



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers  
Département de Biologie

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement*  
مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للاغذية للبيوطبي والبيئة



## **MEMOIRE DE MASTER**

**Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**Option : MICROBIOLOGIE**

*Présenté par*

**KHERBOUCHE EL-HOUARIA**

### **Intitulé du Thème**

**Influence d'un traitement à Ultrason sur la thermorésistance de spores de Bacilles sp.  
isolées de poudre de lait.**

**Soutenu le 04-11-2014**

**Devant le Jury composé de :**

**Pr Moussa Boudjemaa B  
Pr Abdelouahid DE  
Dr Belyagoubi L  
Dr Bendimerad N**

**Professeur  
Professeur  
Maitre de conférence B  
Maitre de conférence B**

**Promoteur  
Président  
Examineur  
Examinatrice**

**Année Universitaire : 2014-2015**

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à*

*Mon père Mr. Kherbouche Abdelghani et Ma mère Mme Kherbouche Fatiha*

*Que j'aime tant, sans lesquels je ne serai jamais arrivée là où j'en suis.*

*A mon très cher frère Said et mes charmantes sœurs Fatima Zohra et Farida et toute ma famille. Ainsi qu'à mes chers amis ; Assia, Fatima Zohra, Hanane, Mehdi, Sara, et tous les*

*Étudiants de ma promotion*

*A tous ceux que j'aime.*

*.Kherbouche Houaria*

## ***Remerciement***

*Ce travail de recherche a été entièrement effectué au laboratoire de microbiologie appliqué à l'agroalimentaire, au Biomédical et à l'environnement (LAMAABE), dirigé par M<sup>r</sup> MOUSSA BOUDJEMAA.B, à qui j'exprime mes sincères remerciements et ma plus profonde gratitude pour avoir réussi à créer les conditions favorables à la réalisation de nos mémoires et veillé de près à leur bon déroulement.*

*Je remercie vivement Monsieur ABDELOUAHID.DE, professeur au département de biologie qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce travail.*

*Mes sincères remerciements à M<sup>r</sup> BELYAGOUBI.L, et M<sup>me</sup> BENDIMERAD.N pour d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je souhaite également remercier tous les membres du laboratoire (LAMAABE) sans exception, les enseignants de leurs très grands dévouements et surtout M<sup>lle</sup> M.Benahmed et M<sup>lle</sup> K.Medjahdi pour leurs aides.*

*Enfin merci à ma famille ....une énorme Merci à mes parents pour leurs soutiens, leur encouragement et leur patience durant ces années d'études.*

***MERCI A TOUS !***

## Résumé

La présence des spores bactériennes pose de sérieux problèmes dans les industries agro-alimentaires (notamment les industries laitières), car non seulement elles sont résistantes à la chaleur mais elles ont la capacité d'altérations dues à leur potentiel enzymatique. En Algérie, l'importation de lait en poudre a augmenté ces derniers temps à cause de la croissance démographique et l'insuffisance de la production nationale, cette importation est destinée surtout à la production du lait pasteurisé. En effet, les poudres du lait étant des produits déshydratés, ne sont pas supposées avoir les conditions favorables pour la croissance des bactéries, mais certaines spores bactériennes peuvent survivre même après un chauffage très important due à leur thermorésistance. Dans ce cadre nous avons étudié l'effet des ultrasons (un traitement non thermique) pour tester son effet en combinaison avec le traitement thermique pour inactiver les spores bactériennes isolées de la poudre du lait. Pour cela, 3 échantillons de quelque poudre de lait importés et commercialisée en Algérie de différentes origines ont été utilisés pour lesquels on a caractérisé la flore microbiennes. L'étude phénotypique a révélé 15 isolats dont (34%) de *Bacillus sphaericus/fusiformis/badius* suivi par *Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis* (27%), *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (14%), *Brevibacillus laterosporus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus* (7%). La spore sélectionnée était caractérisée par la valeur  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  de l'ordre de 3,20 minutes après un chauffage dans du bouillon Muller-Hinton et 2,06 minutes lorsque le traitement thermique était suivi par ultrason, ce qui montre l'amélioration de l'efficacité du traitement thermique lorsqu'il est combiné avec les ultrasons.

**Mots clés :** Bactéries sporulés, poudre de lait, traitement thermique, ultrason, valeur D .

## **Abstract**

The presence of spores poses serious problems in the food industry (including dairy industries), not only because they are resistant to heat, but also because they have the ability of deterioration due to their enzyme potential. In Algeria, the importation of milk powders has increased in the last decades due to population growth and inadequate national production, the import is intended primarily for the production of pasteurized milk. Indeed, the milk powder being dried products are not intended to be favorable for the growth of bacteria but certain bacterial spores can survive even after a very significant heating due to their heat resistance. In this context we tried to study the effect of ultrasound (a non-thermal treatment) to test its effect in combination with heat treatment to inactivate bacterial spores isolated from milk powder. For this purpose, three samples of milk powder imported and marketed in Algeria from different sources were used for which the microbial flora was characterized. Phenotypic study found 15 isolates (34%) of *Bacillus sphaericus* / *fusiformis* / *badiusuivi* by *Brevibacillus choshinensis* / *centrosporus* / *brevis* (27%), *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (14%), *laterosporus Brevibacillus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus* (7%). The selected spore was characterized by  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  value of approximately 3.20 minutes after heating in Muller-Hinton broth and 2.06 minutes when the heat treatment was followed by ultrasound, which shows an improvement in the effectiveness of heat treatment when combined with ultrasound.

**Keywords:** Bacterial Spore, milk powder, heat treatment, ultrasound, value D.

## ملخص

إن وجود أبواغ الجراثيم يطرح مشاكل خطيرة في صناعة الأغذية (بما في ذلك صناعات الألبان)، ليس فقط لأنها مقاومة للحرارة، ولكن أيضا لأن لديها القدرة على إفساد الأطعمة بسبب فعالية أنزيماتها. في الجزائر، زاد استيراد مسحوق الحليب في الآونة الأخيرة بسبب النمو السكاني وعدم كفاية الإنتاج المحلي، ويهدف الإستيراد في المقام الأول لإنتاج الحليب المبستر. ليس من المفروض أن يكون مسحوق الحليب المجفف مواتيا لنمو البكتيريا ولكن بعض الأبواغ البكتيرية يمكنها البقاء على قيد الحياة حتى بعد التسخين الشديد بسبب قدرتها على مقاومة الحرارة. في هذا السياق حاولنا دراسة تأثير الموجات فوق الصوتية (كعلاج غير حراري) لاختبار تأثيرها مع المعالجة الحرارية لإبطال نشاط الأبواغ البكتيرية المعزولة من مسحوق الحليب. لهذا الغرض، استُخدمت ثلاث عينات من بعض منتجات مسحوق الحليب المستوردة والمسوقة في الجزائر من بلدان مختلفة. وجدت الدراسة المظهرية 15 سلالات (34%) من *Bacillus sphaericus* / *Bacillus sphaericus* / *fusiformis* / *badiusuivi* *Brevibacillus* *schoshinensis* / *centrosporus* / *brevis* (27%), *Aneurinibacillus* *neurinilyticus* (14%), *laterosporus* *Brevibacillus*, *Geobacillus* *stearothermophilus*, *Bacillus* *lentus*, *Bacillus* *firmus* (7%).

تم تسجيل قيمة  $D_{90^\circ C}$  للسلالة المختارة حوالي 3.20 دقيقة بعد التسخين في الوسط مولر-هينتون و 2.06 دقيقة عندما أعقب علاج الحرارة الموجات فوق الصوتية، مما يدل على تحسن فعالية المعالجة الحرارية عند دمجها مع الموجات فوق الصوتية.

الكلمات المفتاحية: الأبواغ البكتيرية، مسحوق الحليب، المعالجة الحرارية، الموجات فوق الصوتية، قيمة D

Résumés.....	I
Sommaire.....	II
Liste des abréviations.....	III
Listes des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Introduction .....	01

## Synthèse Bibliographique

<b>Chapitre I : Les poudres de lait.....</b>	<b>02</b>
1-Généralités sur les poudres de lait.....	02
1-1. Définition de la poudre de lait.....	02
1-2-Les différents types de poudre de lait.....	04
1-3-Classifications de la poudre de lait.....	06
1-4-Propriétés chimiques et physiques du lait en poudre.....	06
1-5- technologie de la poudre de lait.....	08
2- La microbiologie de la poudre de lait.....	08
2-1- Propriétés microbiologiques.....	11
2-2- Défauts et altérations.....	11
2-3-les bactéries pathogènes.....	12
2-4- les bactéries d'altération .....	12
<b>Chapitre II : La thermo- résistance des spores bactériennes.....</b>	<b>14</b>
1-Les phénomènes de sporulation et de germination.....	14
2-L'acquisition de la résistance des spores.....	15
3-Les structures impliquées dans la résistance.....	15
4-La définition de la thermo résistance.....	16
5 -Origine de la résistance thermique.....	16
6- L'influence de l'environnement de sporulation sur la résistance des spores.....	17
6-1- La composition du milieu de sporulation.....	18
6-2-La température de sporulation.....	18
6-3-Le pH du milieu de sporulation.....	18
6-4-L'aw du milieu de sporulation.....	19
<b>Chapitre III le traitement microbien avec ultrasons.....</b>	<b>20</b>
1-Introduction.....	20
2-Principes des ultrasons.....	20
3- l'inactivation microbienne.....	22

## Matériel et Méthodes

1-Méthodologie de prélèvement.....	26
2-Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale.....	26
3-dénombrement et identification phénotypiques des souches thermorésistante.....	26
3-1-Isolement et purification.....	26

3-2-Caractérisation morphologique des isolats .....	27
3-2-1-Aspect macroscopique.....	27
3-2-2- Aspect microscopique.....	27
3-3-Caractérisation biochimique des isolats.....	27
3- 3-1- Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	27
3-3-2-Croissance sur le milieu mannitol-mobilité.....	28
3-3-3-Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires.....	28
3-3-4-Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons.....	29
3-3-5-Mise e évidence de l'activité hémolytique.....	29
3-3-6Mise en évidence de l'assimilation de l'Esculine.....	29
3-3-7-Caractérisation des souches par la galerie API 20 <sup>E</sup> .....	29
4-Evaluation de la résistance d'une spore sélectionnée vis-à-vis un traitement thermique et aux Ultrasons .....	30
4- 1- Préparation de la suspension sporale.....	30
4-2-Application du traitement thermique.....	30
4-3-Traitement aux ultrasons.....	31
5- Etude statistique.....	31

## **Résultats**

1-Isolements et purifications souches.....	32
2-Caractérisations phénotypiques des isolats.....	32
2-1-Aspect microscopique.....	32
2-2-Aspect macroscopique.....	32
3-caractéristiques biochimiques des isolats.....	34
3-1-Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	34
3-2 -résultats de la mise en évidence les activités enzymatiques.....	36
3-3-Résultat de la mise en évidence d'activité enzymatique.....	37
3-4-Résultats de la mise en évidence de l'activité hémolytique.....	38
3-5-Test du mannitol mobilité.....	38
3-6-Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de simmons.....	39
3-7-La mise en évidence de l'utilisation du sucre d'esculine.....	39
4-Résultats des plaques API20E .....	39
5. Evaluation de la résistance d'une spore sélectionnée vis-à-vis un traitement thermique et aux Ultrasons.....	43
<b>Discussion.....</b>	<b>45</b>
<b>Conclusion et perspective .....</b>	<b>50</b>
<b>Référence bibliographiques.....</b>	<b>51</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>.....</b>

## Liste des abréviations

- DO : Densité Optique
- Mg : Milligramme
- °C : degré Celsius
- h : heure
- min : minutes
- UFC : unité formant colonie
- ml : Millilitre
- G : Gramme
- MPCA : Milk Plate Count Agar
- % : pour cent
- Log : Logarithme
- EDS : Eau Distillé Stérile
- T° : Température
- ONIL : Organisation de coopération et de développement
- FAO : Food Agriculture Organisation
- WPNI : Whey Protein Nitrogen Index
- UV : Ultraviolet
- ADN : L'acide désoxyribonucléique
- SASP : Small Acid-Soluble Protein
- UHT : Ultra High Temperature
- Khz : kilohertz
- µl : Microlitre
- D : le temps de réduction décimale
- GN : gélose nutritive

## Liste des tableaux

<b>Tableau N°I</b> : Composition des laits en poudre (en %)	04
<b>Tableau N°II</b> :Composition général de la poudre de lait partiellement écrémé	05
<b>Tableau N°III</b> : Classification des poudres de lait écrémé selon le WPNI	06
<b>Tableau N°IV</b> :Propriétés des poudres laitières	08
<b>Tableau N° V</b> :Propriétés physico-chimiques du lait en poudre en fonction du type de séchage	10
<b>Tableau N°VI</b> :Critères microbiologiques des laits en poudre	13
<b>TableauN°VII</b> :Thermo résistance de diverses espèces	17
<b>TableauN°VIII</b> :Quelques causes et les effets des ultrasons sur la cellule microbienne	23
<b>Tableau N°IIX</b> : Résultats de l'aspect macroscopique des souches	33
<b>Tableau N°IX</b> : Résultats de la recherche des enzymes respiratoires	34
<b>Tableau N° X</b> : Résultats des plaques API20E, des quinze souches sélectionnées	40
<b>Tableau N° XI</b> : Résultats biochimiques pour les 31 souches obtenus	42

## Liste des figures

<b>Figure N°1</b> : cyclone des différentes étapes de la production de la poudre de lait.....	9
<b>Figure N°2</b> : Photographie en microscopie électronique d'une spore de <i>B. weihenstephanensis</i> produite à 30°C et d'une spore de <i>B. licheniformis</i> produite à 45°C .....	14
<b>Figure N°3</b> : Microphotographies de <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028 cellules adhèrent à la surface des tomates cerises, des images en utilisant la microscopie électronique à balayage: non aseptisé (A), après désinfection aux ultrasons pendant 10 min (B).....	22
<b>Figure N°4</b> : Microscopie électronique à balayage des <i>Anoxybacillus flavithermus</i> (DSM 2641) cellules végétatives avant et après traitement aux ultrasons. ....	24
<b>Figure N°5</b> : Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (G×100 a immersion).....	32
<b>Figure N°6</b> : exemple d'un Résultats de la recherche des enzymes respiratoires(calalase, oxydase).....	36
<b>Figure N°7</b> : exemple d'un Résultats de la recherche des enzymes respiratoires , A -hydrolyse de l'amidon ,B- Hydrolyse de la caséine, C- dégradation de lécithine.....	37.
<b>Figure N°8</b> : exemple de la mise en évidence d'activités hémolytique par la souche LMB238.....	38
<b>Figure N°9</b> : exemple d'un résultats du mannitol mobilité A-Souche mobile mannitol négative, B - souche mobile mannitol positive.....	38
<b>Figure N°10</b> :A- exemples de mise en évidence de l'utilisation de citrate (source de citrate de Carbone), B -exemples de mise en évidence d'activités d'esculine.....	39
<b>Figure N°11</b> : résultats des plaques API20E de quelques souches.....	41
<b>Figure N°12</b> : courbe de survie d'une population de spore de <i>Bacillus</i> sp traitée à 90°C.....	43
<b>Figure N°13</b> : courbe de survie d'une population de spore de <i>Bacillus</i> sp traitée à 90°C et à l'ultrasons .....	44



# *Introduction*

L'Algérie est le pays le plus important consommateur de lait au Maghreb. La consommation nationale s'élève à environ 3 milliards de litres de lait par an, la production nationale étant limitée à 2,2 milliards de litres, dont 1,6 milliard de lait cru. Les importations par l'Algérie de lait en poudre ont atteint 784,90 millions de dollars, durant les cinq premiers mois de 2014, contre 487,43 millions de dollars à la même période de l'année écoulée, en hausse de 61,03%, selon les chiffres du Centre national de l'informatique et des statistiques (Cnis) des Douanes

C'est donc près d'un milliard de litres de lait qui est ainsi importé chaque année, majoritairement sous forme de poudre de lait(**Ghozlane et al., 2003**).

40 milliards de dinars c'est la somme versée pour l'achat des poudres de lait que l'Algérie importe chaque année, selon les estimations de l'ONIL, l'Algérie est le deuxième importateur de poudre de lait même si un effort non négligeable est déployé pour endiguer cette importation en encourageant le développement du Cheptel bovin laitier.

Chaque année, l'Algérie importe 60% de sa consommation de lait en poudre, et la croissance annuelle moyenne du marché algérien des produits laitiers est estimée à 20%. Le document d'Ubifrance note que "les pays de l'Union européenne, notamment la Pologne et la France mais aussi la Belgique se positionnaient jusqu'en 2003 comme les principaux fournisseurs de poudre de lait à destination de l'Algérie. (**Meziane,2009**).

Les besoins algériens en lait et produits laitiers sont également considérables. Avec une consommation moyenne de 110 litres de lait par habitant et par an, l'élevage ne couvre même pas le tiers de cette consommation. La production laitière en Algérie régulièrement croissante depuis les années 80 est très faiblement intégrée à la production industrielle des laits et dérivés (**Bencherif, 2001**).

Il est connu que les poudres de lait contiennent d'importantes concentrations en spores bactériennes sous la pression de sélection exercée lors de leur préparation, De ce fait, nous nous sommes proposé de réaliser ce travail qui vise essentiellement l'étude de la thermo-résistance des spores bactériennes isolées à partir des poudres de lait commercialisées en Algérie.

# *Chapitre I : Les poudres de lait*

## Chapitre I : Les poudres de lait

Au fil des siècles, l'homme a commencé à développer des techniques de transformation aboutissant à différents produits avec de nouvelles propriétés physicochimiques (fromage, yaourt, poudre de lait,...etc.) permettant une meilleure conservation du produit contre l'altération. De nos jours, ces différentes méthodes de transformation artisanales ont été améliorées, suite au progrès scientifique qu'a connu le domaine de l'agroalimentaire et ont été intégrées dans des procédés industriels permettant de produire plus et mieux, répondant de cette manière à un marché qui devient plus exigeant(Abdenouri,2008).

La production de lait condensé avait débuté dans les années 1860, celle de lait en poudre commença plus tardivement. Les essais de dessiccation de lait entier, demi-écrémé ou écrémé entrepris dans la seconde moitié du XIX<sup>e</sup> s. Avaient donné des produits insatisfaisants à la réhydratation. C'est au début du XX<sup>e</sup> s, qu'ils ont mis au point des procédés aptes à un usage industriel (Pfiffner, 2009).

La production de lait en poudre dans une plus grande mesure, est désormais régie par les exigences du marché et à une certaine utilisation de ces produits spécialisés. Des quantités considérables de lait écrémé en poudre séchées sont utilisées dans la préparation de lait reconstitué être combiné. Les poudres de lait sont aussi largement utilisés dans la fabrication de la crème glacée, produits de boulangerie, de la confiserie, le fromage cottage

et dans d'autres variétés de fromage, La plus grande proportion de poudre de lait est utilisé dans la confiserie tels que le chocolat au lait, caramel, bonbons mous, des revêtements, des biscuits et des gâteaux. Dans ces produits, le lait en poudre a un effet particulier: il améliore la consistance, le goût et la saveur, ainsi que la valeur nutritive et la durée de vie (Ramesh et al.,2008).

### 1-Généralités sur les poudres de lait

#### 1-1. Définition de la poudre de lait

Les laits en poudre sont des produits résultant de l'élimination partielle de l'eau du lait. et l'évaporation autant que possible de sorte que l'eau est perdu et le lait devient poudre (Arie et al., 2011). Aux termes de la norme n° A5 (1971) du Code des principes, on distingue trois catégories de lait en poudre : entier, partiellement écrémé et totalement écrémé dont la composition est donnée au Tableau I. Selon cette norme, ils peuvent recevoir des additifs

alimentaires (stabilisants, émulsifiants, antiagglomérants) dans certaines conditions (**FAO, 2008**).

Le lait en poudre est le produit provenant de la dessiccation de lait entier ou lait écrémé ou de lait partiellement écrémé propre à la consommation humaine, lorsque ils sont additionnée du sucre (saccharose) dans une proportion conforme aux usages la mention «sucré » est porté sur l'étiqueté ou le récipient toute fois l'expression « en poudre » peut être remplacé par le mot sec suivi ou non d'une mention indiquant le mode de présentation (poudre, granulés paillettes...)

Les laits et la crème en poudre sont des produits laitiers obtenus par élimination de l'eau contenue dans le lait ou la crème. La teneur en matière grasse et/ou en protéines du lait ou de la crème peut avoir été ajustée, uniquement pour satisfaire aux critères de composition énoncés à la Section 3 de la présente norme, par l'addition et/ou le retrait de constituants du lait, d'une manière telle que cela ne modifie pas le rapport protéines de lactosérum/caséine du lait (**Le codex alimentarius.2011**).

Les poudres de lait peut jouer de nombreux rôles fonctionnels lorsqu'ils sont incorporés dans les produits alimentaires, l'évolution des technologies de la poudre de lait est une meilleure compréhension des changements physiques et chimiques au lait que l'eau est enlevée a conduit à une meilleure cohérence des poudres de lait et de différenciation a permis de propriétés de la poudre de lait (**Ramesh et al., 2008**).

La principale application du lait en poudre est la constitution pendant les périodes de pointes de la production laitière. De réserve considérables utilisables ultérieurement lorsque les approvisionnements deviennent insuffisants. L'élimination de la presque totalité de l'eau du lait (environ 87%) donne un produit compact concentré facile a transporté et à stocker le lait sec n'est le siège d'aucune multiplication microbienne il peut être conservé pendant de très longues périodes et donne du lait reconstitué par simple adjonction d'eau.

Le tableau N°I, représente la Composition des trois différents types de laits en poudre.

**Tableau N°I.** Composition des laits en poudre (en %) :

(FAO, 2008)

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

### 1-2. Différents types de poudre de lait

Le lait en poudre est un produit solide obtenu par élimination de l'eau du lait, du lait entièrement ou partiellement écrémé, de la crème ou d'un mélange de ces produits, et dont la teneur en eau n'excède pas 5 % en poids du produit fini.

On distingue les laits en poudre suivants:

- **Le lait en poudre riche en matières grasses** ou poudre de lait riche en matières grasses : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 42 % de matières grasses.

- **Le lait en poudre entier** ou poudre de lait entier : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 26% et moins de 42% de matières grasses.

Le lait entier en poudre est dissout dans de l'eau et utilisé en tant que lait reconstitué. Ce sont surtout les pays ne disposant pas d'un grand secteur de production laitière qui constituent un marché important en la matière. De grandes quantités de lait en poudre sont utilisées avec des composants de cacao et du sucre pour la fabrication d'exquis chocolat au lait. Il est en outre utilisé pour les articles de confiserie, les biscuits, les articles de boulangerie, les glaçages et divers produits laitiers tels que la crème glacée et le fromage fondu.

- **Le lait en poudre partiellement écrémé** ou poudre de lait partiellement écrémé : lait déshydraté dont la teneur en matières grasses est, en poids, supérieure à 1,5 % et inférieure à 26 %.

Tableau N°II, détermine la composition chimique de la poudre de lait partiellement écrémé.

**Tableau N°II** : Composition général de la poudre de lait partiellement écrémé  
D'après (Karen *et al.*, 2008).

Composant	Le pourcentage (%)
Cendre	4,5%
Teneur en matière grasse	plus de 1,5 % et moins de 26 %
Eau	4%
Protéine	30 %

- **Le lait en poudre écrémé** ou poudre de lait écrémé : lait déshydraté contenant, en poids, au maximum 1,5 % de matières grasses.

Le lait écrémé en poudre est utilisé de différentes façons. Il parvient directement au consommateur en tant que lait écrémé reconstitué. Les fabricants de denrées alimentaires l'utilisent dans les desserts à base de lait, les crèmes glacées, les yogourts, les produits à base de viande, les produits à base végétale ressemblant à de la viande, dans les glaçages, les sauces, les mayonnaises, les boissons instantanées pour le petit déjeuner..... etc.

### 1-3 –Différents types de la poudre de lait commercialisé

La poudre de lait a l'avantage de pouvoir se stocker et se transporter aisément pour être utilisée via la recombinaison comme matière première pour la production de fromage, de laits fermentés, de crème glacées ...etc.

Les poudres commercialisées sont en général de trois types, classées selon l'intensité du traitement de déshydratation opéré (et le degré de dénaturation qu'il génère) : « Low Heat », « Medium Heat » et « High-Heat ». Le degré de dénaturation est exprimé par l'indice d'Azote protéique (LAP ou WPNI en anglais) en milligrammes de protéines sériques non dénaturées par gramme de poudre considérée (Karen *et al.*, 2008).

Les poudre ayant été préparées avec un traitement thermique bas (low Heat, WPNI égal ou supérieur à 6) contiennent une faible quantité de protéines dénaturées et sont utilisées dans des produits où les propriétés de solubilité, de gélification et d'émulsion sont recherchées.

Il s'agit des poudres de meilleure qualité convenant aussi bien à la préparation du lait de consommation que celui destiné à la fromagerie ainsi qu'à la fortification du yaourt (Nozinck *et al.*, 1982 ).

Les poudres type « Médium Heat » (WPNI entre 1,5 et 5,9) possèdent une bonne capacité d'hydratation et d'activité de surface. Elles sont utilisées notamment dans les fabrications de crèmes glacées...etc.(**Castro-Morel et al.,2003**).

Enfin, les poudres « High-Heat » (WPNI inférieur à 1,5) sont hautement dénaturées et peu solubles. Ce type de poudre trouve une utilisation dans les produits structurés (boulangerie, biscuiterie, et la confiserie)(**Castro-Morel et al.,2003**).

Le tableau N°III donne une classification de la poudre de lait écrémé en fonction de la charge thermique (WPNI).

**Tableau N°III** : Classification des poudres de lait écrémé selon le WPNI (**Atomizer et al.,1990**)

<b>Classes</b>	<b>WPNI (mg d'N/g de poudre)</b>
faible température	$\geq 6.0$
Température moyen	4.5-5.99
haut température moyen	1.51-4.49
Haut température	$\leq 1.5$

WPNI=whey proteinnitrogen index

#### **1-4.Propriétés chimiques et physiques du lait en poudre**

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

- Teneur en eau
- Teneur en matière grasse
- Graisse libre
- Teneur en protéines
- Teneur en substances minérales
- Acide titrable

- Solubilité, reconstitution
- Aptitude à l'écoulement
- Densité apparente
- Charge thermique du lait écrémé en poudre (part de protéines sériques dénaturées)
- Particules brûlées
- Répartition de la grandeur des particules
- Oxygène résiduel dans l'emballage

Les qualités biochimiques et physicochimiques des poudres dépendent essentiellement des paramètres technologiques mis en œuvre pour la réalisation des poudres.

La qualité nutritionnelle des poudres laitières dépend principalement de l'intensité des différents traitements thermiques au cours du procédé technologique. Les traitements thermiques induisent des changements physicochimiques qui tendent à diminuer la disponibilité des nutriments (destruction de vitamines, diminution de la teneur en lysine disponible, dénaturation des protéines solubles) ou éventuellement à produire des composés d'intérêt nutritionnel tel que le lactulose. Les poudres obtenues par pulvérisation sont d'un point de vue nutritionnel supérieures à celles obtenues sur cylindres chauffants (**Jeantet al., 2008**).

A l'exception de quelques pertes de vitamine B12, la valeur nutritive du lait en poudre équivaut à celle du lait pasteurisé et dépasse celle des autres laits conservés (concentré sucré ou non sucré ou stérilisé). L'excès et la prolongation du traitement thermique en cours de fabrication peut dégrader certains des nutriments et abaisser la valeur protéique du produit par dénaturation des acides aminés, mais la dégradation des protéines et les altérations de la solubilité associées aux produits modernes de haute qualité ne diminuent pas leur valeur nutritive.

Tableau N ° IV ci-dessous, représente les différents Propriétés des poudres lactières.

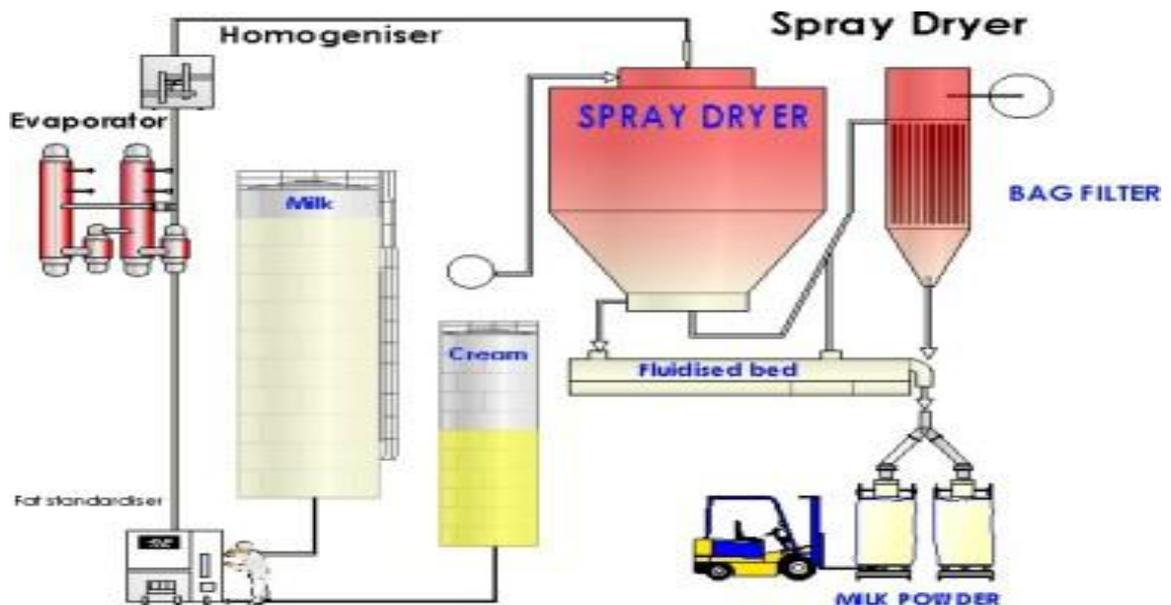
**Tableau N°IV :Propriétés des poudres lactières. (Jeant *et al.*, 2008)**

Propriétés générales	Propriétés influencées par le procédé :
	Propriétés fonctionnelles et propriétés d'usage
-Propriétés biochimiques et physicochimiques <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protéines</li> <li>• Lactose (amorphe et cristallin)</li> <li>• Minéraux</li> <li>• Matières grasses</li> <li>• Teneur en eau libre</li> <li>• Activité de l'eau (aw)</li> <li>• Transition vitreuse (Tg)</li> </ul> -qualités microbiologiques -Propriétés organoleptiques	-Réhydratation <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mouillabilité</li> <li>• Immiscibilité</li> <li>• Gonflement</li> <li>• Dispersibilité</li> <li>• Solubilité</li> <li>• Instantanéité</li> </ul> -Granulométrie -Ecoulement –éboulement -Friabilité -hygroscopicité -mottage-collage -thermoplasticité -Masse volumique <ul style="list-style-type: none"> <li>• Apparente</li> <li>• Tassée</li> <li>• Vrai</li> </ul> -Couleur

### 1-5. Technologie de la poudre de lait

Après les traitements d'épuration, de standardisation, de pasteurisation ou de préchauffage à haute température, on procède en deux étapes principales : la concentration et le séchage. La concentration se fait par évaporation et l'ébullition se fait sur une surface chaude. Pour des raisons de qualité, on cherche à limiter la température du lait et à réduire son temps de séjour

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



**Figure N°1** : cyclone des différentes étapes de la production de la poudre de lait  
D'après (Soy ,2011).

Il existe différent type de séchage afin de produire différents type de qualité de poudre de lait parmi ces types de séchage (Kimet *al.*, 2009) :

#### - Séchage sur cylindre :

C'est le plus ancien des procédés commerciaux satisfaisants ; il n'a qu'ère évolué depuis le début du siècle .Essentiellement simple, il consiste à chauffer un mince film de l'ait pendant 2 à 3 secondes à la pression atmosphérique sur une surface métallique chauffée par de la vapeur a 143-149c. ( Ronimus *et al.*, 2006).

Séchage sur cylindre ne peut répondre aux nouveaux besoins qualitatifs exigés pour Une poudre laitière (solubilité, dispersibilité élevée, faible teneur en matière grasse libre...). Par

contre, les poudres séchées sur cylindre sont encore préférées dans le domaine de la chocolaterie pour leur fort pourcentage en matière grasse libre, pour la taille élevée des particules élevée et l'absence de vacuoles (**Dewettinck et al., 1996**). Dans le domaine de la Confiserie (**Haylock, 1995**), le taux en matière grasse libre élevé et la présence de composés De Maillard libérés lors du séchage en plus grande quantité ne font que le séchage sur cylindre est préférentiellement utilisé.

#### **-Séchage par atomisation :**

Le procédé de fabrication du lait en poudre par atomisation comprend deux grandes étapes, une étape de concentration suivie de l'étape d'atomisation en elle-même parfois appelée dessiccation. Cette opération utilise, selon la taille de l'installation, soit des thermoplongeurs sur bride soit des batteries de procédés chauffantes.

Le séchage par atomisation est la méthode de séchage la plus souvent utilisée pour le lait en poudre, qu'il s'agisse de lait entier ou de lait écrémé. Il est parfois nommé procédé spray et est de plus en plus choisi par les industriels au détriment du séchage sur cylindres, car il permet d'obtenir une poudre plus soluble mais aussi des qualités organoleptiques plus intéressantes (goût, aspect...).

#### **.Processus de lyophilisation :**

Le processus de lyophilisation a été employé pour produire la poudre de lait à haute qualité. Cette méthode offre des avantages de l'aspect de qualité, car la fraction de protéine n'est pas affectée. La lyophilisation n'est pas cependant extensivement utilisée, en partie en raison de la demande énergétique élevée (**Ramesh et al., 2008**).

**Tableau N°V : Propriétés physico-chimiques du lait en poudre en fonction du type de séchage**

	<b>Poudre issue d'un séchage par atomisation</b>	<b>Poudre issue d'un séchage sur cylindres</b>
<b>Structure des particules</b>	Particules sphériques. Inclusions d'air	Compacte forme irrégulière pas d'inclusions d'air
<b>Surface des particules</b>	Lisse, en particule pliée	
<b>Dimension des particules</b>	10-250um	
<b>Densité apparente (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0.50-0.70	0.3-0.5
<b>Solubilité, dénaturation</b>	Dénaturation des protéines peu élevée –bonne solubilité	Taux de dénaturation élevé des protéines –mauvaise solubilité
<b>Exigences relatives à la</b>	Cuivre < 1.5 mg/kg	Idem

<b>teneur en métaux lourds</b>	Fer < 10.0mg/kg	
<b>Teneur en oxygène résiduel dans les poudres contenant des matières grasses</b>	≤0.01 ml O <sub>2</sub> /g	
<b>Brunissement du a la réaction de Maillard</b>	Peu marqué	Plus marqué

## 2. Microbiologie de la poudre de lait

### 2-1 Propriétés microbiologiques

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

Il faut éviter que de nombreux micro-organismes ne survivent dans le lait en poudre, surtout lorsqu'il est destiné à des usages tels que l'alimentation des enfants ou la fabrication des crèmes glacées, car la prolifération des germes peut être rapide une fois que le lait a été reconstitué. Le traitement thermique sévère imposé par le séchage sur cylindres réduit généralement la population bactérienne à moins de 1000 germes par gramme (principalement des spores résistantes). Les principales sources de contamination sont la poussière et les opérations de conditionnement ou autres qui suivent la dessiccation.

La poudre obtenue par atomisation constitue un produit beaucoup plus variable d'un point de vue bactériologique; sa population bactérienne peut aller de 10 à plusieurs millions de micro-organismes par gramme de poudre (Crossley, 1945).

## 2-2. Défauts et altérations

Le lait en poudre peut présenter des défauts et altérations pouvant entraver son utilisation future. Ils sont consécutifs au traitement thermique et peuvent être de nature biochimique tels que: (Brunissement, et goût de cuit) ; au mauvais traitement du lait : ( la mouillabilité et solubilité insuffisante, humidification) .

La qualité de la poudre de lait dépend en grande partie des micro-organismes du lait cru. Il faut signaler que le prétraitement est un facteur important influençant la contamination du lait en poudre, comme la matière première est souvent soumise à des températures létales, qui éliminent les agents pathogènes à l'état de cellule végétative (Salahudin *et al.*, 2006).

## 2-3. les bactéries d'altération :

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

## 2-4. les bactéries pathogènes :

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

### -Flore du lait sec obtenu par atomisation

C'est une flore particulière (Crossley et Johnson, 1942) surtout composée de micro-organismes thermorésistants.

Les principaux groupes de ces germes sont les suivants :

- a) Les Microcoques : thermorésistants fréquents dans l'approvisionnement laitier et difficile à éliminer complètement du matériel et des installations laitières ;
- b) Les Streptocoques thermo-resistant, en particulier souches de *Str. thermophilus*, *Str. bovis*, *Str. faecalis* et *Str. liquefaciens*. Les conditions de l'installation peuvent favoriser

leur prolifération et donner naissance à de graves infections ; ils sont souvent responsables de numérations bactériennes extrêmement élevées observées parfois dans les poudres de lait ;

c) Les Corynebactéries dont la fréquence est très variable. Les souches thermorésistantes proviennent des approvisionnements laitiers et ne semblent pas dues à un manque d'efficacité dans le nettoyage des installations ;

d) les spores bactériennes (surtout des spores d'espèces aérobies telles que *B. subtilis* et *B. licheniformis*) se trouvent dans presque toutes les poudres, à moins que le lait n'ait été à un traitement à très haute température. La flore peut comprendre aussi des types de micro-organismes thermophiles à surveiller lorsque le lait en poudre est utilisé à certains fins ;

e) Des contaminants divers éventuellement non thermorésistants, qui peuvent provenir d'une contamination atmosphérique ou d'un contact direct.

**Tableau N°VI : critères microbiologique des laits en poudre (Pierre, 2003).**

Micro-organisme	Nombre de micro-organisme par g
Flore aérobie mésophile totale	$\leq 5.10^4$
Coliformes totaux	$\leq 10$
Coliformes fécaux	$\leq 1$
Staphylococcus aureus	Absence
Salmonelles (dans 25g)	Absence
BSR	Absence
Levures et moisissures	$\leq 10$

## *Chapitre II : La thermo- résistance des spores bactériennes*

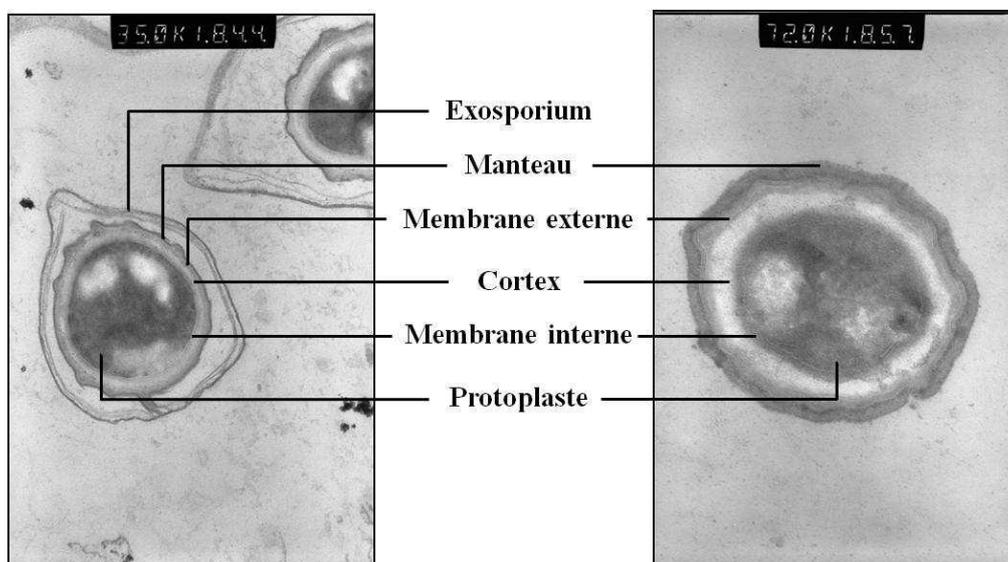
## Chapitre II : La thermo- résistance des spores bactériennes

### 1. Phénomènes de sporulation et de germination

Diverses espèces bactériennes ont la faculté de former des cellules spécialisées montrant une résistance accrue à des facteurs d'environnement défavorables, notamment à une température élevée, à l'absence d'éléments nutritifs, aux agents chimiques et aux rayonnements UV ainsi qu'à la dessiccation. Certaines bactéries possèdent donc la capacité de se transformer en petites unités ovoïdes ou sphériques douées d'une extraordinaire résistance appelées spores.

**Leclerc et ses collaborateurs (1995)**, affirment que la spore qui prend naissance à l'intérieur même de la cellule végétative est une cellule entièrement nouvelle et différente du point de vue structure, composition chimique et enzymatique. Le phénomène de sporulation est déclenché par l'épuisement des ressources nutritives dans un contexte physico-chimique qui peut être variable suivant les espèces.

La figure N°2 montre les différentes parties de deux spores de *Bacillus*



**Figure N°2:** Photographie en microscopie électronique d'une spore de *B.*

*Weihenstephanensis* KBAB4 produite à 30°C (à gauche, x35 000) et d'une spore de *B.*

*Licheniformis* AD978 produite à 45°C (à droite, x72 000), (**Bornard, Inra 2009**).

La germination des spores comprend deux phases :

1. La germination proprement dite, pendant laquelle la spore se réhydrate (elle perd alors sa thermo-résistance) et remet en fonction la machinerie des synthèses des acides nucléiques et protéines.
2. L'émergence de la cellule hors de l'enveloppe de la spore, et la croissance de la cellule jusqu'au stade de la première division.

La germination non spontanée des spores exige l'apport de composés de faibles poids moléculaires et plus ou moins spécifique de l'espèce et de la souche, tels que le glucose certains acides aminés dont la L-alanine, des nucléotides (**Leclerc et al.,1995, Meyer et al.,1991**).

D'après **Jérôme et al. (2008)**, la germination peut être inhibée par divers agents physiques ou chimiques. Ainsi, la germination des spores de *Clostridium botulinum* est entravée par le froid, les pH < à 4,5, des concentrations en nitrites > à 150 ppm et des concentrations en NaCl > à 10%.

## **2. L'acquisition de la résistance des spores**

La résistance des spores est acquise progressivement au cours de la sporulation et n'est pas spécifiquement liée à une étape particulière de la sporulation. Selon **Knott et collaborateurs (1995)**, l'acquisition de la résistance dépend du développement et de la maturité des différentes structures sporales. L'acquisition de la résistance des spores est indissociable de la formation des spores qui dépend de l'espèce bactérienne et des conditions environnementales de sporulation.

## **3. Structures impliquées dans la résistance**

**Setlow et Johnson (2007)** affirment que les spores libres sont capables de résister à la dessiccation, aux radiations UV et aux agents chimiques et physiques, cette résistance est assurée grâce aux différentes structures de la spore. La structure centrale de la spore, appelée Protoplaste, contient l'ADN, les ARN et la plupart des enzymes de la spore. L'ADN de la spore est protégé par des complexes calcium-acide dipicolinique (Ca-DPA) et par des Protéines  $\alpha/\beta$ -SASP (Small Acid-Soluble Protein). La liaison des SASP avec la périphérie de l'ADN consolide et rigidifie la structure en hélice. **Nicholson et al (2000)** annoncent qu'en

plus du calcium, le protoplaste est également composé d'autres minéraux (mono- ou divalents) tels que le sodium, le potassium, le manganèse et le magnésium, entraînant la déshydratation du protoplaste.

La minéralisation et déshydratation du protoplaste sont fortement associées à la résistance des spores. Cette même conclusion est confirmée par d'autres auteurs tels que **Mah et al (2008)**.

#### 4. Définition de la thermo résistance

Il s'agit des propriétés caractéristiques de l'endospore bactérienne liée à plusieurs facteurs dont notamment :

1. La teneur en eau particulièrement faible et l'arrêt de métabolisme par déshydratation et exportation des enzymes vers la périphérie (tunique).
2. Les structures riches en acide dipicolinique (et dipicolinate de calcium) et enrichies en soufre.
3. La présence d'enveloppe successive comme le cortex amorphe et les tuniques sporales protéiques successive et d'orientation croisée.

La thermo-résistance selon les espèces, les spores de *Bacillus stearothermophilus* par exemple ne sont détruites que par un traitement de 15min à 120°C (**Bugwicut, 1995**). Selon **Janstova et al (2001)**, elle est liée au taux des bactéries survivant après traitement thermique, à différentes températures et temps d'exposition.

Des indications effectives pour certains traitements thermiques sur les spores détruites et celles encore en vie sont données par la valeur D (D est le temps de réduction décimale c'est à dire le temps requis pour tuer 90% des micro-organismes ou des spores dans un échantillon à une température donnée) (**Dufrenne et al., 1995, Andersson et al., 1995**).

#### 5. Origine de la résistance thermique

**Beaman et Gerhardt (1986)** ont observé que le fait d'élever la température de sporulation accentuait la déshydratation du protoplaste, ce qui avait pour conséquence une très nette augmentation de la thermo résistance. D'après **Gombas (1983)**, ce phénomène est à l'origine de la différence de comportement qui existe entre les Psychrophiles peu résistants, les mésophiles de résistance moyenne et les thermophiles hautement résistants. En **2001, Cazemie** a conclu que la résistance aux fortes températures est due à trois facteurs principaux, la déshydratation du protoplaste, la minéralisation et l'adaptation thermique.

D'après Jérôme *et al.* (2008), trois facteurs ont été identifiés comme étant les principaux responsables des variations de résistance thermique. Le premier est inhérent au micro-organisme puisque la résistance thermique dépend de la température optimale de croissance. Généralement, les bactéries thermophiles produisent des spores plus thermorésistantes et les bactéries psychrophiles produisent des spores moins thermorésistantes. Le second facteur est lié à l'hydratation de la spore, plus une spore est déshydratée, plus elle est résistante aux traitements thermiques. Le troisième facteur est lié au type de minéralisation de la spore, pour les spores déminéralisées, la valeur de D diminue mais la valeur de Z augmente. Ces valeurs dépendent de la composition en sodium, calcium, magnésium, manganèse, potassium, etc.

Quelques valeurs de thermorésistance de spores de diverses espèces sont données dans le tableau N° VII :

**Tableau VII : Thermorésistance de diverses espèces (Jérôme *et al.*, 2008)**

Espèces	D <sub>120°C</sub> (en s)
<i>Clostridium tetani</i>	5
<i>Bacillus subtilis</i>	5 à 10
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	4 à 5
<i>Bacillus stéarotherophilus</i>	4 à 5
<i>desulfotomaculumnigrificans</i>	2 à 3
<i>Bacillus coagulans</i>	0.1
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.1 à 0.5
<i>Clostridium botulinum A ou B</i>	0.1 à 0.2
<i>Bacillus anthracis</i>	1 à 6

## 6. Influence de certains paramètres sur la thermo résistance de spores

Les conditions environnementales affectent la concentration des spores produites, le temps de sporulation, ainsi que la formation des structures membranaires de la spore. Étant donné que ces structures jouent un rôle primordial dans la résistance des spores, la variation des

conditions environnementales de sporulation influence alors indirectement la résistance des spores formées (Gaillard *et al.*, 2000).

### 6.1. Composition du milieu de sporulation

Les milieux de sporulation sont couramment enrichis en sels de sporulation, ions mono- ou divalents tels que le calcium, le magnésium, le fer, le potassium et le manganèse. En effet, les spores possèdent 4,5 fois plus de calcium et 3 fois plus de manganèse que les cellules végétatives (Lechowichet Ordal, 1962). Il semble donc important d'enrichir le milieu de sporulation en ces ions. Des travaux portant sur les sels de sporulation indiquent, pour deux souches de *B. subtilis* (A163 et AdHCl), deux souches de *B. licheniformis* (A51.1813 et VBBBa03-25) et pour une souche de *B. coagulans* (10545), que les spores produites avec un mélange de sels de sporulation semblent plus résistantes que les spores produites en milieu uniquement enrichi en sulfate de manganèse ( $MnSO_4$ ) (Cazemier *et al.*, 2001).

La thermo-résistance semble dépendre de la forme liquide ou solide du milieu de sporulation. Le temps nécessaire pour détruire 90% des spores de *B. subtilis* PS533 à 90°C est de 52,5 min pour un milieu liquide contre 154,9 min pour des spores produites en gélose (Rose *et al.*, 2007). Il convient donc, pour vérifier l'efficacité d'un traitement thermique, d'utiliser des spores produites en gélose plutôt qu'en milieu de sporulation liquide.

### 6.2. Température de sporulation

L'influence de la température de l'environnement de sporulation est connue depuis 1929 (Williams, 1929). Certains auteurs ont mis en évidence une relation entre les capacités de croissance et la résistance des spores : plus la température optimale de croissance est élevée, plus la thermo-résistance des spores est forte (Warth, 1978). Selon Afchain *et al.* (2008), les spores de *Bacillus sp.* mésophiles sont plus résistantes que les spores de *Bacillus sp.* psychrotrophes.

La thermorésistance ( $D_{90^\circ C}$ ) des spores de *B. cereus* mésophiles est comprise entre 104,7 min et 1,58 min, alors que la thermo-résistance des spores de *B. cereus* psychrotrophes est comprise entre 19,5 min et 0,89 min (Membré *et al.*, 2008). La température de sporulation est considérée comme un des principaux facteurs environnementaux affectant la résistance des spores (Palop *et al.*, 1999).

### 6.3. pH du milieu de sporulation

L'effet du pH de sporulation sur la thermo-résistance des spores est moins étudié que celui de la température. En milieu de sporulation non tamponné, la thermo-résistance des spores de *B. cereus* ATCC4342 et de *B. cereus* ATCC9818 diminue significativement avec une diminution du pH initial de sporulation. Cependant, la thermo-résistance des spores de *B. cereus* ATCC7004 n'est, quant à elle, pas significativement influencée par le pH initial du milieu de sporulation (**Mazas et al., 1997**). Enfin, les spores de *B. Anthracis* produites en milieu non tamponné, à pH 5,0, sont mais significativement plus thermorésistantes que les spores produites à pH 7,0 et à pH 9,0 (**Baweja et al., 2008**).

Dans ces conditions, la thermo-résistance des spores produites en milieu non tamponné est aléatoirement influencée par le pH initial de sporulation. L'étude de **Mazas et al. (1997)** révèle que quel que soit le pH initial de sporulation, en milieu non tamponné, le pH en fin de sporulation est compris entre 8,01 et 8,28.

### 6.4. $a_w$ du milieu de sporulation

Peu de données existent concernant l'influence de l' $a_w$  du milieu de sporulation, sur la thermo-résistance des spores. Une étude indique que la variation de l' $a_w$  de sporulation n'influence pas la thermo-résistance des spores et ce, quel que soit le dépresseur d' $a_w$  utilisé (glycérol, sorbitol ou NaCl) (**Jakobsenet Murrell, 1977**).

***Chapitre 111 : le traitement microbien  
avec ultrasons***

## Chapitre 3 : le traitement microbien avec ultrasons

### 1. Introduction

Les traitements thermiques, tel que la pasteurisation et l'ultra haute température (UHT), ont longtemps été utilisés pour l'inactivation bactérienne dans la fabrication de produits alimentaires (**Piyasena et al.,2003**). En revanche, **Kadkhodae et al (2008)**, ont rapportés que ces traitements thermiques provoquent une perte de vitamines, des nutriments et des saveurs. D'autre part, les techniques de traitement non thermique, y compris les ultrasons, ultra haute pression, phase dense CO<sub>2</sub>, ozonation, champs électriques pulsés à haute tension et le traitement avec des champs magnétique, ont suscité beaucoup d'intérêt car ils offrent une alternative aux méthodes de traitement thermique. En **2011 Chemat et al**, ont affirmé que le traitement par ultrasons est connue d'avoir un impact réduit sur le contenu nutritionnel et sur l'ensemble de la qualité des aliments.

Les ultrasons sont une sorte d'énergie de vibration, avec une fréquence de 20 kHz ou plus (**Mason,1990**). L'inactivation de la bactérie en utilisant un traitement par ultrasons a été signalée dans les années 1920 et l'enquête sur le mécanisme d'inactivation microbienne a commencé dans les années 1960 (**Earnshaw et al.,1995**).

Il existe de nombreuses théories sur le mécanisme des effets biocides des ultrasons. En **1982 Wase et ses collaborateurs**, ont rapporté que les cellules plus grandes sont plus sensibles aux ultrasons que les plus petites. En **2007, Cameron** a signalé que certain chercheur sont rapporté qu'aucune différence significative est observé en ce qui concerne la relation entre le type de Gram des bactéries et l'inactivation par ultrasons, en 2009, **Monsen et al.**,rapportent que les bactéries Gram-négatives sont plus sensibles à une inactivation par ultrasons par rapport aux bactéries à Gram positif. Aussi, il a été rapporté que les bactéries en forme de bâtonnets sont plus sensibles que les cellules en forme de cocci.

### 2. Principe des ultrasons

L'ultrason est une forme d'énergie produite par les ondes sonores à une fréquence trop élevée pour être détectée par l'oreille humaine. Ces ondes participe à une région du spectre de bruit qui est divisé en trois parties principales: les infrasons (16Hz <v16 kHz), bande son (v16 Hz)et l'ultrason (v> 16 kHz).

L'ultrason peut être classé par la quantité d'énergie utilisée: sa puissance (W), l'intensité ( $W m^{-2}$ ) et la densité d'énergie sonore ( $Ws m^{-3}$ ) sont les mesures les plus importantes utilisées pour classer les applications à ultrasons (**Knorr et al., 2004**).

Les applications d'ultrasons sont classés en basse énergie (de faible puissance ou faible intensité) et à haute énergie (haute puissance ou de haute intensité)(**Kentishetkumar, 2011**).

Le groupe à faible énergie comprend des fréquences supérieures à 1 MHz et ces ondes ultrasonores ne provoquent pas d'altérations physiques ou chimiques dans les propriétés de la matière à travers laquelle l'onde passe. Les ultrasons à faible énergie produisent des effets non destructifs et fournissent des informations sur les propriétés physico-chimiques de aliments, tels que la composition, la structure et l'état physique (**Knorr et al., 2004; Leadlyet Williams, 2006**). L'ultrason à haute puissance inclut des fréquences entre 18 kHz et 100 kHz et peut produire des effets physiques, mécaniques ou chimiques, tels que la perturbation physique et l'accélération de certaines réactions chimiques (**Golmohamadi et al., 2013**). L'ultrason à haute intensité a été utilisé pendant de nombreuses années pour produire des émulsions, de rompre les cellules et disperser les matériaux agrégés. Divers domaines ont été reconnus pour le futur développement potentiel, par exemple, le réglage et le contrôle du processus de la cristallisation; la mesure de la texture, la viscosité, et le contenu de des solides et des fluides; le dégazage de liquides alimentaires; l'inactivation des enzymes; séchage amélioré, la filtration et l'induction de la réaction d'oxydation et l'inactivation de micro-organismes (**Knorr et al., 2004; Suslicket al., 1999**).

Dans la transformation des aliments, des ultrasons de haute intensité à basses fréquences, de 20 à 100 kHz, est utile pour inactiver des micro-organismes (**Piyasena et al., 2003**). Selon (**Kentishetal., 2011**), lorsque propagée à travers une structure biologique, les ultrasons favorisent la compression et expansion des particules moyennes, ce qui entraîne la production d'une grande quantité d'énergie. L'inactivation des micro-organismes est une conséquence de la cavitation. La cavitation est la formation, la croissance et l'effondrement des bulles qui génèrent une énergie mécanique et chimique localisée (**Gogateetal., 2009. Kabadi, 2009; Rastogi ; 2011**).

**La figure N° 3** montre le changement de forme de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 avant, (A), et après, (B), traitement avec ultrason pendant 10min



**Figure N°3 :** Microphotographies de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 cellules adhèrent à la surface des tomates crues, des images en utilisant la microscopie électronique à balayage. Non aseptisée (A), après désinfection aux ultrasons pendant 10 min (B) (Jackline *et al.*, 2014).

L'ultrason offre des avantages en termes de coûts, la productivité et sélectivité, avec un meilleur temps de traitement, amélioration de la qualité, et réduit les dommages chimiques et les risques physiques. Actuellement, l'application de cette technologie a attiré l'attention pour son rôle dans la durabilité de l'environnement sans causer de dommages, et il est donc applicable à la notion de technologie verte (Chemat *et al.*, 2011).

### 3. L'inactivation microbienne

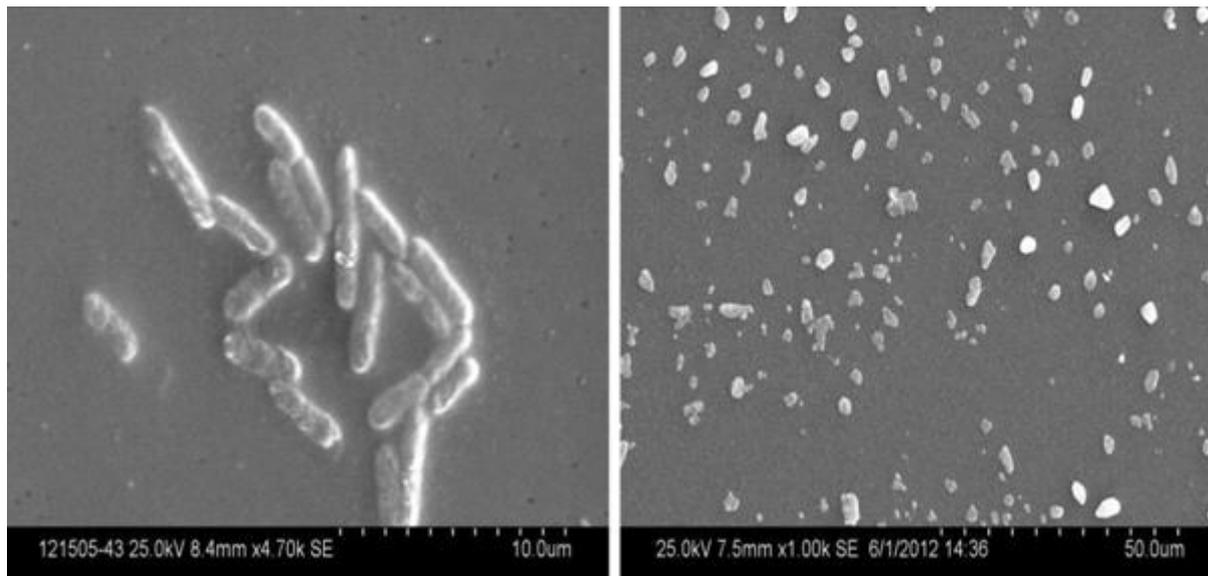
Plusieurs recherches ont été menées pour étudier le mécanisme de rupture par ultrasons dans les systèmes biologiques, les effets de la cavitation sont considérés comme étant un facteur majeur. Dans le Tableau VII sont exposés des causes et effets des ultrasons sur la cellule microbienne. Les mécanismes impliqués dans la perturbation cellulaire sont multifactorielles et pourraient inclure des forces de cisaillement générées pendant le mouvement de bulles ou de température brutale localisée et changements de pression provoqués par explosion de la bulle (Mack et Roberts, 2007; Ulusoy *et al.*, 2007).

**Tableau VII :** Quelques causes et effets des ultrasons sur la cellule microbienne (**Piyasena et al., 2003**)

Les ultrasons	Les effets sur les cellules microbiennes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• La cavitation</li> </ul>	-l'amincissement des cellules ; -la formation des pores et perturbation des membranes cellulaires ; -la rupture des structures des parois cellulaires et la libération du contenu cytoplasmique.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• La destruction des radicaux libres</li> </ul>	-DNA blesse qui produisent des ruptures et la fragmentation de ce dernier.

Deux types de cavitation ont été observés à avoir des effets différents :

**La première est la cavitation stable**, ce qui se produit en raison à des oscillations des ondes ultrasonores, induisant la formation de minuscules des bulles dans le liquide. L'effondrement des bulles ne se produit pas dans ce processus, mais nécessite des milliers de cycles d'ultrasons oscillant vagues pour augmenter la taille des bulles (**Cárcelet et al., 2012**). Comme les ondes d'ultrasons passent à travers le milieu, des bulles vibrées, et cavitation met en place des courants dans le liquide adjacent à la vibration des bulles; les courants exercent à leur tour un mouvement de rotation et de torsion sur les zones proches. De petites bulles se déplacent à travers le champ sonore et créer des microcourants. Cet effet est appelé un micro. Nyborg (1982) décrit un micro comme un phénomène qui participe dans une classe d'occurrences acoustiques, tels que les mouvements, forces, déformations et des contraintes, dans lequel l'échelle géométrique est faible.



Avant ultrasons

Après ultrasons

**Figure N°4 :** Examen au Microscope électronique à balayage des *Anoxybacillus flavithermus* (DSM 2641) cellules végétatives avant et après traitement aux ultrasons. 1 Ultrasons à 80% (91,2 mm) d'amplitude pour 10 min.

Cette manifestation offre forces importantes, qui frottent contre la surface des cellules et perturber la membrane cellulaire pour induire la rupture de la paroi cellulaire. À proximité de vibration des bulles de gaz, de rotation, forces et contraintes affectent les organites intracellulaires (Leadly et Williams, 2006).

*Le deuxième type est la cavitation transitoire*, où la taille des bulles augmente au sein de quelques cycles oscillatoires et puis s'effondrent, provoquant un stress cellulaire. La pression peut perturber la structure de la paroi cellulaire, entraînant une fuite de la cellule. Des changements dans la pression et la température n'affectent pas les cellules, seulement ces cellules à proximité immédiate (Cárcel *et al.*, 2012; Leadley et Williams, 2006).

Autres mécanismes proposés des ultrasons sur l'inactivation microbienne produire par formation de radicaux libres. Ces composés peuvent aider à faciliter différentes applications des ultrasons. Au cours de l'effondrement de bulle, l'énergie est libérée, ce qui peut contribuer à la sonolyse de l'eau. Dans cette réaction, OH<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>, et de peroxyde d'hydrogène sont générés, qui ont des effets bactéricides importants. L'ADN est la cible principale de ces radicaux libres dans la cellule bactérienne, qui produit des ruptures et fragmentation dans le prolongement de l'ADN (Bermúdez *et al.*, 2011).

Le rendement de traitement par ultrasons est affecté par la forme, le type ou le diamètre des micro-organismes. Il est important de savoir le type du micro-organisme cible afin de choisir les meilleures conditions du traitement qui garantiront l'efficacité de la méthode. Des cellules plus grandes avec une plus grande surface sont plus sensibles que les plus petites (**Ananta et al., 2005; Piyasena et al., 2003**).

Les bactéries à Gram-positif sont reconnues comme étant plus résistantes que les bactéries à Gram négatif parce qu'elles ont des parois cellulaires plus épaisses qui protègent contre les effets d'ultrasons. (**Ananta et al., 2005. Piyasena et al. 2003; Ulusoy et al., 2007**).

L'inactivation par les ultrasons a actuellement été associée à une lésion des structures, qui est soutenu par le fait que certaines bactéries sont plus résistantes que d'autres à la cavitation dans le cadre du même régime. L'amincissement de la membrane cellulaire avec chauffage et la production des radicaux libres est essentielle pour l'inactivation (**Knorr et al., 2004; Ulusoy et al., 2007**).

La membrane externe des bactéries Gram-négatives agit comme une barrière et protège la cellule. Cependant, **Ananta et al., (2005)** ont observé que les ultrasons (20 kHz / 17.6W) déstabilise la membrane externe et facilite la pénétration des composés.

Les effets des ultrasons sur les différentes bactéries demeurent discutables. **Scherba, et O'Brien (1991)** ont montré l'absence de différence significative entre le pourcentage de bactéries Gram-positif et des cellules Gram-négatives qui sont inactivés par les ultrasons (26 kHz). Les différences entre les résultats observés mentionnés pourraient être relatives aux conditions de traitement. La forme des cellules peut influencer l'efficacité d'ultrasons. Les spores peuvent résister à une gamme de conditions extrêmes, telles que les hautes températures, pressions osmotiques, les valeurs de Ph extrêmes, et les chocs mécaniques (**Joyce et al., 2003**). Certaines espèces, comme *Bacillus cereus* peut contaminer une variété d'aliments, tels que le riz, épices, le lait et les produits laitiers, les légumes, la viande, gâteaux et autres desserts, ces bactéries produisent des toxines et plusieurs ont été isolé de germes et graines germées (**Kim et al., 2006**). Un grand nombre de bactéries résistantes à la chaleur sont de même résistant aux ultrasons (**Sanz, Lopez, 1985**). Cependant, le traitement par ultrasons, peut induire des changements dans certaines caractéristiques des spores, tels que le gonflement, l'érosion de surface et la stimulation de la croissance (**Burgos et Sala, 1972**).

## *Matériel et Méthodes*

## **1. Méthodologie de prélèvement**

Trois échantillons de poudre de lait importée et commercialisée en Algérie ont été collectés. Les échantillons ont été obtenus auprès des laiteries de la région de Tlemcen. Les échantillons sont d'origine d'Irlande, de la nouvelle Zélande et de l'Inde. Il s'agit de poudre de lait écrémé. Une quantité de 250 à 500 g de la poudre de lait a été prélevée aseptiquement dans des sachets stériles. Au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement, les échantillons ont subi un étiquetage adéquat (origine de la poudre, N° de lot, taux de MG, dates de péremption et de prélèvement). Après, ils ont été stockés à une température de 0 à 4°C.

## **2. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale**

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale est effectué selon la méthode de **JORADP N 32 du 23 mai 2004**, 10g de poudre de lait est diluée, dans 90 ml de Ringer (1/4), c'est la solution mère. Une série de dilutions allant à  $10^{-5}$  est effectuée. 1 mL sont prélevés de chaque dilution et placés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MPCA (Milk plate count Agar) pour effectuer un ensemencement par profondeur. Les boîtes sont bien mélangées en exerçant un mouvement de 8. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 72h. Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies sont prises en compte.

## **3. Dénombrement et identification phénotypiques des souches thermorésistantes**

### **3. 1. Isolement et purification**

Selon la méthode de **Yuan et al (2012)**, 10g de poudre de lait est diluée, dans 90 ml de Ringer (1/4), c'est la solution mère. Elle est traitée à 80°C pendant 10min. et à 100°C pendant 30min. Une série de dilutions allant à  $10^{-3}$  est effectuée. 0.1mL de chaque dilution est ensemencée en surface sur des boîtes de Pétri contenant du milieu MPCA. L'incubation est effectuée à 55°C pendant 24h et à 30°C pendant 48h.

Après incubation de chaque boîte ensemencée, on choisit au maximum 3 à 4 colonies d'aspect différent pour l'isolement. Chaque colonie choisie est ensemencée sur bouillon Cœur cervelle BHIB. L'incubation est effectuée à 30°C et à 55°C pendant 24 à 48h. Après, on introduit une pipette Pasteur stérile et boutonnée dans le BHIB ensemencé.

Celle-ci sert à pratiquer un isolement par stries sur gélose nutritive. Cette opération est renouvelée jusqu'à l'obtention des colonies pures

### **3. 2. Caractérisation morphologique des isolats**

Les souches isolées à partir de poudre de lait sont identifiées en se basant sur des caractères cultureux, morphologique, et quelques caractères biochimiques.

#### **3. 2.1. Aspect macroscopique**

L'aspect macroscopique des colonies (Aspect, bord, couleur) est déterminé après incubation à 30°C et à 55°C sur GN pendant 24h à 48 h.

#### **3. 2.2. Aspect microscopique**

- **Coloration de Gram**

La morphologie, l'arrangement des cellules le type pariétale des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration de Gram (1884) à l'aide d'un microscope optique (ZEISS-westGermany)

### **3. 3. Caractérisation biochimique des isolats**

#### **3. 3.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires**

- **Catalase**

La présence de la catalase est mise en évidence en dissociant à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur une quantité suffisante de la culture sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée a 10 volumes .la présence d'une catalase se traduit. En quelque secondes par la formation de bulles d'oxygène (**Gerhardt et al, 1994**).

- **Recherche de l'oxydase**

Le test d'oxydase est basé sur la production de l'enzyme indophénol oxydase par lesorganismes possédant le cytochrome C. Cette enzyme en présence de l'oxygèneatmosphérique, oxyde un colorant redox ((dihydrochlorure de tetraméthylparaphénylènediamine) pour former un composé violet (**Kohleret al., 2008**)

A partir d'une culture jeune ensemencées sur GN, une colonie est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur (Aslanzadeh, 2006) puis mise en contact avec un disque d'oxydase. Un virage de la couleur en violet indique la présence de l'enzyme oxydase chez la bactérie.

### **3. 3. 2. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité**

La mobilité bactérienne ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées en ensemencant le milieu semi-solide mannitol-mobilité par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. La mobilité est révélée par un envahissement plus ou moins grand du milieu à partir de la piqure d'inoculation.

Selon Gerhard et collaborateur (1994), l'utilisation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du rouge au jaune.

### **3. 3. 3. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires**

- **Détermination de l'activité amylolytique**

La mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon est réalisée par l'ensemencement des souches en une seule strie sur gélose à amidon. Après incubation à 30°C des observations régulières sont effectuées chaque 24h pendant 72 heures. En recouvrant la gélose par une solution de lugol, l'absence de la coloration autour de la culture indique la dégradation de l'amidon alors que les zones contenant l'amidon se colorent en brun (De vos *et al.*, 2009).

- **Détermination de l'activité protéolytique (Hydrolyse de la caséine) :**

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur gélose au lait. Les souches sont ensemencées en une seule strie puis incubée à 30°C. Les résultats sont appréciés quotidiennement durant 72 heures. L'apparition d'une auréole claire autour de la culture indique la dégradation de la caséine (De vos *et al.*, 2009)

- **(Lécithinase)**

Selon la méthode de Genta et Heluane (2001), 10mL d'une émulsion de jaune d'œuf ont été additionnés à 90mL de milieu de base (Gélose nutritive). Maintenu en surfusion (~45°C), ce mélange était coulé sur des boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les souches étaient ensemencées par stries

L'apparition de toute zone claire autour de la culture après 24 à 72 heures d'incubations à 30°C, témoigne que la souche possède de lécithinase (De vos *et al.*, 2009).

### **3. 3. 4. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons**

La capacité des souches à assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est testée sur un milieu synthétique au citrate de Simmons.

Après incubation, la croissance sur ce milieu s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage de couleur du vert au bleu vif (**Harley et Prescott, 2002**).

### **3. 3. 5. Mise en évidence de l'activité hémolytique**

Sur le milieu gélose au sang de base additionné de 5% de sang de cheval, les différentes souches sont ensemencées par strie. Les boîtes sont incubées à 24 à 48h. Un résultat positif est exprimé par une couleur verdâtre au tour de la strie (**Ventosa et al., 2009**).

### **3. 3. 6. Mise en évidence de l'assimilation de l'Esculine**

L'esculine est un hétéroside formé d'un glucide complexe qui peut être dégradé par l'esculinase. Les produits de la réaction sont le glucose et l'esculétine. L'esculétine formé peut réagir avec les ions Fer III pour donner un précipité noir.

- ✓ Si le milieu est noir : le fer III a réagi avec l'esculétine; la bactérie possède l'enzyme esculinase.
- ✓ Si le milieu reste gris, il n'y a pas eu de réaction ; la bactérie ne possède pas l'enzyme.

### **3. 3. 7. Caractérisation des souches par la galerie API 20E**

C'est un système simplifié et standardisé, comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés permettant d'effectuer 22 tests biochimiques, des suspensions bactériennes effectuée, à partir des cultures de 18h, de chaque souche dans de l'eau physiologique sont inoculées dans les micros tubes de la plaque API 20 E. les plaques sont incubées pendant 24h à 30°C. Les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs (**Camille, 2007**)

#### **4. Evaluation de la résistance d'une spore sélectionnée vis-à-vis un traitement thermique et aux Ultrasons :**

##### **4. 1. Préparation de la suspension sporale**

La technique rapportée par **Gaillard (2003)** a été utilisée. La durée d'incubation a été ramenée à sept jours au lieu de trente jours. Le taux de sporulation est suivi par un examen microscopique.

L'ensemencement par écouvillon est effectué à partir de la boîte contenant la souche sélectionnée. 4 boîtes de Pétri remplies de gélose nutritive enrichies ont été ensemencées. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 7 jours. Lorsqu'un tapis se forme à la surface, le taux de sporulation est vérifié. Quand celui-ci dépasse 90%, 2 à 3 mL d'EDS (Eau distillée stérile) est versée sur chaque boîte. Le tapis de spores formé est raclé avec une pipette Pasteur sous forme de râteau, puis récupérée dans un tube stérile. La solution est reversée dans 4 tubes à hémolyse pour subir une série de centrifugations. La première centrifugation est à 3000 t/m pendant 30 minutes. Le surnageant est jeté. Cette dernière est suivie par deux autres centrifugations effectuées dans les mêmes conditions. 4ml de l'EDS est ajoutée au culot. Puis homogénéiser au vortex. A la fin la suspension est traitée à 80°C pendant 10 min. la suspension sporale est stockée à 4°C.

##### **4. 2. Application du traitement thermique**

La suspension de spores de la souche donnée, caractérisé par le nombre de spores par mL, a été diluée au 1/10 avant l'expérience.

- **Avant traitement**

On a effectué un dénombrement du nombre initial de la suspension sporale. Pour cela, une série de dilution est effectuée. À partir des trois dernières dilutions, 1mL est ensemencé par profondeur dans 2 boîtes de Pétri stériles. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 24 à 48h.

- **Au cours du traitement**

11 tubes à essais remplis de 9 mL du bouillon Muller Hinton sont mis dans un bain Marie réglé 90°C. Chaque tube représente un temps (2 minute ). Afin de vérifier la température dans les tubes, le thermomètre est mis dans un tube témoin.

A la température voulue dans le tube témoin, on a ajouté 1mL de la suspension sporale dans chaque tube et en parallèle on a lancé le chronomètre. A la sortie du bain Marie les tubes ont été gardés dans un bain glacé.

- **Après traitement**

A partir de chaque tube traité thermiquement (représentant un temps fixe), on a effectué une série de dilutions dans de l'EPS. 1mL des trois dernières dilutions estensemencé par profondeur dans des boites de Pétri stériles (duplicatas). L'incubation est effectuée à 30°C pendant 24 à 48h.

#### **4. 3 Traitement aux ultrasons**

11 tubes à essais remplis de 9 ml du bouillon Muller Hinton sont mis dans un appareil a ultrason réglé a (60 htz),(Model WUC-D06H 10W) on a ajouté 1mL de la suspension sporale dans chaque tube, après 5min les tubes sont retirés de l'appareil des ultrasons pour subir directement un traitement thermique identique à celui décrit au paravent.

#### **5. Etude statistique**

Après avoir réalisé les deux traitements, les courbes de survie sont construites graphiquement à partir des logarithmes décimaux des nombres de survivant log UFC/ml en fonction du temps de traitement (T). Le temps de réduction décimal (D) à une température donnée (T) est noté DT. Il correspond au temps nécessaire pour diminuer d'un logarithme décimal (ou diviser par 10) une population microbienne déterminée. Dans cette étude, le logiciel Graph Pad Demo 5 ® est utilisé pour tracer les courbes de survie.

## *Résultats et discussions*

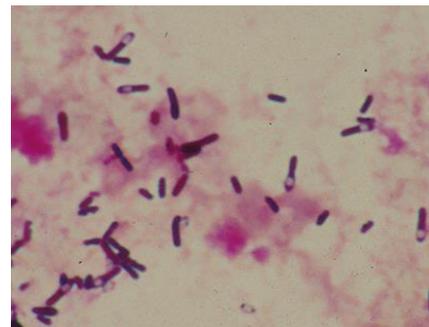
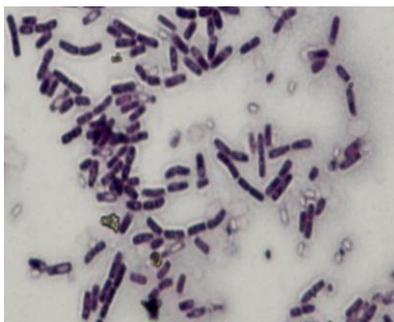
## **1. Isolements et purifications souches :**

Des colonies à différents aspect macroscopique et microscopique sont apparues et après une étape de purification, 31 souches ont été retenues selon les critères de sélection fixés déjà auparavant c'est-à-dire des bacilles à Gram positif et capable de former des spores.

## **2. Caractérisations phénotypiques des isolats :**

### **2.1. Aspect microscopique :**

Le but de cette étude était porté sur le screening des bactéries du genre *Bacillus* qui présente la forme bacille à Gram positif sporulé, la coloration de Gram effectuée selon la technique de **Dussault (1955)** a révélé une dominance de 98% des isolats sont des courts bacille a Gram positive, a extrémités arrondie et souvent disposés en paires ou en chainettes aussi (Figure N°5 : )



**Figure N°5** : Résultats d'observations microscopiques après la coloration de Gram (observation par microscope optique G×100 a immersion)

### **2.2. Aspect macroscopique :**

Les résultats de l'examen macroscopique des souches sont mentionnés dans le Tableau IIX

Tableau N°IX : Résultats de l'aspect macroscopique des souches

Souches	Aspect des colonies (Bacille, Gram +)					
	Taille	Forme	Relief	Opacité	Couleur	Consistance
LMB214	(4mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	muqueuse
LMB216	(3mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	muqueuse
LMB218	(4mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Muqueuse
LMB220	(3/2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Muqueuse
LMB222	(5mm)	Etoilé	Plate	Translucide	Crème	Crémeuse
LMB224	(4mm)	Etoilé	Plate	Translucide	Crème	Crémeuse
LMB226	(5/2mm)	Etoilé	Plate	Translucide	crème	crémeuse
LMB228	(4/2mm)	étoilé	Plate	Translucide	Blanche	Muqueuse
LMB230	(3mm)	Ronde	plate	Translucide	Crème	Muqueuse
LMB232	(3mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Crémeuse
LMB234	(2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Blanche	Crémeuse
LMB236	(2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Crémeuse
LMB238	(4/2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Crémeuse
LMB240	(2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Crémeuse
LMB242	(2/1mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Crémeuse
LMB244	(5/3mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Crémeuse
LMB246	(2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Crémeuse
LMB248	(6/4mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Muqueuse
LMB250	(4/2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Muqueuse
LMB252	(7mm)	Ronde	Plate	Translucide	Blanche	Muqueuse
LMB254	(3mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Muqueuse
LMB256	(6mm)	Ronde	Plate	Translucide	Blanche	Crémeuse

LMB258	(2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Blanche	Muqueuse
LMB260	(5/2mm)	RONDE	Plate	Translucide	Crème	Muqueuse
LMB262	(2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Muqueuse
LMB264	(5/2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Muqueuse
LMB266	(4mm)	Ronde	Plate	Translucide	Blanche	Crémeuse
LMB268	(6mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Crémeuse
LMB270	(7mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Muqueuse
LMB272	(2mm)	Ronde	Plate	Translucide	Crème	Muqueuse

**NB** : les souches en couleur rouge sont les souches sélectionnées pour les plaques Api 20 E

### 3. caractéristiques biochimiques des isolats

Les résultats de la caractérisation biochimique sont résumés dans le Tableau N°XI

#### 3.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires

Presque Toutes les souches étudiées sont catalase positives à part quelque unes. Elles sont aérobies ou anaérobies facultatives et plus que la moitié des souches ont un oxydase négative

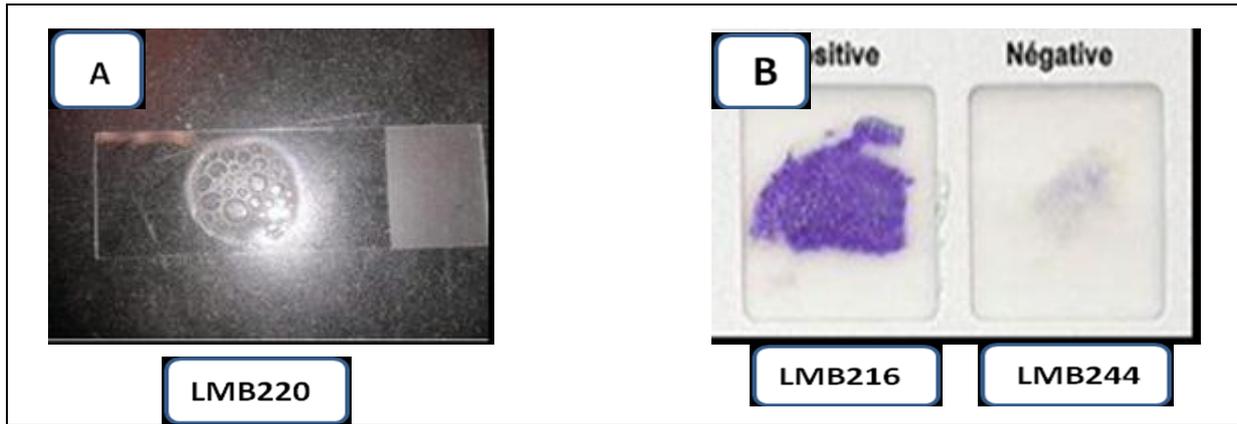
**Tableau N° IX: Résultats de la recherche des enzymes respiratoires**

+ : résultat positif

- : résultat négatif

Souches	Catalase	Oxydase
LMB214	+	-
LMB216	+	+
LMB218	+	-
LMB220	+	-
LMB222	+	-

LMB224	+	+
LMB226	+	+
LMB228	+	+
LMB230	+	-
LMB232	-	-
LMB234	+	-
LMB236	-	-
LMB238	-	-
LMB240	-	-
LMB242	-	-
LMB244	-	-
LMB246	-	-
LMB248	+	-
LMB250	-	-
LMB252	+	-
LMB254	-	-
LMB256	-	-
LMB258	+	-
LMB260	+	-
LMB262	-	-
LMB264	+	-
LMB266	+	-
LMB268	+	-
LMB270	+	-
LMB272	+	+



**A.** Résultat du test de la catalase (+)  
test positive

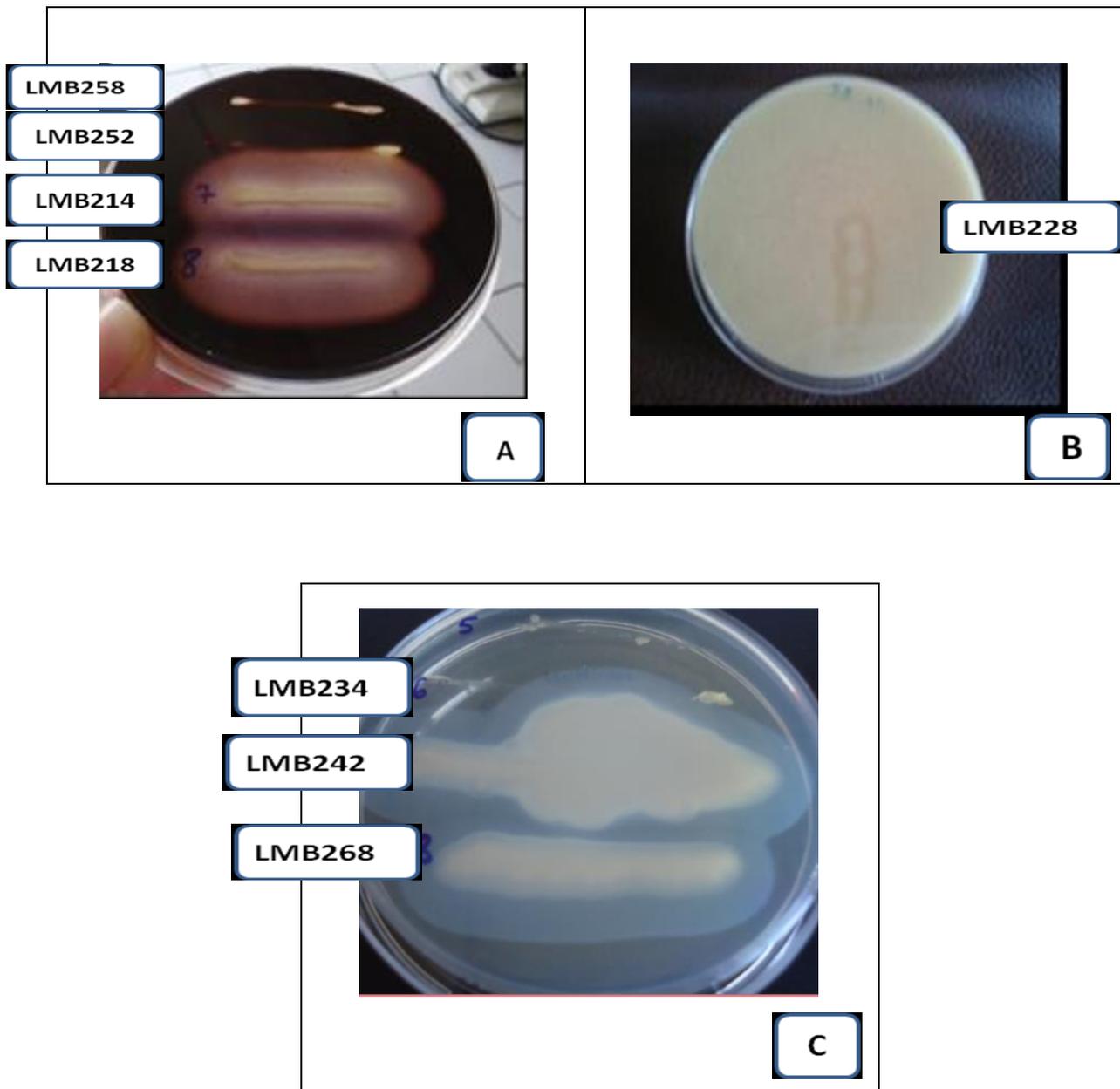
**B.** Résultat du test de l'oxydase LMB216  
et LMB244 négative

**Figure N°6 :** Exemple d'un Résultats de la recherche des enzymes respiratoires (calalase, oxydase).

### 3.2 Résultats de la mise en évidence les activités enzymatiques :

Les activités amylolytique, protéolytique, lipolytique ont été mises en évidence en utilisant les milieux : gélose a amidon, gélose a émulsion d'œuf, gélose au lait, et la lécithine les résultats sont mentionnés dans le tableau N° XI

### 3.3 Résultat de la mise en évidence d'activité enzymatique



**Figure N° 7:** Activités enzymatiques.

A-Dégradation de l'amidon

B-Dégradation de la caséine

C-Dégradation de lécithine

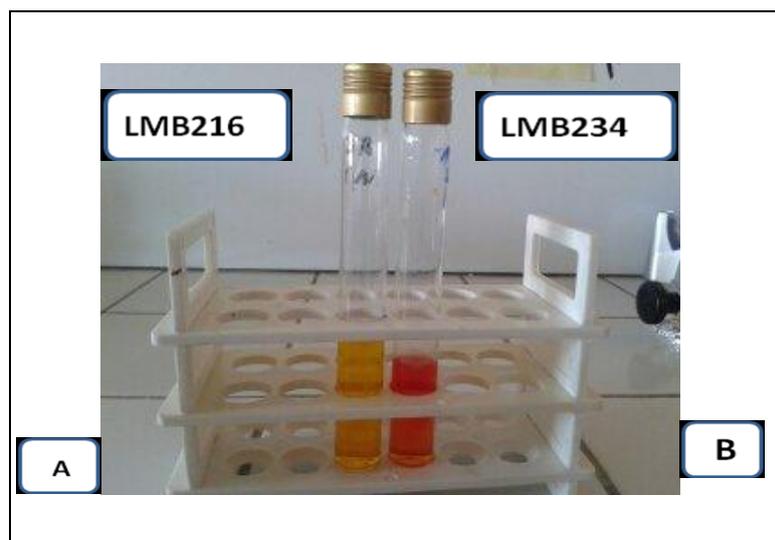
### 3.4 Résultats de la mise en évidence de l'activité hémolytique

Presque Toutes les souches étudiées ne possèdent pas une enzyme hémolytique à part quelque unes comme le montre la figure N°8 : et les résultats sont illustrés dans le tableau N° XI



Figure N°8 : Exemple de la mise en évidence d'activités hémolytique par la souche LMB238

### 3.5 Test du mannitol mobilité :



**Figure N° 9 : résultats du mannitol mobilité**

**A.** Souche mobile mannitol négative

**B.** souche mobile mannitol positive

### 3.6 Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de simmons

La capacité des souches à assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est observée dans 31 souches comme le montre la figure et les résultats sont résumés dans le tableau N°XI



**Figure N°10 :**

**A :** exemples de mise en évidence d'activités d'esculine

**B :** exemples de mise en évidence de l'utilisation de citrate (source de citrate de Carbone)

### 3.7. La mise en évidence de l'utilisation du sucre d'esculine

L'esculétine formé peut réagir avec les ions Fer III pour donner un précipité noir a été remarquer dans plusieurs souches comme le montre la figure N° 10 :

### 4. Résultats des plaques API20E :

Le reste des tests biochimiques ont été réalisés sur plaques API 20 E, 15 souches ont été sélectionnées et identifiées, les résultats obtenus par le logiciel API feuille de calcul pour l'identification microbienne (Jean *et al.*, 2007) sont

Tableau N° X : Résultats des plaques API20E, des quinze souches sélectionnées

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
1-LMB222	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-LMB220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3-LMB214	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-LMB256	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-LMB254	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-LMB260	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7-LMB270	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-LMB250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-LMB258	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-LMB272	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
11-LMB268	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
12-LMB266	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
13-LMB224	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14-LMB262	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15-LMB240	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

-Souches 1 : correspond à 5 *Bacillus sphaericus/fusiformis /badius*

-Souches 2 : correspond à 4 *Brevibacillus choshinensis/centrosporus /brevis*

-Souches 3 : correspond à 1 *Bacillus firmus*

-Souches 4 : correspond à 1 *Aneurinibacillus aneurinilyticus*

-Souches 5 : correspond à 1 *Geobacillus stearothermophilus*

-Souches 6 : correspond à 1 *Brevibacillus laterosporus*

-Souches 7 : correspond à 1 *Bacillus lentus* , -souches8 : *Bacillus lentus*

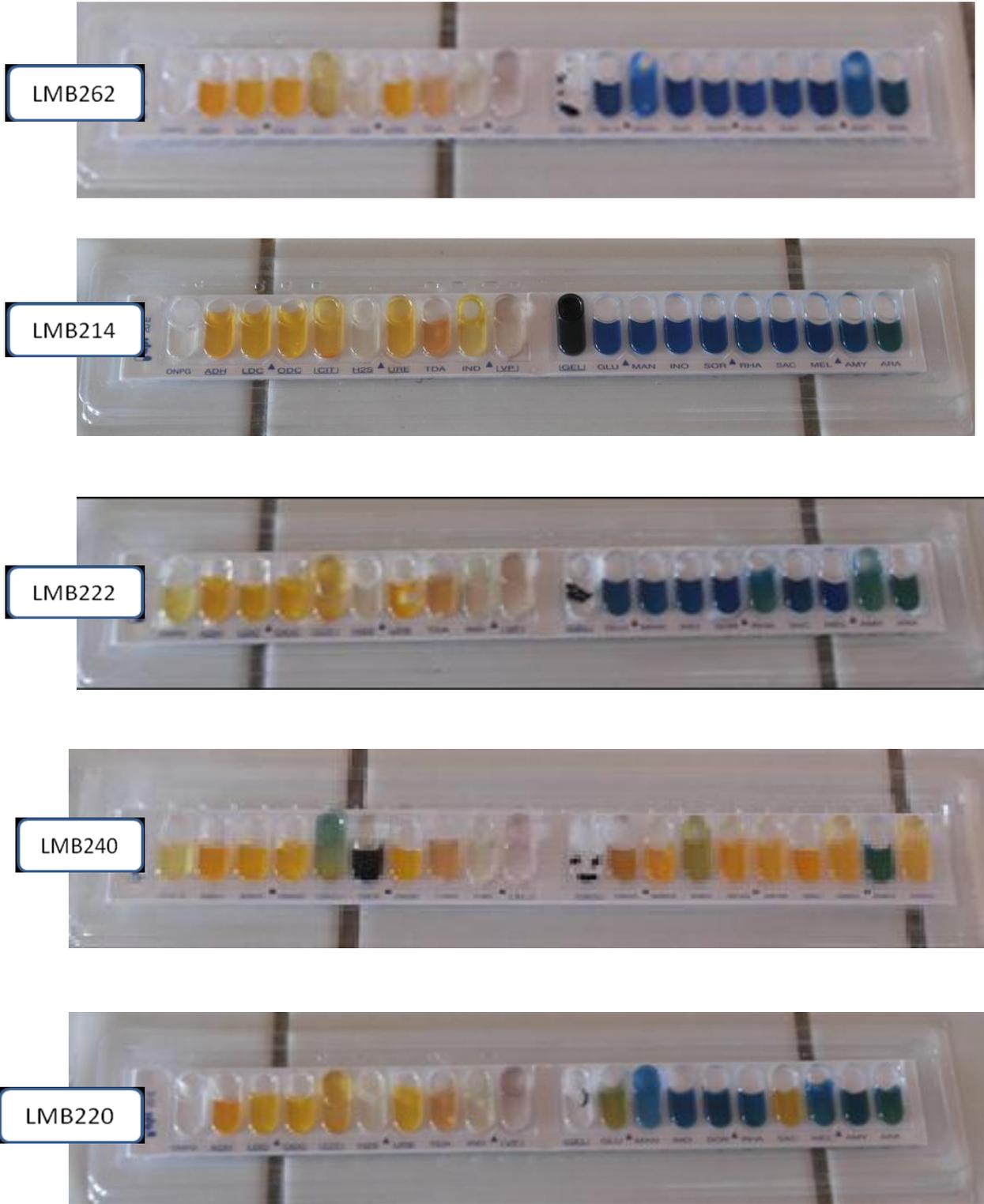


Figure N° 11 : Résultats des plaques API20E de quelques souches

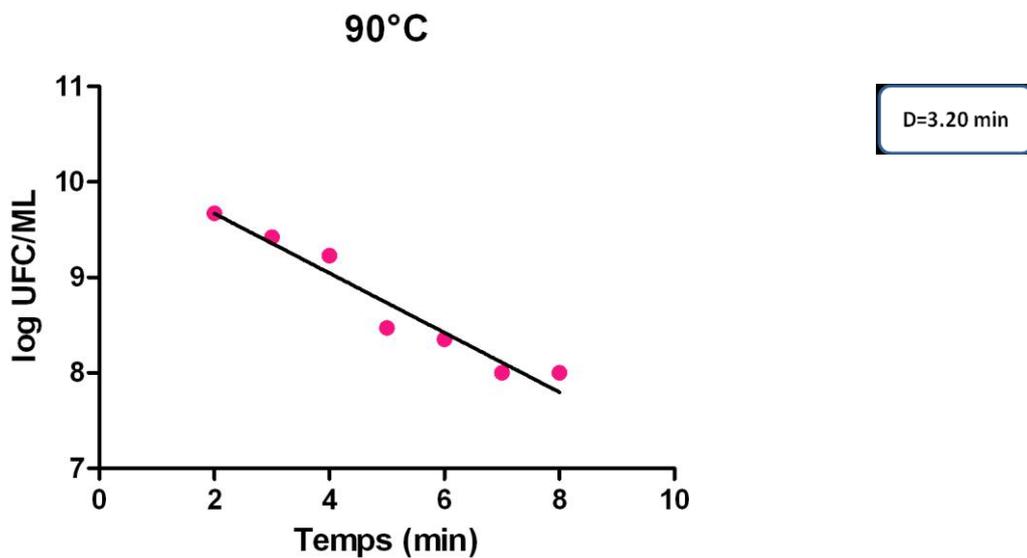
**Tableau N°XI :** Les résultats biochimiques pour les 30 isolats obtenus .

<b>Souches</b>	<b>Amylase</b>	<b>Caséinase</b>	<b>lécithinase</b>	<b>esculine</b>	<b>hémolyse</b>	<b>Citrate de simons</b>	<b>Mannitol</b>
<b>LMB214</b>	+	+	-	-	-	-	+
<b>LMB216</b>	+	+	-	-	-	-	-
<b>LMB218</b>	+	+	-	+	-	-	+
<b>LMB220</b>	+	-	+	-	-	-	-
<b>LMB222</b>	+	+	-	-	-	-	+
<b>LMB224</b>	+	+	+	-	-	-	+
<b>LMB226</b>	+	-	-	-	-	∵	+
<b>LMB228</b>	+	+	+	-	-	+	+
<b>LMB230</b>	+	+	-	+	-	+	+
<b>LMB232</b>	+	+	+	-	-	+	-
<b>LMB234</b>	+	+	-	+	-	-	+
<b>LMB236</b>	+	-	+	+	-	-	-
<b>LMB238</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>LMB240</b>	+	+	-	-	-	-	+
<b>LMB242</b>	+	+	+	+	-	-	+
<b>LMB244</b>	+	+	-	-	-	+	-
<b>LMB246</b>	+	+	+	-	+	-	+
<b>LMB248</b>	+	+	-	-	-	-	+
<b>LMB250</b>	+	+	+	-	+	-	+
<b>LMB252</b>	-	+	-	+	-	-	-
<b>LMB254</b>	-	+	-	-	-	∵	-
<b>LMB256</b>	-	+	-	-	-	-	-
<b>LMB258</b>	-	+	+	+	-	-	-

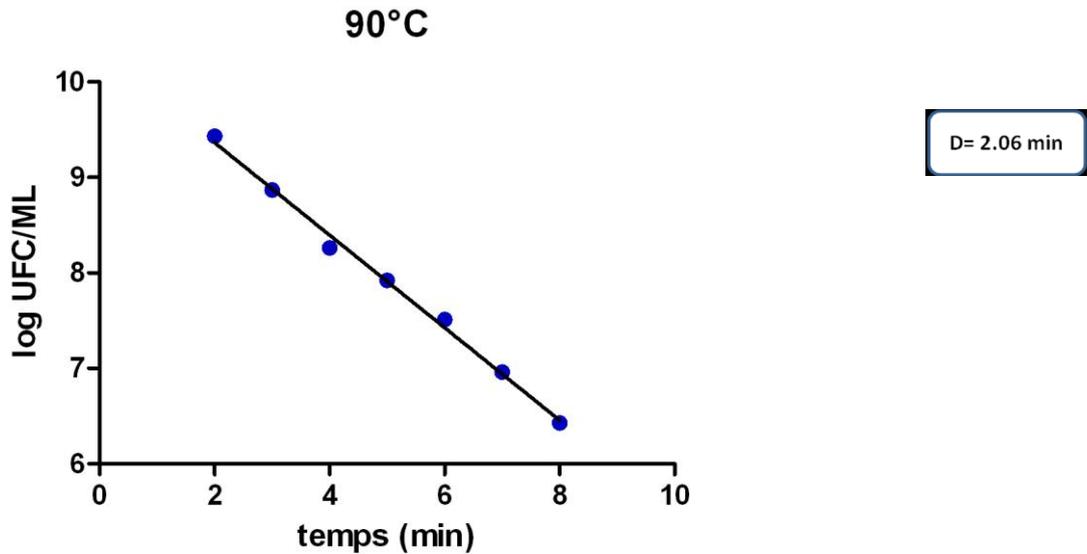
<b>LMB260</b>	-	+	-	+		-	-
<b>LMB262</b>	-	+	-	-	+	-	-
<b>LMB264</b>	-	-	-	-	-	+	-
<b>LMB266</b>	-	+	-	+	-	-	+
<b>LMB268</b>	+	+	+	-	+	+	+
<b>LMB270</b>	+	+	+	+	-	+	+
<b>LMB272</b>	+	+	+	-	+	+	+

**5. Evaluation de la résistance d'une spore sélectionnée vis-à-vis un traitement thermique et aux Ultrasons :**

L'étude de l'effet du traitement thermique et du traitement aux ultrasons est représenté sur les deux graphiques suivant :



**Figure N°12 : courbe de survie d'une population de spore de Bacillus sp traitée à 90°C**



**Figure N°13** : courbe de survie d'une population de spore de *Bacillus* sp traitée à 90°C en combinaison avec le traitement à Ultrason

31 souches bactériennes isolées de 3 types de poudre de lait d'origines différentes ont été identifiées, des approches différentes mais complémentaires de microscopie et de tests biochimique ont été utilisées pour l'identification de ces souches.

Ainsi l'utilisation de la coloration de Gram combinée à une observation microscopique suivie par une identification phénotypique a montré que la majorité des isolats sont des bacilles à Gram positif aérobies, capables de former des spores à catalase positif.

L'étude enzymatique des souches a montré un bagage enzymatique très important, elles sont capables d'hydrolyser la caséine, l'amidon, la lécithine.

Les autres tests biochimiques étaient réalisés en utilisant la galerie **API 20 E** pour apprécier les 20 tests présents sur cette plaque puisque normalement l'identification biochimique des bactéries du genre *Bacillus* se fait sur les plaques API 50CHB. Seul 15 souches ont été sélectionnées (LMB222, LMB220, LMB214, LMB256, LMB254, LMB260, LMB270, LMB250, LMB258, LMB272, LMB268, LMB266, -LMB224, LMB262, LMB240)

Les isolats identifiés appartiennent à plusieurs espèces différentes dont (34%) de *Bacillus* *sphaericus/fusiformis/badius* *suivipar* *Brevibacillus* *choshinensis/centrosporus* */brevis* (27%) *Aneurini* *bacillus* *aneurinilyticus*, (14%), *Brevibacillus* *laterosporus*,

*Geobacillusstearothermophilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus* (7%). L'étude de **Rückert et al (2004)** a permis d'identifier comme espèces majoritaires : *Anoxybacillusflavithermusa* (43%), suivi par *Bacillus licheniformis* a (37%) et *Geobacillusstearothermophilus* (11%).

Malgré que les analyses phénotypiques soient importantes en taxonomie microbienne, et qu'elles soient généralement faciles à étudier et bien significatives vu que les critères phénotypiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables, il est difficile de déterminer les espèces et de les rassembler dans le genre *Bacillus*, néanmoins les résultats obtenus sont prometteurs et prouvent qu'on est sur la bonne voie. De nombreuses études suggèrent que le genre *Bacillus* constitue un genre hétérogène, d'un point de vue phénotypique par rapport à la plupart des autres genres bactériens (**Claus et Berkeley, 1986**) et que les espèces appartenant à ce genre sont en augmentation continue et sont difficiles à identifier par les méthodes traditionnelles fondées sur les caractéristiques phénotypiques (**Woese, 1987**).

La nature de la matière première utilisée explique la faible diversité obtenue dans notre étude. En effet, les produits déshydratés ne sont pas supposés avoir les conditions favorables pour une large diversité à cause de la faible activité d'eau qui les caractérise, en plus des procédés restrictifs tels que les traitements thermiques réalisés à des températures abusives aussi bien au cours du processus de production de la poudre de lait qu'à sa transformation peuvent aboutir à une réduction de la microflore (**Malek 2013**) .

Les espèces retrouvées dans la poudre de lait varient avec la saison, l'origine mais aussi le processus de fabrication de la poudre qui diffère d'une usine à une autre (**Rückert et al., 2004**). Le processus de fabrication de la poudre de lait conduit à l'élimination des formes végétatives. Aussi, l'activité d'eau relative de la poudre de lait est très faible, ce qui suggère l'absence de bactéries. Cependant la forme sporulée .caractéristiques des bacilles thermophiles est favorisée par pression de sélection appliquée au cour du processus (**Ruckert et al., 2004**).

Les bacilles thermophiles principalement *Anoxybacillus* et *Geobacillus* sont considérés comme les contaminants les plus importants de l'industrie laitière où ils sont introduits via la poudre de lait (**Murphy et al., 1999, Ronimus et al., 2003 ; Seale et al., 2008, Yuan et al., 2012**).

Les bactéries thermophiles ne sont pas pathogènes mais forment des spores très thermorésistantes (**Fabienne, 2010**), elles peuvent être à la cause de l'altération du lait reconstitué vu leur croissance exponentielle dans les segments de transformation à des températures de 40 à 65°C avec un temps de génération très court de 15 à 20 minutes (**Burgess et al., 2010**) en plus, les acides et les enzymes hydrolytiques telles que la protéase et les lipases provenant des bacilles thermophiles peuvent jouer un rôle important dans la réduction de la durée de vie du lait reconstitué (**Chen et al., 2003**).

Dans l'industrie laitière, les bacilles thermophiles sont essentiellement des indicateurs d'hygiène et sont responsables d'altérations dues à leur propriété acidifiantes et leur potentiel enzymatique (**Burgess et al., 2010**). En effet, les thermophiles obligatoires tels que *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus* spp. ne sont pas pathogènes alors que quelques espèces des thermophiles facultatifs telles que *B. licheniformis* et *B. subtilis* peuvent produire des toxines (**De Jonghe et al., 2010**).

Dans notre étude la valeur de D obtenue après un traitement des spores à 90° C était 3,20 minutes, alors que pour le 2<sup>ème</sup> traitement thermique suivi par ultrason, cette valeur était de l'ordre de 2,06 minutes

Dans une étude récente de **Montville et al. (2005)**, les valeurs de D des spores de trois souches de *B. anthracis* à 90 ° C étaient de 1,5, 1,0 et 6,7 min, et les valeurs Z (augmentation calculée de la température nécessaire pour réduire la valeur D de 90%) était de 10,2, 8,7 et 13,6 ° C, respectivement. Dans cette étude, la résistance thermique des spores de *B. anthracis* est similaire à celle d'autres espèces de Bacillus (**Sa Xu, 2006**).

**Novak et al 2005** ont mené une étude sur la résistance thermique de *B. cereus* dans le lait écrémé. Les valeurs de D rapportées pour la souche étaient 1,189 min à 72 ° C, 5,13 min à 90 ° C, 7 min à 100 ° C, et de 1,1 min à 130 ° C. Les valeurs D à 90 ° C étaient significativement plus élevées que nos valeurs,

En **2001 Janstova et Lukasova** ont mené une étude sur la thermorésistance de quelques souches du genre Bacillus dans le lait de vache à 95°C qui a donné des valeurs de D de 4,40 pour *B. Sphaericus* de 2,02 pour *B. amylolytique* et de 3,96 pour *B. coagulans* ce qui montre que dans les mêmes conditions cette valeur est caractéristique de chaque souche.

Le traitement thermique du lait de consommation, en particulier la pasteurisation, vise principalement à inactiver les micro-organismes nocifs dans le lait et les produits laitiers. La pasteurisation du lait est effectuée par un chauffage à 72° C pendant 15s ou 63° C / 30m (Lewis et al., 2009). Certains Bacilles sporogènes telles que *Anoxybacillus flavithermus* (température optimale de croissance de 60° C et 65° C dans des conditions aérobies et anaérobies, respectivement) et *Geobacillus stearo thermophilus* (se développe à des températures jusqu'à 75° C) sont de nature thermo résistantes, par conséquent, la pasteurisation n'est pas suffisante pour les éliminer (Burgess et al., 2009 )

La pasteurisation classique et la stérilisation sont largement utilisées pour l'inactivation des micro-organismes dans les produits alimentaires. Cependant, ces méthodes thermiques nuisent aux qualités sensorielles et valeurs nutritionnelles des aliments transformés (Lee et al., 2009). Comparé avec les traitements thermiques, les méthodes non-thermiques augmentent la rétention de saveurs, de couleurs et de compositions nutritives

Plus précisément, le traitement par ultrasons est connue d'avoir un impact réduit sur le contenu nutritionnel et sur la qualité des aliments (Chemat ,Zille, (2011). L'utilisation d'ultrasons au sein de l'industrie alimentaire était un sujet de recherche et développement depuis de nombreuses années (McClements, 1995; Mason, 1998).

L'un des objectifs de notre étude était de déterminer la thermorésistance des spores de Bacillus dans la poudre de lait qui subis un traitement thermique avec ou sans ultrason.

Som et al (2013) ont mené une étude sur L'inactivation des bactéries sporulées aérobies dans le lait par traitement aux ultrasons. Les expériences ont été réalisées pour étudier l'effet des ultrasons seul ou en combinaison avec la pasteurisation sur l'inactivation des cellules végétatives de certains Bacillus spp thermorésistantes (*Bacillus coagulans* (ATCC\_ 12245), *Anoxybacillusflavithermus* (DSM 2641), *Bacillus sporothermodurans*(DSM 10599), *Bacillus licheniformis* (ATCC\_6634), and *Geobacillusstearothermophilus* (ATCC\_ 15952). En général, ils ont rapporté que les cellules végétatives de *B. coagulans* et *A. Flavithermus* survivent un traitement de pasteurisation (63 °C/30 min) dans l'échantillon de lait entier et écrémé,alorsqu'un traitement d'ultrasons à 80% d'amplitude pendant 10 min a inactivé les cellules végétatives de *B. coagulans* et *A. flavithermus* dans le lait écrémé avec des réductions de 4,53, et 4,26 logs. Une combinaison de traitement de pasteurisation (63° C / 30 min) aux ultrasons a permis d'éliminer environ 6 log de ces cellules dans le lait écrémé.

La pasteurisation seule a été observée à être inefficace pour l'inactivation des cellules végétatives de *B. coagulans* et *A. flavithermus* dans deux le lait écrémé et entier. Les ultrasons à haute intensité ont inactivé presque toutes ces cellules après 10 min. Une combinaison d'ultrasons avec la pasteurisation a donné lieu à une inactivation totale des cellules.

la valeur de D obtenue dans notre expérience après un traitement thermique à 90°C en combinaison avec les ultrasons étaient 2,06 minutes, elle est inférieure à celle qu'on a trouvé dans la premier expérience sans ultrasons (3,40 min), ces résultats indiquent le rôle des ultrasons dans la réductions du nombre de spores.

**NathKhanal et al .,2013** ont rapporté que l'ultrason peut entraîner la destruction physique des structures de cellule végétative de bactéries sporulantes. Des conclusions similaires avaient déjà été établies par **Lee et al. (2009)** et **Koda et al. (2009)**.

Les résultats de notre étude étaient significativement comparables de ceux rapportés par **NathKhanal et al.,2013**

**Pagan et al. (1999)** ont comparé les effets d'un traitement par les ultrasons (20 kHz, 200 kPa, 117 μm, 40°C) sur *Listeria monocytogenes* dans différents milieux, ils ont constaté que le lait a un effet protecteur.

D'après **Ritz et al.(2002)**, le nombre de bactéries survivantes après un traitement par les ultrasons décroît de manière exponentielle avec le temps d'application.

**Ritz et al., 2002** ont mené une étude sur l'effet des ultrasons sur les constituants alimentaires et ils ont rapporté que même si les modifications induites par les ultrasons sont, et ont été, très étudiées dans le domaine de la chimie, peu de données sont disponibles sur leurs effets sur les constituants alimentaires.

**Wrigley et al., (1992)** ont mis en évidence qu'il n'y avait pas de différence significative dans les concentrations en protéines solubles du lait et de l'œuf liquide, après un traitement par les ultrasons à 50°C pendant 30 minutes. Plusieurs autres modifications sont rapportées par **Boistier et al.(1999)** : une odeur de brûlure peut apparaître sur le lait, les qualités organoleptiques du jus d'orange sont altérées.

Les modifications constatées sur les protéines (rupture de la structure quaternaire des protéines globulaires polymériques, délipidation de certaines lipoprotéines, dissociation de l'hémoglobine, modifications de la structure de certains acides aminés), sont fortement

dépendantes de la concentration de ces protéines et de la nature des gaz dissous (**Salaf et al., 1995**).

Les données rapportées sur les effets d'un traitement par les ultrasons sur les micro-organismes laissent à penser que son utilisation seule ne trouvera probablement pas de débouché en matière de conservation des aliments, en raison des intensités trop élevées requises pour atteindre un seuil d'inactivation microbienne satisfaisant, modifiant de ce fait de manière trop importante les aliments. En revanche, son utilisation combinée avec l'emploi de la chaleur, augmente parfois de manière spectaculaire la sensibilité des micro-organismes, permettant d'entrevoir des applications potentielles intéressantes. Des études portant sur les conséquences toxicologiques d'un tel traitement sont toutefois nécessaires (**Ritz et al., 2002**).

# *Conclusion*

**Conclusion et perspectives :**

L'objectif essentiel de ce travail était d'étudier l'influence des ultrasons sur des spores de *Bacillus sp* isolées à partir de la poudre de lait, les spores isolés sont traitée thermiquement à 90°C pendant 20 minutes. Avant de procéder au traitement d'ultrason on a identifié la flore thermorésistante de 3 d'échantillon de poudre de lait d'origine différent.

La recherche des souches bactériennes a été réalisée sur 3 types d'échantillon différents ,31 souches ont été isolées et identifié, L'identification phénotypique a montré que la majorité des isolats sont des Bacille à Gram positif aérobie, capable de former des spores

Les résultats de la caractérisation biochimiques c'était près de 98% des souches sont catalase positives. à part quelque unes. Elles sont donc aérobies ou anaérobies facultatives et plus que la moitié des souches ont un oxydase négative ,elles sont capables aussi d'hydrolyser la caséine, l'amidon, la lécithine .Et plus que la moitié des souches ont un oxydase négative.

Au cour de notre étude nous avons pu identifier 15 isolat dont Les isolats identifiés appartiennent à plusieurs espèce différents dont (34% )De *Bacillus sphaericus/fusiformis /badius* suivi par *Brevibacillus choshinensis/centrosporus /brevis*(27%),*Aneurinibacillus aneurinilyticus*,(14% ),*Brevibacillus laterosporus,Geobacillus stearothermophilus,Bacillus lentus ,Bacillus firmus* (7%)

La valeur de D des spores du notre expérience de traitement thermique à 90°C en combinaison avec l'ultrason C étaient 2.06 elle est inférieure de celle que on a trouvé dans la premier expérience (3.40) ces résultats ont indiqué que le traitement thermique de (90 ° C, 20 min) ne pouvait pas inactiver une concentration élevée de spores et il est inefficace était inefficace Sans le traitement d'ultrason.

Cette contribution à l'étude phénotypique et la mise en évidence d'activités enzymatiques extracellulaires de souches microbiennes isolées à partir de poudre de lait a donné des résultats très encourageants

Nous comptons a complété notre étude par une analyse polyphasique plus approfondie en introduisant de la chimiotaxonomie couplée à l'approche moléculaire.(identifier complètement les 31 souches sélectionnées par études physiologiques complète (cinétique), et phylogénétiques et moléculaire) ,Nous comptons aussi réalisé des traitements thermique en combinaison avec d'ultrason a d'autres températures plus important.

## Références bibliographiques

## Références bibliographiques :

- **Ananta. E., Voigt, D., Zenker, M., Heinz, V., & Knorr, D. (2005).** Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 271e278.
- **ARIE. F, SriKumalaningsh et Ariesta .W (2012)** Process engineering of drying milk powder with Foam mat drying method. *Journal of basic and applied scientific research* 2(4) :3588-3592 .
- **Ashokkumar. M., Sunartio, Kentish . D , Mawson .S, Simon.R, Vilku .L et al. (2008).** Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 155e160
- **AZZA. M. M. Deeb. Al Hawary. I. I , I. Aman et Doaa M H Shahine (2010)** Bacteriological investigation on milk powder in the Egyptian market with emphasis on its safety. *Journal Global Veterinaria* .4(5) :424-433.
- **Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011).** Ultrasound applications in food processing. In H. Feng, G. V. Barbosa-Cánovas, & J. Weiss (Eds.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 64e105). New York: Springer.
- **BURGESS, S., Lindsay ,D. et Flint, S (2010).** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *Revue. International journal of food microbiology* 144, 215-225
- **Burgess, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M., & Flint, S. H. (2009).** The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1012e1018.
- **Cameron M. , L.D. McMaster, T.J. Britz, (2008)** Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry* 15 960–964.
- **Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V., Benedito, J., & Mulet, A. (2012).** Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 200e207
- **CASTRO-MOREL M , HARPER WJ. (2003).** Effect of retentate heat treatment and spray dryer inlet temperature on the properties of milk protein concentrates (MPC'S) *Milchwissenschaft* 58 :13-15.

- **Cazemier , A ., Wagenaars ,S., .ter streeg , P .,2001** . Effect of sporulation and recovery medium on the heatresistance and amount of injury of spores fromspoilagebacilli. *Journal of appliedMicrobiology* 90,761-770
- **CHEN Y-G,CUIX-L. ,Zhang Y-Q.,LiW-J.,WangY-X.,Xu l-H ,Peng Q., Wen M-L.,dairy Production and tradedevelopments.(2012)**
- **ChematF, H. Zill e, M.K. Khan,(2011)** Applications of ultrasound in foodtechnology: Processing, preservation and extraction, *UltrasonicsSonochemistry* 18 -813–835
- **Chemat, F., &Hoarau, N. (2004).**Hazardanalysis and critical control point (HACCP) for an ultrasoundfoodprocessingoperation. *UltrasonicsSonochemistry*, 11(3e4), 257e260.
- **Claus D. and Berkeley C. W. (1986).** The Genus*Bacillus*. In: Sneath PHA ed. *Bergey'sManual of SystematicBacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.,1105-1139.
- **DufrenneJ . ,Bijaward M .,Te Giffel M ., et Nnothermans R (1995).**Characterstics os somepsychrotrophicB .cereus in int.*J.OfMicrobiology*. Vol.27,pp175-183.
- **Gaillard, S., Leguérinel, I., Mafart, P., 1998a.** Model for combinede\_ects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Food Science* 63 (5), 887\_889.
- **Gaillard, S., Leguérinel, I., Mafart, P., 1998b.** Modellingcombinede\_ect of the temperature and pH on the heatresistance of spores of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* 15, 625\_630.
- **Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., &Nindo, C. (2013).**Effect of ultrasoundfrequency on antioxidantactivity, total phenolic and anthocyanin content of redraspberrypuree. *UltrasonicsSonochemistry*, 20(5), 1316e1323
- **Gogate, P. R., &Kabadi, A. M. (2009).** A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 60e72
- **Gombas ,D. , 1983.** Bacterial spore resistance to heat .*Food TechnologyNov* ,105-110
- **Janstova .B,J .Lukasova (2001).**heatresistance of bacilluspp ,spores isolatedfromcrow'smilk and from environnement (70).pp.179-184

- **Joyce, E., Phull, S. S., Lorimer, J. P., & Mason, T. J. (2003).** The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(6), 315e318.
- **R. Kadkhodae, (2008)** M.J. Povey, Ultrasonic inactivation of *Bacillus alpha-amylase*. I. effect of gas content and emitting face of probe, *Ultrasonics Sonochemistry* 15-133–142.
- **KAREN Smith .(2008)** . *Dried Dairy Ingredients*. P60.
- **Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011).** The physical and chemical effects of ultrasound. In H. Feng, G. V. Barbosa-Cánovas, & J. Weiss (Eds.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 1e12). New York: Springer.
- **Koda, S., Miyamoto, M., Toma, M., Matsuoka, T., & Maebayashi, M. (2009).** Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500 kHz. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 655e659.
- **Kim, H. J., Feng, H., Kushad, M. M., & Fan, X. (2006).** Effects of ultrasound, irradiation and acid electrolyzed water on germination of alfalfa and broccoli seeds and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*, 71(6), m168em173.
- **Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., & Lee, D. U. (2004).** Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15(5), 261e266.
- **Leadley, C. E., & Williams, A. (2006).** Pulsed electric field processing, power ultrasound and other emerging technologies. In James G. Brennan (Ed.), *Food processing handbook*. Weinheim: Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA.
- **Leclerc H. Gaillard J.L et Simonet M. ,(1995)** . *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien* .ED Doin 1995.p335.Paris.
- **Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H., & Martin, S. E. (2009).** Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*, 93, 354e364.
- **Lewis, M. J., & Deeth, H. C. (2009).** Heat treatment of milk. In A. Y. Tamime (Ed.), *Milk processing and quality management* (pp. 168e204). Wiley-Blackwell

- **Malek F et al .,(2013).**identification and géneticdiversity of bacilluscereustrainsisolated a pasteurizedmilkprocessing in algéria.Revue.Official journal of the institute national.93 :73-82.
- **Mason, T., Riera, E., Vercet, A., & Lopez-Buesa, P. (2005).** Application of ultrasound. In D. W. Sun (Ed.), *Emerging technologies for foodprocessing* (pp. 323e350). California: Elsevier AcademicPress
- **Montville, T. J., R. Dengrove, D. De Siano, M. Bonnet, and D. W. Schaffner.(2005).** Thermal resistance of spores from virulent strains of *Bacillus anthracis* and potentialsurrogates. *J. Food Prot.* 68:2362-2366
- **. MasonT.J,(1990).**Sonochemistry: The Uses of Ultrasound in Chemistry, The Royal Society of ChemistryPress, Cambridge,
- **MasonT.J. , E. Riera, A. Vercet, P. Lopez-Buesa,** Application of ultrasound, in: D.W. Sun (Ed.), *Food SciTechnol-Int*, Elsevier AcademicPress, California, 2005, pp. 323–351.
- **Mazas, M., Gonzalez, I., Lopez, M., Gonzalez, J., Sarmiento, R., 1995.** E\_ects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Science and Technology.* 30, 71\_78.
- **Meyer M .,Gouzdlez ,Lopez I.,Gonzoles , Samanta RM., (1995).** Effects of sporulation média ans strain of thermal resistance of bacilluscereus spore .*Int.j .Food.sci.tech.*30 pp71-78
- **MonsenT, E. Lovgren, M. Widerstrom, L. Wallinder, (2009)**In vitro effect ofultrasound on bacteria and suggestedprotocol for sonication and diagnosis ofprosthetic infections, *Journal of ClinicalMicrobiology* 47 (2009) 2496–2501.
- **Murphy, P.M., Lynch, D., and Kelly, P.M. (1999)**( Growth of thermophilic spore formingbacilli in milkduring the manufacture of lowheatpowders. *Int. J. DairyTechnol.* ; 52: 45–50
- **Novak, J. S., J. Call, P. Tomasula, and J. B. Luchansky. 2005.** An assessment of pasteurizationtreatment of water, media, and milkwith respect to *Bacillus* spores. *J. Food Prot.* 68:751-75
- **Pagán, R., Mañas, P., Álvarez, I., &Condón, S. (1999).** Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonicwavesunder pressure atsublethal (manosonication) and

lethal (manothermosonication) temperatures. *Food Microbiology*, 16(2), 139e148.

- **Palop, A., Manas, P., Condon, S., (1999).** Sporulation temperature and heatresistance of *Bacillus* spores : areview. *Journal of Food Safety* 19, 57\_72.
- **P. Piyasena, E. Mohareb, R.C. McKellar,(2003)** Inactivation of microbes usingultrasound: areview, *International Journal of Food Microbiology* 87 - 207–216.
- **Rastogi, N. (2011).**Opportunities and challenges in application of ultrasound in foodprocessing. *CriticalReviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 705e722
- **M. RITZ et M. FEDERIGHI,B. PETIT,( 2002)** ° Nouveaux traitements physiques de conservation des aliments : Revue.
- **RONSON, Ronimus,LynneE,Parker, Nicola Turner, SushmaPoudel,Andreas,Ruckert et Hugh W . Morgan.(2002).**A RAPD-basedcomparison of thermophilic*Bacillus*frommilkpowders,internation journal of food Microbiologie.96 :263-272.
- **RuckertS ,Hugh et W.Morgan.(2004).**A RAPD-basedsurvery of thermophilic*Bacillus* in milkpowdersfromdifferentcountries.international journal of food Microbiology.96 :263-272
- **SALAHUDIN Ahmed et Nuralanwar M (2006)**Microbialcounts of driedpowder Milk Available in local Markets of bangladesh .*journal Microbiol* .Vol 23,N°2,pp162-164
- **Salleh-Mack, S. Z., & Roberts, J. S. (2007).** The effects of temperature, soluble solids, organicacids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *UltrasonicsSonochemistry*, 14(3), 323e329.
- **Sanz, P., Palacios, P., Lopez, P., &Ordonez, J. A. (1985).**Effect of ultrasonicwaves on the heatresistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. In D. J. E. Dring, & G.W. Gould (Eds.), *Fundamental and applied aspects of bacterial spores* (pp. 251<sup>e</sup> 259). New York: AcademicPress.
- **Scherba, G., Weigel, R. M., & O'Brien, J. R. (1991).** Quantitative assessment of the germicidalefficiency of ultrasonicenergy. *AppliedEnvironmentalMicrobiology*., 57(1), 2079e2084.

- **Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J., and Bremer, P.J. (2008).** Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 74:731–737
- **SomNathKhanal a,1, Sanjeev Anand a,\* , KasiviswanathanMuthukumarappan b, Megan Huegli.(2014).** Inactivation of thermophilic aerobic spore formers in milk by ultrasonication
- **SOY b (2011).** Milk powder production  
.http://www.docstoc.com/docs/70425205/MilkPowder-Production
- **Suslick, K. S., Didenko, Y., Fang, M. M., Hyeon, T., Kolbeck, K. J., McNamara, W. B., III et al. (1999).** Acoustic cavitation and its chemical consequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 357(1751), 335e353
- **Ulusoy, B. H., Colak, H., & Hampikyan, H. (2007).** The use of ultrasonic waves in Food Technology. *Research Journal of Biological Sciences*, 2(4), 491e497.
- **Woese C. R. (1987).** Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221- 271.
- **Xu, S., T. P. Labuza, and F. Diez-Gonzalez. (2006).** Thermal inactivation of *Bacillus anthracis* spores in cow's milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4479-4483.
- **Yuan, D.D., Liu, G.C., Ren, D.Y., 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 Contr.* ; 25: 752–757

## Préparation des milieux de cultures utilisés

### Milieux gélosés

Gélose nutritive.....	
Peptone.....	15
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure .....	0.2
Chlorure de sodium.....	0.5
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

Ph = 6.8-7.4

Gélose Muller-Hinton.....	
Infusion de viande de boeuf.....	300g
Hydrolysate de caséine.....	17.5
Amidon.....	01.5
Agar.....	17g.
Eau distillée.....	1000ml

Ph =:7.4

Gélose a amidon.....	
Gélose nutritive.....	100ml
Amidon .....	0.1g

Gélose au lait .....	
Lait écrémé poudre.....	0.5
Agar.....	0.1g
Eau distillée .....	100 lm
Emulsion de jaune d'œuf.....	

Dans un flacon stérile ,récupérez le jaune d'œuf –après avoir flambée la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes- ensuite ajoutez 4 fois le volume en eaudistilléestérile, mélanger rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C ensuite au réfrigérateur pendant 24 heures .....

## Résumé

La présence des spores bactériennes pose de sérieux problèmes dans les industries agro-alimentaires (notamment les industries laitières), car non seulement elles sont résistantes à la chaleur mais elles ont la capacité d'altérations dues à leur potentiel enzymatique. En Algérie, l'importation de lait en poudre a augmenté ces derniers temps à cause de la croissance démographique et l'insuffisance de la production nationale, cette importation est destinée surtout à la production du lait pasteurisé. En effet, les poudres du lait étant des produits déshydratés, ne sont pas supposées avoir les conditions favorables pour la croissance des bactéries, mais certaines spores bactériennes peuvent survivre même après un chauffage très important due à leur thermorésistance. Dans ce cadre nous avons étudié l'effet des ultrasons (un traitement non thermique) pour tester son effet en combinaison avec le traitement thermique pour inactiver les spores bactériennes isolées de la poudre de lait. Pour cela, 3 échantillons de quelque poudre de lait importés et commercialisée en Algérie de différentes origines ont été utilisés pour lesquels on a caractérisé la flore microbiennes. L'étude phénotypique a révélé 15 isolats dont (34%) de *Bacillus sphaericus/fusiformis* / *badiusuivi* par *Brevibacillus choshinensis/centrosporus/brevis* (27%), *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, (14%), *Brevibacillus laterosporus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus* (7%). La spore sélectionnée était caractérisée par la valeur  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  de l'ordre de 3,20 minute après un chauffage dans du bouillon Muller-Hinton et 2,06 minutes lorsque le traitement thermique était suivi par ultrason, ce qui montre l'amélioration de l'efficacité du traitement thermique lorsqu'il est combiné avec les ultrasons.

**Mots clés :** Bactéries sporulés, poudre de lait, traitement thermique, ultrason, valeur D .

## Abstract

The presence of spores poses serious problems in the food industry (including dairy industries), not only because they are resistant to heat, but also because they have the ability of deterioration due to their enzyme potential. In Algeria, the importation of milk powders has increased in the last decades due to population growth and inadequate national production, the import is intended primarily for the production of pasteurized milk. Indeed, the milk powder being dried products are not intended to be favorable for the growth of bacteria but certain bacterial spores can survive even after a very significant heating due to their heat resistance. In this context we tried to study the effect of ultrasound (a non-thermal treatment) to test its effect in combination with heat treatment to inactivate bacterial spores isolated from milk powder. For this purpose, three samples of milk powder imported and marketed in Algeria from different sources were used for which the microbial flora was characterized. Phenotypic study found 15 isolates (34%) of *Bacillus sphaericus / fusiformis / badiusuivi* by *Brevibacillus choshinensis / centrosporus / brevis* (27%), *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (14%), *laterosporus Brevibacillus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus* (7%). The selected spore was characterized by  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  value of approximately 3.20 minutes after heating in Muller-Hinton broth and 2.06 minutes when the heat treatment was followed by ultrasound, which shows an improvement in the effectiveness of heat treatment when combined with ultrasound.

**Keywords:** Bacterial Spore, milk powder, heat treatment, ultrasound, value D.

## ملخص

إن وجود أبواغ الجراثيم يطرح مشاكل خطيرة في صناعة الأغذية (بما في ذلك صناعات الألبان)، ليس فقط لأنها مقاومة للحرارة، ولكن أيضا لأن لديها القدرة على إفساد الأطعمة بسبب فعالية أنزيماتها. في الجزائر، زاد استيراد مسحوق الحليب في الآونة الأخيرة بسبب النمو السكاني وعدم كفاية الإنتاج المحلي، ويهدف الاستيراد في المقام الأول لإنتاج الحليب المبستر. ليس من المفروض أن يكون مسحوق الحليب المجفف مواتيا لنمو البكتيريا ولكن بعض الأبواغ البكتيرية يمكنها البقاء على قيد الحياة حتى بعد التسخين الشديد بسبب قدرتها على مقاومة الحرارة. في هذا السياق حاولنا دراسة تأثير الموجات فوق الصوتية (كعلاج غير حراري) لاختبار تأثيرها مع المعالجة الحرارية لإبطال نشاط الأبواغ البكتيرية المعزولة من مسحوق الحليب. لهذا الغرض، استُخدمت ثلاث عينات من بعض منتجات مسحوق الحليب المستوردة والمسوقة في الجزائر من بلدان مختلفة. وجدت الدراسة المظهرية 15 سلالات (34%) من *Bacillus sphaericus Bacillus sphaericus / fusiformis / badiusuivi Brevibacillus choshinensis / centrosporus / brevis* (27%)، *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (14%)، *laterosporus Brevibacillus*، *Geobacillus stearothermophilus*، *Bacillus lentus*، *Bacillus firmus* (7%).

تم تسجيل قيمة  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  للسلالة المختارة حوالي 3.20 دقيقة بعد التسخين في الوسط مولر-هينتون و 2.06 دقيقة عندما أعقب علاج الحرارة الموجات فوق الصوتية، مما يدل على تحسن فعالية المعالجة الحرارية عند دمجها مع الموجات فوق الصوتية .

الكلمات المفتاحية: الأبواغ البكتيرية ، مسحوق الحليب، المعالجة الحرارية، الموجات فوق الصوتية، قيمة D

