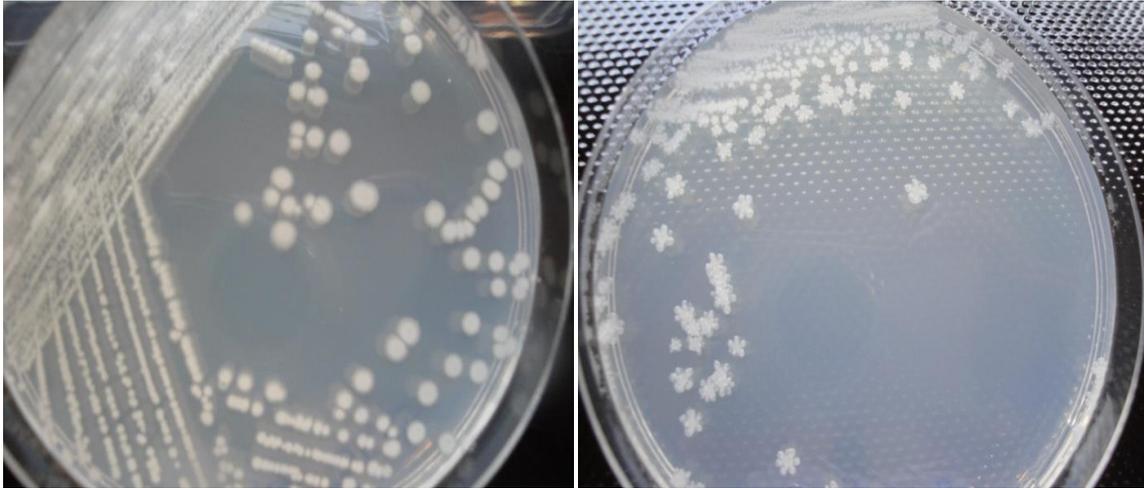
Aspet de colonie 2



Aspet de colonie 3

Aspet de colonie 4

**Figure 12.** Aspect macroscopique de différentes souches après purification par repiquages successifs.

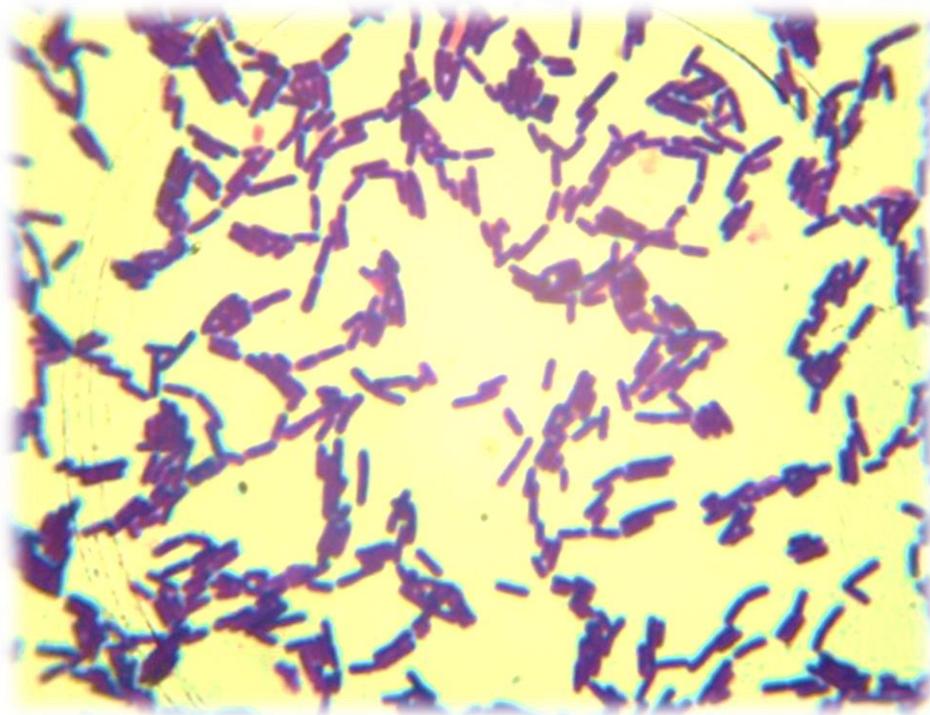


**Aspet de colonie 5**

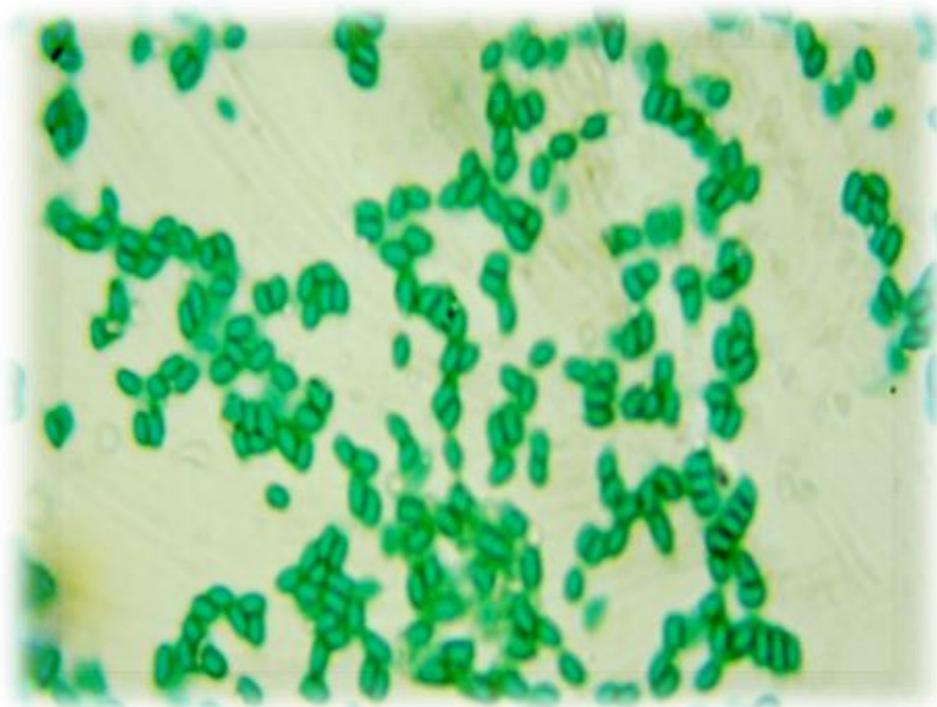
**Aspet de colonie 6**

**Figure 12 suite.** Aspect macroscopique de différentes souches après purification par repiquages successifs.

L'examen microscopique après la coloration de Gram a révélé que toutes les souches présumées *Bacillus* étaient sous forme de bâtonnets à Gram+. Par ailleurs, l'observation microscopique après coloration au vert de malachite a indiqué la présence des spores colorées en verts qui sont bien représentées sur **la figure 13**.



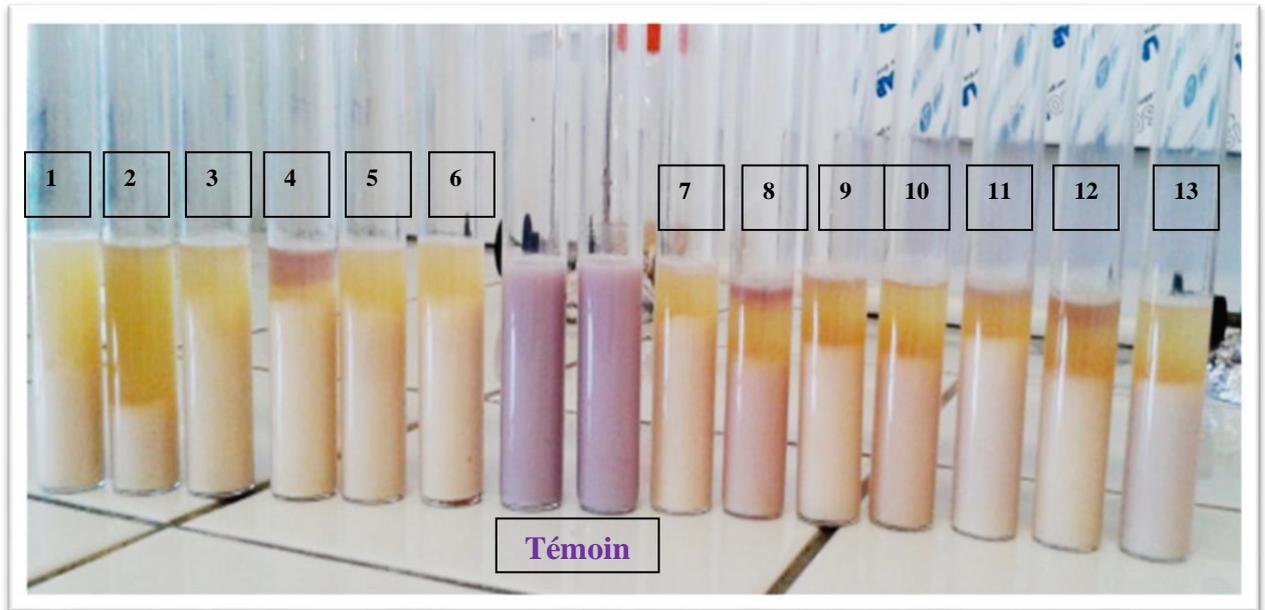
**Figure 13A:** Observation microscopique d'un isolat présumé *Bacillus* spp., provenant d'un échantillon de poudre de lait, après coloration de Gram.



**Figure 13B:** Observation microscopique d'un isolat présumé *Bacillus spp.*,provenant d'un échantillon de poudre de lait, après coloration au vert de Malachite.

Les isolats, bacilles à Gram positif, ont montré un résultat positif vis-à-vis de la catalase et un résultat négatif par rapport à l'oxydase.

Pour le test du lait au tournesol et comme le montrent les résultats illustrés par **la figure 14**, la plupart des souches testées ont acidifié puis coagulé le lait. Cette action est qualifiée de **de type AC**. Une minorité des souches ont présenté également un pouvoir réducteur mis en évidence par la disparition de la couleur de l'indicateur. Cette action est qualifiée de type **ACR**.



**Figure 14.** Résultats de différenciation des isolats par le test de lait au tournesol.

(1, 2, ...13) Souches présumés bacillus testé par le test de lait au tournesol

pH acide : couleur rose à rouge

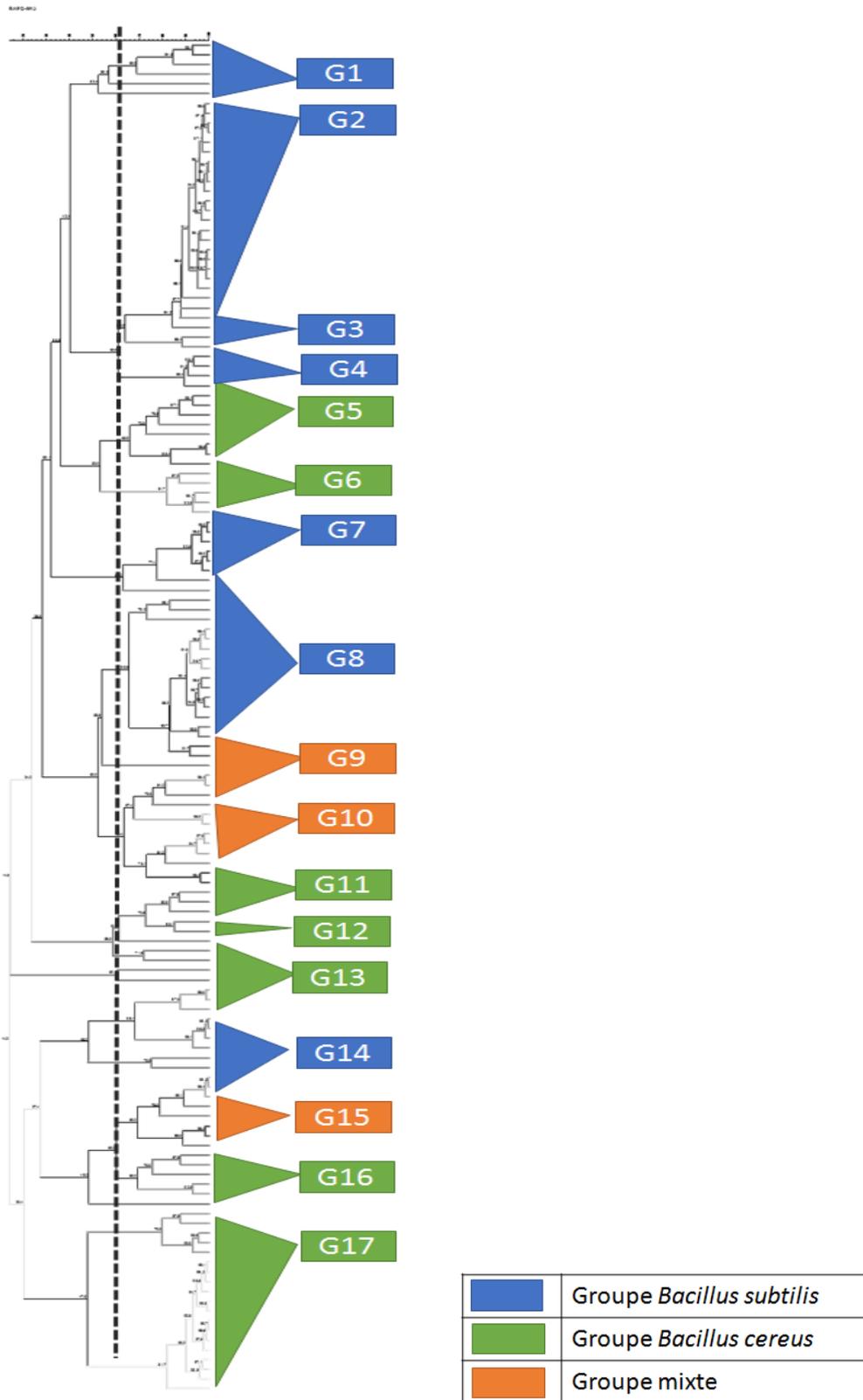
- pH alcalin : couleur bleu violacé
- Réduction : blanc
- Caillé acide : caillé dur avec surnageant clair (lactosérum)
- La dégradation : Dissolution du caillot avec un liquide clair, grisâtre et aqueux et un caillot rose, insoluble.
- Caillé de présure : caillé doux suivi d'une peptonisation (pH alcalin, brun surnageant)
- Production de gaz : bulles dans le lait coagulé.

### I. 3. Identification moléculaire des isolats

Sur 170 souches collectées présumées *Bacillus*, 139 isolats mésophiles ont été analysés par la technique RAPD-PCR et 75 isolats représentatifs de profils RAPD distincts ont été identifiés par analyse partielle de la séquence du gène 16SrRNA. Un dendrogramme a été construit à partir des isolats représentatifs de chaque groupe RAPD. Le dendrogramme est représenté sur la **figure 15**. Il a été généré en utilisant la méthode de l'algorithme des paires-groupes non pondérés avec des moyennes arithmétiques dont les niveaux de corrélation sont exprimés en pourcentage du coefficient de corrélation de Pearson. Le niveau d'identité (68%) pour la discrimination des différents génotypes est représenté par une ligne en pointillé.

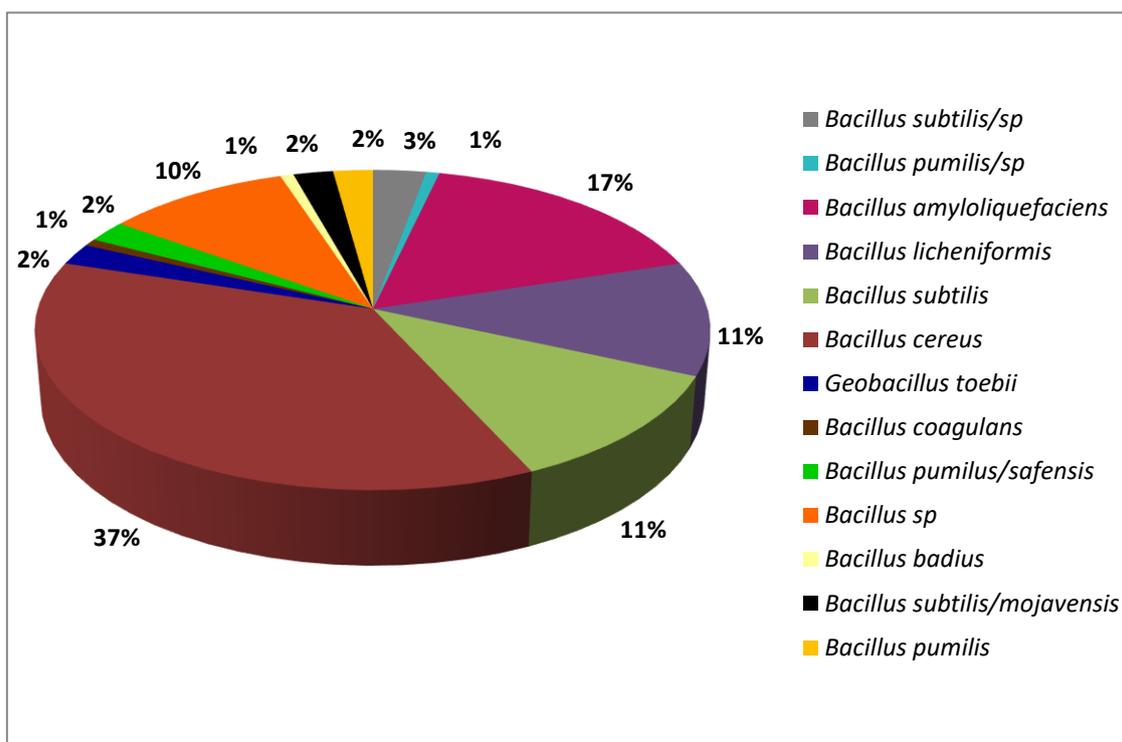
Les résultats obtenus nous ont permis de distinguer 17 groupes (G1 à G17). Sept d'entre eux (G1, G2, G3, G4, G7, G8 et G14) étaient représentés par le groupe *B. subtilis* (dont *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*), et sept autres (G5, G6, G11, G12, G13, G16 et G17) étaient constitués par le groupe *B. cereus*. Les trois derniers groupes (G9, G10 et G15) étaient des groupes mixtes (multi-espèces). Les différents groupes représentant les isolats sont illustrés sur **la figure 16**.





**Figure 16.** Groupes RAPD représentant les différents isolats étudiés

L'occurrence des bacilles aéobies formant des spores, isolés à partir de différentes poudres de lait, est illustrée par la figure 17.



**Figure 17.** Occurrence des bacilles aéobies formant des spores Isolées à partir des différentes poudres de lait (%).

Avec 37% du total des isolats, *B. cereus* s'est avérée l'espèce la plus commune. La discrimination des 24 isolats identifiés à *B. cereus* montre que ceux-ci appartiennent à trois groupes phylogénétiques différents selon la classification de Guinebretière et al (2008)

- 1 Un (01) isolat appartient au Groupe phylogénétique II
- 2 Seize (16) isolats appartiennent au Groupe phylogénétique III qui comprend des souches cytotoxiques
- 3 Sept isolats appartiennent au Groupe phylogénétique IV.

Les 3 différents groupes phylogénétiques signalés dans la présente étude reflètent une diversité génétique de *Bacillus cereu* s'inféodée dans les poudres de lait importées commercialisées en Algérie.

*Bacillus cereus* est apparue dans les 21 échantillons de poudre de lait testées. C'est l'espèce dominante dans les poudres de lait de France, de Nouvelle-Zélande et d'Irlande.

La répartition des espèces identifiées par la RAPD 16Sr ARN selon les origines des échantillons de poudre de lait est représentée sur **le tableau 7**

<b>Tableau 7.</b> Types des profils RAPD des spores mésophiles isolées des différentes poudres de lait commercialisées en Algérie.												
isolats	Inde (n=1)	France (n=3)	N. Zealande (n=3)	Allemagne (n=2)	Belgique (n=3)	Pays Bas (n=2)	Irlande (n=3)	Ukraine (n=1)	Argentine (n=2)	Danemark (n=1)	Total	Fréquence (%)
<i>B. cereus</i>	3	12	9	1	2	3	15	1	4	2	<b>51</b>	<b>37</b>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2	3	7	2	4	-	5	-	-	-	<b>23</b>	<b>17</b>
<i>B. licheniformis</i>	3	2	1	1	2	3	3	1	-	-	<b>16</b>	<b>12</b>
<i>B. subtilis</i>	-	-	2	2	-	8	2	1	-	1	<b>16</b>	<b>12</b>
<i>Bacillus sp.</i>	1	-	4	-	1	4	1	1	1	1	<b>14</b>	<b>10</b>
<i>B. subtilis/sp</i>	2	1	-	-	-	-	1	-	-	-	<b>4</b>	<b>3</b>
<i>G. toebii</i>	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	<b>3</b>	<b>2</b>
<i>B. pumilus / safensis</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	<b>3</b>	<b>2</b>
<i>B. subtilis / mojavensis</i>	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	<b>3</b>	<b>2</b>
<i>B. pumilis</i>	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	<b>3</b>	<b>2</b>
<i>B. pumilis/sp</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	<b>1</b>	<b>0,7</b>
<i>B. coagulans</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1</b>	<b>0,7</b>
<i>B. badius</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1</b>	<b>0,7</b>
Total isolats/ origine	15	21	24	6	9	20	28	5	8	3	<b>139</b>	<b>100</b>

*Bacillus amyloliquefaciens* est le 2<sup>ème</sup> plus abondant, il représente 17% du total des isolats, avec une présence plus remarquée dans les poudres provenant de Nouvelle-Zélande et d'Irlande. En revanche, aucun *Bacillus amyloliquefaciens* n'a été isolé des poudres de lait provenant du Danemark, d'Ukraine, d'Argentine et des Pays-Bas.

*Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* étaient les troisièmes isolats les plus abondants. Chacun d'entre eux représentait 12% de toutes les souches identifiées.

*Bacillus licheniformis* était présent dans tous les échantillons de lait en poudre, à l'exception de ceux provenant du Danemark et de l'Argentine. C'était l'isolat le plus dominant dans les poudres provenant d'Inde, d'Irlande et des Pays-Bas, suivi par la poudre de lait française.

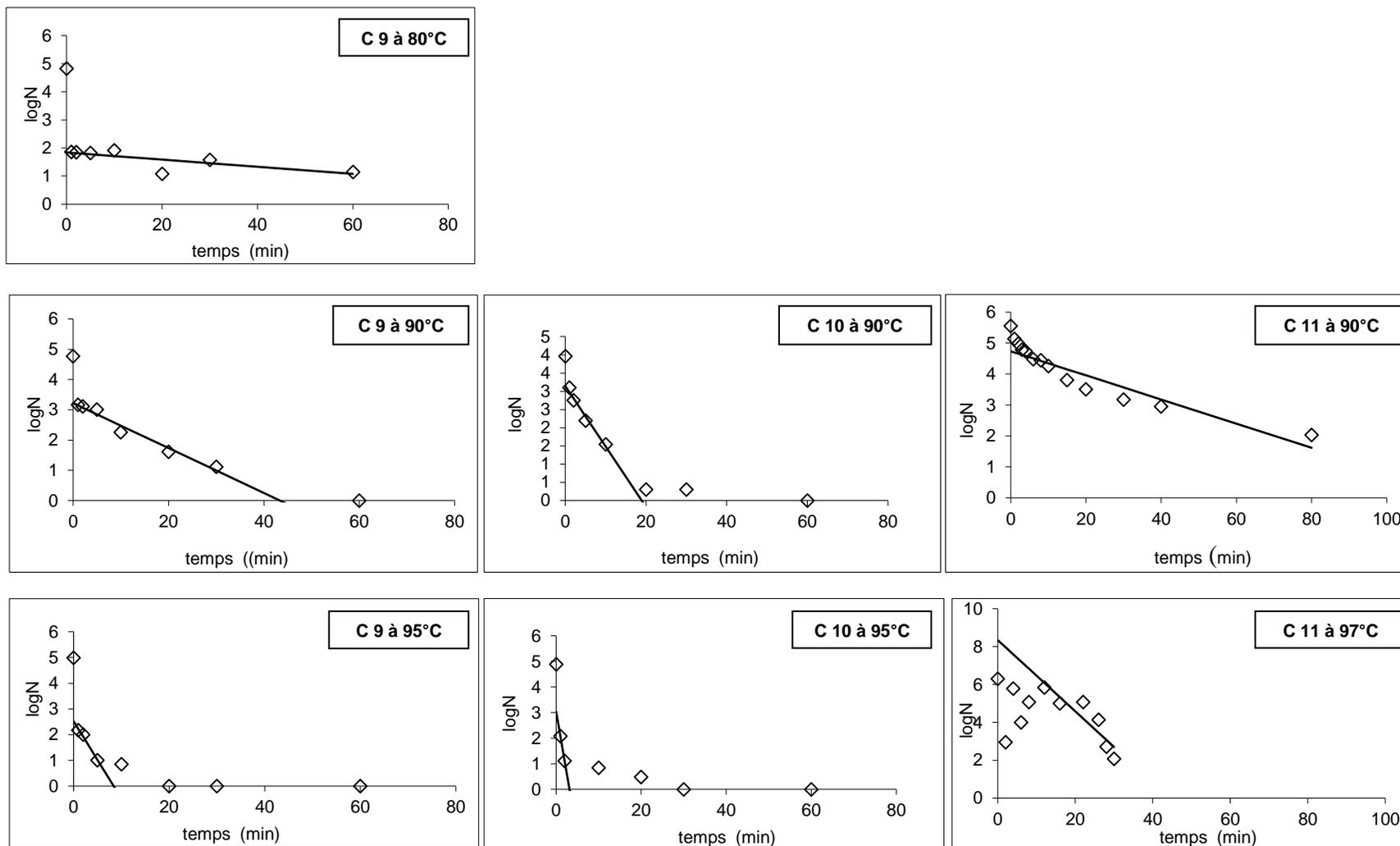
*Bacillus subtilis* était présent dans plus de la moitié des poudres de lait analysées. Aucun isolat n'a été trouvé dans les poudres françaises, indiennes, belges et argentines. *Bacillus subtilis* était dominant dans les poudres de lait néerlandaises, néo-zélandaises, allemandes et irlandaises.

Les autres profils représentent 24%, dont 10% sont représentés par *Bacillus sp.* parmi tous les isolats.

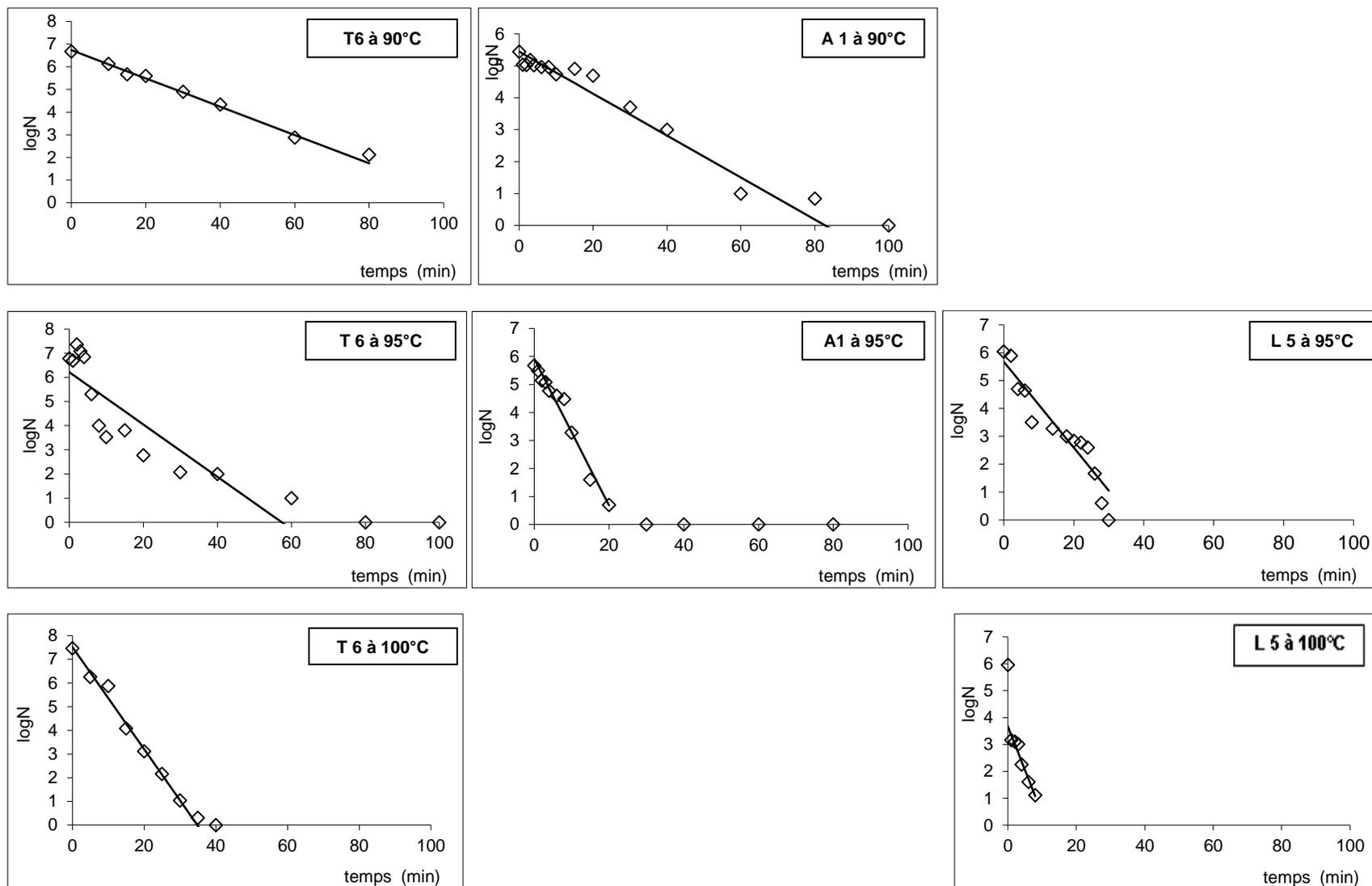
#### **I. 4. Thermorésistance des spores représentatives des profils dominants**

Sept spores représentant les profils dominants : *Bacillus cereus* (C9, C10 et C11), *Bacillus subtilis* (T6), *Bacillus licheniformis* (L5), *Bacillus amyloliquefaciens* (A1) et *Géobacillus toebii* (G1) ont été sélectionnées pour l'étude de leur thermorésistance. Les spores testées ont été traitées à des températures allant de 80°C à 105°C.

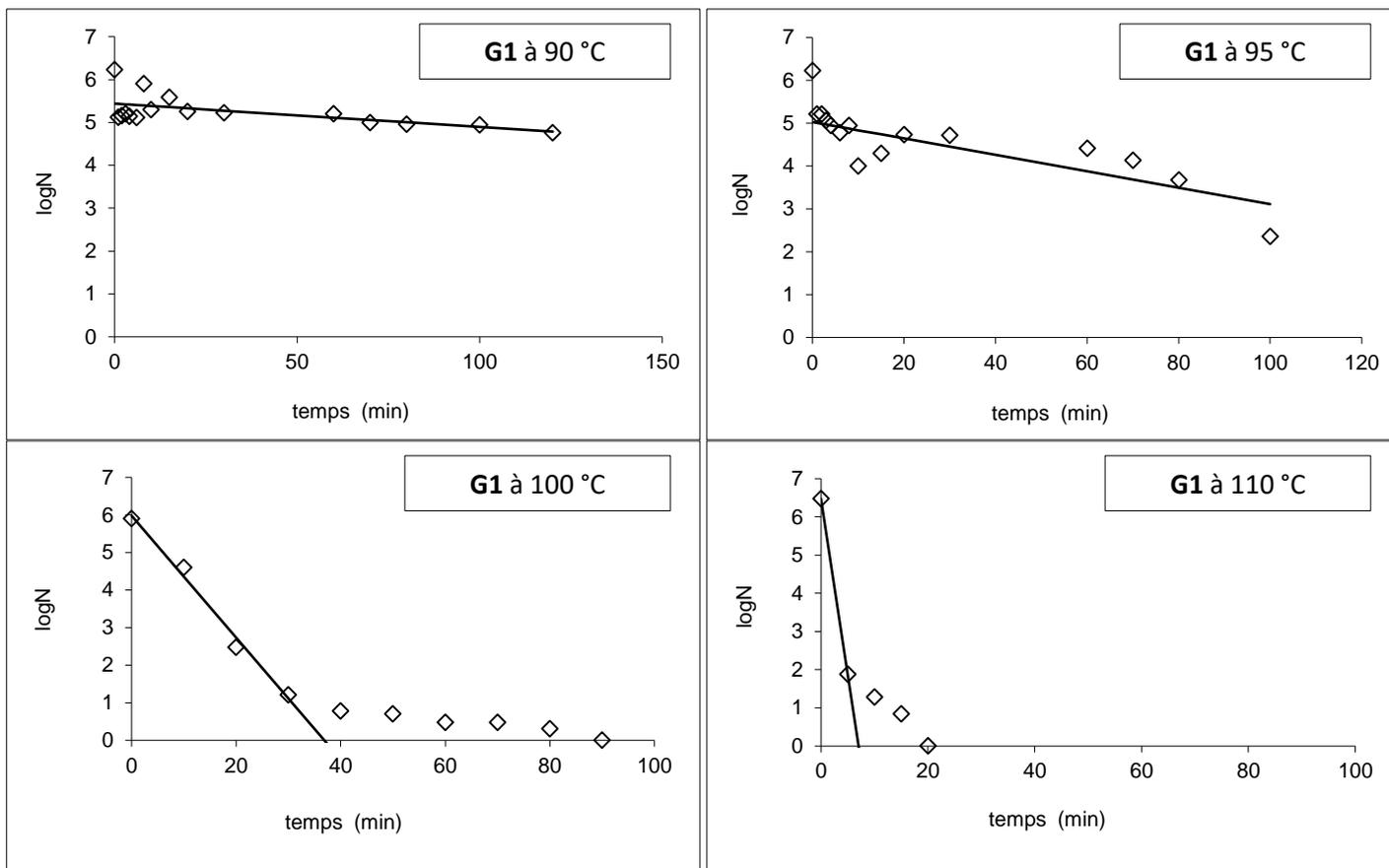
**Les figures 18, 19 et 20** représentent les cinétiques d'inactivation thermique des spores de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* et *Géobacillus toebii*, respectivement.



**Figure 18.** Cinétiques d'inactivation thermique des spores de *Bacillus cereus* C9 ; *B. cereus* C10 et *B. cereus* C11.



**Figure 19.** Cinétique d'inactivation thermique des spores de *B. subtilis* T6, *B. amyloliquefaciens* A1 et *B. licheniformis* L5.



**Figure 20.** Cinétique d'inactivation thermique des spores de *Geobacillus toebii* G1

Les valeurs de  $D_{T^\circ}$  et les valeurs  $z$  des spores testées sont illustrées par le **tableau 8**. Les temps de réduction  $D$  ont varié de 183,7 min pour la souche (G1) à 90°C à 0,96 min pour la souche(A1) à 100°C.

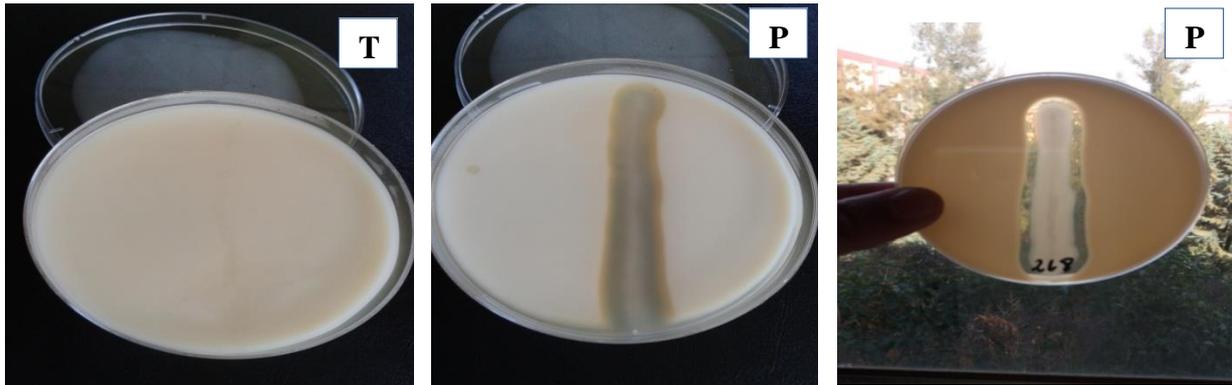
Le paramètre de résistance à la chaleur  $z$  variait de 6,54°C pour la souche (C11) à 18,57°C pour la souche (T6).

**Tableau 8.** Valeurs de  $D_{T^\circ}$  et valeurs  $z$  enregistrées durant la cinétique de destruction des spores représentatives isolées des poudres de lait commercialisées en Algérie.

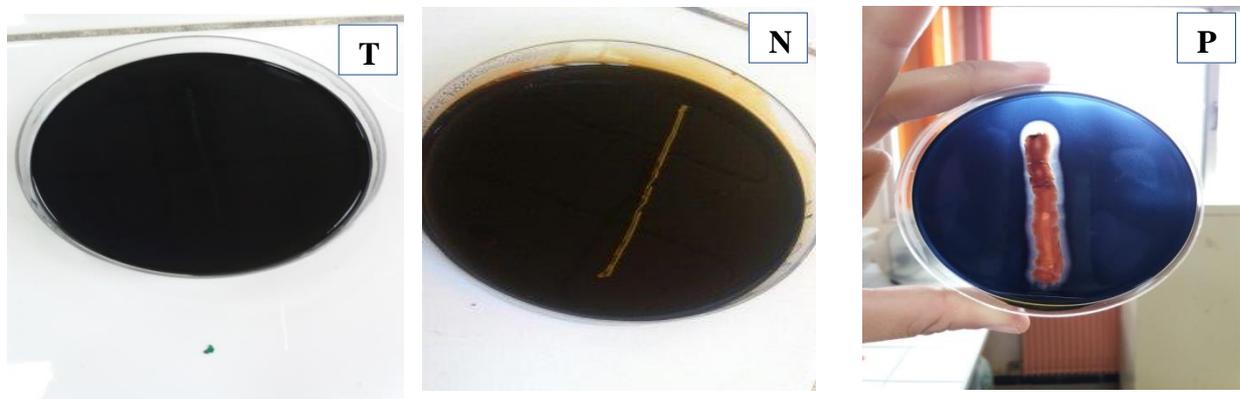
Spores	Origines des PDL	Valeurs de $D_T$ (min)						$z$ (°C)	Corrélation
		80	90	95	97	100	110		
<i>B. cereus C9</i>	Belgique	78.82	13.46	3.32	-	-	-	11.16	-0.99
<i>B. cereus C10</i>	France	-	25.64	7.22	5.32	-	-	10.00	0.995
<i>B. cereus C11</i>	Allemagne	-	6.03	1.04	-	-	-	6.54	-1.00
<i>B. licheniformis L5</i>	Pays Bas	-	24.08	3.08	-	0,11	-	17.58	0.629
<i>B. amyloliquefaciens A1</i>	France	-	15.22	3.83	-	0.96	-	8.34	-1.00
<i>B. subtilis T6</i>	Pays Bas	-	16.01	9.24	-	4.64	-	18.57	0.998
<i>G. toebii G1</i>	Pays Bas	-	183.7	52.22	-	6.17	1.09	6.57	0.996

## I. 5. Activité enzymatique des souches représentatives des profils dominants

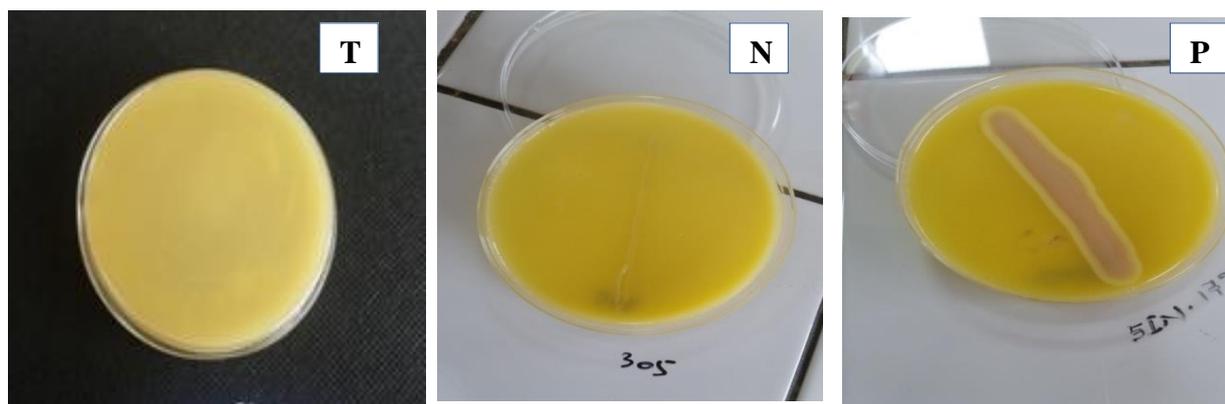
Des tests de production d'enzymes d'altération ont été réalisés sur trente-huit isolats. Plusieurs milieux de culture spécifiques ont été utilisés pour réaliser les tests. Les résultats de l'activité protéolytique, amylolytique et léctinase sont représentés sur **les figures 19, 20 et 21** respectivement.



**Figure 21.** Résultats du test de l'activité protéolytique. **T:**témoin, **P:** test Positif



**Figure 22.** Résultats du test de l'activité amylolytique. **T:** témoin, **N :** test Négatif  
**P:** test Positif.



**Figure 23.** Résultats du test de l'activité de lécitinase. **T:** témoin, **N :** test Négatif  
**P:** test Positif.

La semi-quantification des trois activités enzymatiques de tous les isolats testés est résumée dans le **tableau 9**.

**Tableau 9.** Semi quantification des activités protéolytiques, amylolytiques et lécitinase des bactéries formant des spores isolés des poudres de lait commercialisées en Algérie.

Espèces bactériennes	souches	Origines des PDL	Index de l'activité Proteolytique *(R/r)	Index de l'activité Amylolytique *(R/r)	Index de l'activité lécitinase *(R/r)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	A1	France	1,21	0	0
	A2	N. Zelande	1,25	0	0
	A3	Irlande	1,21	0	2
	A4	Irlande	1,19	0	1,25
	A5	Allemagne	1,08	0	1,5
	A6	Irlande	1,3	0	1,5
<i>B. cereus</i>	C1	France	2	2,8	1,22
	C2	N. Zelande	2,33	ND	ND
	C3	Irlande	1,12	ND	2
	C4	Irlande	2,5	3	1,22

	C5	Irlande	ND	ND	0
	C6	Irlande	3	ND	0
	C7	Inde	1,22	2,11	1,63
	C8	France	1,5	2	1,66
	C9	Belgique	1,17	1,5	1,23
	C10	France	1,25	1,77	3,25
	C11	Allemagne	1,29	1,33	1,15
	C12	N. Zelande	1,66	1,55	4,5
	C13	Inde	1,22	2,11	4
	C14	Argentine	1,36	1,3	1,33
<i>B. licheniformis</i>	L1	France	0	0	0
	L2	Ukraine	0	0	0
	L3	Belgique	0	0	0
	L4	Allemagne	0	ND	0
<i>B. majavensis/subtilis</i>	M1	Ukraine	2,25	ND	ND
<i>B. pumilis/safensis</i>	P1	Argentine	1,25	0	0
	P2	Argentine	3	0	0
<i>Bacillus sp.</i>	S1	Pays Bas	1,18	0	0
	S2	N. Zelande	3,1	ND	ND
	S3	Ukraine	3,5	ND	1,22
	S4	Allemagne	1,5	4	5
	S5	Pays Bas	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	T1	N. Zelande	1,44	2	0
	T2	Pays Bas	3,5	ND	0
	T3	Ukraine	3	ND	0
	T4	N. Zeland	1,44	2	0
	T5	Pays bas	3	2,14	0
<i>G. toebii</i>	G1	Inde	1,15	0	0

	Pas d'activité enzymatique : Indice d'activité enzymatique $R/r = 0$
	Faible Activité: Indice d'activité enzymatique $R/r < 1.50$
	Activité Modérée: Indice d'activité enzymatique ( $1,5 \leq R/r < 2,5$ )
	Forte Activité:Indice d'activité enzymatique $\geq 2.50$
ND	Non determine

**Indice d'activité enzymatique\***: largeur de la zone de lyse, zone clair (R) par rapport à la largeur de la colonie (r).

Les résultats des tests de production des enzymes d'altération ont révélé que 84.21% des souches présentait une activité protéolytique, 36.84% une activité amylolytique et 44.74% avait une lécitinase.

**Concernant l'activité protéolytique**, sur la totalité des bactéries testées, 32 souches ont présenté une activité protéolytique dont 18 souches ont une faible activité, 6 souches ont une activité moyenne et 8 souches ont une forte activité protéolytique. Parmi celles qui ont une forte activité protéolytique on a : 3 souches de *Bacillus subtilis* isolées de la poudre de lait des Pays Bas et de l'Ukraine, 2 souches de *Bacillus cereus* isolées de la poudre de lait Irlandaise, 2 souches de *Bacillus* sp. Provenant de la poudre de lait de la Nouvelle Zélande et une dernière souche de *Bacillus pumilis/safensis* isolée de la poudre de lait de l'Argentine.

**Concernant l'activité amylolytique**, sur la totalité des bactéries testées, 14 souches ont présenté une activité amylolytique dont 4 souches ont une faible activité, 7 souches ont une activité moyenne et 3 souches ont une forte activité amylolytique. Parmi celles qui ont une forte activité amylolytique on a : 2 souches de *Bacillus cereus* isolées de la poudre de lait de la France et de l'Irlande et 1 souche de *Bacillus* sp. isolée de la poudre de lait de l'Allemagne.

**Concernant l'activité lipolytique (lécitinase)**, sur la totalité des bactéries testées, 17 souches ont présenté une activité lipolytique dont 7 souches ont une faible activité, 6 souches ont une activité moyenne et 4 souches ont une forte activité lipolytique. Parmi celles qui ont une forte activité lipolytique on a : 3 souches de *Bacillus cereus* isolées de la poudre de lait de la France, de la Nouvelle Zélande et de l'Inde, 1 souche de *Bacillus* sp. isolée de la poudre de lait de l'Allemagne.

**En regardant du côté des espèces, on peut dire :** que pour *Bacillus amylolichefaciens* ; toutes les souches se sont révélées actives sur les protéines, 66.66% des souches sont actives sur les lipides (lécitinase). Par contre aucune souche n'a révélé une activité amylolytique.

Pour *Bacillus cereus* ; la majorité des souches 92.86% se sont révélées actives sur les protéines, 72.43% et 78.57% actives sur l'amidon et la lécitine respectivement. Pour *Bacillus licheniformis* ; sur les quatre souches testées aucune activités enzymatiques n'est enregistrée.

La souche de *Bacillus majavensis/subtilis* a présenté une activité protéolytique et n'ont pas des activités amylolytique et lécitinase. Les deux souches de *Bacillus pumilis* n'ont pas représenté des activités amylolytique et lécitinase par contre se sont révélées actives sur les protéines.

Pour *Bacillus sp.*, 80, 20 et 40% se sont révélées actives respectivement sur les protéines, l'amidon et la lécitine. La totalité des souches de *Bacillus subtilis* ont représenté une activité protéolytique, 60% d'activité amylolytique. Alors, aucune activité lipolytique (lécitinase) n'est enregistrée pour cette souche. La souche unique de *Geobacillus toebii* a présenté une activité protéolytique sans aucune activités amylolytiques et lipolytique.

## II. Discussion des résultats

L'objectif principal de cette étude était de mettre en évidence la biodiversité des spores mésophiles dans les poudres de lait importées et commercialisées en Algérie. Il s'agissait aussi de caractériser ces spores par certaines activités importantes sur le plan de la technologie, l'hygiène des process et de la sécurité sanitaire.

Les poudres de lait étudiées ont été importées de 10 pays différents à savoir : l'Allemagne, l'Argentine, la Belgique, le Danemark, la France, l'Inde, l'Irlande, la Nouvelle-Zélande, les Pays-Bas et l'Ukraine.

Les résultats ont montré une variation de la contamination du lait en poudre par les spores aérobies mésophiles : 19% des échantillons présentaient un nombre inférieur à  $10^2$  spores/g alors que 66% des échantillons présentaient un taux de spores compris entre  $10^3$  et  $10^4$  spores/g. 14% des échantillons présentaient des taux supérieurs à  $10^4$  spores/g. Les niveaux de contaminants trouvés dans cette étude sont proches des limites établies par les réglementations néo-zélandaises rapportées par Rückert et al. (2004) et étaient au dessus des nombres les plus élevés dans le lait en poudre analysé par Reginensi et al. (2011).

Rückert et al. (2004) ont analysé 28 échantillons de poudre de lait provenant de 11 origines différentes (Australie, Chili, France, Allemagne, Grande-Bretagne, Mexique, Pays-Bas, Nouvelle-Zélande, Pologne, Afrique du Sud et USA). Le nombre de spores variait de 8 spores/g trouvée dans les poudres laitières allemandes et mexicaines à  $5 \cdot 10^4$  spores/g (Etats Unis)

Par ailleurs, ces auteurs ont trouvé que les poudres de lait produites en France et en Grande-Bretagne étaient également chargées en spores ( $2,7 \cdot 10^4$  et  $3 \cdot 10^4$  spores/g respectivement).

Contrairement à ces résultats, les échantillons les plus contaminés dans la présente étude provenaient de la Nouvelle-Zélande et de la Belgique.

Reginensi et al. (2011) se sont intéressés à la poudre de lait de l'Uruguay et ont analysé 22 échantillons. Les niveaux de contamination les plus élevés étaient de  $10^3$  spores/g.

En général, la plupart des échantillons analysés dans la présente étude dépassaient la limite de tolérance (de 500 spores/g à 1000 spores/g) pour les spores mésophiles fixée par l'US Dairy Export Council (Watterson *et al.*, 2014).

Les charges de spores dans les poudres de lait peuvent s'expliquer par les conditions et les paramètres de fabrication, essentiellement les programmes de traitements thermiques qui peuvent être plus ou moins intenses en fonction de la qualité du lait cru. Ces traitements influent sur la qualité de la poudre de lait caractérisée par l'indice d'azote protéique lactosérique (WPNI). Il est à noter, cependant, que les conditions et les paramètres d'évaporation et de séchage par pulvérisation n'affectent pas le taux de spores dans les poudres produites (Walstra *et al.*, 2006).

Les niveaux acceptables de contamination des poudres de lait par des spores ne sont pas toujours les mêmes d'un pays à l'autre. Ils sont basés sur les normes nationales de chaque pays et sur les exigences du client dans la relation contractuelles clients-fournisseurs. Par exemple, l'autorité irlandaise de sécurité des aliments (FSAI) stipulent que le nombre de spores aérobies dans les poudres de lait devait être idéalement  $< 10^4$  spores/g (FSAI, 2014) alors que le département américain de l'agriculture (USDA) applique les limites microbiologiques suivantes aux poudres laitières extragrades des États-Unis : lait entier sec  $< 10\ 000$  ufc/g (USDA 2001a), lait écrémé en poudre (séché au rouleau)  $< 50\ 000$  ufc/g (USDA, 1984), et du lait en poudre non gras (spray)  $< 10\ 000$  ufc/g (USDA 2001b).

Un intérêt mondial grandissant est observé pour le développement de nouvelles méthodes standardisées pour la détection et l'identification des spores dans le lait en poudre et les produits laitiers (Burke *et al.*, 2018 ; Dettling *et al.*, 2019). La contamination du lait cru par des bactéries sporulées se produit principalement dans les exploitations laitières (Borreani *et al.*, 2019). Cependant, les spores isolées du lait en poudre sont différentes de celles isolées du lait cru (Miller *et al.*, 2015).

Dans la présente étude, 139 isolats ont été identifiés par leur profil RAPD. Les profils dominants sont représentés par quatre espèces, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefacien*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*. Dans la littérature, il est bien établi que les espèces du genre *Bacillus* sont les principaux contaminants des poudres de lait et des produits laitiers. Au fil du temps, ils ont fait l'objet de nombreuses études : en 2003, Ronimus et al. ont analysé des poudres de lait produites en Nouvelle-Zélande pour identifier les types de contaminants sporulés. Plus de 98% des isolats examinés ont été identifiés aux espèces

*Geobacillus stearothermophilus*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis*. Alors qu'En 2004, une étude RAPD menée par Rückert et al. a montré que *Geobacillus stearothermophilus* représentait 11% des isolats issus de 28 poudres de lait d'origine différente. En 2006, Ronimus et al. ont analysé de vieilles poudres de lait (âgées de plus de 90 ans) de Nouvelle-Zélande. Le nombre de spores était faible, avec un maximum de 330 spores/g et les deux espèces dominantes dans cet ancien lait en poudre étaient *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis*.

En 2012, Yuan et al. ont signalé *Bacillus licheniformis*, *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus stearothermophilus* comme étant les espèces prédominantes dans les poudres de lait chinoises, ce résultat a été conforté par Sadiq et al. en 2016. Ces derniers auteurs ont trouvé *Bacillus licheniformis* comme l'espèce la plus répandue dans la poudre de lait chinoise, suivie par *Geobacillus stearothermophilus* et *Anoxybacillus flavithermus*

En 2014, Buehner et al. ont analysé les poudres de lait traitées dans le Midwest des États-Unis et ont identifié *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sonorensis* et *Geobacillus stearothermophilus* comme espèces prédominantes.

Contrairement aux études citées ci-dessus, il est intéressant de noter la présence de *Bacillus cereus* dans toutes les poudres de lait analysées dans le présent travail Il convient également de noter l'affiliation de plus de 66% des isolats de *Bacillus cereus* au groupe phylogénétique III qui est cytotoxique selon Guinebretière et al (2008).

Selon nos résultats et ceux de Lan et al. (2017), la présence de *Bacillus cereus* du groupe phylogénétique III dans le lait en poudre peut présenter un risque sanitaire potentiel pour le consommateur. A cet égard, le ministère Algérien du commerce (2015), a estimé que 10% des laits et des produits laitiers étaient impliqués dans les toxi-infections alimentaires collectives (Benamara *et al.*, 2016). Malheureusement avant cette étude, il n'existait pas d'informations en Algérie sur la prévalence de *Bacillus cereus* dans le lait en poudre. Aujourd'hui, il est essentiel que le gouvernement algérien et les professionnels laitiers tiennent compte dans leurs cahiers de charges d'importation du lait en poudre.

Un autre résultat notable de notre travail est la présence de *Bacillus amyloliquefaciens* dans plus de la moitié des poudres de lait analysées. Il s'agit de la deuxième espèce la plus fréquente avec un taux de 17%. Dans leur étude sur le lait cru et le lait en poudre,

VanderKelen et al. (2016) ont suggéré que *Bacillus amyloliquefaciens* était moins fréquente dans ces produits.

*Bacillus licheniformis* qui était présente dans 19 échantillons de lait en poudre analysés dans cette étude a été signalée dans l'étude de Sadiq et al. (2016) dans du lait en poudre chinois et par Rückert et al. (2004) dans des poudres de lait de différents pays. En raison de sa capacité à se développer dans le processus de transformation des produits laitiers, *Bacillus licheniformis* est reconnue comme l'une des espèces sporulées les plus courantes qui affecte de manière significative la qualité des produits laitiers, en particulier la poudre de lait (Wang et al., 2019).

Selon les résultats obtenus par Reginensi et al en 2011 sur des poudres d'Uruguay, *Bacillus licheniformis* et *Anoxybacillus flavithermus* sont régulièrement trouvées alors que *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* et *Bacillus megaterium* constituent une proportion mineure des spores isolées. D'autres études ont également signalé que ces spores étaient des contaminants mineurs dans les poudres de lait (Rückert et al., 2004 ; Vanderkelen et al., 2016). Burgess et al. (2017) ont également noté que *Geobacillus toebii* pouvait être trouvé dans l'environnement laitier.

Concernant les activités enzymatiques, *Bacillus cereus* groupes III et IV et *Bacillus subtilis* isolés des différentes poudres de lait ont montré un potentiel de détérioration important. L'activité enzymatique peut être utilisée comme un indicateur du potentiel de détérioration microbienne des produits fabriqués à base de poudres de lait.

Selon nos résultats, 92.86%, 72.43% et 78.57% des souches de *Bacillus cereus* ont montré une activité protéolytique, amylolytique et lipolytique. La totalité des souches de *Bacillus subtilis* étaient positives pour l'activité protéolytique et 60% se sont révélés présenter une activité amylolytique en absence de l'activité lipolytique. Ainsi, les résultats de Mehta et al (2019) ont montré que les souches de *Bacillus* isolées à partir de poudre de lait et de produits laitiers produisent, à des niveaux différents, de la protéase et de la lipase. Cosentino et al. (1997) ont rapporté que les souches provenant de produits laitiers avaient une forte activité hydrolytique sur la caséine, l'amidon et l'huile d'olive. Alors, les résultats présentés dans cette étude confirment la forte activité protéolytique de *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*.

Contrairement à d'autres études (Lukhing *et al.*, 2013 ; Mehta *et al.*, 2019), aucun signe d'activité protéolytique, amylolytique et lécitinase est signalée pour la souche de *Bacillus licheniformis*.

Cependant, *Bacillus amyloliquefaciens* a montré une faible activité protéolytique.

Il est important de signaler que la détérioration microbienne est le facteur le plus important des pertes constatées en industrie laitière (Remenant *et al.*, 2015). Le Service de recherche économique de l'USDA (USDA 2012) estime les pertes à plus de 42% pour le lait en poudre entier et le lait en poudre écrémé et des pertes à plus de 31% pour l'ensemble des produits laitiers. Le type de microorganismes de détérioration diffère en fonction des produits laitiers. Cela s'explique par les effets sélectifs des pratiques suivies dans la formulation, la transformation, l'emballage, le stockage, la distribution et la manipulation.

Dans l'industrie laitière algérienne, la présence des bactéries aérobies sporulées dans les poudres de lait importées pose de sérieux problèmes de sécurité et de qualité. L'exemple le plus courant est la durée de conservation du lait recombinaé pasteurisé communément appelé «lait pasteurisé en sachet», dont la durée de vie excède pas 24 heures alors que normalement la date de péremption du lait pasteurisé conditionné est de sept jours à compter de la date de fabrication (JORADP N ° 069, 1993). Selon le cahier des charges liant l'Office National Interprofessionnel du Lait (ONIL) aux laiteries, le lait recombinaé pasteurisé est fabriqué avec la poudre de lait importée et de la matière grasse anhydre. Il doit être traité thermiquement à une température de 63°C pendant 30 minutes ou à une température de 85°C pendant 15 à 20 secondes. Le lait traité thermiquement est ensuite refroidi dans les 60 minutes à 6°C et stocké à une température de 6°C ou moins.

Malgré toutes ces conditions, de nombreux consommateurs se plaignent de la qualité du lait pasteurisé conditionné en sachets, non seulement pour sa durée de conservation limitée mais aussi pour son odeur et sa saveur anormale. Des études menées dans les laiteries Algériennes ont montré des niveaux élevés de contamination du lait pasteurisé par les bactéries aérobies formants des spores (Moussa-Boudjemaa *et al.*, 2004, Chérif Antar 2015; Didouh 2015).

Cette altération peut être expliquée principalement par l'activation des spores bactériennes, présentes dans les poudres le lait, par le traitement thermique « pasteurisation ». Ces spores bactériennes germent et se développent rapidement si la chaîne du froid est rompue comme cela est souvent observé sur le marché de détail en Algérie. De plus, le nettoyage inapproprié des équipements laitiers facilite la tâche aux spores bactériennes pour former des biofilms qui se détachent et contaminent les produits finis.

Un autre impacte de la présence des bactéries aérobies dans la poudre de lait importée est la dégradation de la qualité du yaourt à savoir les défauts d'apparence et de texture et, surtout, les arômes amers dans le produit final causés par *Bacillus cereus*/ou *Bacillus subtilis* (Mistry 2001). Il a été démontré que lors d'une fermentation lente, une lente acidification conduit à une croissance plus importante de *Bacillus cereus*. Le nombre de bactéries a augmenté de 4 à 5 unités logarithmiques au lieu de 3 unités logarithmiques (Brisabois *et al.*, 1997).

A noter que malgré la forte consommation de yaourt en Algérie et l'importance du sujet, à ce jour aucune étude ne rapporte l'effet des spores aérobies sur ce produit laitier en raison de l'ajout de lait en poudre.

Un autre impacte de l'utilisation de la poudre de lait contaminée, par les spores aérobies, est la qualité du fromage fondu. Ce dernier représente une des formes de consommation de fromage les plus courantes en Algérie. La quantité consommée était de 105 tonnes en 2015 soit (2,51 kg / an / personne) (données fournies par le Centre national de l'informatique et des statistiques douanières CNIS, Algérie). La production de fromage fondu nécessite le mélange, le chauffage et la texturation de produits laitiers (fromage, beurre et lait en poudre) et de produits non laitiers (agents, émulsifiants et sels). La fusion du fromage est réalisée à une température variant entre 70 et 95°C pendant 4 à 15 min (Richonnet 2016).

Sadek *et al.* (2016) ont montré que l'une des deux principales familles de bactéries formant des spores dans l'industrie du fromage fondu est la famille des Bacillaceae, qui peut causer des altérations et/ou des intoxications d'origine alimentaire. Plusieurs types de détérioration peuvent se produire lors de la transformation du fromage en raison de la croissance d'espèces de bacilles telles que *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Geobacillus stearothermophilus* (Fernández-No *et al.*, 2011). Des exemples incluent la coagulation de la caséine par la protéase chymosine produite par certaines espèces de *Bacillus* ou *Geobacillus* et une altération « aigre-douce » produite par *Geobacillus stearothermophilus* en raison de sa capacité à produire de l'acide (Lücking *et al.*, 2013).

En Algérie, la seule étude menée par Benamara *et al.* (2016) a enregistré la présence de *Bacillus cereus* sur soixante échantillons de quatre marques différentes de fromages fondus fabriqués en Algérie dont la poudre de lait importée est un produit de base. Quatre isolats des spores de *Bacillus cereus* appartenant au groupe III, qui est un groupe toxique selon la classification de Guinebretiere *et al.* (2008).

En Egypte, Sadek et al. (2016) ont signalé la présence de *Bacillus cereus* dans les 150 échantillons de fromages fondus étudiés et dans les ingrédients utilisés dans leur fabrication en particulier la poudre de lait écrémé et le cheddar avec une occurrence variable. En outre, certains travaux montrent la présence et la persistance de cette bactérie lors de la fabrication du fromage cheddar, qui est le fromage de base pour la fabrication de fromage fondu, lait en poudre, qui représente l'une des principales matières premières dans la fabrication des fromages fondus, l'amidon modifié (McHugh *et al.*, 2017, Oliver *et al.*, 2016, Sadiq *et al.*, 2016, Cherif-Antar 2015, Lüking *et al.*, 2013, Gonzalez *et al.*, 1997).

Les résultats de la thermorésistance des spores de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Géobacillus toebii* ont montré une très grande variabilité. Les valeurs  $z$  des souches de *Bacillus cereus* ont été rapportées dans plusieurs data. La synthèse des données de la littérature a permis d'estimer des valeurs moyennes de  $z$  pour les spores de *Bacillus cereus* allant de 8,3°C (Afchain *et al.*, 2008) à 12,8°C (Van Asselt et Zwietering, 2006).

La valeur  $z$  moyenne pour les souches traitées dans notre étude se situe bien dans cette fourchette (6,54°C à 11,16°C). Toutefois, il existe de grandes différences entre les souches (de 6,54 à 11,16°C). Cela est peut-être dû à la différence de groupes phylogénétiques. Dans ce contexte, une analyse menée par Hue et al. (2014) a révélé des différences de valeur  $z$  entre certains groupes phylogénétiques de *Bacillus cereus*. La valeur  $z$  moyenne la plus élevée (12,0°C) a été observée pour le groupe VI, significativement différent du groupe VII ayant la valeur  $z$  la plus basse (5,7°C). La valeur  $z$  moyenne du groupe III (8,4°C) a été également inférieure à celle du groupe VI, mais avec une différence non significative. La faible valeur  $z$  du groupe VII est parmi les plus faibles de tous les pathogènes sporulés et est en fait d'une ampleur similaire à celle généralement observée pour les formes végétatives des bactéries (Van Asselt et Zwietering, 2006 ; FDA/CFSAN 2000).

Pour la souche de *Bacillus subtilis*, la valeur  $z$  est de 18,57 °C et les valeurs de  $D_{T^{\circ}C}$  variées de 16,01 min à 4,64 min pour 90°C et 100°C. Les résultats obtenus dans notre étude sont en accord avec les valeurs obtenues par d'autres études réalisées dans diverses solutions tampons. Par exemple, Montville et al. (2005) ont rapporté une valeur  $D_{90^{\circ}C}$  pour les endospores ATCC 6633 de *Bacillus subtilis* de 6 min à pH 7,0 dans le tampon de Clark et Lubs. De même, une valeur  $D_{105^{\circ}C}$  de 0,44 min obtenue par Cregenzán-Alberti et al. (2016) se situe dans la fourchette de 0,24 à 1,42 min rapportée par Condón et al. (1996) pour les

endospores STCC 4524 de *Bacillus subtilis* dans le tampon McIlvaine 264 à pH 7,0. Cependant, Ababouch et al. (1995) ont montré une résistance considérablement plus grande des endospores de *Bacillus subtilis* aux traitements thermiques, où une valeur moyenne de  $D_{115^{\circ}\text{C}}$  de 1,32 min pour les endospores de la souche 5230 de *Bacillus subtilis* dans le tampon de Buttersfield à pH 7,2. Par ailleurs autres études ont s'intéressait à la recherche des valeurs de  $D_{T^{\circ}\text{C}}$  dans le lait. Montville et al. (2005) ont obtenu des valeurs de  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  allant jusqu'à 12,8 min pour diverses espèces d'endospores de *Bacillus* dans du lait UHT disponible dans le commerce (2% de matière grasse) et Janštová et Lukášová ont rapporté une valeur moyenne de  $D_{100^{\circ}\text{C}}$  de 1,18 min parmi 18 souches différentes d'endospores de *Bacillus subtilis*. Cependant, des valeurs de  $D_{T^{\circ}\text{C}}$  considérablement plus élevées que celles observées dans la présente étude ont également été rapportées par Pendurkar et Kulkarni (1990) sur l'inactivation des endospores de *Bacillus subtilis* dans le lait, où une valeur moyenne de  $D_{100^{\circ}\text{C}}$  d'environ 60 min a été obtenue. Ces différences dans les valeurs de  $D_{T^{\circ}\text{C}}$  peuvent être dues à des variations dans les méthodes utilisées pour évaluer la thermorésistance, le milieu de traitement utilisé et les souches bactériennes étudiées. Les conditions de sporulations ont aussi un effet sur la résistance des spores. Cet effet a été déduit par Nguyen Thi Minh et al. (2011). Ces auteurs ont mis en évidence l'effet des conditions de sporulation des spores de *Bacillus subtilis* au moment de la croissance, de la germination, de la thermorésistance et la résistance à la haute pression. En outre, les changements dans les conditions de sporulation sont responsables de plusieurs changements qui affectent les différentes structures de la spore, comme la composition du protoplaste, la fluidité de la membrane et l'enveloppe des spores. Les perturbations affectant les différents composants des spores ont une influence sur leur résistance (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011).

La valeur  $D_{100^{\circ}\text{C}}$  est de 6,49 min pour la souche de *Bacillus licheniformis* étudiée ; est proche des résultats enregistrés Lukhing et al. (2013) mais un peu élevée de celle rapportée par Rodríguez-Lozano et al. (2010) qui était de 2.37 min dans du lait UHT semi-écrémé.

La souche de *Bacillus amyloliquefaciens* traitée thermiquement dans la présente étude a enregistré des valeurs  $D_{90, 95, 100^{\circ}\text{C}}$  de 15,22; 3,85 et 6,50 respectivement. La valeur  $z$  trouvée (8,34 min) est supérieure à celle (6,23 min) rapportée par Berendsen et al. (2014). Ce résultat confirme la conclusion de l'étude menée par Berendsen et al. (2014) qui a montré clairement que la thermorésistance des spores de différentes souches du groupe *Bacillus subtilis* peut varier considérablement. Les souches peuvent être séparées en deux groupes, auxquels s'appliquent différentes cinétiques d'inactivation thermique des spores.

## Conclusion

Dans cette étude, nous avons enregistré une charge moyenne de  $10^2$  à  $10^3$  spores/g avec une variation entre les échantillons de poudre de lait allant de moins de 100 spores à plus de  $10^4$  spores/g. Les profils prédominants isolés étaient le groupe *Bacillus cereus* suivi du groupe *Bacillus subtilis* : *Bacillus amyloliquefacian*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*. La présence des groupes III et IV de *Bacillus cereus* représente une menace potentielle pour la sécurité sanitaire du lait en poudre importé et commercialisé en Algérie. En outre, une activité protéolytique élevée des groupes *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* a été montrée, contrairement à l'activité de la lécitinase qui semble être moins importante pour les souches testées.

Les spores étudiées ont montré une sensibilité thermique différente. *Géobacillus toebii* était hautement thermorésistante. La présence de ces spores dans le lait en poudre oblige, ainsi, les opérateurs à utiliser des échelles de traitement thermique plus sévères qui affecteront sans doute la qualité des produits finis.

Nous ne pouvons pas nous permettre une comparaison entre les résultats de cette étude et les normes algériennes car il n'existe pas de critères officiels pour les spores aérobies dans le lait en poudre dans la réglementation algérienne. En effet, l'Arrêté interministériel du 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires, ne mentionne, pour les poudres de lait et de lactosérum, que trois critères à savoir les enterobactéries, Staphylocoques à coagulase + et Salmonella. Les niveaux et les types de spores autorisés par la réglementation dans les poudres de lait ne sont précisés que dans le cas des préparations pour nourrissons. L'absence de données scientifiques relatives aux spores aérobies mésophiles inféodées aux poudres de lait consommées en Algérie, en particulier, leur abondance, leur capacité à produire des enzymes et leur thermorésistance qui peuvent influencer la qualité des produits recombinaés justifie cette étude. Celle-ci montre l'importance d'inclure les spores comme critère d'hygiène de process et de *Bacillus cereus* comme critère de sécurité sanitaire. Il est du devoir des scientifiques d'attirer l'attention du gouvernement Algérien sur cette question. Pour toutes ces raisons, il est donc important que le gouvernement, les professionnels et les importateurs algériens sélectionnent la poudre de lait en fonction de sa qualité microbiologique, en particulier sa charge en spores bactériennes.

Les résultats de cette étude suggèrent qu'ils doivent exiger des poudres de lait moins chargées en spores, notamment pour *Bacillus cereus*.

Le dénombrement et l'identification des spores bactériennes aident à mettre en œuvre des actions correctives et préventives. En agissant au cours des étapes du processus de fabrication avant le traitement thermique, on pourra diminuer le nombre de spores qui, pour leur élimination, on pourra soumettre le produit à un traitement thermique moins intense et préserver ainsi la qualité organoleptique et nutritionnelles des produits finis. Ces actions peuvent être complétées par une meilleure compréhension de la structure des biofilms dans l'environnement de transformation du lait pour élaborer de meilleures mesures de maîtrise.

## Références Bibliographiques

- Ababouch LH, Gमित L, Eddafry R and Busta F F (1995) Thermal inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* spores suspended in buffer and in oils. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 669-676.
- Acker L (1969) Water activity and enzyme activity. *Food Technology* 23: 27-40.
- Afchain A L, Carlin F, Nguyen-The C, Albert I (2008) Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurized and chilled foods. *International Journal of Food Microbiology* 128: 165-173.
- Al-Abri S S, Al-Jardani A K, Al-Hosni M S, Kurup P J, Al-Busaidi S and Beeching N J (2011) A hospital acquired outbreak of *Bacillus cereus* gastroenteritis. *Journal of Infection and Public Health* 4: 180-186.
- Al-Shehri M A and Mostafa S Y (2004) Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from TihametAseer, Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7: 1631-1635.
- Alzamora S M, Cerrutti P, Guerrero S and López-Malo A (1995) Minimally processed fruits by combined methods. In: Welti Chanes, J., Barbosa Cañovas, G.V. (Ed.). Food preservation by moisture control -fundamentals and applications (pp. 463-492). Lancaster, USA : Technomic Pub. Co.
- ANSES (2011) Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments/ *Bacillus cereus*. Retrieved 2017/11/12 from <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0116Fi.pdf>.
- Aouadhi C, Maaroufi A and Mejri S (2013) Incidence and characterization of aerobic spore-forming bacteria originating from dairy milk in Tunisia. *International Journal of Dairy Technology* 67: 95-102.
- Aqel H, Al-Quadani F and Yousef T K (2012) A novel neutral protease from thermophilic *Bacillus* strain HUTBS62. *Journal of BioScience and Biotechnology* 1: 117-123.
- Arslan S, Eyi A and Küçüksarı R (2014) Toxigenic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. *Anaerobe* 25: 42-46.
- Aryal S (2018) Litmus Milk Medium Test. Microbiology Notes disponible sur le lien : <https://microbenotes.com/litmus-milk-medium-test/>. Consulté le 05.06.2020.
- Badhe P, Joshi M and Adivarekar R (2016) Optimized production of extracellular proteases by *Bacillus subtilis* from degraded abattoir waste. *Journal of BioScience and Biotechnology* 5: 29-36.
- Baechler R, Clerc M F, Ulrich S and Benet S (2005) Physical changes in heat-treated whole milk powder. *Lait* 85: 305-314.
- Ball C O (1923) Thermal process time for canned food. *Bulletin of the National Research Council* 37: 1-76.
- Barash J R, Hsia J K and Arnon S S (2010) Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas. *The Journal of Pediatrics* 156 402-408.
- Baril E, Coroller L, Couvert O, Leguerinel I, Postollec F, Boulais C, Carlin F and Mafart P (2012) Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus*

- licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiology* 30: 29-36.
- Barrientos M and Soria C (2019) Dairy, dry whole milk powder imports by country in 1000 MT. [https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=powdered-whole-milk&graph=im ports](https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=powdered-whole-milk&graph=im%20ports). Accessed 16/03/2020.
- Beattie S H and Williams A G (1999) Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Letter in Applied Microbiology* 28: 221-225.
- Behringer R and Kessler H G (1992) Thermal destruction kinetics of spores of selected *Bacillus* strains in skimmilk and skimmilkconcentrate. *International Dairy Journal* 2: 233-242.
- Benamara R (2016) Identification and characterization of *Bacillus cereus* spores isolated from Algerian cheese. PhD Thesis, Tlemcen University Algeria. Retrieved 2017/11/12 from <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/10182/1/finale.pdf>.
- Bennett S D, Walsh K A, Gould H A (2013) Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*-United States, 1998-2008. *Clinical Infectious Diseases* 57: 425-33.
- Berendsen E M, Zwietering M H, Kuipers O P and Wells-Bennik H J (2014) two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiology* 45: 18- 25.
- Berendsen E M, Zwietering MH, Kuipers OP and Wells-Bennik HJ (2014) Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiology* 45: 18- 25.
- Bhunja A K (2008) Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis (1st Ed., Chapt. 6). New York: Springer.
- Birchal V.S., Passos M.L., Wildhagen G.R.S., Mujumdar A.S. 2005. Effect of spray dryer operating variables overall milk powder quality. *Drying Technology* 23: 611–636.
- Bogdanovicova K, Necedova L, Harustiaková D and Janstová B (2017) Milk powder risk assessment with *Staphylococcus aureus* toxigenic strains. *Food Control* 73: 2-7.
- Borreani G, Ferrero F, Nucera D, Casale M, Piano S and Tabacco E (2019) Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium* spp. and *Paenibacillus* spp. spores in silage, total mixed ration, dairy cow feces, and raw milk. *Journal of Dairy Science* 102: 8273-8289.
- Bottone E J (2010) *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 382-98.
- Brett M M, McLauchlin J, Harris A, O'Brien S, Black N, Forsyth R J et al. (2005) A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: Evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food. *Journal of Medical Microbiology* 54: 769-776.
- Briggs A (1966) The resistance of spores of the genus *Bacillus* to phenol, heat and radiation. *Journal of Applied Bacteriology* 29: 490-504.
- Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, deBuyser M-L, Collette C, Garin-Bastuji B and Thorel M-F (1997) Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en

- France et en Europe. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 16: 452-471.
- Brown KL (2000) Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin* 56: 158-171.
- Buehner KP, Anand S, Djira GD and Garcia A (2015). Corrigendum to prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. *Journal of Dairy Science* 97: 8009-8016.
- Burgess S A, Brooks JD, Rakonjac J, Walker KM and Flint SH (2009) The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1012-1018.
- Burgess S A, Flint S H, Lindsay D, Cox M P and Biggs P J (2017) Insights in to the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC Microbiology* 17: 1-140.
- Burke N, Southern M, Ryan A and Adley C (2018) Investigating the current skim milk powder inspection strategies for improvements in process optimization. *Food Control* 94: 17–21.
- Bylund Gösta et al., (2003) Dairy processing handbook. pp 442, Tetra Pak Processing Systems AB S-221 86 Lund, Sweden
- Cahill S M, Wachsmuth I K, Costarrica M D and Ben Embarek P K (2008). Powdered infant formula as a source of Salmonella infection in infants. *Clinical Infectious Diseases* 46: 268-273.
- Celestino E L, Iyer M and Roginski H (1997) The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. *International Dairy Journal* 7: 119-127.
- Chandan R C and Kilara A (2011). Dairy Ingredients for Food Processing (1st edn., Chapt. 20). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd.
- Chen L (2000) Thermophilic enzymes and their impact on milk powder during storage. PhD thesis. Waikato University. Hamilton, New Zealand. Retrieved 2017/11/12 from <http://www.worldcat.org/title/thermophilic-enzymes-and-their-impact-on-milk-powder-during-storage/oclc/155723710>.
- Chen L, Coolbear T and Daniel R M (2004) Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal* 14: 495-504.
- Chen L, Daniel R M and Coolbea T (2003) Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal* 13: 255-275.
- Chérif Antar A (2015). Identification et caractérisation de la flore bactérienne mésophile constitutive des biofilms inféodés aux lignes de production de lait de vache pasteurisé. PhD thesis, Tlemcen University. Algeria. Retrieved 2017/11/12 from <https://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/bitstream/123456789/12806/1/cherif%20antar%20asma.pdf>
- Condón S, Palop A, Raso J and Sala F J (1996) Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 22: 149-152
- Coorevits A, De Jonghe V, Vandroemme J, Reekmans R, Heyrman J, Messens W, De Vos P and Heyndrickx M (2008) Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-

- forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 126-140.
- Cosentino S, Mulargia A F, Pisano B, Tuveri P and Palmas F (1997) Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 38: 235–238.
- Cregenzán-Alberti O, Arroyo C, Dorozko A, Whyte P, Lyng JG (2016) Thermal characterization of *Bacillus subtilis* endospores and a comparative study of their resistance to high temperature pulsed electric fields (HTPEF) and thermal-only treatments. *Food Control* doi: 10.1016/j.foodcont.2016.11.012.
- De Jonghe V, Coorevits A, De Block J, Coillie E V, Grijspeerdt K, Herman L, De Vos P and Heyndrickx M (2010) Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 136 : 318- 325.
- Delarras C (2007) Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Ed Lavoisier, pp 128-271.
- Delmas G, Jourdan da Silva N, Pihier N, Weill F X, Vaillant V, de Valk H (2010) Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *BulletinEpidémiologique Hebdomadaire* 31: 344-348.
- Dettling A, Doll E, Wedel C, Hinrichs J, Scherer S and Wenning M (2019) Accurate quantification of thermophilic spores in dairy powders. *International Dairy Journal* 98: 64-71.
- Dhaked R K, Singh M K, Singh P and Gupta P (2010) Botulinum toxin: Bioweapon & magic drug. *Indian Journal of Medical Research* 132: 489-503
- Didouh N (2015) Caractérisation des spores de *Bacillus cereus* isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection. PhD thesis, Tlemcen University. Algeria. Retrieved 2017/11/12 from [dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/8478/1/Nassima-DIDOUH.pdf](https://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/8478/1/Nassima-DIDOUH.pdf).
- Doyle C J, Gleeson D, Jordan K, Beresford R, Ross P, Fitzgerald G F and Cotter PD (2015) Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 197 77-87.
- Drobniewski F A (1993) *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews* 6: 324-338.
- Ehling-Schulz M, Fricker M and Scherer S (2004a) Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiology Letters* 232: 189-95.
- Ehling-Schulz M, Martina F and Siegfried S (2004b) *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition Food Research* 48 479-487.
- Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Märtilbauer E and Scherer S (2005) Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Applied of Environmental Microbiology* 71: 105-13.
- Eijlander R T, Abee T and Kuipers O P (2011) Bacterial spores in food: how phenotypic variability complicates prediction of spore properties and bacterial behavior. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 180-186.

- El-Shafei H A and Rezkallah L A (1997) Production, purification and characterization of *Bacillus lipase*. *Microbiology Research* 152: 199-208
- El hariry H M (2008) Biofilm formation by endospore-forming bacilli on plastic surface under some food-related and environmental stress conditions. *Global Journal of Bio Sciences and Biotechnology* 3: 69-78.
- Evelyn F and Silva V M (2016) Modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores in beef slurry by 600 MPa HPP combined with 38-70 °C: comparing with thermal processing and estimating the energy requirements. *Food and Bioproducts Processing* 99: 179-187.
- Faille C, Fontaine F and Benezech T (2001) Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *Journal of Applied Microbiology* 90: 892-900.
- FDA/CFR (2000) Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm100158.htm> (accessed February 17th, 2014).
- Fernández-No IC, Guarddon M, Böhme K, Cepeda A, Calo-Mata P and Barros-Velázquez J (2011) Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. *Food Microbiology* 28: 605-610.
- Fincan S A and Enez B (2014) Production, purification, and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Starch/Stärke* 66: 182-189.
- Flint S H, Bremer P J and Brooks J D (1997) Biofilms in dairy manufacturing plant – description, current concerns and methods of control. *Biofouling* 11: 81-97.
- Flint S, Palmer J, Bloemen K, Brooks J and Crawford R (2001) The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 90: 151-157.
- FSAI (2014) *Guidelines for the Interpretation of Results of Microbiological Testing of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market* (Revision 1). Dublin, Ireland: Food Safety Authority of Ireland.
- Garny K, Horn H and Neu T R (2008) Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31: 619-629.
- Gbalou R, Rouquette P, Lefebvre D, Girbal-Neuhauser E and Marcato-Romain CE (2017) In situ analysis of *Bacillus licheniformis* biofilms: Amyloid-like polymers and DNA are involved in the adherence and aggregation of the extracellular matrix. *Journal of Applied Microbiology* 122: 1262-1274
- Ghori M I, Iqbal M J and Hameed A (2011) Characterization of A Novel Lipase From *Bacillus* Sp. Isolated From Tannery Wastes. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 22-29.
- Giammanco G M, Aleo A, Guida I and Mammina C (2011) Molecular epidemiological survey of *Citrobacter freundii* misidentified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) and *Enterobacter hormaechei* isolated from powdered infant milk formula. *Food borne Pathogens and Disease* 8: 517-525.

- Gibson T and Gordon R E (1974) *Bacillus* In R E Buchanan and N E Gibbons (Ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (pp. 529-550). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Godon J J, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F and Moletta R (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2802-2813.
- Gonzalez I, Lopez M, Was M, Gonzkezi J and Bernard A (1997) Thermal resistance of *Bacillus cereus* spores as affected by additives in the recovery medium. *Journal of Food Safety* 1: 71-72.
- Gopal N, Hill C, Ross P R, Beresford T P, Fenelon M and Cotter P D (2015) The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in Microbiology* 6 1418.
- Granum P E, O'Sullivan K and Lund T (1999). The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* 177: 225-229.
- Guinebretiere M H, Velge P, Couvert O, Carlin F and Debuyser M L (2010) Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *Journal of Clinical Microbiololy* 48: 3388-3391.
- Guinebretière M, Thompson F L, Sorokin A and al. (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology* 10 851-865.
- Guinebretière M, Thompson F L, Sorokin A et al. (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology* 10 : 851-865.
- Guiraud J P (2012) *Microbiologie alimentaire. Industries Agro-alimentaires*. ISSN 1633-8456. ISBN 2100570080, 9782100570089, Dunod.696 Pages.
- Hammer B W and Babel F J (1957) *Dairy Bacteriology*. 4th Edit, pp 614. Published by John Wiley & Sons, New York.
- Heyndrickx M and Scheldeman P (2002) *Bacilli* associated with spoilage in dairy and other food products. In: R Berkely, M Heyndrickx N A Logan and P De Vos (Eds.), *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives* (pp. 64-82). Oxford, UK: Blackwell Science.
- Hill B M and Smythe B W (2012) Endospores of thermophilic bacteria in ingredient milk powders and their significance to the manufacture of sterilized milk products: an industrial perspective. *Food Reviews International* 28: 299-312.
- Hill W M and Fields M L (1967) Factors affecting growth and interaction of the rough and smooth variants of *Bacillus stearothermophilus* (2) Media and pH. *Journal of Food Sciencen* 32: 463-467.
- Hornstra L M, Beek T, Smelt A J P , Kallemeijn W W and Brul S (2009) On the origin of heterogeneity in (preservation) resistance of *Bacillus* spores: input for a systems analysis approach of bacterial spore outgrowth. *International Journal of Food Microbiology* 134: 9-15.
- Houry A, Briandet R, Aymerich S and Gohar M (2010) Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* 156: 1009-1018.

- Hue L T, Dambar B K, Chris W M (2014) Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 189: 183-188.
- Huemer I A, Klijn N, Vogelsang H W J and Langeveld L P M (1998) Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *International Dairy Journal* 8: 851-855.
- Huybens N, Houeix J, Licois D, Mainil J and Marlier D (2009) Inoculation and bacterial analyses of fractions obtained from the reference inoculum TEC4 which experimentally reproduces the epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Science* 17: 185-193.
- Ingram, M. (1969). Sporeformers as food spoilage organisms. In G.W. Gould, A. Hurst (Ed.), *The bacterial spore* (pp. 549-608). London: Academic Press.
- Iqbal I, Aftab M N, Afzal M, Ur-Rehman A, Aftab S, Zafar A, Ud-Din Z, Khuharo A R, Iqbal J and Ul-Haq I (2014) Purification and characterization of cloned alkaline protease gene of *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of Basic Microbiology* 54: 1-12.
- Jacob R A, Nicholas R C and Pflug I J (1973) High temperature short time (HTST) processing of suspensions containing bacterial spores. *Journal of Food Science* 38: 168-172.
- Jacobs C, Braun P and Hammer P (2011) Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. *Journal of Dairy Science* 94: 3801-3810.
- Janstova B and Lukasova J (2001) Heat resistance of *Bacillus* Spp. spores isolated from cow's milk and farm environment. *Acta Veterinaria Brunensis* 70: 179-184.
- Janštová B and Lukášová J (2001) Heat resistance of *Bacillus* spp. spores isolated from cow's milk and farm environment. *Acta Veterinaria Brno* 70: 179-184.
- Jeanet R, Schuck P, Famelart M H, Maubois J L (1996) Intérêt de la nanofiltration dans la production de poudres de lactosérum déminéralisées. *Le Lait* 76 : 283-301.
- Jindal S, Anand S, Kang H, Goddard J, Metzger L and Amamcharla J (2016) Evaluation of modified stainless steel surfaces targeted to reduce biofilm formation by common milk sporeformers. *Journal of Dairy Science* 99 : 1-12.
- Joffin J N and Leyral G (2001) *Microbiologie technique: Dictionnaire des techniques*, 3rd Ed. pp 163-164. Bordeaux: CRDP d'Aquitaine.
- JORADP Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire N° 069. (1993). Arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. Retrieved 2017/11/12 from [http://www.qualilab.dz/documents/LAIT\\_ET\\_PRODUIITS\\_LAITIERS/3-Arrete\\_interministeriel\\_du\\_29\\_Safar\\_1414.pdf](http://www.qualilab.dz/documents/LAIT_ET_PRODUIITS_LAITIERS/3-Arrete_interministeriel_du_29_Safar_1414.pdf).
- Kaci et Yahiaoui 2017 Industrie laitière: la capacité de production installée sous-exploitée. Forum Entrepreneur de Progres, revue de Press.
- Kacimi El-Hassani S (2013) La dépendance alimentaire en Algérie: importation de lait en poudre versus la production locale, quelle évolution? *Mediterranean Journal of Social Sciences* 4: 152-158.

- Kaur G, Singh A, Sharma R, Sharma V, Verma S and Sharma P K (2016) Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India. *3 Biotechnology* 6: 49.
- Kelly J., Kelly P.M., Harrington D. 2002. In: uence of processing variables on the physicochemical properties of spray dried fat-based milk powder. *Lait* 82: 401-412.
- Kotzekidou (2014)*Geobacillusstearothermophilus* (Formerly *Bacillus stearothermophilus*).In *Batt. C.A & Tortorello, M.L* . Encyclopedia of Food Microbiology (2<sup>nd</sup>Edn), NY, Oxford: Academic Press.
- Kubrak O I, Storey J M, Storey K B and Lushchak V I (2010) Production and properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. BKL20. *Canadian Journal of Microbiology* 56 279-288.
- Kumar S, Kikon K, Upadhyay A, Kanwar S S and Gupta R (2005) Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression Purification* 41 38-44.
- Kumar C G, Tiwari M P & Jany K D (1999) Novel alkaline serine proteases from an alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties. *Process Biochemistry* 34: 441-449.
- Kumari S and Sarkar P K (2014) Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* group from various marketed dairy products in India. *Dairy Science & Technology* 94: 483-497.
- Kumari S and Sarkar P K (2016) *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control* 69: 20-29.
- Labuza T P (1970) Properties of water as related to the keeping quality of foods. Proceedings of the Third International Congress of Food Science & Technology. Washington, DC.
- Lan X, Wang J, Zheng N, Zhao S, Li S and Li F (2017) Prevalence and risk factors for *Bacillus cereus* in raw milk in Inner Mongolia, Northern China. *International Journal of Dairy Technology* 71: 269–273.
- Lee D W, Koh Y S, Kim K J, Kim B C, Choi H J, Kim D S, Suhartono M T and Pyun Y R (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters* 179: 393-400.
- Lesuisse E, Schanck K and Colson C (1993) Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *European Journal of Biochemistry* 216: 155-160.
- Lianghua T and Liming X (2005) Purification and Partial Characterization of a Lipase From *Bacillus coagulans* ZJU318. *Applied of Biochemistry and Biotechnology* 125: 01-39.
- Lin L L, Chyau C C and Hsu W H (1998) Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnology of Applied Biochemistry* 28: 61-8.
- Lindsay D, Brözel V S, Mostert J F and von Holy A (2000a) Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide range of pH. *International Journal of Food Microbiology* 54: 49-62.
- Liu X D and Xu Y (2007) A novel raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. *Bioresource Technology* 99: 4315-4320.

- Logan N A and Devos P (2009) Genus *Bacillus*. In: P DeVos, G M Garrity, D Jones, N R Krieg, W Ludwig, F A Rainley, K H Schleifer, W B Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 21-108). New York : Springer Science and Business Media.
- Lucking G, Stoeckel M, Atamer Z, Hinrichs J and Ehling-Schulz M(2013) Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 166: 270-279.
- Lücking G, Stoeckel M, Atamer Z, Hinrichs J and Ehling-Schulz M(2013) Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 166: 270-279.
- Lukášová J, Vyhnálková J and Pácová Z (2001) *Bacillus* species in raw milk and in the farm environment. *Milchwissenschaft* 56: 609-611.
- Lund T, De Buyser M L and Granum P E (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* 38: 254-61.
- Ma J, Zhang Z, Wang B, Kong X, Wang Y, Cao S and Feng Y (2006) Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. *Protein Expression Purification* 45 : 22-29.
- Malek F (2013) Le biofilm en industrie laitières, caractérisation, facteurs de développement et élimination. Cas du Biofilm de *Bacillus cereus* dans quelques laiteries de la région de Tlemcen. PhD thesis, Tlemcen University. Algeria. Retrieved 2017/11/12 from [dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/5607/1/THESE.pdf](http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/5607/1/THESE.pdf).
- Marchand S, De Block J, De Jonghe V, Coorevits A, Heyndrickx M and Herman L (2012) Biofilm formation in milk production and processing environments; Influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 133-147.
- McClure P J (2006) Spore-forming bacteria. In Blackburn (Ed.), *Food spoilage microorganisms* (pp. 579-623). Sawston, United Kingdom: Woodhead Publishing.
- McGuire J and Kirtley S A (1989) On surface characterization of materials targeted for food contact. *Journal of Food Science* 54: 224-226.
- McHugh AJ, Feehily C, Hill C and Cotter PD (2017) Detection and enumeration of spore-forming bacteria in powdered dairy products. *Frontiers in Microbiology* 8: 109.
- Meer R R, Baker F W, Bodyfelt F W and Griffiths M W (1991) Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products -A review. *Journal of Food Protection* 54: 969-979.
- Mehta D S, Metzger L E, Hassan A N, Nelson B K and Patel H A (2019) The ability of spore-formers to degrade milk proteins, fat, phospholipids, common stabilizers, and exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science* 102: 10799-10813.
- Mehta D S, Metzger L E, Hassan A N, Nelson B K and Patel H A (2019) The ability of spore-formers to degrade milk proteins, fat, phospholipids, common stabilizers, and exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science* 102: 10799-10813.
- Meler J, Rademacher B, Walenta W and Kessler H G (1996) Heat-resistant spores under UHT treatment. In: *Proceedings of the IDF Symposium: Heat treatments and alternative methods*. Vienna, Austria, 6-8 September 1995 Brussels: IDF, 17-25.

- Merzougui S, Cohenn N, Grosset N, Gautier M and Lkhider M (2013) Enterotoxigenic Profiles of psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group isolated from food in Morocco. *International Journal of Engineering Research and Applications* 3: 964-970.
- Miller R A, Kent D J, Watterson M J, Boor K J, Martin N H and Wiedmann M (2015) Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *Journal of Dairy Science* 98: 8492-8504.
- Mistry V V (2001) Fermented milks and cream. In E.H. Marth, & J.L. Steele (Eds.), *Applied Dairy Microbiology* (pp. 301–305). New York: Marcel Dekker.
- Molva C, Sudagidan M and Okuklu B (2009) Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. *Food Control* 20: 829-834.
- Montville TJ, Dengrove R, De Siano T, Bonnet M and Schaffner D W (2005) Thermal resistance of spores from virulent strains of *Bacillus anthracis* and potential surrogates. *Journal of Food Protection* 68: 2362-2366.
- Morgenroth E (2003) Detachment an often overlooked phenomenon in biofilm research and modeling. In S Wuertz, P A Wilderer and P L Bishop (Eds) *Biofilms in Waste water Treatment* (264-270). UK, London : IWA Publishing.
- Moussa-Boudjemaa B, Kihal M, Lopez M and Gonzalez J (2004) The incidence of *Bacillus cereus* spores in Algerian milk: a study on the chief sources of contamination. *Archive for Food Hygiene* 55: 73-76.
- Murphy P M, Lynch D and Kelly P M (1999) Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology* 52: 45-50.
- Nawani N, Khurana J and Kaur J (2006) A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: Purification and characterization. *Molecular and Cellular Biochemistry* 290: 17-22.
- Nazarowec-White M and Farber J M (1997) *Enterobacter sakazakii*: A review. *International Journal of Food Microbiology* 34: 103-113.
- Nguyen Thi Minh H, Durand A, Loison P, Perrier-Cornet J M, Gervais P (2011) Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1409-1417.
- Nilegaonkar S S, Zambare V P, Kanekar P P, Dhakephalkar P K and Sarnaik S S (2007) Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology* 98: 1238-1245.
- O'Callaghan D, Cunningham P (2005) Modern process control techniques in the production of dried milk products - a review. *Le Lait, INRA Ed* 85 (4-5), pp.335-342.
- Oliveira R B A, Margalho Larissa P, Nascimento Janaina S, Costa Leonardo E O, Portela Jessica B, Cruz Adriano G and SantAna Anderson S (2016) Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends in Food Science & Technology* 57: 11-19.
- Pagedar A and Singh J (2011) Influence of physiological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. *International Dairy Journal* 23: 30-35.

- Parkar S G, Flint S H and Brooks J D (2003) Physiology of biofilms of thermophilic bacilli-potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 553-560.
- Parkar S, Flint S, Palmer J and Brooks J (2001) Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 90 901-908.
- Pasvolsky R, Zakin V, Ostrova I and Shemesh M (2014) Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. *International Journal of Food Microbiology* 181: 19-27.
- Pena W, De Andrade N J, Soares N F F, Alvarenga V O, Rodrigues S, Granato D, Gilardo A D and Sant'Ana A S (2014) Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *International Dairy Journal* 3: 153-158.
- Pendurkar S H and Kulkarni P R (1990) Heat resistance of *Bacillus* spores exposed to food processing conditions. *Die Nahrung* 34: 177-180
- Phillips J D and Griffiths MW (1990) Pasteurized dairy products: the constraints imposed by environmental contamination. In: J O Nriagu and M S Simmons (Ed.), *Food Contamination from Environmental Sources* (pp. 387-456). USA: Wiley.
- Prevost S, André S and Remize F (2010) PCR detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage. *Current Microbiology* 61: 525-533.
- Randrianjatovo I, Girbal-Neuhauser E and Marcato-Romain C E (2015) Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 4835-4844
- Rauld, Biswas T, Mukhopadhyay S, Das S K and Gupta S (2014) Production and partial purification of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) using solid state fermentation. *Biochemistry Research International*, Retrieved 2017/11/12 from <http://dx.doi.org/10.1155/2014/568141>.
- Ray B (2004) *Fundamental food microbiology* (3rd edn.). Florida: CRC Press.
- Reginensi S M, Gonzalez M J, Olivera J A, Sosa M, Juliano P and Bermudez J (2011) RAPD based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International Journal of Food Microbiology* 148: 36-41.
- Remenant B, Jaffres E, Dousse X, Pilet MF and Zagorec M (2015) Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology* 45: 45-53.
- Renner E (1988) Storage stability and some nutritional aspects of Milk powders and ultra high temperature products at high ambient temperatures. *Journal of Dairy Research* 55 : 125-142.
- Richonnet C (2016) Caractéristiques nutritionnelles des fromages fondus. *Cahier de Nutrition et de Diététique* 51 : 48-56.
- Robinson R K (2002) *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*, 3rd Ed., Wiley & Son, pp 198, New York. ISBN: 978-0-471-38596.
- Rodríguez-Lozano A, Campagnoli M, Jewel K, Monadjemi F and Gazev J E (2010) *Bacillus* spp. thermal resistance and validation in soups. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial*. A. Méndez-Vilas (ed). pp 537-544.

- Ronimus R S, Parker L E, Turner N, Poudel S, Rückert A and Morgan H W (2003) A RAPD based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology* 85: 45-61.
- Ronimus R S, Rückert A and Morgan HW (2006) Survival of thermophilic spore forming bacteria in a 90-year-old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds Hut in Antarctica. *Journal of Dairy Research* 73: 235-243.
- Rückert A, Ronimus R S and Morgan H W (2004) A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International Journal of Food Microbiology* 96: 263-272.
- Sadek Z I, Refaat B M, Abd El-Shakour E H, Mehanna N S H and Hassan M (2016) Potential sources of aerobic and anaerobic spore former bacteria in processed cheese. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 6: 1830-1837.
- Sadiq F A, Flint S c, He G (2018) Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. *International Dairy Journal* 85: 159-168
- Sadiq F A, Li Y, Liu T, Flint S, Zhang G and He G (2016) A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China. *International Journal of Food Microbiology* 217: 200-208.
- Sambrook J and Russell D W (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 1st Ed. Chap 1, Essentials, pp. 1-78. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sangeetha R, Geetha A and Arulpandi I (2010) Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* Vsg1: production, purification and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 179-185.
- Saxena R K, Dutt K, Agarwal L and Nayyar P (2007) A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology* 98: 260-265.
- Scheldeman P, Herman L, Foster S and Heyndrickx M (2006) *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology* 101: 542-555.
- Scheldeman P, Pil A, Herman L, De Vos P and Heyndrickx M (2005) Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied Environmental Microbiology* 71: 1480-1494.
- Schuck P (2011) Modifications des propriétés fonctionnelles des poudres de protéines lactières: Impact de la concentration et du séchage. *Innovations Agronomiques* 13: 71-99
- Schuck P, Mejean S, Dolivet A and Jeantet R (2005) Thermohygro-metric sensor: A tool for optimizing the spray drying process. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6: 45-50.
- Scott S A, Brooks J D, Rakonjac J, Walker K M and Flint S H (2007) The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology* 60: 109-117.
- Seale R B, Dhakal R, Chauhan K, Craven H M, Deeth H C, Pillidge C J, Powell I B and Turner M S (2012) Genotyping of present-day and historical *Geobacillus* species

- isolates from milk powders by high-resolution meltanalysis of multiple variable-number tandem-repeat loci. *Applied Environmental Microbiology* 78: 7090-7097.
- Shaheen R, Svensson B, Andersson M A, Christiansson A and Salkinoja-Salonen M (2010) Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology* 27: 347-355.
- Shapton D A and Shapton N F (1993) Principles and practices for the safe processing of foods, (1st Edn). UK: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Sharma K-M, Kumar R, Panwar S and Kumar A (2017) Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15: 115-126.
- Sharma M and Anand S K (2002) Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry a case. *Food Control* 13: 469-477.
- Shehata T E and Collins E B (1972) Sporulation and heat resistance of strains of *Bacillus*. *Journal of Dairy Science* 55: 1405-1409.
- Shrestha A K, Howes T, Adhikari B P and Bhandari B R (2008) Spray drying of skim milk mixed with milk permeate effect on drying behavior, physicochemical properties, and storage stability of powder. *Dry Technology* 26: 239-247.
- Shukla R J and Singh S P (2015) Production optimization, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus licheniformis* TSI-14. *Biosynthesis Nutrition Biomedical* 67: 629- 639.
- Si T, Li B, Zhang K, Xu Yiran, Zhao H and Sweedler V (2016) Characterization of *Bacillus subtilis* colony biofilms via mass spectrometry and fluorescence imaging. *Journal of Proteome Research* 15: 1955-1962.
- Sonbol H, Joseph S, McAuley C M, Craven H M and Forsythe S J (2013) Multilocus sequence typing of Cronobacter spp. from powdered infant formula and milk powder production factories. *International Dairy Journal* 30: 1-7.
- Srey S, Jahid I K and Ha S D (2013) Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31: 572-585.
- Stapelfeldt H, Nielsen B R and Skibsted L H (1997) Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. *International Dairy Journal* 7: 331-339.
- Stenfors Arnesen L P, Fagerlund A and Granum P E (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews* 32: 579-606.
- Sugihara A, Tani T and Tominaga Y (1991) Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus* sp. *Journal of Biochemistry* 109: 211-216.
- Tatzel R, Ludwig W, Schleifer K H and Wallnfer P R (1994) Identification of *Bacillus* strains isolated from milk and cream with classical and nucleic acid hybridization methods. *Journal of Dairy Research* 61: 529-535.
- Taylor J M W, Sutherland A D, Aidoo K E and Logan N A (2005) Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters* 242: 313-317.

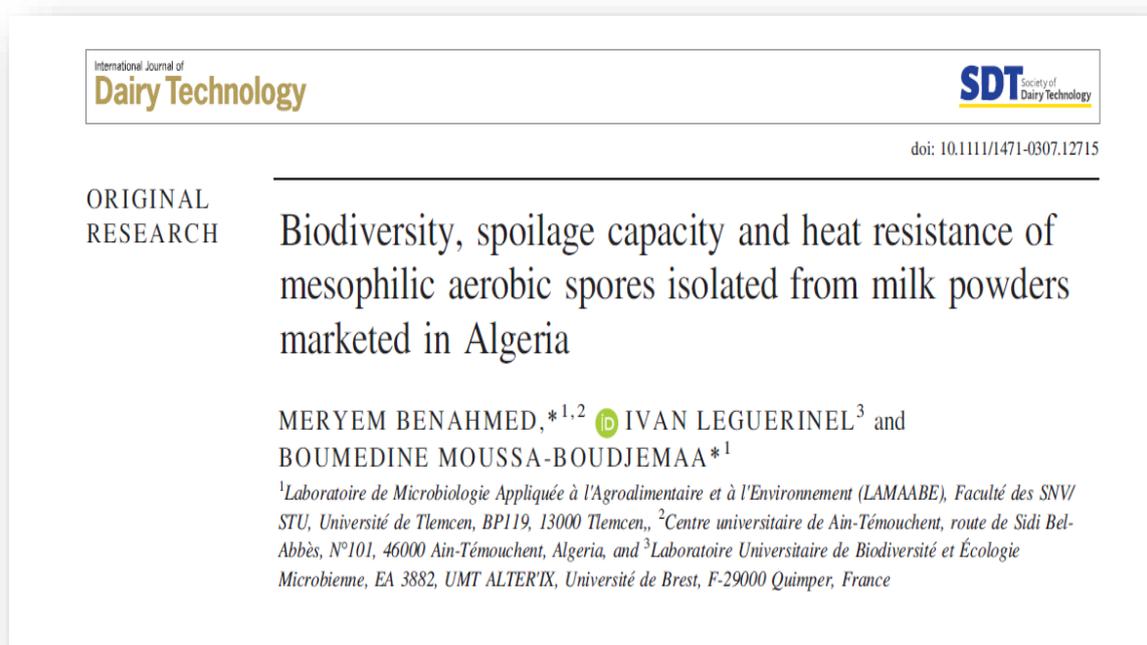
- Troller J A and Christian J H B (1978) Water activity and food (1<sup>st</sup>edn., Chapt. 11). New York, San Francisco, London: Academic Press.
- USDA (2012) All Dairy Products: Per capita availability adjusted for loss. Retrieved 2017/11/12 from <http://search.ers.usda.gov/>
- Van Asselt E D, Zwietering M H (2006) A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 107: 73-82.
- Vanderkelen J J, Mitchell R D, Laubscher A, Black M W and Goodman A L (2016) Typing and tracking Bacillaceae in raw milk and milkpowder using pyroprinting. *Journal of Dairy Science* 99: 146-151.
- Vieira de Carvalho Raquel, Thamy Livia Ribeiro Côrrea, Júlia Caroline Matos da Silva, Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira Mansur, and Meire Lelis Leal Martins (2008) Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 102-107.
- Walstra P, Wouters J T M and Geurts T J (2006) Dairy Science and Technology, 2nd Ed. Chap 20, milk powders, pp. 513-535, London, New York: Taylor & Francis group.
- Wang N, Yuana L, Sadiq F A and Hea G (2019) Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* metabolites against biofilm formation by *Bacillus licheniformis* isolated from milk powder products. *Food Control* 106: 31-106721.
- Watterson M J, Kent D J, Boor K J, Wiedmann M and Martin N H (2014) Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of Dairy Science* 97: 2487-2497.
- Wijman J G E, de Leeuw P, Moezelaar R, Zwietering M H and Abee T (2007) Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1481-1488.
- Wong H C, Chang M H, Fan J Y (1988) Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Applied Environmental Microbiology* 54: 699-702.
- Workman D (2019) Top milk imports by country. <http://www.worldstopexports.com/international-markets-for-imported-milk-by-country>. Accessed 16/03/2020.
- Xing X, Zhang Y, Wu Q, Wang X, Ge W and Wu C (2016) Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk powder processing plants. *Food Control* 59: 644-650
- Ye A., Anema S.G., Singh H. 2007. Behaviour of homogenized fat globules during the spray drying of whole milk. *International Dairy Journal* 17: 374-382.
- Yuan DD, Liu GC, Ren DY, Zhang D, Zhao L, Kan C P, Yang Y Z, Ma W, Li Y and Zhang L B (2012) A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control* 25: 752-757.
- Zhang F, Yang X, Geng L, Zhang Z, Yin Y and Li W (2016) Purification and characterization of a novel and versatile  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Anoxybacillus* sp. *YIM* 342. *Starch* 68: 446-453.

Zhao Y, Caspers M P, Metselaar K I, de Boer P, Roeselers G, Moezelaar R, Nierop Groot M, Montijn R C, Abee T and Kort R (2013) Abiotic and microbiotic factors controlling biofilm formation by thermophilic sporeformers. *Applied Environmental Microbiology* 79: 5652-5660.

# VALORISATIONS DES TRAVAUX DE THESE

## 1. Publication avec comité de lecture

**M. Benahmed**, I. LeguerineL, B. Moussa-boudjemâa 2020. Biodiversity, spoilage capacity and heat resistance of mesophilic aerobic spores isolated from milk powders marketed in Algeria. *International Journal of Dairy Technology*. Doi:[10.1111/1471-0307.12715](https://doi.org/10.1111/1471-0307.12715).



## 2. Publication en préparation

M. Benahmed, AG. Mathot, K. Medjahdi, F. Postollec, O. Couvert, L. Coroller, M. Ziane, I. Leguerinel, B. Moussa-Boudjemâa. Dried milk and milk powder as a vector of spoilage bacteria in dairy industry (Case of Algerian Dairy Industry). *En préparation pour soumission*.

### 3. Communications orales

- **M. Beanahmed**, K. Medjahdi, AG. Mathot, I. Benamar, A. Cherif Antar, F. Postollec, I. Leguerinel et B. Moussa-Boudjemaa (2017). Aerobic spore in milk powder marketed in Algeria. **SAFOOD1, Tlemcen (Algeria)**.
- M. Benahmed, I. Leguerinel et **B. Moussa-Boudjemaa** (2018). Spore forming bacteria in imported milk powder used in Algerian dairy Industry. **SQUAD2, Tripoli (Liban)**.
- 

### 4. Communications affichées

- Mars 2014** Participation au 5<sup>ème</sup> atelier international de biotechnologie & son rôle dans le développement économique des pays arabes, Khartoum, *Sudan*.
- Juin 2014** Participation à la journée mondiale du lait, SBA, *Algérie*.
- Juin 2014** Participation à la 1<sup>ère</sup> journée scientifique de l'Agro-alimentaire, faculté des SNV/STU, université de Tlemcen. *Algérie*.
- Novembre 2015** Participation au 1<sup>er</sup> congrès international de la Nutrition et des sciences des aliments, Tlemcen. *Algérie*.
- Mars 2017** Participation au congrès international des bactéries sporulées dans les aliments, Quimper. *France*.
- Mars 2017** Participation au deuxième workshop sur le management et l'amélioration génétique des plantes et des ressources microbiennes, Tlemcen. *Algérie*.
- Novembre 2017** Participation au 3<sup>ème</sup> workshop, lait : production, conservation et valorisation, Tlemcen. *Algérie*.

## 5. Prix de la meilleure communication affichée en 2018 au séminaire national sur l'avenir de l'agriculture et la transformation des produits agricoles en Algérie.

### Milk powder and aerobic spores forming bacteria.

<sup>a</sup>Meryem Benahmed, <sup>b</sup>Khadidja Medjahdi, <sup>c</sup>Anne-Gabrielle Mathot, <sup>d</sup>Asma Chérif Antar, <sup>e</sup>Ibrahim Benamar, <sup>f</sup>Rym Benamara <sup>g</sup>Florence Postollec, <sup>h</sup>Ivan Leguérinel & <sup>i</sup>Boumediene Moussa-Boudjemaa

<sup>a</sup> Université de Tlemcen, laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire au biomédical et à l'environnement, Algérie.

<sup>b</sup> Université de Brest Occidental, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, 6 rue de l'Université, F-29334 Quimper, France

<sup>c</sup> ADRIA Food safety and quality unit, UMT14.01 SPORE-RISK, Quimper, France.

\*dr.meryembahmed@gmail.com

#### Introduction & Objectives

Algeria is the second largest importer of milk powder in the world. Algerian dairy industry use primarily milk powder and anhydrous milk fat to produce pasteurized and sterilized milk, cheese and fermented milk. However, milk powder and dried milk products are known to be frequently contaminated with bacilli aerobic spores forming bacteria, these can survive to heat treatments and persist during processing. *Bacillus* spp. may cause food spoilage and/ or food poisoning due to its toxigenic and pathogenic nature, and extracellular enzymes. **The aim of this study was to determine the biodiversity and spoiling enzymatic activities of mesophilic aerobic spore formers bacilli in imported milk powders marketed in Algeria.**

#### Material & Methods:



# Annexe

## Composition des diluants et des milieux de culture

### 1. Bouillon Trypton-sel-eau (TSE)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone 1,0 g
- Chlorure de sodium 8,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C :  $7,0 \pm 0,2$ .

#### Préparation

- Mettre en solution 9,5 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

### 2. Gélose PCA (Plat Count Agar )

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone 5,0 g
- Extrait autolytique de levure 2,5 g
- Glucose 1,0 g
- Agar agar bactériologique 12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C :  $7,0 \pm 0,2$ .

#### Préparation

- Mettre en suspension 20,5 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Ajuster le pH à  $7,0 \pm 0,2$
- Répartir en flacons de 250 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

### 3. Gélose FNA (Fortified Nutrient Agar)

Pour 1 litre de milieu :

- Pastone ou Tryptone 5g

- Chlorure de sodium 3g

- Extrait de viande 3g

- Glucose 0,1g

\*\*Solution métaux 20X 50mL

- Agar Agar bactériologique 20g

- Eau permutée 1000mL

Composition de la solution métaux pour 1000mL

- MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 0,05g

- CaCl<sub>2</sub> 0,06g

- (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 0,08g

- MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O 0,008g

- CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O 0,005g

- ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,005g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

### **Préparation**

- Mélanger les différents composants du milieu FNA dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Ajuster le pH à 7,0 ± 0,2
- Répartir en flacons de 250 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

### **4. La Solution de Ringer diluée au quart**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Chlorure de sodium 2,25

Chlorure de potassium 0,105

Chlorure de calcium anhydre 0,12

Bicarbonate de sodium 0,05

### **Préparation de la solution de Ringer (1/4)**

- Mettre en suspension 2,5 grammes ou 2 comprimés dans 1 litre d'eau pure.
- Agiter jusqu'à dissolution complète.
- Répartir 9 ml par tubes.
- Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

### **5. Tampon TE, 10 X (Tris, Acétate, EDTA)**

- Trisma base 48,5 g
- EDTA 7,5 g
- Eau distillée QSP 1000 mL
- Stériliser à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes.
- Ajustement de pH à 8. Conservation à température ambiante.