

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الجبلاي بونعامة خميس مليانة
Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention de diplôme de **Master 02** en Microbiologie Appliquée

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie et des sciences de la Terre

Filière : Sciences biologiques

Spécialité: Microbiologie Appliquée

L'analyse microbiologique de la poudre du lait utilisée en industrie laitière (Usine d'Arib)

Présenté par :

- TIMTAOUCINE Mouna
- BOUCHARREB Fatiha
- KELOUAZE Yassamina

Devant le jury:

Mr ACHEK R	MCA	Président	(U.D.BKhemisMiliana)
Mme DIDOUH N	MCA	Promotrice	(U.D.BKhemisMiliana)
Mme ZAOUADI N	MCB	Examinatrice	(U.D.BKhemisMiliana)

Année universitaire :2021/2022



REMERCIEMENT

*Nous remercions tout d'abord ALLAH le tout puissant
Et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience
d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Mme
DIDOUH N, notre encadreur pour avoir dirigé ce travail,
pour son sérieux et ses efforts afin de nous aider, de nous
conseiller et de nous orienter. Nous lui exprimons notre
profond respect et nos chaleureux remerciements.*

*Nous tenons à remercier **Mr ACHEK** pour l'honneur qu'il
nous a fait de présider ce travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mme**
ZAOUADI qui nous a fait l'honneur de bien vouloir
examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont à tous les enseignant(e)s qui nous
ont formés durant les cinq ans.*



Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance...

Aussi, c'est tout simplement que Je dédie ce mémoire :

À Ma tendre Mère Meriem : Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

À Mon très cher Père Ahmed : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

À mes chers frères Siddiq, Oussama, Ayoub et Hassan, et ma chère sœur Wafa.

Sans oublier toutes mes chères cousines et mes chères amies sans exception.

Et à toutes les familles de TIMTAOUCINE et HACHEMI

Et enfin à tous mes collègues de la promotion MICROBIOLOGIE APPLIQUEE 2021/2022 pour tous les moments que nous avons partagés ensemble.

TIMTAOUCINE Mouna



Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance...

Aussi, c'est tout simplement que Je dédie ce mémoire :

À Ma tendre Mère Fatma : Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

À Mon très cher Père Abdelkader : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

À celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de projet : à mes chers frères et mes chères sœurs et mes chères nièces et mes neveux.

Sans oublier toutes mes chères amies sans exception.

À toute la famille BOUCHAREB

Et enfin à tous mes collègues de la promotion MICROBIOLOGIE APPLIQUEE 2021/2022 pour tous les moments que nous avons partagés ensemble.

BOUCHAREB Fatiha



Dédicaces

Les mots ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance...

Aussi, c'est tout simplement que Je dédie ce mémoire :

À Ma tendre Mère ARBIA : Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

À Mon très cher Père MOUSSA : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

À celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de projet : à mes chers frères et mes chères sœurs et mes chères nièces et mes neveux.

Sans oublier toutes mes chères amies sans exception.

À toute la famille KELOUAZE

*Et enfin à tous mes collègues de la promotion MICROBIOLOGIE
APPLIQUEE 2021/2022.*

KELOUAZE Yassamina

الملخص

يعتبر مسحوق الحليب بشكل عام منتجًا ذا جودة ميكروبيولوجية جيدة. ومع ذلك ، يمكن أن تساهم عدة عوامل في تعديل خواصه الفيزيائية والكيميائية التي تؤثر على جودته الميكروبيولوجية ، مما يقلل من مدة صلاحيته وبالتالي من قيمته التجارية. تهدف هذه الدراسة إلى عزل سلالات العصيات المخية في اللبن المجفف المستخدم في ملبنة عريب بولاية عين الدفلى. العصيات المخية هي بكتيريا مكونة للجراثيم معروفة بأنها تشكل مخاطر صحية. هذه البكتيريا لديها القدرة على الالتصاق وتشكيل الأغشية الحيوية على أسطح معدات تجهيز الأغذية. مقاومته للبيئات الكيميائية والحرارية المعاكسة (المنظفات ، المعالجة بالبسترة ، التعقيم) وقدرته على تصنيع الإنزيمات المسؤولة عن تلف الحليب.

الكلمات المفتاحية: مسحوق الحليب ، التحليل الميكروبيولوجي ، العصيات المخية ، الخواص الفيزيائية والكيميائية ، المعالجة بالبسترة ، البكتيريا المكونة للجراثيم.

Résumé

Le lait en poudre est généralement considéré comme un produit de bonne qualité microbiologique. Cependant, plusieurs facteurs peuvent contribuer à la modification de ses propriétés physiques et chimiques qui influent sur sa qualité microbiologique, qui réduit sa durée de conservation et donc sa valeur commerciale. Cette étude a pour objectif d'isoler les souches de *Bacillus cereus* dans la poudre du lait utilisé au niveau de l'usine Arib de la wilaya d'Ain Defla. *Bacillus cereus* est une bactérie sporulée reconnue pour présenter un risque sanitaire. Cette bactérie a la capacité d'adhérer et de former des biofilms sur les surfaces des équipements agroalimentaires. Sa résistance aux environnements chimiques et thermiques défavorables (détergents, traitement de pasteurisation, stérilisation) et son pouvoir de synthétiser des enzymes qui sont responsables de la détérioration du lait.

Mots clés : Lait en poudre, analyse microbiologique, *Bacillus cereus*, propriétés physiques et chimiques, traitement de pasteurisation, bactéries sporulées.

ABSTRACT

Milk powder is generally considered to be a product of good microbiological quality. However, several factors can contribute to the modification of its physical and chemical properties that affect its microbiological quality, which reduces its shelf life and therefore its commercial value. This study aims to isolate the strains of *Bacillus cereus* in the milk powder used at the Arib plant in the wilaya of Ain Defla. *Bacillus cereus* is a spore-forming bacterium known to present a health risk. This bacterium has the ability to adhere and form biofilms on the surfaces of food processing equipment. Its resistance to adverse chemical and thermal environments (detergents, pasteurization treatment, and sterilization) and its ability to synthesize enzymes those are responsible for the deterioration of milk.

Key words: Powdered milk, microbiological analysis, *Bacillus cereus*, physical and chemical properties, pasteurization treatment, spore forming bacteria

Table de matières

Résumé	
Liste d'abréviation	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
Partie 01 : Synthèse Bibliographique	
I. Introduction.....	02
I.1. Le lait en poudre	02
I.2. Les différents types de la poudre du lait	03
I.2.1. Lait entier en poudre.....	03
I.2.2. Lait écrémé en poudre	04
I.2.3. Lait concentré de protéine	04
I.2.4. Concentré de protéines et de lactosérum.....	04
I.2. 5. Babeurre de poudre	04
I.3. Traitement de la poudre de lait	05
I.3.1. Séchage sur cylindres	05
I.3.2. Atomisation.....	05
I.3.3. Lyophilisation	05
I.4. Microflore du lait en poudre.....	06
I.5. Les bactéries contaminants le lait en poudre.....	07
I.5.1. Genre <i>Bacillus</i>	07

I.5.1.1. Description	07
I.5.1.2. <i>Bacillus cereus</i>	08
I.5.1.3. La pathogénicité de <i>Bacillus cereus</i>	09
I.5.2. <i>Bacillus Thuringiensis</i>	09
I.5.3. <i>Bacillus Lickeniformis</i>	10
I.6. La contamination de lait en poudre par d'autres <i>Bacillus spp</i>	11
I.7. <i>Staphylococcus spp</i>	13
1.8. Salmonelle	13
I.9. Consommation de lait en poudre en Algérie.....	14
 Partie 02 : Matériel et méthodes	
II.1. Prélèvement	15
II.2. Préparation des dilutions	15
II.3. Ensemencement des boites de pétri	16
II.4. Répartition de la gélose dans les boites de pétri.	16
II.5. Incubation des boites de pétri	16
II.6. Numération des colonies	16
II.7. Expression des résultats	17
 Chapitre II : Discussion des travaux antérieurs	18-28
 Cocclusion	29-30
 Références bibliographiques	31-41

Liste d'abréviations

% : Pour cent

C° : Degré celsius

A. flavithermus : *Anoxybacillus flavithermus*

ADH : Arginine d'hydrolase

API : Appareils et Procédés d'Identification

API 20E : Système standardisé pour l'identification des enterobacteriaceae

B. amyloliquefacins : *Bacillus amyloliquefaciens*

B. Anthracis : *Bacillus Anthracis*

B. badius : *Bacillus badius*

B. circans : *Bacillus circans*

B. coagulans : *Bacillus coagulans*

B. licheniformis : *Bacillus licheniformis*

B. mojavensis : *Bacillus majayensis*

B. mycoides : *Bacillus mycoides*

B. pumilus : *Bacillus pumilus*

B. safensis : *Bacillus safensis*

B. sporothermodurans : *Bacillus sporothermodurans*

B. weihenstephanensis : *Bacillus weihenstephanensis*

B.cereus: *Bacillus cereus*

B.subti *Bacillus subtilis*

CM : Centimètre

CPM : Coût pour mille

CytK: Cytotoxine K

E. coli: *Escherichia coli*

EN: Norme européenne

FIL: Federation of International Lacrosse

g: gramme

G. toebii: *Geobacillus toebii*

H: Heure

H₂S: Sulfure d'hydrogène

Hbl: Hémolysine BL

ICMF : Commission internationale pour les spécifications microbiologiques des aliments

ISO : Organisation internationale de normalisation

LDC : Lysine décarboxylase

Log : logarithme

ml : Millilitre

NF : Norme française

Nhe : Entérotoxine non

hémolytique

ODC : Ornithine

décarboxylase

PCA : Plate count agar

PH : Potentiel hydrogène

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SE : Staphylococcus entérotoxine

SFB : Bouillon à la sélénite cystéine de fer

SP : Sous espèce (subspecies)

SPP : *Species plures*

TSB: trypticase soja bouillon

UFC : Unité formant colonie

UHT : Ultra-haute température

WPC : Whey protein concentrate

Liste des tableaux

Tableau n° 01 : Composition de lait cru.

Tableau n° 02 : Résumé de quelques bactéries associées à la poudre de lait.

Tableau n°03 : Charge bactérienne des différents échantillons.

Tableau n°04 : Nombre et origine des différents échantillons de lait en poudre.

Tableau n°05 : Profil RAPD des types de spores mésophiles isolés de plusieurs poudres de lait commercialisées en Algérie.

Liste des figures

Figure n °01 : Diagramme de fabrication de la poudre du lait.

An orange scroll banner with a gradient from light to dark orange, featuring a shadow and a 3D effect. The banner is positioned horizontally in the lower middle of the page. The word "Introduction" is centered on the banner in a black serif font.

Introduction

Introduction

L'industrie alimentaire a connu une évolution importante en faveur des consommateurs et est constamment à la recherche de produits de qualité qui répondent à leurs besoins nutritionnels de base (**Amoït *et al.*, 2002**).

La poudre de lait est actuellement le produit de choix dans l'industrie. La consommation de lait en Algérie n'a cessé de croître depuis l'indépendance, la croissance démographique et l'élévation du niveau de vie ont créé une forte demande pour ce produit, qui dépasse désormais 7,07 tonnes. Les préparations pour nourrissons (**Astier-Théfenne *et al.*, 2014**).

L'importation de la poudre de lait n'est pas sans risques. En effet le lait sec n'est pas stérile et peut contenir des germes plus ou moins dangereuses pour le consommateur d'où la nécessité de contrôles répétés pour s'assurer de l'innocuité et de la qualité nutritionnelle de cette denrée de première nécessité. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail qui se divise en trois parties : Une partie bibliographique, et une partie expérimentale qui a pour objectif : l'évaluation de la qualité microbiologique de la poudre du lait.

1. Une mise au point bibliographique traitant des connaissances sur la poudre de lait et les microorganismes qui contaminent ce produit qui est très consommé en Algérie.

2. Une partie expérimentale comprenant : L'analyse microbiologique de la poudre de lait qui est utilisé au niveau de l'usine Arib de la wilaya de Ain Defla.

3. Une troisième partie rend compte une discussion des résultats antérieurs. Enfin, nous présenterons les principales conclusions de ce travail et les ouvertures vers de nouvelles voies de recherche.

A horizontal orange banner with rounded corners and a slight 3D effect, resembling a scroll. The text is centered on the banner.

Synthèse Bibliographique

I. Introduction

Le lait cru est le lait sécrété par les glandes mammaires du bétail. Le lait cru est une matière première alimentaire précieuse qui peut être utilisée pour la fabrication de nombreux produits alimentaires, notamment le fromage, le yaourt, le beurre, le lait en poudre et les produits à base de lactosérum (**Chandan, 2011 ; Spreer, 2017**).

Le tableau ci-dessous représente la composition primaire de lait cru (voir tableau 01)

Tableau n° 01 : Composition de lait cru (**Chandan, 2011 ; Spreer, 2017**).

Composants	Teneur (%)
L'eau	87,4
Lactose	4,9
Matières grasses	3,6
Protéines	3,4
Minéraux	0,7

Avant que le lait cru puisse être transformé, sa qualité est vérifiée afin de répondre aux normes de l'entreprise et aux normes réglementaires. Le lait cru doit répondre à la norme de teneur en matières grasses et en protéines avec une faible charge microbienne et de cellules somatiques, un point de congélation bas ainsi que de faibles quantités d'inhibiteurs tels que les antibiotiques, tels que la pénicilline, un antibiotique (**Murphy et al., 2016 ; Spreer, 2017**).

I.1. Le lait en poudre

Le lait en poudre est fabriqué en éliminant l'eau du lait liquide. L'élimination de l'eau est nécessaire pour réduire l'activité de l'eau et empêcher le développement des micro-organismes. Le lait en poudre a une durée de conservation plus longue que le lait cru. La poudre de lait écrémé a une durée de conservation maximale d'environ 3 ans, tandis que la poudre de lait entier a une durée de conservation maximale d'environ 6 mois (**Falegan et Oluwaniyi, 2015**).

De nos jours, on accorde une grande importance à la valorisation du lait en poudre. Les principaux paramètres de qualité du lait en poudre sont la qualité microbiologique et les caractéristiques sensorielles, en plus des propriétés physiques et chimiques, qui concernent

Principalement la teneur en humidité, en matières grasses, en protéines totales, en azote non protéique, en lactose, en acidité titrable, en cendres et en autres nutriments tels que le calcium (**Laszlo, 2007**).

Les microorganismes thermophiles ont la capacité de produire des spores extrêmement résistantes à la chaleur et peuvent avoir des conséquences économiques importantes (**Anup et Rupesh, 2012**).

Les microorganismes pathogènes les plus préoccupants dans le lait en poudre sont *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella*. Ces microorganismes peuvent rester viables dans la poudre de lait pendant une longue période, et reprendre leur croissance lorsque la poudre est reconstituée et stockée à une température favorable (**Hafsa et al., 2013**).

Le lait peut être contaminé par des vaches infectées par la tuberculose, la brucellose et la mastite, ainsi que par des porteurs humains atteints de fièvre typhoïde, de diphtérie, de dysenterie et de scarlatine. Il est mentionné que les bovins laitiers et l'environnement de leur exploitation contiennent des *Listeria*, des *Salmonella* et des *Escherichia coli*. La consommation de lait cru ou insuffisamment pasteurisé est également associée à des *E. coli*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* produisant des toxines (**Ahmed et al., 2014**). *Staphylococcus aureus* peut également être présent dans les mamelles et les trayons des vaches et, par conséquent, contaminer le lait (**Pal, 2001**).

I.2. Les différents types de la poudre du lait

Il existe une large gamme de poudre de laits disponibles sur le marché, avec différents niveaux de teneur en protéines, en matières grasses et en eau.

I.2.1. Lait entier en poudre

La poudre de lait entier est un produit laitier de grande valeur produit par le traitement et le séchage par pulvérisation du lait entier standardisé, obtenu par traitement et séchage par pulvérisation de lait entier normalisé. Bien que le lait entier en poudre conserve la composition en matières grasses du lait entier à partir duquel il est produit, il subit généralement le même processus de séparation centrifuge que le lait écrémé pour obtenir de l'écraimée de la crème, qui sont ensuite recombinaés afin de normaliser la teneur en matières grasses du lait entier (**Kelly et al., 2002**).

I.2.2. Lait écrémé en poudre

C'est un type de lait avec une teneur en matières grasses de 1,5% et moins de 5% d'eau. Le lait écrémé en poudre est classé pour être utilisés comme ingrédients en fonction du traitement thermique utilisé dans leur fabrication. Il existe trois classifications principales à haute température (le moins soluble), à chaleur moyenne et à basse température (le plus soluble).

I.2.3. Lait concentré de protéine

Le Lait concentré de protéine contient à la fois de la caséine et des protéines de lactosérum (Ann Augustin *et al.*, 2011).

I.2.4. Concentré de protéines et de lactosérum

Le concentré de protéines et de lactosérum est un sous-produit de la fabrication du fromage après la séparation de la caséine et de la graisse pendant la coagulation du lait (Spreer, 2017). Il contient généralement 65 à 80 % p/p de protéines, 4,0 à 21,0 % p/p de lactose et 3,0 à 5,0 % p/p de minéraux (Jelen, 2009).

Il existe généralement deux types de lactosérum : le lactosérum acide et le lactosérum doux. Le lactosérum doux est produit lors de la fabrication du fromage, tandis que le lactosérum acide est produit à partir de la déstabilisation du colloïde de caséine du lait par acidification du lait à un pH inférieur à 5,0 (Jelen, 2009).

Les deux lactosérums ont des quantités similaires de protéines de lactosérum (environ 8 g/L) et de lactose (environ 46 g/L), mais ils sont très différents en ce qui concerne les quantités de calcium (0,4 à 0,6 g/L pour le lactosérum doux et 1,2 à 1,6 g/L pour le lactosérum acide) et d'acide lactique (2,0 g/L pour le lactosérum doux et 6,4 g/L pour le lactosérum acide) (Jelen, 2009)

En fonction du pourcentage de protéines, il existe plusieurs types de WPC disponibles dans le commerce : WPC 35, 55, 65 et 80. Le WPC 35 est généralement utilisé pour remplacer la poudre de lait écrémé (Huffman *et al.*, 2011).

I.2.5. Babeurre de poudre

Il est obtenu en éliminant l'eau du babeurre liquide dérivé du barattage de la crème en beurre et pasteurisé avant la condensation. Il est couramment utilisé dans la boulangerie, la confiserie, les produits laitiers, les mélanges préparés, les sauces et les soupes.

I.3. Traitement de la poudre du lait

I.3.1. Séchage sur cylindres

Dans le séchage sur cylindre, le lait est distribué dans un tambour rotatif chauffé à la vapeur. (Abdenouri *et al.*, 2008). 143 -149 ° C (Penda et Sow, 2002).

I.3.2. Atomisation

Procédé de pulvérisation ou "spray process" ou procédé par brouillard (Penda et Sow, 2002). S'est positionné pour la transformation industrielle des produits laitiers traditionnels (Schuck *et al.*, 2004). Le séchage par atomisation est un procédé de déshydratation rapide. La poudre de lait de qualité supérieure (Yrjö et Roos, 2002).

I.3.3. Lyophilisation

Parmi les différentes méthodes de séchage par atomisation, la fluidisation et la lyophilisation. La lyophilisation permet une déshydratation complète pour une très longue durée de conservation (Penda et Sow, 2002). Le principe de base est que lorsque l'eau est chauffée à l'état solide à très basse pression, l'eau devient sublime, c'est-à-dire une transition directe d'un état solide à un état gazeux (Culibaly *et al.*, 2011).

La figure ci-dessous représente le diagramme de fabrication de la poudre du lait (voir figure 01).

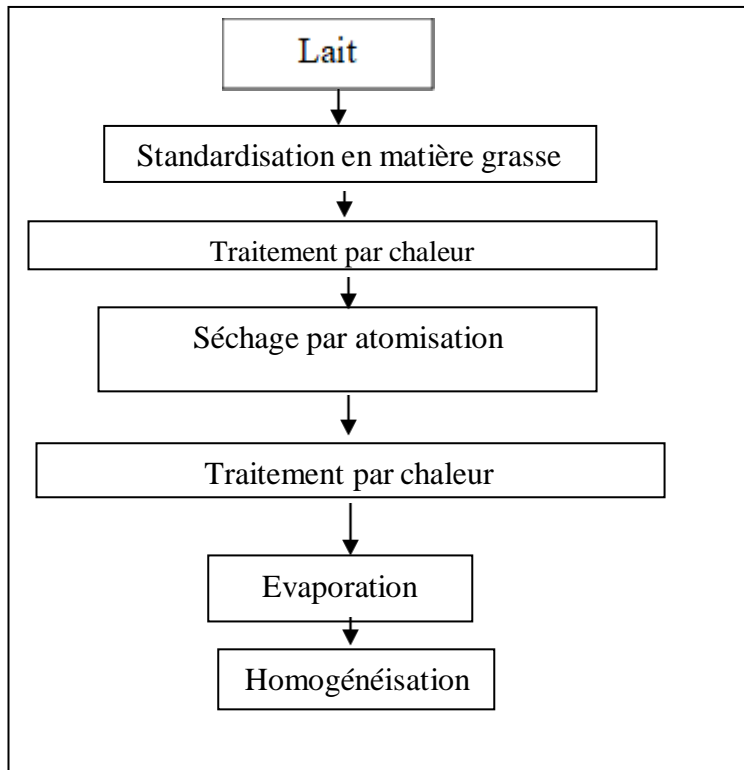


Figure n°01 : Diagramme de fabrication de la poudre du lait (Toure, 2001)

I.4. Microflore du lait en poudre

Les bactéries dans la poudre de lait au cours de la fabrication de la poudre de lait, l'eau contenue dans le lait cru est évaporée. Le processus d'évaporation implique un traitement thermique, ce qui entraîne une réduction du nombre de psychotrobes et autres mésophiles. Cependant, cette condition est toujours favorable à la croissance des bactéries sporulées et des thermophiles. Ceci est évident dans diverses études qui ont été menées sur les bactéries dans la poudre de lait (Gopal *et al.*, 2015). Une étude en 2016, a révélé que *B.licheniformis* était présente à la fois dans le lait cru et dans la poudre de lait (Vanderkelen *et al.*, 2016).

La présence de *B. licheniformis* sur les surfaces de traitement de la poudre de lait a été attribuée à sa capacité à former des biofilms (Zain, 2018). *B. licheniformis* peut contaminer lors des étapes de fabrication ultérieures les équipements tels que les séparateurs de crème, les échangeurs de chaleur, les préchauffeurs et les évaporateurs dans les usines de fabrication de poudre de lait (Ronimus *et al.*, 2003).

Ce tableau présente quelques Bactéries dans la poudre du lait

Tableau n°02 : Résumé de quelques bactéries associées à la poudre de lait. (Indra Pramularsih ,2020)

Nom des bactéries	Type de la poudre du lait	Température de croissance			Références
		min	opt	max	
<i>B.licheniformis</i>	Lait écrémé en poudre + Concentré de protéine de lactosérum + poudre de lait entier + poudre de formule pour nourrisson	15	30-45	50-55	Li et al., 2019; Ronimus et al., 2003; Rückert et al., 2004; Sadiq et al., 2016; Skanderby et al., 2009; Zain et al., 2016)
<i>B.cereus</i>	Lait écrémé en poudre + Concentré de protéine de lactosérum	5-20	30-37	45-48	(Li et al., 2019; Skanderby et al., 2009; Zain et al., 2016)
<i>B.subtilis</i>	Lait écrémé en poudre + Concentré de protéine de lactosérum + poudre de lait entier	6-20	30-40	45-55	(Ronimus et al., 2003; Rückert et al., 2004; Skanderby et al., 2009; Zain et al., 2016)
<i>Bacillus thuringensis</i>	Concentré de protéine de lactosérum	-	30	-	(Zain et al., 2016)

I.5. Les bactéries contaminants le lait en poudre

I.5.1. Genre *Bacillus*

I.5.1.1. Description

Bacillus comprend des bactéries Gram-positives, les cultures plus anciennes peuvent Gram-négatif apparaître. Les bacilles sont des bâtonnets droits aux extrémités carrées ou Rond,

tailles variables de 0,5-2,5 x 1,2-10 μ . Leur GC% est de 32 à 69. Elles forment endospores. Le plus souvent mobiles, avec des flagelles péribucaux. Ils ont de l'aérobie parfois facultatif et positif pour la catalase (**Prescott et al, 2003**).

Plusieurs espèces de *Bacillus* forment des capsules, parfois acides glutamate, tel que *Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis*. Gélules de *B. pumilus*, *B. circans*, *B. mycoides* et d'autres contiennent des glucides. *Bacillus* appartient à la classe *Bacillus*, l'ordre *Bacillus*, et Famille des bacilles. Cependant, les classifications couramment utilisées sont basées sur Morphologie et localisation des spores.

Le genre *Bacillus* fait partie de la famille *Bacillus* et peut être Le genre bactérien le plus ancien et le plus diversifié. Selon le commentaire de (**Slepecky et al., 2006**), a une portée importante caractéristiques physiologiques qui ne peuvent en aucun cas être classées et généralisation appropriée. Bien que leur habitat principal ait été considéré comme le sol, il est maintenant suggéré que le sol puisse être agit simplement comme un référentiel pour *Bacillus*. (**Hong et al., 2009**).

En fait, il semble que leur physiologie étendue permette à ces espèces coloniser presque n'importe quel environnement naturel, y compris le sol, l'air, sédiments lacustres, eaux et fourrages et milieux extrêmes tels que l'eau chaude acide, les marais salants, les sources chaudes, le sol Larves d'abeilles subantarctiques et malades (**Krause et Berkeley, 1986**).

I.5.1.2. *Bacillus cereus*

L'industrie laitière a une longue tradition de préservation de la sécurité et de la qualité du lait de consommation, basée sur deux processus principaux : le refroidissement du lait cru à des températures inférieures à 7-10 °C jusqu'au traitement et le chauffage du lait dans une usine laitière. La production de différents produits laitiers exige l'application de divers procédés de chauffage (pasteurisation, traitement à ultra-haute température (UHT), séchage). La durée de conservation du lait pasteurisé est principalement déterminée par la présence et la croissance d'endospores aérobies à Gram positif, en forme de bâtonnets, dont les membres du groupe *Bacillus cereus* sont les plus importants. Les endospores thermophiles résistent au processus de pasteurisation et peuvent revivre par germination et croissance externe et produire des enzymes d'altération (protéases, lipases et phospholipides) dans le lait pasteurisé, qui entraîne des goûts désagréables (**Lücking et al., 2013 ; Gopal N et al., 2015**)

En outre, *B. cereus* est un agent pathogène d'origine alimentaire bien connu. En raison

de ces risques, l'industrie laitière doit constamment optimiser et améliorer les processus qui permettent d'obtenir des produits répondant aux exigences des entreprises et des consommateurs et pouvant être exportés sur de longues distances et parfois dans des conditions de stockage défavorables sans perte de qualité. Malgré les progrès réalisés par l'industrie laitière au cours du siècle dernier, l'altération prématurée du lait reste un problème et entraîne des pertes environnementales et économiques considérables qui sont liées aux coûts directs des rappels de produits et indirectement au préjudice d'image subi par les entreprises concernées. Si le rappel concerne un produit contenant du lait en poudre, les coûts de rappel peuvent être plus élevés que pour le lait de consommation (**Machado et al., 2017**)

I.5.1.3. La pathogénicité de *Bacillus cereus*

B. cereus provoque des syndromes d'intoxication alimentaire autolimités (24-48 heures) (un type diarrhéique et un type émétique), des infections opportunistes et est associé à des infections cliniques telles que l'endophtalmie et d'autres infections oculaires (**Logan et al., 2006**).

La forme diarrhéique de l'intoxication alimentaire à *B. cereus* se caractérise par des crampes abdominales, une diarrhée aqueuse abondante, un ténesme rectal et, parfois, de la fièvre et des vomissements. La forme émétique de l'intoxication alimentaire à *B. cereus* se caractérise par des nausées, des vomissements et des malaises, parfois accompagnés de diarrhée (**Logan et al., 2006**).

B. cereus peut provoquer des infections de plaies, des bactériémies, des septicémies, des méningites, des pneumonies, des infections du système nerveux central, des endocardites, des péricardites, des infections respiratoires et des infections périphériques (**Logan et al., 2006**). L'infection chez les personnes immunodéprimées peut mettre leur vie en danger (**Le Scanniff et al., 2006**).

Les souches de *B. cereus* qui abritent un plasmide portant des facteurs de virulence semblables à ceux de *B. Anthracis* peuvent causer une pneumonie grave chez les personnes immunocompétentes.

I.5.2. *Bacillus Thuringiensis*

Bacillus thuringiensis fait partie du groupe de bactéries *B. cereus* (*B. cereus* sensu lato) et est connu pour être biochimiquement identique à *B. cereus* sensu stricto. La bactérie

est connue pour produire des entérotoxines similaires à celles de *B. cereus* sensu stricto, certaines souches utilisées commercialement étant connues pour avoir des gènes pour Hbl, Nhe et CytK (Kim *et al.*, 2014). Cependant, étant donné que les méthodes standard de détection et de dénombrement (ISO7932 et ISO21871) dans les milieux alimentaires et cliniques ne font pas la différence entre les deux espèces, l'occurrence des épidémies dues à *B. thuringiensis* est souvent sous-estimée (Anonyme, 1997 ; Autorité européenne de sécurité des aliments, 2005 ; Kim *et al.*, 2014). En dépit de sa pathogénicité connue, *B. thuringiensis* n'a été impliqué que dans un seul cas confirmé d'intoxication alimentaire, alors qu'il avait déjà été isolé dans divers produits alimentaires, notamment du lait, du lait de réservoir de ferme et du lait de silo de crèmerie, ce qui indique que les épidémies peuvent être attribuées à *B. cereus sensu stricto* plutôt qu'à *B. thuringiensis* (Phillips et Griffiths, 1986 ; Jackson *et al.*, 1995 ; Damgaard *et al.*, 1996). Depuis des années, des préparations commerciales de *B. thuringiensis* sont utilisées comme insecticides biologiques, car il s'agit d'un entomopathogène capable de produire plusieurs protéines insecticides (Lemes *et al.*, 2015). Par conséquent, la pulvérisation de préparations de *B. thuringiensis* sur les cultures agricoles pour les protéger contre les infestations d'insectes est courante, ce qui soulève la question de la prévalence d'entérotoxines pathogènes pour l'homme, si les préparations bactériennes persistent lors de la consommation.

I.5.3. *Bacillus Licheniformis*

Il a été démontré que *Bacillus licheniformis* l'une des espèces de *Bacillus* les plus répandues dans le lait cru et tout au long du processus de transformation des produits laitiers (Kalogridou-Vassiliadou, 1992 ; Scheldeman *et al.*, 2006). Bien que *B. licheniformis* ne soit pas considéré comme un agent pathogène pour l'homme, les spores de la bactérie sont connues pour provoquer l'altération du lait et des produits laitiers, poser des problèmes de conformité aux spécifications et avoir des effets négatifs sur les propriétés organoleptiques et fonctionnelles du lait (Crielly *et al.*, 1994 ; Dhakal *et al.*, 2014). Des études antérieures ont démontré que les souches de *B. licheniformis* rencontrées dans les aliments laitiers présentent une grande hétérogénéité génétique, la forte prévalence dans l'industrie laitière étant attribuée

à la contamination par des sources externes telles que le sol et l'ensilage ainsi que par des sources intrinsèques aux usines de transformation du lait (**Rückert et al., 2004 ; Scheldeman et al., 2005 ; Dhakal et al., 2013**).

B. licheniformis est souvent associé aux poudres de lait qui ont un faible nombre de spores en raison de son incapacité à former des biofilms et il est également connu pour être parmi les spores capables de produire des enzymes d'altération (**De Jonghe et al., 2010 ; Reginensi et al., 2011**).

Bacillus licheniformis était le deuxième sporophile thermophile le plus fréquemment détecté dans une étude portant sur 28 échantillons de lait en poudre provenant de 18 pays différents, avec une occurrence totale de 39,2 % (**Rückert et al., 2004**). La même étude a mis en évidence la présence d'une souche spécifique de *B. licheniformis* dans 27 des 28 échantillons de lait en poudre, ce qui indique son ubiquité en tant qu'isolat de sol commun (**Rückert et al., 2004**). Des études sur les effets saisonniers de la flore bactérienne d'exploitations agricoles du Midwest américain (lait en vrac, environnement et ensilage de maïs) ont montré que *B. licheniformis* était l'espèce prédominante en été (49,4 %) ainsi qu'en hiver (62 %), bien qu'elle soit moins présente en été (**Buehner et al., 2014**). Conformément à d'autres études, les poudres de lait infantile et de lait entier échantillonnées chez divers fabricants en Chine ont permis d'identifier *B. licheniformis* comme le bacille thermophile le plus répandu dans les poudres de lait chinoises, avec une occurrence de 36,8 % sur 801 isolats (**Yuan et al., 2012**). La forte prévalence de *B. licheniformis* dans les échantillons de lait est potentiellement attribuée à sa large distribution dans l'environnement et dans les exploitations laitières, par exemple dans les concentrés alimentaires, les matières fécales, les pis et les trayons souillés, le lait cru ainsi que dans les contaminations provenant des usines (**Vaerewijck et al., 2001 ; Rückert et al., 2004 ; Scheldeman et al., 2005 ; Reginensi et al., 2011**).

I.6. La contamination de lait en poudre par d'autres *Bacillus spp*

D'autres espèces de *Bacillus*, telles que *B. weihenstephanensis*, *B. pumilus* et *B. subtilis*, souvent isolées du lait et des environnements agricoles, ont été signalées comme produisant de la céréulide putative, la toxine émétique produite par *B. cereus*, ou d'autres substances entérotoxiques pouvant être nocives pour l'homme (**Nieminen et al., 2007 ; Yoo et al., 2014**). *B. weihenstephanensis* est une bactérie psychrotolérante connue pour provoquer des

altérations mais sa pathogénicité n'a pas encore été élucidée (**Thorsen et al., 2006 ; Hoton et al., 2009 ; Stenfors Arnesen et al., 2011**). *B. pumilus* n'est pas connu pour causer couramment des infections humaines, mais il a déjà été isolé dans des échantillons de lait mastiqué en Finlande (**Nieminen et al., 2007 ; Caamaño-Antelo et al., 2015**). *B. subtilis*, d'autre part, bien qu'il ne soit pas traditionnellement classé comme un agent pathogène pour l'homme, a été signalé comme étant impliqué dans des cas d'intoxication alimentaire, par exemple lors d'une épidémie survenue en 2005 dans un jardin d'enfants et causée par du lait en poudre, les vomissements étant le symptôme le plus courant mais souvent accompagné de diarrhée (**Pavic et al., 2005 ; Logan, 2012**). Cependant, on pense que les épidémies causées par *B. weihenstephanensis*, *B. pumilus* et *B. subtilis* sont souvent attribuées à *B. cereus*, à moins que des identifications microbiologiques plus approfondies ne soient entreprises (**Logan, 2012**). Une autre bactérie sporulée rencontrée dans le monde entier dans les produits laitiers est *B. sporothermodurans*, une bactérie sporulée très résistante à la chaleur (**Pettersson et al., 1996**).

La présence de *B. sporothermodurans* a été principalement identifiée dans le lait traité indirectement par UHT et les produits laitiers affectés vont du lait UHT entier, écrémé, évaporé ou reconstitué à la crème UHT, au lait chocolaté et aux poudres de lait (**Hammer et al., 1995 ; Klijn et al., 1997**).

En raison de leur omniprésence dans la nature, la source réelle de contamination par *Bacillus sp.* Dans les exploitations laitières peut rarement être déterminée avec exactitude et est probablement un processus cumulatif au fur et à mesure que le lait cru est extrait, traité, transporté et stocké. Les sources de contamination les plus courantes sont le sol, la litière, l'ensilage, les matières fécales, l'eau de rinçage de l'équipement de traite et les aliments pour animaux (**Christiansson et al., 1999 ; Magnusson et al., 2007**). Une fois que le lait cru est contaminé par ces espèces d'altération, tout le continuum de la transformation du lait est affecté puisque certains *Bacillus sp.* Produisent des spores très hydrophobes qui peuvent adhérer fermement aux matériaux inertes utilisés dans la transformation des aliments, par exemple, l'acier inoxydable et les polymères pour former des structures multicellulaires appelées biofilms (**Wiencek et al., 1991 ; Hüsmark et Rönner, 1992**).

Une fois attachés aux usines de fabrication, ces biofilms deviennent un réservoir de spores, qui agissent comme la principale source de contamination des produits laitiers finaux, indiquant une mauvaise hygiène de l'usine (**Burgess et al., 2013**).

I.7. *Staphylococcus spp*

Le lait en poudre n'est pas stérile et peut être contaminé par diverses bactéries, dont certains pathogènes. Diverses bactéries, dont certains agents pathogènes. Il s'agit d'un aliment à haut risque en en termes de présence de staphylocoques à coagulase positive. Leur nombre maximal dans cette denrée est limité par la législation européenne à 10 UFC/ g et dans deux des cinq échantillons, leur nombre peut même atteindre 100 UFC/ g. Même atteindre 100 UFC/ g (**Règlement (CE) 2073/2005**). La limite de 10^5 UFC/g est considérée comme un taux de *S. aureus* à haut risque dans les aliments qui permet la production d'entérotoxines (**Necidova, Jan stova, Karpískova, 2012 ; Règlement (CE) 2073/2005 ; Wang et al., (2012)**)

Une température de 4°C ne permet pas la croissance de la plupart des bactéries pathogènes, à l'exception des psychrotrophes. Bactéries pathogènes, à l'exception des organismes psychrotrophes. *S. aureus* se reproduit à des températures comprises entre 7 °C et 48 °C. Les limites de la production de SE ne se superposent pas à celles de la réplication de *S. aureus* celles de la réplication de *S. aureus* ; en général, les SE sont produits dans les aliments à des températures allant de 10 °C à 46 °C (**Bhunia, 2008 ; Schelin et al., 2011**). *S. aureus* est relativement résistant à la dessiccation, la valeur minimale de l'activité de l'eau pour sa prolifération étant de 1,5 %. Valeur d'activité de l'eau pour sa prolifération est de 0,86 (**Bhunia, 2008 ; Fernandes, 2009**) ou même 0,83 (**Schelin et al., 2011**).

La survie de *S. aureus* dans le lait en poudre est courante, et les SE sont produites à partir d'une valeur de 0,83 (**Schelin et al., 2011**).

I.8. *Salmonelle Spp*

Les salmonelles sont des bacilles anaérobies facultatifs à Gram négatif, de petite taille, non printaniers, qui sont facilement détruits par la pasteurisation thermique des aliments (**Pal et al, 2015**).

Les épidémies de salmonellose sont généralement causées par un contrôle inadéquat des températures de cuisson, une contamination croisée après la cuisson, des taux de refroidissement lents et une mauvaise réfrigération.

Les établissements de restauration collective ou domestique mal nettoyés sont souvent impliqués dans les épidémies, et le lait cru, la volaille, la viande ou les œufs, mais aussi les

produits frais et les aliments secs sont des sources de l'agent pathogène. Une contamination de faible niveau de lait en poudre pour nourrissons par Salmonella a été associée à une infection chez les nourrissons (**Salwa et Neimat, 2014**).

1.9. Consommation de lait en poudre en Algérie

L'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb, avec une consommation de 260 à 300 000 t de poudre par an, ce qui en fait le 2 ou 3ème importateur mondial de poudre de lait. Le lait produit en Algérie représente moins de 30 % des besoins de l'industrie. L'industrie transforme environ des milliards de litres pour la production de lait liquide et des milliards pour la production de yaourts, et laits fermentés. Le lait instantané en poudre (40 000 t par an) et les laits infantiles (15 000 t par an) Il existe un marché du lait en poudre (surtout en boîtes de 500g) Gloria, Loya, Celia, Novilait, Nespray, Candia, ...etc. l'Algérie ne produit pas mais conditionne sur place (**MIAA., 2015**).

A horizontal orange banner with a scroll-like appearance, featuring rounded corners and a slight shadow. The text is centered within the banner.

Matériel et Méthodes

Dans cette partie, nous intéressons à l'analyse de la qualité microbiologique de la poudre de lait.

II.1. Prélèvement

Le prélèvement est réalisé initialement au niveau du laboratoire bactériologique, à l'aide d'un ciseau stérile on ouvre le sac à côté du bec Bunsen ou une flamme et on plonge une louche stérile au fond du sac pour réaliser un bon prélèvement qui servira à toutes les analyses.

(Akli .B, 2011)

Les échantillons prélevés doivent par la suite être maintenus dans des conditions qui n'altèrent pas la qualité intrinsèque du lait. Le volume de l'échantillon prélevé est très variable et doit être représentatif du volume total de l'échantillon de lait en poudre à analyser

(Michel *et al.* 2002)

II.2. Préparation des dilutions

- Préparation de dilution au 1/10 (reconstitution de la poudre).
 - Réchauffer un flacon contenant 90 ml de diluant à 47 ± 2 °C au bain-marie.
 - Peser 10 g de lait en poudre dans un récipient en verre stérilisé en procédant de façon aseptique.
 - Introduire la poudre dans le flacon de dilution contenant le diluant à 47 ± 2 °C.
- pour dissoudre la poudre, la mouiller en faisant tourner lentement puis en secouant doucement le flacon pendant 10 secondes environ, 25 fois avec un mouvement d'une amplitude de 30 cm environ.
- Remettre le flacon au bain-marie et le maintenir pendant 5 minutes en agitant de temps à autre le contenu.
 - Agiter une fois et effectuer le dénombrement. Le volume final du lait reconstitué est d'environ 97,5 ml et non de 100 ml, mais cet écart est négligeable.
 - Préparation des dilutions au 1/100 et plus.

- A l'aide d'une pipette stérile transférer 10 ml de lait reconstitué dans 90 ml de diluant stérile en veillant à ne pas enfoncer l'extrémité de la pipette de plus d'un centimètre au-dessous de la surface. On obtient ainsi la dilution au 1/100.
- Mélanger en agitant 25 fois avec un mouvement d'une amplitude de 50 cm environ.
- On peut pour suivre les dilutions décimales en utilisant chaque fois une nouvelle pipette pour passer d'une dilution à l'autre.

II.3. Ensemencement des boîtes de Pétri

- Préparer au moins deux boîtes à partir de chaque dilution choisie de façon à obtenir au moins deux boîtes comprenant de 20 à 300 colonies. Normalement il suffit de choisir deux dilutions par-miles dilutions au 1/10, au 1/100 ou au 1/1000, mais si l'on prévoit une énumération très élevée, il faudra procéder à d'autres dilutions.
- Utiliser une nouvelle pipette stérile de 1 ml pour ensemercer 1 ml de chaque dilution Dans les boîtes de Pétri.

II.4. Répartition de la gélose dans les boîtes de Pétri

- Faire bouillir le milieu et le refroidir aussi vite que possible à une température de 45 à 47 °C.
- Verser dans chaque boîte 10 à 12 ml du milieu fondu, refroidir à une température de 45 à 47 °C.
- Immédiatement après avoir versé le milieu, le mélanger par cinq mouvements de va-et-vient, suivis de cinq mouvements circulaires dans le sens des aiguilles d'une montre suivis de cinq mouvements de va-et-vient exécutés perpendiculairement aux premiers et suivis enfin de cinq mouvements circulaires dans le sens contraire des aiguilles d'une montre.
- Laisser reposer les boîtes jusqu'à la solidification du milieu, les retourner et les placer Dans l'étuve. Le temps qui s'écoule entre la préparation des dilutions, et la répartition de la Gélose dans les boîtes ne doit pas dépasser 15 minutes.

II.5. Incubation des boîtes de Pétri

Les boîtes sont mises à incuber, leur fond étant tourné vers le haut à 30 ± 1 °C pendant $72 \pm$ heures ; il est préférable de ne pas les empiler à plus de quatre (maximum six).

II.6. Numération des colonies

- Les colonies doivent être comptées dans les 4 heures qui suivent la fin de la période d'incubation pour faciliter la numération. Il est recommandé d'utiliser un appareil de Comptage lumineux muni d'une loupe et d'un compteur-enregistreur.

- Ne tenir compte, pour exprimer les résultats, que des boîtes dans lesquelles se sont développées de 20 à 300 colonies.

- Calculer la moyenne arithmétique à partir des chiffres obtenus dans les boîtesensemencées avec la même dilution.

-Si les boîtes correspondant à plusieurs dilutions donnent des résultats compris entre ces limites, ne tenir compte que de la moyenne des résultats.

- Si une numération dépasse à peine 300 colonies et si la dilution suivante est à peine inférieure à 20 colonies, prendre la moyenne.

- Si l'écart est important, recommencer l'épreuve.

- Si une boîte à plus du quart de sa surface recouvert de colonies envahissantes, elle doit être écartée.

II.7. Expression des résultats

(JO n° 32 - 2004).

An orange scroll graphic with a gradient from light to dark orange, featuring a shadow and a 3D effect. The text is centered on the scroll.

Discussion des travaux antérieurs

Discussion des travaux antérieurs

La connaissance de la microflore bactérienne et leur évolution est hautement impérative pour assurer la sécurité et la qualité des produits laitiers (**Ahmed et al., 2014**).

Les sources de contamination microbienne de la poudre de lait sec sont nombreuses. Les micro-organismes qui contaminent le lait en poudre peuvent provenir de l'air, de la poussière, du sol, de l'eau, des insectes, de l'homme, des récipients de stockage et des équipements de manipulation et de traitement. Les bactéries peuvent provenir du sol (**Heyndrickx, 2011**), des matières fécales, de la litière, des aliments pour animaux ou de l'équipement de traite (**Gleeson et al., 2013**), ou peuvent pénétrer dans le lait cru via des trayons, des gobelets de traite et des réservoirs à lait contaminés. En outre, la contamination peut se produire pendant le transport de la ferme à l'usine de transformation (**Pantoja et al., 2011**), ainsi que dans l'usine de transformation elle-même, en raison d'une mauvaise manipulation et d'équipements contaminés (**Burgess et al., 2010 ; Faille et al., 2014**). Ainsi, un nettoyage et un assainissement inadéquats des équipements laitiers conduiront à une intoxication alimentaire due à la contamination par des microbes (**Pal et Mahendra, 2015**).

En 2021, **Nagat et ses collaborateurs** ont fait une étude sur huit échantillons de poudre du lait dans l'état de Khartoum au Soudan, quatre genres de bactéries ont été isolés dans le lait en poudre conditionné. *Bacillus spp* était l'agent pathogène le plus répandu (46,2 %), suivi de *Streptococcus spp* suivi de *Streptococcus spp* (30,8 %), *Micrococcus spp* (15,4 %) et *Staphylococcus aureus* (7,7 %).

Selon des études les variations de la composition microbienne, peut être due à des conditions environnementales non hygiéniques et de la manipulation du lait en poudre reconditionné et leur multiplication dépendrait cependant aux conditions environnementales favorables comme le temps, la température, l'humidité relative, et la durée de stockage ainsi que de paramètres tels que l'activité potentielle de l'eau, la teneur en humidité, les nutriments présents (**Ahmed et al., 2006 ; Oyeyipo et al., 2012**).

D'autre part, il a été démontré que la composition bactérienne sporulée du lait cru diffère considérablement de celle des poudres laitières associées (**Miller et al., 2015**). Ce qui montre que la transformation du lait en poudre modifie la composition des spores spécifiques présentes. Après la production, les poudres peuvent être stockées pendant de longues périodes et en l'absence d'eau, l'activité métabolique et la croissance bactérienne sont limitées (**Deng et al., 2012**). Ce qui permet d'éviter l'altération et les défauts du produit. Cependant, dans ces

Discussion des travaux antérieurs

conditions, les spores bactériennes peuvent rester dormantes jusqu'à ce que des conditions plus favorables soient rencontrées, lorsque la germination et l'excroissance peuvent procéder (**Setlow, 2003, 2014**). Dans le séchage par atomisation, la quantité de chaleur à laquelle les bactéries contaminantes peuvent être exposées est insuffisante pour que le processus de séchage soit efficace pour décontaminer le lait, même en ce qui concerne les pathogènes relativement sensibles à la chaleur, tels que la *Salmonelle* sensibles à la chaleur. En outre, il se produit une contamination du lait en poudre après le traitement, à partir d'environnements de production alimentaire. Par conséquent, le lait destiné au séchage rapide doit d'abord être pasteurisé et il faut veiller à ce qu'il n'y ait aucune possibilité de recontamination entre le pasteurisateur et le séchoir (**Harrigan, 1998**).

Parmi les bactéries sporulantes les plus isolées de la poudre du lait, on a le genre *Bacillus* qui sont pathogènes pour l'homme, les affectant de manière fortuite. Une exception notable est le *Bacillus anthracis*, qui a provoqué l'anthrax chez l'homme et les animaux domestiques, et le *Bacillus thuringiensis*, qui a provoqué des maladies chez les insectes (**Terranova et al., 1978**).

Selon l'étude de **Pal et ses collaborateurs en (2014)**, qui a pour objectif de connaître les aspects hygiéniques et microbiens de la poudre de lait. Ils ont trouvé que *Bacillus cereus* est capable de produire des spores qui peuvent survivre à la pasteurisation, et survivre au processus de fabrication du lait en poudre. Il représente un problème lorsque les laits en poudre sont reconstitués et stockés pendant des périodes prolongées à des températures incorrectes. La plupart des souches de *B.cereus* isolées de produits laitiers sont capables de se développer et de produire des toxines en dessous de 10°C. Le *Bacillus cereus* est à l'origine de deux types de maladies d'origine alimentaire : une maladie émétique (vomissements) due à l'ingestion d'une toxine (céréale) préformée dans l'aliment et une infection diarrhéique due à l'ingestion de cellules/spores bactériennes qui produisent des entérotoxine dans l'intestin grêle.

De nombreux chercheurs ont signalé que la présence de *Staphylococcus* et de *Streptococcus spp* était un contaminant possible par les manipulateurs. *Streptococcus spp* a été impliqué dans des infections humaines comme la pharyngite, la scarlatine et la pneumonie (**Shamsuddeen et al.,2008 ; Kawo et al.,2009**).

Aux Etats-Unis, 1 à 2 millions de cas d'intoxication alimentaire staphylococcique sont enregistrés chaque année. Les entérotoxines staphylococciques ne sont normalement pas ou peu inactivées lors de la transformation des aliments, de leur stockage, de leur distribution ou

Discussion des travaux antérieurs

pendant la préparation de l'aliment en cuisine.

Par conséquent, si les staphylocoques entérotoxiques sont capables de se développer dans les aliments jusqu'à un nombre élevé (plus de 10^5 à 10^6 UFC/g ou ml) avant d'être tués. Il existe toujours un risque d'intoxication avec la consommation de lait en poudre (**Hafsa et al., 2013**).

Le *Staphylococcus aureus* ne peut pas se développer à des températures $<10^\circ\text{C}$, le contrôle est donc plus efficace par une réfrigération adéquate (**Glava et al., 2014**).

Selon **Nazia et al. (2018)** qui ont fait une étude sur la poudre du lait qui a été collecté dans différents marchés locaux de la ville de Gazipur à Bangladesh, le nombre total de bactéries dans le lait en poudre doit être inférieur à 10^4 UFC/g est indicatif de leur qualité acceptable tandis qu'une charge bactérienne supérieure à 10^5 UFC/g est inacceptable. Les résultats de dénombrement ont montré une qualité marginalement acceptable des échantillons de lait analysés (voir tableau 03). Tous les échantillons de lait en poudre dépassaient les limites acceptables, sauf l'échantillon n°4. Mais aucun d'entre eux ne dépassait la limite inacceptable. Dans l'étude précédente, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp* et *Pseudomona ssp* ont été identifiés par leur couleur respective dans des milieux de culture spécifiques.

Discussion des travaux antérieurs

Tableau n° 03 : Charge bactérienne des différents échantillons.
(Nazia *et al.*,2018)

Echantillons	CFU/g	m*	M*
Echantillon01	25x10 ⁴		
Echantillon02	22 x10 ⁴		
Echantillon03	32.7 x10 ⁴		
Echantillon04	8.3 x10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵
Echantillon05	19.9 x10 ⁴		
Echantillon06	15.3 x10 ⁴		
Echantillon07	3.4 x10 ⁴		
Echantillon08	9.9 x10 ⁴		

m* : niveau acceptable et les valeurs supérieures à ce niveau sont marginalement acceptablesou inacceptables selon les termes du plan d'échantillonnage.

M* : un critère microbiologique qui sépare une qualité marginalement acceptable d'une qualité défectueuse selon l'ICMSF. La charge bactérienne représente en UFC/g.

Le dénombrement de la charge microbienne du lait en poudre a été rapportée par **Salahudinet Naural** en (2006). Les contaminants communs identifiés dans les poudres de lait comprennent des espèces de bacilles, dont beaucoup sont capables de former des endospores (**Checinski et al., 2006 ;2015**). Des taxons autres que Bacilli ont également été trouvés notamment *Clostridium halophilum*, *Klebsiella oxytoca* (**Buehner et al., 2015**), *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novy* et *C. novy. septicum*, *C. novyi/haemolyticum*, *C. sporogenes* (**Barash et al., 2010**), *Staphylococcus aureus* (**Zhang et al., 2015**), et *Cronobacters akazakii* (**Minami et al., 2012**). Ces résultats sont en accord avec une étude où ils ont identifié *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* Et *Bacillus sp* dans différents échantillons. Des résultats similaires ont également été rapportés par (**Hafsa et al.,2013**). En 2011, **Pal** a identifié *Staphylococcus aureus* qui peut être présent dans la mamelle et les trayons de la vache, et par conséquent contaminer le lait.

Selon une autre étude en 2020. Sur un total de 70 échantillons de poudre de lait testés, 35 des échantillons de poudre laitière présentaient des charges des bactéries aérobies plus élevées lorsqu'ils étaient testés à 37°C par rapport à 30°C bien que cela ne soit pas statistiquement significatif ($p > 0,05$).

Discussion des travaux antérieurs

La numération bactérienne moyenne lors des tests à 30°C s'est avérée être de 2,27 log₁₀ UFC/g alors que les tests à 37°C ont donné 2,26 log₁₀UFC/g. De même, sur un total de 70 échantillons de poudre de lait, 26 présentaient des charges des bactéries aérobies plus élevées lorsqu'ils étaient testés à 65°C qu'à 55°C. L'analyse des bactéries totales à 65°C a favorisé la croissance de certaines bactéries ; cependant, le nombre de bactéries capables de se développer à 55°C était significativement plus élevé ($p < 0,05$) qu'à 65°C.

Le nombre moyen de bactéries pendant l'essai à 55°C était de 1,78 log₁₀UFC/g, tandis que l'essai à 65°C a donné 1,54 log₁₀UFC/g. Les résultats montrent que les tests de numération des bactéries aérobie dans les poudres de lait à 30°C et 55°C, tels qu'ils sont actuellement effectués dans l'industrie laitière (FIL/ISO), sont appropriés pour dénombrer les bactéries totales, mésophiles et thermophiles.

Cependant, le nombre de bactéries dénombrées à 37°C et 65°C aurait pu être plus élevé si la taille de l'échantillon avait été augmentée. Cela peut être observé dans les différents échantillons de lait en poudre qui ont été testés. Sur les 30 échantillons de lait entier en poudre testés, 19 d'entre eux présentaient un nombre plus élevé de bactéries aérobies à 37°C, ce qui représente environ 63% des échantillons de lait entier en poudre. Pour la poudre de lait écrémé, un total de 13 échantillons a été testé et 5 d'entre eux avaient un nombre de bactéries plus élevé à 37°C, ce qui représente environ 38%. Seuls 29 % des échantillons de babeurre de poudre testés présentaient un nombre de bactéries plus élevé à 37°C. Cela peut être dû au faible échantillonnage (**Pramularsih,2020**).

Certains auteurs ont rapporté le nombre total des bactéries dans des échantillons de poudre laitière. **Li et al.,(2019)** ont enregistré une fourchette allant de <1 à 3,15 log₁₀ UFC/ml de bactéries dans leurs échantillons de la poudre écrémés à 30°C. D'autre part, **Zain et al., (2016)** ont enregistré une gamme de 4-5,77 log₁₀UFC/g dans leurs échantillons de WPC 80. Ces résultats sont beaucoup plus élevés que ceux de la précédente étude (0,7-3,16 log₁₀ UFC/g).

Plusieurs auteurs ont signalé un nombre de bactéries plus élevé lorsque le lait en poudre était testé à 37°C par rapport à 30°C. Une étude menée par **Yuan et al., (2012)** a rapporté que certaines souches de bacilles thermophiles étaient capables de se développer sur une gélose à 37°C après 48 heures. Ils ont suggéré qu'un nombre élevé des bactéries aérobies à 37°C a une forte corrélation avec un nombre élevé de thermophiles à 55°C. Malheureusement, les auteurs

Discussion des travaux antérieurs

n'ont pas indiqué le nombre exact de bactéries qu'ils ont compté pendant l'incubation à 37°C.

Dans une recherche similaire, **Sadiq et al., (2016)** ont trouvé une moyenne de 2 \log_{10} UFC/g de spores mésophiles dans des échantillons de lait en poudre chinois lors de tests à 37°C. De même, **Zain et al., (2016)** n'ont pas non plus compté le nombre total de bactéries totales dans le CPM à 37°C. Cependant, ils ont comparé la formation de biofilms de plusieurs isolats de *B. licheniformis* à 30°C, 37°C et 55°C. Ils ont observé que le plus grand nombre d'isolats de *B. licheniformis* (33 isolats) formaient des biofilms à 37°C sur des plaques de micro-titration en milieu TSB.

Plusieurs études ont testé les bactéries thermophiles totales à 55°C puisque le lait en poudre est un milieu idéal pour la croissance des thermophiles (**Wehr et Frank, 2004**).

De nombreuses bactéries thermophiles se développent à 55°C (**Wehr et Frank, 2004**), le nombre moyen de thermophiles testés à 55°C dans le la poudre du lait entiers et la poudre du lait écrémé est de 1,82 et 1,89 \log_{10} UFC/g respectivement. Cette étude est en accord avec d'autres études qui ont été rapportées par exemple, dans une étude réalisée par **Sadiq et al., (2016)**, le nombre moyen de thermophiles dans la poudre du lait entiers et la poudre du lait écrémé qui ont été fabriqués à Heilongjiang, en Chine, était de 1,81 et 2,65 \log_{10} UFC/g respectivement. Cependant, d'autres études ont trouvé des résultats beaucoup plus élevés que ceux de la précédente étude. **Reginensi et al., (2011)** ont trouvé que le nombre moyen de thermophiles dans les produits suivants poudres de lait écrémé et entier uruguayennes testées à 55°C était d'environ 3 \log_{10} UFC/g. **Rajput et al., (2009)** ont trouvé 2,04-2,69 \log_{10} UFC/g de thermophiles dans la poudre du lait écrémé et 2,59- 2,77 \log_{10} UFC/g dans la poudre du lait entier du Pakistan.

Rückert et al., (2004) ont comparé les bacilles thermophiles dans des poudres de lait provenant de 18 pays différents. Le nombre de thermophiles dans le lait écrémé en poudre obtenus en New-Zélande était de 2,85 \log_{10} UFC/g et de 3,04 \log_{10} UFC/g respectivement. Le nombre de thermophiles était plus élevé dans les poudres de lait provenant de France, de Grande-Bretagne et des Etats-Unis. L'échantillon de lait en poudre de France contenait 4,54 \log_{10} UFC/g de thermophiles et les échantillons de lait en poudre de Grande-Bretagne et des États-Unis présentaient des comptes plus élevés de 4,60 \log_{10} UFC/g et 5,34 \log UFC/g respectivement (**Rückert et al., 2004**). Les résultats de **Rückert et al., (2004)** ont montré que les nombres de thermophiles comptés en France, en Grande-Bretagne et aux États-Unis dépassaient les limites moyennes acceptables pour les thermophiles.

Discussion des travaux antérieurs

Il n'y a pas de travaux de recherche effectués sur le test des bactéries thermophiles totales à 65°C. Cependant, d'après les résultats, certains isolats de 26 échantillons de poudre de lait ont eu une meilleure croissance lorsqu'ils ont été testés à 65°C qu'à 55°C, et la différence est significative ($p < 0,05$). Cela indique que, même si un nombre relativement faible de bactéries sont capables de se développer à 65°C, il est tout de même important pour les entreprises laitières d'envisager de tester à 65°C. Il est probable que le fait de négliger les tests à cette température puisse empêcher l'industrie laitière d'identifier certaines souches de bactéries capables de se développer à 65°C. Dans une recherche de **Ronimus et al., (2003)**, il a été démontré que *A. flavithermus* et *G. stearothermophilus* trouvés dans la poudre de lait se développaient fortement à 65°C. Dans une autre étude de **Karaca et al., (2019)**, *A. flavithermus* était capable de former une plus grande quantité de biofilms sur des coupons en acier inoxydable à 65°C qu'à 55°C.

Une étude était de mettre en évidence les mésophiles dans les poudres de lait importées et commercialisées en Algérie. Les poudres de lait ont été importées de 10 pays : Argentine, Belgique, Danemark, France, Allemagne, Inde, Irlande, Pays-Bas, New-Zélande et Ukraine. Cette étude est justifiée par le fait qu'il n'existe pas en Algérie de données scientifiques sur ce sujet et qu'il faut vérifier la capacité des spores mésophiles à produire des enzymes et leur résistance thermique. (**Watterson et al., 2014**). 21 échantillons de poudres de lait écrémé et de lait entier ont été collectés dans des laiteries et au laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen (Algérie). Les poudres de lait qui ont fait l'objet de cette étude ont été importées de 10 pays différents et commercialisées en Algérie (**Tableau 04**). Chaque échantillon a été étiqueté et conservé à 0-4 °C avant d'être analysé (**Benahmed et al., 2020**).

Ce tableau présent Nombre et origine des différents échantillons de lait en poudre.

Discussion des travaux antérieurs

Tableau n° 04 : Nombre et origine des différents échantillons de lait en poudre. (Benahmed *et al.*, 2020).

Nombre	Pays	Echantillons	Type de poudre du lait
01	Argentine	A B C	Entier
02	France	A B C	Ecrémé
03	New Zélande	A B C	Entier
04	Irlande	A B C	Entier
05	Pays-Bas	A B	Entier
06	Belgique	A B	Entier Ecrémé
07	Allemagne	A B	Entier Ecrémé
08	Inde	A	Ecrémé
09	Ukraine	A	Ecrémé
10	Danemark	A	Ecrémé
Totale	Différentes origines 10	Nombre d'échantillons 21	

Les résultats de la numération des spores mésophiles dans les poudres de lait varient de 10^2 UFC/g, à 10^4 UFC/g. Les poudres de lait belge et néo-zélandais étaient les plus contaminées, tandis que les poudres françaises et danoises étaient les moins contaminées.

Discussion des travaux antérieurs

Bacillus cereus était l'espèce la plus courante, représentant 37 % de tous les isolats. Elle est apparue dans les 21 échantillons de lait en poudre testés. *Bacillus cereus* était l'isolat le plus dominant dans les laits en poudre français, néo-zélandais et irlandais poudres de lait (**Tableau 05**). Ce tableau présente Profil RAPD des types de spores mésophiles isolés de plusieurs poudres de lait commercialisées en Algérie. La discrimination entre 24 isolats de *B. cereus* par groupe phylogénétique.

Tableau n°05 : Profil RAPD des types de spores mésophiles isolés de plusieurs poudres de lait commercialisées en Algérie. (**Benahmed et al., 2020**)

Isolats	Origines										Totale
	Inde	France	New-Zélande	Allemagne	Belgique	Pays-Bas	Irlande	Ukraine	Argentine	Danemark	
<i>B.subtilis</i>	2	1	-	-	-	-	1	-	-	-	4
<i>B.pumils</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>B.amyloliquefaciens</i>	2	3	7	2	4	-	5	-	-	-	23
<i>B.licheniformis</i>	3	2	1	1	2	3	3	1	-	-	16
<i>B.subtilis</i>	-	-	2	2	-	8	2	1	-	1	16
<i>B.cereus</i>	3	12	9	1	2	3	15	1	4	2	51
<i>G.toebii</i>	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3
<i>B.coagulans</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>B.pumilis/safensis</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	3
<i>Bacillus sp</i>	1	-	4	-	1	4	1	1	1	1	14
<i>B.badius</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>B.subtilis/mojavensis</i>	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	3
<i>B.pumilis</i>	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	3
Totales	15	21	24	6	9	20	28	5	8	3	139

Selon la classification de **Guinebretiere et al., en 2008**, a permis de distinguer trois groupes : **II** (1 isolat), **III** (16 isolats) qui contient des souches cytotoxiques et **IV** (7 isolats). Les résultats de cette étude montrent la diversité génétique de *B.cereus* isolé de la poudre de lait. Le deuxième sporophile mésophile le plus courant, *B. amyloliquefaciens*, était présent dans 17

% de tous les isolats, avec une contamination plus élevée dans les poudres provenant de

Discussion des travaux antérieurs

Néo-Zélande et d'Irlande. En revanche, aucun *B. amyloliquefaciens* n'a été isolé dans les poudres de lait danoises, ukrainiennes, argentines ou néerlandaises.

Bacillus subtilis et *B. licheniformis* étaient les troisièmes isolats les plus abondants. Chacun d'entre eux représentait 11 % de toutes les souches testées. *Bacillus licheniformis* était présent dans tous les échantillons de lait en poudre, sauf ceux du Danemark et de l'Argentine. C'était l'isolat le plus dominant dans les poudres provenant d'Inde, d'Irlande et des Pays-Bas, suivi par la poudre de lait française. *Bacillus subtilis* a été trouvé dans plus de la moitié des poudres de lait analysées. Aucun n'a été isolé dans les poudres françaises, indiennes, belges ou argentines. *Bacillus subtilis* était dominant dans les poudres de lait néerlandaises, néo-zélandaises, allemandes et irlandaises. Les autres profils représentent 24 %, dont 10 % sont représentés par *Bacillus* sp étaient représentés par *Bacillus* sp sur l'ensemble des isolats.

Un test de production d'enzymes d'altération a été réalisé sur 38 isolats. Plusieurs milieux spécifiques ont été utilisés afin de réaliser les tests. Ces résultats ont montré que 84% des isolats étaient positifs pour l'activité protéolytique, 36% pour l'activité amylolytique et 44% pour la lécithinase (**Benahmed et al., 2020**).

L'étude de **Watterson** a montré une variation de la contamination du lait en poudre par des spores aérobies mésophiles du lait en poudre : 19 % des échantillons présentaient moins de 10^2 UFC/g, tandis que 66% des échantillons présentaient entre 10^3 et 10^4 UFC/g et 14 % des échantillons présentaient des charges supérieures à 10^4 UFC/g. Les échantillons les plus contaminés provenaient de New-Zélande et de Belgique, alors que les autres échantillons provenant de ces pays présentaient des nombres faibles. Il n'y avait donc pas de corrélation entre le niveau de contamination et l'origine de la poudre de lait (**Watterson et al., 2014**). En général, les niveaux acceptables de contamination de la poudre de lait par les spores ne sont pas toujours les mêmes. Ils sont basés sur les normes nationales de chaque pays et sur les exigences du client dans chaque relation interentreprises. Par exemple, le ministère américain de l'agriculture a déclaré que le nombre de bactéries aérobies dans les poudres de lait devait être $<10^4$ UFC/g. (FSAI. 2014), et **Food Safety Authority of Ireland** (Autorité irlandaise de sécurité alimentaire) spécifie $<10^5$ UFC/g pour la poudre de lait écrémé irlandaise (**Burke et al., 2018**). Il a été observé que le monde entier se concentre sur l'élaboration de nouvelles méthodes normalisées pour la détection et l'identification des spores dans le lait en poudre et le lait écrémé (**Burke et al., 2018 ; Dettling et al., 2019**).

Discussion des travaux antérieurs

Le ministère algérien du commerce (2015), a estimé que 10% du lait et des produits laitiers étaient impliqués dans des toxi-infections alimentaires collectives. Cependant, il n'existe pas d'information en Algérie sur la prévalence de *B. cereus* dans la poudre de lait. En effet, il est essentiel que le gouvernement algérien et les producteurs laitiers examinent attentivement leurs besoins en termes d'importation et de contrôle du lait en poudre importé **(Benamara, 2016)**.

D'autres études ont également signalé qu'il s'agissait de contaminants mineurs dans les poudres de lait **(Rückert et al., 2004 ; Reginensi et al., 2011 ; Vanderkelen et al., 2016)**. **(Burgess et al., 2017)** ont noté que *G. toebii* peut être trouvé dans l'environnement laitier.

En ce qui concerne l'activité enzymatique du *B. cereus* peut être utilisée comme un premier indicateur de potentiel d'altération microbienne dans l'utilisation ultérieure de la poudre de lait. **(Mehta et al., 2019)**.



Conclusion

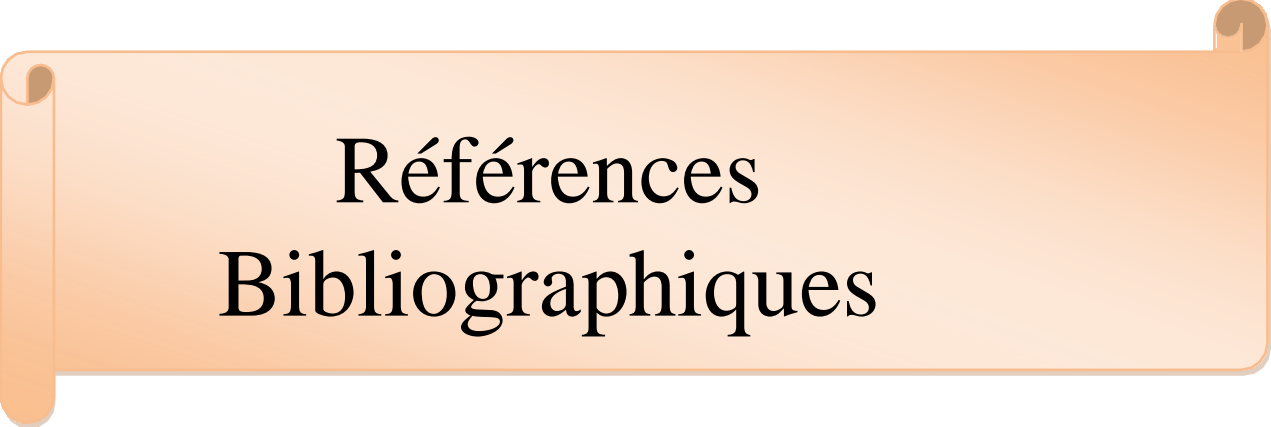
Conclusion

Conclusion

Dans de nombreux pays en développement, l'insuffisance de l'offre de lait nécessite une utilisation accrue du lait en poudre. Le consommateur reconstitue le lait en poudre avec des boissons chaudes, des desserts glacés, du fromage, des yaourts, des produits de boulangerie, des savons et du lait maternisé et des préparations pour nourrissons afin d'en le contenu nutritionnel soit le même que celui des aliments existants. Malgré la température élevée atteinte lors de son traitement, l'industrie laitière a toujours été consciente des risques microbiologiques associés à la poudre de lait. Elle peut être responsable de la transmission de certaines maladies aux consommateurs, comme l'intoxication alimentaire, notamment avec *Salmonella*, *Enterococcus* et *Staphylococcus*.

Le lait en poudre est généralement considéré comme un produit de bonne qualité microbiologique. Cependant, plusieurs facteurs peuvent contribuer à la modification de ses propriétés physiques et chimiques, qui réduisent sa durée de conservation et donc sa valeur commerciale. Les conditions d'hygiène dans lesquelles le lait cru est produit peuvent affecter la qualité du lait en poudre. La température de stockage et le transport peuvent également influencer les propriétés du lait poudre. Il est impératif de n'utiliser que du lait pasteurisé pour préparer du lait en poudre. Les réglementations sur la qualité microbiologique du lait en poudre dans certains pays ont établi des niveaux maximums pour les bactéries mésophiles, les coliformes, les *Staphylococcus* coagulase positive, et les espèces de *Salmonella*. Les efforts des usines laitières pour répondre aux exigences des normes se sont traditionnellement sur l'application de températures élevées afin de réduire les charges bactériennes initiales du lait cru de mauvaise qualité. Cette méthode, cependant, a été associée à une faible qualité de poudre, principalement en ce qui concerne les mauvaises saveurs, les changements de couleur et la stabilité réduite après reconstitution. Il est suggéré que l'application de l'HACCP à chaque étape de la chaîne alimentaire est pertinente pour afin de contrôler la contamination des aliments par divers micro-organismes. En outre, la surveillance microbiologique du lait et des produits laitiers est très importante du point de vue de la sécurité alimentaire.

Cette étude vise à évaluer la qualité microbiologique de la poudre du lait utilisé dans l'usine laitière Arib. Sachant que la partie pratique n'a pas été réalisée à cause des conditions défavorables au niveau de l'usine, aucun résultat relatif à notre étude n'a été obtenu, nous souhaitons que ce travail soit réalisé par d'autres étudiants.

An orange scroll banner with a gradient from light to dark orange, featuring a shadow and rounded corners. The text is centered on the banner.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Abdenouri, N., Ildiman, A., & Kouhila, M. (2008). Etude hygroskopique du lait en poudre. *Revue des énergies renouvelables, Alger*, 35-44.
- Afrin, N., & Shilpi, R. Y. (2018). Bacteriological quality of dry powder milk available in local markets of Bangladesh. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 4(3), 267-273.
- Afroz, H., Sultana, F., Fakruddin, M., Khan, M., Uddin, Z., & Datta, S. (2013). Isolation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from full cream powder milk sold under market conditions at Dhaka , Bangladesh and their antibiotic susceptibility. *Journal of Advanced Scientific Research*, 4(3).
- Ahmed, M. M. M., Hafez, E. E., Mona, A. M., Abdelrassoul, H. A., & Mabrouk, Y. M. (2014). Detection of baby milk powder contamination by microorganisms. *World Applied Sciences Journal*, 30(1), 93-98.
- Ahmed, S., & Anwar, M. N. (2006). Microbial counts of dried powder milk available in local markets of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 23(2), 162- 164.
- Akli, B. (2011). Analyse physico chimique et microbiologique de lait UHT demi-écrémé, centre de formation professionnelle EL Hidhab Sétif Algérie. *BTS en contrôle de qualité dans les industries agros-alimentaires*.
- Anonymous (1997). *Bacillus cereus* Determination in Foods. NKML Method No. 67 4th Edn. Oslo: The Nordic Committee on Food Analysis. [Google Scholar]
- Augustin, M. A., & Clarke, P. T. (2011). Dry milk ingredients. *Dairy ingredients for food processing*, 141.

B

- Benahmed, M., Leguerinel, I., & Moussa-Boudjemaa, B. (2020). Biodiversity, spoilage capacity and heat resistance of mesophilic aerobic spores isolated from milk powders marketed in Algeria. *International Journal of Dairy Technology*, 73(4), 771- 780.
- Benamara, R. N., Ziane, M., & Medjahdi, K. (2016). Characterization of *Bacillus cereus* spores isolated from Algerian processed cheese. *African journal of microbiology research*, 10(30), 1173-1181.

Références Bibliographiques

- Blagoeva, G., Milev, M., Minkova, S., Gotcheva, V., & Angelov, A. (2014). Assessment of lactic acid bacteria and Enterobacteriaceae counts in Bulgarian probiotic products by TEMPO® system and ISO methods. *J. Nutr. Health Food Eng*, 1(5), 29.
- Buehner, K. P., Anand, S., & Djira, G. D. (2015). Prevalence of thermotolerant bacteria and spores in nonfat dry milk powders of Midwest origin. *Journal of dairy science*, 98(5), 2861-2866.
- Buehner, K. P., Anand, S., & Garcia, A. (2014). Prevalence of thermotolerant bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. *Journal of dairy science*, 97(11), 6777-6784.
- Burgess, S. A., Flint, S. H., & Lindsay, D. (2014). Characterization of thermophilic bacilli from a milk powder processing plant. *Journal of applied microbiology*, 116(2), 350-359.
- Burgess, S. A., Flint, S. H., Lindsay, D., Cox, M. P., & Biggs, P. (2017). Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC microbiology*, 17(1), 1-12.
- Burgess, S. A., Lindsay, D., & Flint, S. H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International journal of food microbiology*, 144(2), 215- 225..
- Burke, N., Southern, M., Ryan, A., & Adley, C. C. (2018). Investigating the current skim milk powder inspection strategies for improvements in process optimisation. *Food Control*, 94, 17-21.

C

- Caamaño-Antelo, S., Fernández-No, I. C., Böhme, K., Ezzat-Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2015). Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. *Food microbiology*, 46, 288-298.
- Chandan, R. C., & Kilara, A. (Eds.). (2010). *Dairy ingredients for food processing*. John Wiley & Sons.
- Checinska, A., Paszczynski, A., & Burbank, M. (2015). *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annual review of food science and technology*, 6, 351-369.
- Christiansson, A., Bertilsson, J., & Svensson, B. (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of dairy*

Références Bibliographiques

science, 82(2), 305-314.

- Claus, D. (1986). The genus *Bacillus*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, 1105-1139.

- Coulibaly I., Dubois-Dauphin R., Danthine S., Majad L., MejobT., Destain J., Béraf., Wathelet J.P., Thonart P. Techniques de séchage des starters lactiques et mécanismes affectant la viabilité cellulaire suite à la lyophilisation. 2011..

- CR, F., & Oluwaniyi, T. T. (2015). Microbial composition, antibiotic sensitivity and proximate composition of popular imported powdered infant milk formulas sold in Ado Ekiti, Nigeria.

- Crielly, E. M., Logan, N. A., & Anderton, A. (1994). Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *Journal of applied bacteriology*, 77(3), 256-263.

D

- Damgaard, P. H., Larsen, H. D., Hansen, B. M., Bresciani, J., & Jørgensen, K. (1996). Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Letters in Applied Microbiology*, 23(3), 146-150.

- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., & Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International journal of food microbiology*, 136(3), 318-325.

- De Souza Machado, A. A., Zarfl, C., Rehse, S., & Kloas, W. (2017). Low-dose effects: nonmonotonic responses for the toxicity of a *Bacillus thuringiensis* biocide to *Daphnia magna*. *Environmental science & technology*, 51(3), 1679-1686.

- Deng, X., Li, Z., & Zhang, W. (2012). Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiology*, 30(1), 311-315.

- Dettling, A., Doll, E., Wedel, C., Hinrichs, J., Scherer, S., & Wenning, M. (2019). Accurate quantification of thermophilic spores in dairy powders. *International Dairy Journal*, 98, 64-71.

- Dhakal, R., Seale, R. B., Deeth, H. C., Craven, H., & Turnera, M. S. (2014). Draft Genome Comparison of Representatives of the Three Dominant Genotype Groups of Dairy *Bacillus licheniformis* Strains.

Références Bibliographiques

- Desidério, J. A. (2015). Selection of *B. thuringiensis* strains containing genes effective in the control of *Spodoptera frugiperda*. *Bt Res*, 6, 1-8.

F

- Faille, C., Benezech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., ... & Slomianny, C. (2014). Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. *Food microbiology*, 40, 64- 74.

G

- Gleeson, D., O'Connell, A., & Jordan, K. (2013). Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 217-227.

- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., & Cotter, P. D. (2015). The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in microbiology*, 6, 1418.

- Guinebretière, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., ... & De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology*, 10(4), 851-865.

H

- Hammer, P., Lembke, F., Suhren, G., & Heeschen, W. (1995). Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT-milk: a preliminary report. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 47(4), 297-305.

- Heyndrickx, M. (2011). The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011.

- Hong, H. A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E., & Cutting, S. M. (2009). Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Research in microbiology*, 160(6), 375-379

- Hoton, F. M., Fornelos, N., N'guessan, E., Hu, X., Swiecicka, I., Dierick, K., et al. (2009). Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Environ. Microbiol.* 1, 177–183. doi: 10.1111/j.1758- 2229.2009.00028.x

- Huffman, L. M., & de Barros Ferreira, L. (2011). Whey-based ingredients. *Dairy ingredients for food processing*, 1, 179-198.

Références Bibliographiques

- Husmark, U., & Rönner, U. (1992). The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. *Biofouling*, 5(4), 335- 344.

I

- Indra Pramularsih.2020. Analyse des bactéries totales dans les poudre de lait comparaison des températures d'incubation des tests à Université Massey, Manawatū, New-Zélande, v58, p31-35.

J

- Jackson, S. G., Goodbrand, R. B., Ahmed, R., & Kasatiya, S. (1995). *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in Applied Microbiology*, 21(2), 103-105.
- Jelen, P. (2009). Dried whey, whey proteins, lactose and lactose derivative products. *Dairy powders and concentrated products*, 255-267.

K

- Kalogridou-Vassiliadou, D. (1992). Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. *Journal of dairy science*, 75(10), 2681-2686.
- Karaca, B., Buzrul, S., & Coleri Cihan, A. (2019). Anoxybacillus and Geobacillus biofilms in the dairy industry: effects of surface material, incubation temperature and milk type. *Biofouling*, 35(5), 551-560.
- Kawo, A., & Abdulmumin, F. (2009). Microbiological quality of re-packaged sweets sold in metropolitan Kano, Nigeria. *Bayero journal of pure and applied sciences*, 2(1), 154-159.
- Kelly, D. P., & Wood, A. P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(2), 511-516.
- Kim, B., Bang, J., Kim, H., Kim, Y., Kim, B. S., Beuchat, L. R., & Ryu, J. H. (2014). *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in Korean rice: Prevalence and toxin production as affected by production area and degree of milling. *Food microbiology*, 42, 89-

Références Bibliographiques

94.

• Klijn, N., Herman, L., Langeveld, L., Vaerewijck, M., Wagendorp, A. A., Huemer, I., et al. (1997). Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilisation. *Int. Dairy J.* 7, 421–428. doi: 10.1016/S0958-6946(97)00029-0

L

• Le Scanff, J., Mohammedi, I., Thiebaut, A., Martin, O., Argaud, L., & Robert, D. (2006).

Necrotizing gastritis due to *Bacillus cereus* in an immunocompromised patient.

Infection, 34(2), 98-99.

• Li, F., Hunt, K., Van Hoorde, K., Butler, F., Jordan, K., & Tobin, J. T. (2019).

Occurrence and identification of spore-forming bacteria in skim-milk powders. *International dairy journal*, 97, 176-184.

• Logan, N. A. (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of applied microbiology*, 112(3), 417-429.

• Logan, N. A., & Rodrigez-Diaz, M. (2006). *Bacillus* spp. and related genera. *Principles and practice of clinical bacteriology*, 2, 139-158.

• Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., & Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International journal of food microbiology*, 166(2), 270-279.

M

• Magnusson, M., Christiansson, A., & Svensson, B. (2007). *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *Journal of dairy science*, 90(6), 2745-2754.

• Marucci, S. C. (2015). Interação de proteínas Vip3A e Cry11a10 de *Bacillus thuringiensis* com atividade inseticida a lepidópteros-praga. 2015. iv, 67 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015.

• Mehta, D. S., Metzger, L. E., Hassan, A. N., Nelson, B. K., & Patel, H. A. (2019). The ability of spore formers to degrade milk proteins, fat, phospholipids, common stabilizers, and exopolysaccharides. *Journal of dairy science*, 102(12), 10799-10813.

• Miller, R. A., Kent, D. J., Watterson, M. J., Boor, K. J., Martin, N. H., & Wiedmann,

Références Bibliographiques

M. (2015). Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *Journal of dairy science*, 98(12), 8492-8504.

- Minami, J. I., Soejima, T., Yaeshima, T., & Iwatsuki, K. (2012). Direct real-time PCR with ethidium monoazide: a method for the rapid detection of viable *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *Journal of food protection*, 75(9), 1572-1579.

- Michel J.C., Pouliot M., Richard J. Lait de consommation In : Science et technologie du lait. Vignola C. 3^{ème} édition. Ecole polytechnique de Montréal Canada, 2002. P : 277-316.

- Murphy, S. C., Martin, N. H., Barbano, D. M., & Wiedmann, M. (2016). Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 10128- 10149

N

- Nagat A Elrofaei, Kauther H Elsharif, AmnaYousif Mohamed, Sara Y Ali, Omnia A Mohamed, Ahmed Ali Mustafa. Microbiological Quality of Milk Powder Packed in Sudan and Their Antibiotic Susceptibility. *Am J Biomed Sci & Res*. 2021 - 14(3). AJBSR. MS.ID.001989. DOI: 10.34297/AJBSR.2021.14.001989.

- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A. M., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., ... & Salkinoja-Salonen, M. (2007). Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Veterinary microbiology*, 124(3-4), 329- 339.

O

- Oyeyipo, O. O., Iwuji, C. A., & Owheeli, O. (2012). Public health implication of mycotoxin contaminated pawpaw (*Carica papaya* L) on sale in Nigerian markets. *International Journal of Health Research*, 5(1), 23-27..

P

- Pal, M. (2015). The Complete Book on Waste Treatment Technologies. *Delhi, India: Niir Project Consultancy Services*, 556.

- Pal, M., & Mahendra, R. (2015). *Sanitation in food establishments*. LAP Lambert Academic Publishing.

- Pal, M., Alemu, J., Mulu, S., Karanfil, O., Parmar, B. C., & Nayak, J. B. (2016). Microbial and hygienic aspects of dry milk powder. *Beverage & Food World*, 43(7), 28- 31.

- Pal, M., Asefa, M., Deressa, A., & Muzein, R. (2014). Processed foods and *Bacillus Cereus* poisoning. *Beverage & Food World*, 41(12), 41-43.

Références Bibliographiques

- Pavic, S., Brett, M., Petric, I., Lastre, D., Smoljanovic, M., Atkinson, M., & Ropac, D. (2005). An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 56(1), 20-22.
- Penda N.N., Sow E. 2002. Contrôle de qualité de différentes marques de lait en poudre commercialisé en sénégal. Université Cheikh Anta Dop de Dakar. P : 10, 12,19.
- Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, E., & Priest, F. G. (1996). *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(3), 759-764.
- Phillips, J. D., & Griffiths, M. W. (1986). Factors contributing to the seasonal variation of *Bacillus* spp. in pasteurized dairy products. *Journal of applied bacteriology*, 61(4), 275-285.
- Prescott ,L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (2003). Microbiologie. Edition De boeck Ed. 2ième édition française, 525-526PP.

R

- Rajput, I. R., Khaskheli, M., Soomro, A. H., Rajput, N., & Khaskheli, G. B. (2009). Enumeration of thermoduric and thermophilic spores in commercial repacked milk powder. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(8), 1196-1198.
- Reginensi, S. M., González, M. J., Olivera, J. A., Sosa, M., Juliano, P., & Bermúdez, J. (2011). RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International journal of food microbiology*, 148(1), 36-41.
- Recham, H. (2015). Le marché des industries alimentaires en Algérie. *Revue agroligne*, (97).
- Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. W. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International journal of food microbiology*, 85(1-2), 45-61.
- Roos, Y. H. (2002). Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders. *Le Lait*, 82(4), 475-484.
- Rückert, A., Ronimus, R. S., & Morgan, H. W. (2004). A RAPD-based survey of

Références Bibliographiques

thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International journal of food microbiology*, 96(3), 263-272.

S

•Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., & He, G. (2016). A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China. *International journal of food microbiology*, 217, 200-208.

•Salwa, A.A. and Neimat, A.E. 2014. Safety and quality of some imported milk powder sold in the Egyptian market. *International Journal of Science and Nutrition* 5: 399-406.

Références Bibliographiques

- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., & Heyndrickx, M. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of applied microbiology*, 101(3), 542-555.
- Schuck, P., Bouhallab, S., Durupt, D., Vareille, P., Humbert, J. P., & Marin, M. (2004). Séchage des lactosérums et dérivés: rôle du lactose et de la dynamique de l'eau. *Le Lait*, 84(3), 243-268.
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology*, 6(6), 550- 556.
- Setlow, P. (2014). Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of bacteriology*, 196(7), 1297-1305.
- Shamsuddeen, U., & Ameh, J. B. (2008). Survey on the Possible Critical Control Points during the Production of “Balangu” in Kano. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 76-79.
- Sharma, A., Jana, A. H., & Chavan, R. S. (2012). Functionality of milk powders and milk-based powders for end use applications—a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 11(5), 518-528.
- Skanderby, M., Westergaard, V., Partridge, A., & Muir, D. D. (2009). Dried milk products. *Dairy powders and concentrated products*, 180-234.
- Slepecky R. A., Hemphill H. E. (2006). The genus *Bacillus*—nonmedical. *Prokaryotes* 4 530–562. 10.1007/0-387-30744-3_16[CrossRef] [GoogleScholar]
- Spreer, E. 1998. *Milk and Dairy Product Technology* (1st edn., Chapt. 2). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Stenfors Arnesen, L., Granum, P. E., Buisson, C., Bohlin, J., & Nielsen-LeRoux, C. (2011). Using an insect model to assess correlation between temperature and virulence in *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, 317(2), 196-202.

T

- Terranova W, Blake P A (1978) *Bacillus cereus* food poisoning. *North England journal of Medicine* 298-144.

Références Bibliographiques

• Thorsen, L., Hansen, B. M., Nielsen, K. F., Hendriksen, N. B., Phipps, R. K., & Budde, B. B. (2006). Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5118-5121.

TOURE O., 2001. Contribution à l'étude de la qualité des laits secs micro conditionnés commercialisés sur le marché dakarois. Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 14.

V

• Vaerewijck, M. J. M., De Vos, P., Lebbe, L., Scheldeman, P., Hoste, B., & Heyndrickx, M. (2001). Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *Journal of applied microbiology*, 91(6), 1074-1084.

• VanderKelen, J. J., Mitchell, R. D., Laubscher, A., Black, M. W., Goodman, A. L., Montana, A. K., ... & Kitts, C. L. (2016). Typing and tracking Bacillaceae in raw milk and milk powder using pyroprinting. *Journal of dairy science*, 99(1), 146-151.

• Varga, L. (2007). Microbiological quality of commercial dairy products.

W

• Watterson, M. J., Kent, D. J., Boor, K. J., Wiedmann, M., & Martin, N. H. (2014). Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of dairy science*, 97(4), 2487-2497.

• Wehr, H. M., Frank, J. F., & American Public Health Association (Eds.). (2004). *Standard methods for the examination of dairy products* (pp. 327-404). Washington, DC: American Public Health Association.

• Wiencek, K. M., Klapes, N. A., & Foegeding, P. M. (1991). Adhesion of *Bacillus* spores to inanimate materials: effects of substratum and spore hydrophobicity. *Biofouling*, 3(2), 139-149.

Y

• Yoo, J. G., Chang, J. H., Kim, S. Y., Ji, J. Y., Hong, S. W., Park, B. Y., & Oh, M. H. (2014). Analysis of emetic toxin production by *Bacillus* species using cellular cytotoxicity, molecular, and chromatographic assays. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 19(6), 978-983.

• Yuan, D. D., Liu, G. C., Ren, D. Y., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C. P., ... & Zhang, L. (2012). A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China.

Références Bibliographiques

Food Control, 25(2), 752-757.

Z

•Zain, M. (2018). *Biofilm formation by B. licheniformis isolated from whey protein concentrate 80 powder as a potential source of product contamination: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Food Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand* (Doctoral dissertation, Massey University).

•Zain, S. N. M., Flint, S. H., Bennett, R., & Tay, H. S. (2016). Characterisation and biofilm screening of the predominant bacteria isolated from whey protein concentrate 80. *Dairy Science & Technology*, 96(3), 285-295.

•Zhang, Z., Liu, W., Xu, H., Aguilar, Z. P., Shah, N. P., & Wei, H. (2015). Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1625-1633.



Research Article

Copy Right@ Ahmed Ali Mustafa

Microbiological Quality of Milk Powder Packed in Sudan and Their Antibiotic Susceptibility

Nagat A. Elrofaei¹, Kauther H. Elsharif¹, Amna Yousif Mohamed¹, Sara Y. Ali¹, Omnia A. Mohamed¹ and Ahmed Ali Mustafa^{2*}

¹Biotechnology Department, Faculty of Science and Technology, Omdurman Islamic University, Sudan

²Botany Department, Faculty of Science and Technology, Omdurman Islamic University, Sudan

*Corresponding author: Ahmed Ali Mustafa, Botany Department, Faculty of Science and Technology, Omdurman Islamic University, Sudan.

To Cite This Article: Nagat A Elrofaei, Kauther H Elsharif, AmnaYousif Mohamed, Sara Y Ali, Omnia A Mohamed, Ahmed Ali Mustafa. Microbiological Quality of Milk Powder Packed in Sudan and Their Antibiotic Susceptibility. Am J Biomed Sci & Res. 2021 - 14(3). AJBSR. MS.ID.001989. DOI: 10.34297/AJBSR.2021.14.001989.

Received: 📅 May 13, 2021; Published: 📅 October 01, 2021

Abstract

In this study the microbiological quality of milk powders packed in Sudan has evaluated by method of enumeration of total viable bacteria, *coli* form, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Then the antibiotic susceptibility of pattern bacterial isolates has been assessed. Eight samples of different brands packed in Sudan have collected. The highest total bacterial count (5.3×10^3 cfu/ml) was found in sample no-8, and the lowest one 3.4×10^2 cfu/ml in sample no-4, but they were found free from all other microbes which were tested. Some pathogenic bacteria were isolated from the samples. *Bacillus spp.* was the most prevalent isolate (46.2%) followed by *Streptococcus spp.* (30.8%), *Micrococcus spp.* (15.4%) and *Staphylococcus aureus* (7.7%). All bacterial isolates were found susceptible to Cefuroxime and Ceftriaxone, but they were resistant to Nalidixic acid, Cotrimoxazole and ampicillin. The practice of packing milk powders should discourage as the final products contaminated with consequent public health risk.

Keywords: Milk; Powder; Brands; Antibiotics; Bacteria; Staphylococcus Aureus; Ceftriaxone; Nalidixic Acid; Escherichia Coli; Buttermilk; Lactic Acid Bacteria

Introduction

Milk powder and cream powder are milk products which can be obtained by the partial removal water from milk or cream. One reason for drying milk is to preserve it. Milk powder has a longer shelf life than liquid milk and does not need to be refrigerated, due to its low moisture content. Another reason is to reduce its bulk for economy ease of transportation. Powdered milk and dairy products include such items as dry whole milk, non-fat (skimmed) dry milk, dry butter milk, dry whey products and dry dairy blends. Milk is a part of daily diet for adults (especially expectant and breast-feeding mothers) and growing children [1]. Milk is highly valued because it provides important source of many of the nutrients required for the proper development and maintenance of the human body [2]. Milk is highly nutritious and serves as an excellent growth medium for a wide range of microorganisms contaminating it. The microbial quality of milk and other dairy products influenced of the

initial flora of raw milk, the processing addition, and post-thermal treatment concentration.

Microorganisms that can cause spoilage of dairy products include Gram-negative psychographs, coliforms, Lactic acid bacteria, yeasts, and moulds. Furthermore, various bacteria of public health concern such as *Salmonella spp.*, *Listeria Monocytogenes*, *Compylobacterjejuni*, *Yersinia enterocolitica*, Pathogenic strains of *Escherichia coli* and enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* many also be found in Milk [2,3].

Therefore, the microbiological examination of milk and dairy products cannot be over emphasized. Microbiological quality analysis is crucial for the assessment of quality and safety. Conformation with standards and specifications and regulatory compliance. Pathogen bacteria of public health significance in

milk have been a major concern since the early days of the dairy industry, as many diseases are transmissible via milk products traditionally raw or unpasteurized milk has been giving more attention as a major for transmission of pathogens [1]. According to the standards [4-7]. Whole milk powder should contain more than 10 cfu/gm of coliforms and yeasts and moulds, <1cfu/gm of *E. coli* and 50,000 cfu/gm (maximum) of total bacterial count, and both salmonella and *Staphylococcus aureus* should be absent in 25gm of the product. The consumption of whole milk powder increased in the last few years due to shortage of fresh milk. This situation encouraged some investors import powdered milk in large size bags (25 kg) and repack into small size bags to be distributed in the retail markets. Most plants repack the milk in aluminum bags, while some milk powders are packed metal containers. The study was aimed at evaluating the microbiological quality of milk packed in Sudan and to assess the antibiotic susceptibility pattern of bacteria isolates.

Material and Methods

Sample Collection

A total of eight (8) of milk powder samples 200gm from different commercial brands were purchased from the supermarkets in Khartoum state, Sudan. All the samples were packed (in aluminum foil bags) in Sudan. The milk powder of Nido brand was imported from Netherlands and used as control. The samples were transported to the central Laboratory, Faculty of Agriculture University of Khartoum, Sudan for analysis. The samples were aseptically opened and immediately subjected to microbiological analysis.

Experimental Procedures

Preparation of Milk Samples

A tenfold serial dilution up to 10⁻⁶ for each sample were prepared in 0.1% peptone water was obtained [8].

I Numeration of Total Viable Bacteria

Total plate count was used for enumeration of total viable bacteria. For the determination of TVC, 1 ml of each dilution was transferred using sterile pipette and spreader on plate count Agar sample. The Petri dish was then kept in a cubature at 37°C for 24-48 hours. Following incubation, plates exhibiting 30-300 colonies were counted. The average number of colonies in a particular dilution was multiplied by the dilution factor to obtain the TVC. The TVC was expressed as several organisms of colony forming units per ml (CFU/ml) of samples according to [9].

I Numeration of Total Coliform Bacteria

It was performed by most probable number (NPN) Technique (Harrigan and Mac Cance, 1976) using Mac Con key broth. And

(MPN) value was calculated from a most Probable Number (MPN) table.

I numeration of *Escherichia coli*:

E. coli was enumerated on selective medium Eosin Methylene Blue (EMB) Agar and incubated at 37°C for 24 hours.

I Numeration of *Staphylococcus Aureus*

Enriched samples were streaked on baited parked Agar (BPA) and the plate was incubated at 37°C for 24-48 hours [10].

Numeration Of *Salmonella Spp*: The medium used for salmonella spp. Was Sabouraud Dextrose Agar (SDA). 1ml of each dilution milk sample was transferred using sterile pipette into two tubes of (1) Selenite Cysteine broth inoculated for 24hr at 35°C. (2) Tetrathionate Brilliant Green Broth (TBG) inoculated for 24hr at 42.5 After incubation, broth was streaked onto xylos Lysine. Desoxycholate (XLD) agar and incubated for a further 24 hours at 37°C [11].

Yeast and Moulds Counting Method: The Medium for yeasts and moulds was Sabouraud Dextrose Agar (SDA). 1ml of each dilution milk samples were transferred using sterile pipette on (SDA), using a sterile petri dish for each sample. The dishes were then kept in an incubator at 27°C for 3-5 days [12]. All plates in all experiments mentioned above were in duplicate.

Characterization and Identification of Isolates: Characterization and identification of the isolated bacteria were carried out based on either colonial, morphological or biochemical characteristics with reference to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [13].

Antibiotic Susceptibility Testing: Antibiotic susceptibilities of bacterial isolate were determined according to method recommended by the clinical and laboratory standards institute 2007 [14]. Briefly, inocula were prepared for each bacterial isolate by adjusting the turbidity to 0.5 MC Farland standard and pried on Muller-Hinton agar plates. Antibiotic discs (Himedia and Mumbai, India) were placed on the agar plates and incubated overnight at 37°C for 24 hours. The zones of inhibition were measured and the isolates were classified as sensitive, moderately sensitive, intermediate, and resistant according to CLSI tables and guidelines.

The following antibiotics with the disc strength in parentheses were used:

Ciprofloxacin (5mg), Nalidixic acid (30mg), Cefotaxime (30mg), cefuroxime (30mg), Azithromycin (15mg), Imipenem (10mg), Cephalexin (30mg), Ceftriaxone (30mg), Cotrimoxazole (25mg), Ampicillin (10mg), Erythromycin (15mg). A control strain of *E. coli* ATCC 25922 was included in each plate.

Results and Discussion

Total Viable Bacterial Count

The highest total viable bacterial count (5.3×10^3 cfu/ml) was found in sample no-8 and the lowest one was 3.4×10^2 cfu/ml in sample no-4 compared to the count of bacteria in Nido (3×10) table 1. The variations in the microbial composition of the sample in this study either regards to location may be due to the level of unhygienic environmental conditions and handling of the repacked milk powder milk powder and their multiplication

would however depend on favorable environmental conditions like time, temperature, relative humidity, and duration of storage as well as parameters such as potential water activity (aw), moisture content, nutrients present [15,16]. Total coliforms, *E. coli*, *S. auers*, *Salmonella spp.* and yeasts and molds were not found in all milk powders which have been tested (Table 1), thus, they were considered microbiologically safe. Milk powder is generally considered a product of good microbiological quality [17] it made from good quality milk and containing low microbial count and the moisture content is kept low [18].

Table 1: Microbiological quality of Milk powder of 8 different brands packed in Sudan

Sample	Total viable count (cfu/ml)	Total coliform count (MPN/100ml)	E. coli count (MPN/100ml)	Staphylococcus count (Cfu/100ml)	Salmonella count (cfu/ml)	Yeasts and moulds count (cfu/ml)
1	5.0×10^2	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
2	3.8×10^2	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
3	3.3×10^3	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
4	3.4×10^2	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
5	3.6×10^3	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
6	4.3×10^2	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
7	4.5×10^3	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
8	5.3×10^3	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
9	3×10^3	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil

Key:9=Nido sample (control)

Percentage of Prevalence Bacterial Isolates

Four genera of bacteria have been isolated from the packed milk powder, *Bacillus spp.* was the most prevalence pathogens (46.2%) followed by *Streptococcus spp.* (30.8%), *Micrococcus spp.* (15.4%) and *Staphylococcus aureus* (7.7%). (Table 2). Isolation of *bacillus spp.* is attributed to the presence of them in the environment. In addition, they are spore-forming bacteria, which made them to

survive high temperatures of processing. Also, they are able to inhabit soils and vegetation and have been repeatedly isolated in several countries from wide variety of foods [19,20]. Most strains of *bacillus* are pathogenic for man, affect them incidentally. A notable exception is *Bacillus anthracis*, which caused anthrax in human and domestic animals and *Bacillus thuringiensis*, which caused disease in insects [21].

Table 2: Percentage prevalence of bacterial isolation from milk powders packed in Sudan.

Isolates	No. of isolates	Percentage (%)
<i>Bacillus spp.</i>	6	46.2
<i>Streptococcus spp.</i>	4	30.8
<i>Micrococcus spp.</i>	2	15.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	7.7

Many researchers [22,23] have reported that the presence of *Staphylococcus* and *Streptococcus spp.* were possible contaminants from handlers. *Streptococcus spp.* has been implicated in Human infections like Pharyngitis, scarlet fever, and pneumonia. *Staphylococcus aureus*, a mesophile bacteria have been applicate in food poisoning outbreak of some good material, special interest is the ability of *S.aureus* to elaborate enterotoxins food, which is dangerous to human and other animal health[24]. All bacterial

isolates in this study have a health implication for man except *Micrococcus spp.*, which have not been associated with human infection [25].

Antibiotic Susceptibility Test

All the bacterial isolates were susceptible to cefuroxime and ceftriaxone but were found resistant tonalidixic acid, cotrimoxazole and ampicillin. Varied results of resistance, intermediate susceptible

and moderate susceptibilities are observed with the other tested antibiotics (Table 3). Multiple antibiotics resistance (MAR) has been widely reported in Bacteria [26-28]. Indexes of multiple antibiotics resistance are revealed the spread of resistance in each microbial population, it implied that the strains of such bacteria originate from an environment where several antibiotics are used.

Resistance to antimicrobial agents is a public health threat and increasingly coming a global problem. Also, it limited therapeutic options and lead to increase of mortality and morbidity. Infection with antibiotic resistant bacteria make the therapeutic treatment against infection extremely difficult or virtually impossible in some instances [25] (Table 1-3).

Table 3: Antibiotic susceptibilities of bacterial isolation from milk powder packed in Sudan.

Antibiotics	Disk	Bacterial isolates			
		<i>Bacillus Spp</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Micrococcus Spp</i>	<i>Staphylococcus Spp</i>
Ciprofloxacin	5mg	13®	10®	27(s)	26(s)
.Nalidixic acid	30mg	0	0	0	0
Cefotaxime	30mg	0	17(MS)	21(s)	25(s)
Cefuroxime	30mg	25(S)	24(S)	29(s)	38(s)
Azithromycin	15mg	12®	0	22(s)	24(s)
Imipenem	10mg	10®	21(S)	25 (s)	28(s)
Cephalexin	30mg	0	10®	20 (s)	21(s)
Ceftriaxone	30mg	23(S)	19(S)	32(s)	39(s)
Cotrimoxazole	25mg	0	0	12®	11®
Ampicillin	10mg	0	0	17®	11®
Erythromycin	15mg	0	14(I)	12®	13®

Keys: mg=Micro gram; mm: millimetre; R= Resistant; I= Intermediate; S=Susceptible; MS= Moderately Susceptible; O=No Zone of inhibition.

Conclusions and Recommendation

This study has revealed the presences of pathogenic/toxigenic bacteria in milk powder packed in Sudan, Also the study has explained that development of multiple antibiotics resistance is the major public health threat to consumers, especially in children. And they administered on them during illness. Infections many be prolonged a may even lead to increase in mortality therefore, we recommended the following:

- Improvement of personal hygiene of sellers.
- To use small package of milk powder to reduce the duration of exposure and hence decrease chance of contamination.

Acknowledgment

We are grateful to Department of Biotechnology, Faculty of Science and technology, Omdurman Islamic University, and Department of Botany, Faculty of Sciences and Technology, Omdurman Islamic University, Omdurman, Sudan.

References

- El Khier, M Khalid, Abu El Gasim AY (2009) Quality assessment of milk powders packed in Sudan. Pakistan Journal of Nutrition 8(4): 388-391.
- Deeb AM, Al Hawary II, Aman IM, Shahine DA (2010) Bacteriological investigation on milk powder in the Egyptian market with emphasis on its safety. Global etenaria 4(5): 424-433.
- Rajput I R, Khaskheli M, Kaleri HA, Fazlani S A, Devi K, et al. (2009) Determination of total viable cells and enterobacteriaceae in categorized milk powder. Pakistan journal of nutrition 8 (9): 1493-1496.
- Codex Stan (1999) Codex standard for milk powder and cream powder. Codex stan 207-1999. Codex Alimentarius commission.
- EAS (2006) Dried whole milk and skimmed milk powder-Specification. EAS 49: 2006. East African community standards.
- SDS (2008) Milk powder SDS 2008/108. Sudanese Standards and Methodology Organization, Khartoum, Sudan.
- SVGNS (2004) Standard for milk powders and cream powder. ST Vincent and the Grenadines bureau of standards.
- ICMSF (1978) International Commission on Microbiology for specification for food Microorganism's food. Their significance and Methods of numeration, (2nd Edn) Toronto, Canada University of Toronto press.
- FAO/WHO (1973) Code of principles concerning milk and milk products (7th Edn). Standard for whole milk powder partly skimmed milk powder and skimmed milk powder Vo. A.S. FAO/WHO.
- Jahan M, Rahman M, Parvej, M S Chowdhury Z H, Haque M E, et al. (2015) Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from raw milk in Bangladesh. Journal of Advanced veterinary and Animal Research 2: 49-55.
- Robinson R K (1983) the Microbiology of Milk. Applied science publishers Ltd. London. Dairy microbiology 1: 209-231.
- Houghtby A G, Maturin L J, Koenig E (1992) Microbiological count methods. In Standard methods for the Examination of Dairy products, 16th edition, Ed, RT. Marshal. Washington, DC, American public Health Association 0020 213-246.

13. Holt J G, Krieg N R, Sneath, Staley J T, Williams S T, et al. (1994). Bergey's Manual of Determinative bacteriology, 9th edn. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, M.D.
14. Clinical and Laboratory standards institute (CLSI) (2007) Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing, 17th Informational supplement (CLSI document M 100-S17).
15. Oyeyipo OO, Iwuji C A, Owhoeli O (2012) Public health implication of mycotoxin contaminated paw paw (*Carica papaya* L) on sale in Nigerian markets. International journal of Health research 5(1) 23-27.
16. Ahmed S, Anwar M N (2006) Microbial counts of dried powder Milk availed in local markets in Bangladesh. Bangladesh journal of Microbiology 23(2): 162-164.
17. Fernandes De oliveira, C A Mestieri, L Santos, M V Moreno, Spers A, et al. (2000) Effect of microbiological characteristics of raw milk on the quality of whole milk powder. Brazilian Journal of Microbiology 31: 95-98.
18. USDEC (2001) US Dairy Export council with the collaboration of Dr. N. Farkye, California polytechnic san luis Obispo, Dr. K. Smith, Wisconsin center for Dairy Research and F. Tracy schonrock, Schonconrock consulting.
19. Oyeyi T I, Lum nwi (2008) Bacteriological quality of some street vended foods in Bayero University compuses, Kano, Nigeria. Journal of biological and Environmental Science for the Tropics 5(4): 239-2243.
20. Osuntogun B, Aboaba O O (2004) Microbiological and Physico-chemical evaluation of some non-alcoholic beverages. Pakistan Journal of Nutrition 3(3): 188-192.
21. Terranova W, Blake P A (1978) *Bacillus cereus* food poisoning. North England journal of Medicine 298-144.
22. Shamsuddeen, U, Ameh J B, Oyeyi T I (2008) Survey on the possible critical control point during the production of dambunname in Kano. Journal of biological and Environmental science for Tropics 5(4): 1-5.
23. Kawo A H, Abdulmumin F N (2009) Microbiological quality of re-packaged sweets sold in metropolitan Kano, Nigeria Bayero Journal of pure Applied Science 2(1): 154-159.
24. Wieneke A A, Roberts D, Gilbert R J (1993) *Staphylococcal* food poisoning in the United Kingdom. (1969-1990). Journal of Epidemiology and Infectious Diseases 110(3): 519-531.
25. Falegan C R, Oluwaniyi T T (2015) Microbial composition, antibiotic sensitivity and proximate composition of popular imported powdered infant milk formulas sold in Abo-Ekiti, Nigeria. International journal of Microbiological Genetics and Molecular biology research 1 (1): 10-24.
26. Klein E, Smith D L, Laxminaryan R (2007) Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in United states, 1999-2005. Emerging infections disease 13(12): 1840-1846.
27. Scott K F, Jeff Hageman, Linda K McDougal, Jasmine Mohammed, William R Jarvis, et al. (2003) Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to Vancomycin, United state: 1971-2001. Clin Infect Dis 36(4): 429-439.
28. Foster T (1996) *Staphylococcus*, In: Barrons Medical Microbiology, 4th edition. University of Texas Medical branch ISBN 0-9631172-1-1.

ORIGINAL
RESEARCH

Biodiversity, spoilage capacity and heat resistance of mesophilic aerobic spores isolated from milk powders marketed in Algeria

MERYEM BENAHMED,*^{1,2}  IVAN LEGUERINEL³ and BOUMEDINE MOUSSA-BOUDJEMAA*¹

¹Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire et à l'Environnement (LAMAABE), Faculté des SNV/STU, Université de Tlemcen, BP119, 13000 Tlemcen,, ²Centre universitaire de Ain-Témouchent, route de Sidi Bel-Abbès, N°101, 46000 Ain-Témouchent, Algeria, and ³Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, EA 3882, UMT ALTER'IX, Université de Brest, F-29000 Quimper, France

An analysis of milk powder isolates based on RAPD-M13 and 16SrRNA sequencing has been conducted. Phylogenetic groups were distinguished by panC gene sequencing. An evaluation of the enzymatic activity and heat resistance of representative isolates has also been made. Molecular analysis revealed 17 groups. *Bacillus cereus* groups II, III and IV were the main phylogenetic groups. *Bacillus cereus* and *B. subtilis* groups demonstrated high proteolytic activity along with $D_{95^{\circ}\text{C}}$ values ranging from 1 to 9 min and z-values between 6.5 and 18.6 °C.

Keywords Spore-formers, Mesophilic, *Bacillus*, Enzyme, Milk powder, Heat resistance.

INTRODUCTION

Consumption of milk and dairy products has nutritional benefits for a large part of the population. In recent decades, a significant increase in milk production has been observed worldwide. Thus, there is a growing interest in the production of milk powder to manage overproduction, improve shelf life and make milk available in countries with low production capacity. Dried milk is used in reconstituted and recombined dairy formulations, such as yoghurt, dairy desserts and also as a food ingredient (Sadat *et al.* 2018; Yildiz and Ozcan 2019).

Aside from lipid oxidation, low water activity in milk powder significantly limits microbial growth and enzymatic activities resulting in spoilage curtailment, which in turn causes product defects (Alvarenga *et al.* 2018). It is also worth noting that bacterial spores can remain dormant until they are able to germinate and grow under suitable conditions (Setlow 2014).

The most common bacterial spores identified in dairy powders belong to the genus *Bacillus*. Mesophilic and thermophilic aerobic spores are of particular concern because of their high heat resistance and the thermal stability of their degradation

enzymes (Mehta *et al.* 2019). *Bacillus cereus* groups, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* groups are the most common mesophilic spore-forming species detected in powdered dairy products (Rückert *et al.* 2004; Regimensi *et al.* 2011; Vanderkelen *et al.* 2016; Pinto *et al.* 2018; Eijlander *et al.* 2019).

The role of *B. cereus* as a potential food poisoning agent is well documented. It may produce food poisoning syndromes: emetic and diarrhoeal (Guinebretière *et al.* 2002). At mesophilic temperatures, some facultative thermophiles, such as *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *B. pumilus* can also produce toxins (Burgess *et al.* 2010). In addition to the toxic potential, species from the *B. cereus* and *B. subtilis* groups present an important spoilage potential. They can produce several extracellular enzymes (Mehta *et al.* 2019).

Algeria is a major importer of powdered milk (Barrientos and Soria 2019; Workman 2019). Its dairy industry operates mostly with imported feedstock, mainly skimmed and whole milk powder. Apart from sanitary and hygiene indicator microorganisms, Algerian standards do not indicate any criteria for aerobic spores in milk powders (Ministerial Decree 1999, 2016). When imported powder arrives, it is not subject to any

*Authors for correspondence. E-mails: dr.meryembenahmed@gmail.com (MB) and b.moussaboudjemaa@gmail.com (BM)

control of aerobic spore-forming bacteria. In this aspect, there are no requirements for exporting countries. Some operators often set their own microbiological limits to ensure the technological aptitude of the powders in relation to the products to be manufactured. Indeed, in Algeria, the prevalence of aerobic mesophilic spores forming bacteria in milk powders remains unknown. Presently, there seem to be no data on this subject, which motivated the purpose of this study; that is, to identify the predominant species and biodiversity of mesophilic spore-forming bacteria in imported powdered milk available on the Algerian market. The heat resistance and spoilage potential of identified spore-formers were also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Twenty-one samples of skimmed milk powders and whole milk powders were collected from dairies and the regional veterinary laboratory of Tlemcen (Algeria). The milk powders that were subject to this study were imported from 10 different countries and marketed in Algeria (Table 1). Each sample was labelled and stored at 0–4 °C before further analysis.

Enumeration of microbial populations and selection of isolates

Ten grams of each milk powder sample were reconstituted in 90 mL of sterile Ringer solution diluted to 1/4 (Merck, Darmstadt, Germany) and agitated for 15–20 min in an ice bath. Total mesophilic count was determined by plating 1 mL aliquot of appropriate dilutions on Plate Count Agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Petri dishes were incubated for 24 h at 37 °C. Mesophilic spore-former counts were determined similarly but after a pre-heating treatment of the reconstituted milk (10 min at 80 °C in a water bath). This was followed by plating on Nutrient agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and then an incubation of 24 h at 37 °C (Reginensi *et al.* 2011). The colonies were counted after incubation.

To isolate spore-formers, suitable milk powder dilutions were prepared, pre-heated and spread onto Nutrient Agar medium. After incubation at 37 °C for 24 h, the dishes containing about 30 colonies were selected. From each plate, a maximum of five colonies with different appearance were isolated and spread on nutrient agar.

Isolates genotypic characterisation

DNA extraction

Extraction of bacterial DNA was performed as described by Sambrook and Russell (2001). Total genomic DNA was prepared from 1.5 mL of bacterial strains, which were grown in Brain Heart Infusion (Difco 0037) and incubated at 37 °C for 24 h. Pellets of these strains were obtained by

Table 1 Number and origin of different milk powder samples.

Number	Country	Samples	Type of milk powder
1	Argentina	A	Whole
		B	
		C	
2	France	A	Skimmed
		B	
		C	
3	New Zealand	A	Whole
		B	
		C	
4	Ireland	A	Whole
		B	
		C	
5	Netherlands	A	Whole
		B	
6	Belgium	A	Whole
		B	Skimmed
7	Germany	A	Whole
		B	Skimmed
8	India	A	Skimmed
9	Ukraine	A	Skimmed
10	Denmark	A	Skimmed
Total	Different origins 10		
	Number of samples 21		

centrifugation at 5000 g for 5 min after the addition of 1.5 mL of Tris-EDTA (TE 0.1×). The cell lysis was carried out by adding 0.2 mL of a lysis solution (2.5 mg/mL lysozyme in 10 mM Tris-HCl (pH 7), 20% sucrose) and incubated for 45 min at 37 °C. Then 0.5 mL of the 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 500 µg/mL proteinase K and 1% SDS solution were added and the mixture incubated for 30 min at 37 °C. Proteins were precipitated by the addition of 0.7 mL of the chloroform phenol. The mixture was centrifuged for 20 min at 15 000 g. 0.6 mL of the aqueous phase was subsequently recovered and 200 µL of the 3 M sodium acetate solution, pH 5.2, and 400 µL of isopropyl alcohol were added. After 30 min at –20 °C, the mixture was centrifuged for 10 min at 10 000 g. The pellet was washed with 0.5 mL of 70% ethanol solution and then centrifuged for 5 min at 10 000 g. The genomic DNA was purified using the DNeasy Tissue mini kit and quantified using NanoDrop (Thermo Scientific 2000).

Bacterial identification by 16srRNA gene sequencing

The isolate identification by sequencing the 16SrRNA gene was used to provide real-time PCR results, as well as to investigate the potential presence of other species not targeted by PCR biochips. The colony lysis was realised after a short beating of beads in 200 µL sterile extraction buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM sodium EDTA, pH 8.0). Bacterial

16SrRNA genes were amplified using universal primers w18 and w002 (Godon *et al.* 1997). Purified extracts were sequenced by Biofidal (Vaulx-en-Velin, France). Sequences of at least 600 bp were compared with known sequences in Gen Bank with the advanced gapped BLAST algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Isolate identification was attributed when at least 98% homology was obtained.

Bacillus cereus phylogenetic group discrimination by panC gene sequencing

To distinguish phylogenetic groups of *B. cereus*, the partial sequence of the panC gene was used in the same way as that indicated by Guinebretière *et al.* (2010). The panC PCR amplification was carried out using a first primer set for identification of groups I to VI, i.e. 5'-TYGGTTTTGTGCCAACRATGG-3' and 5'-CATAATCTACAGTGCCTTTCG-3' as forward and reverse primers, respectively. The PCR was carried out in a CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The PCR was performed in a CFX96 (Bio-Rad, CFX96, Marnes-la-Coquette, France) with a first denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 15 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 72 °C, and a final extension of 7 min at 72 °C (Guinebretière *et al.* 2008). To establish strain identity, gene sequences were compared with the available database using a BLAST online tool from the following link (<http://symprevius.eu/software/>).

Isolate screening for enzymatic activity

A semiquantitative test was used to evaluate isolate starch hydrolysis, proteolysis and lecithinase activities. For this purpose, the isolates were first plated on BHI agar and incubated overnight at 37 °C.

Starch hydrolysis

A single colony was streaked on Nutrient Agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) containing 1% starch. After incubation at 37 °C for 24 h, the dishes were covered with lugol (Joffin and Leyral 2001).

Proteolytic activity

A single colony was streaked on milk agar (Nutrient agar containing 5% casein) and then incubated at 37 °C for 48 h.

Lecithinase activity

A single colony was streaked on Trypticase Soy Agar with sterile egg yolk diluted to 1/2 in physiological water (final concentration 10% or 2.5 mL for 25 mL medium) and incubated at 37 °C for 24 h (Joffin and Leyral 2001).

The enzymatic activity index was determined by the width of the lysis zone relative to the width of the colony. A four-point scale was used: (–) was given to plates with no clear zone around the growth. 'Low' was given to plates with the enzymatic activity index ≤ 1.50 ; 'Moderate' was given to plates with the enzymatic activity index between

1.51 and 2.50; and 'High' was given to plates with the enzymatic activity index ≥ 2.50 .

Isolates for heat resistance analysis

Sporulation step conditions

Isolated *Bacillus* strains were first pre-cultivated for 24 h at 37 °C in Brain Heart Infusion (Difco 0037) placed on BHI agar and incubated overnight at 37 °C. This culture was used to inoculate Nutrient Agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 40 mg/L MnSO₄ and 100 mg/L CaCl₂. Plates were incubated at 37 °C for 5–7 days. Spores were then collected by scraping the surface of the agar, suspended in sterile distilled water and washed three times by centrifugation (10 000 g for 15 min) (Bio-block Scientific, Sigma 2-16 PK model). The pellet was re-suspended in 5 mL of distilled water and 5 mL ethanol. The resulting suspension was kept at 4 °C for 12 h in order to reduce the number of nonsporulated bacteria, and washed again three times by centrifugation. The final suspension, containing more than 99% refractive spores, was finally distributed in sterile Eppendorf microtubes and kept at 4 °C (Baril *et al.* 2012).

Estimation of spores' heat resistance

In order to estimate the spores' heat resistance, survival kinetics were determined using the capillary tube method. To do this, 10 μ L of spore suspensions were diluted in 9 mL of nutrient broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). 200 μ L capillary tubes (Hirschman Laborgerate, Eberstadt, Germany) were then filled with 100 μ L spore suspension, sealed, and subjected to a heat treatment at three different temperatures in a thermostatic glycerol/water bath (80/20, V/V). After the targeted heating time, capillary tubes were cooled in a water/ice bath, washed with ethanol, and their extremities were blazed and broken. Lastly, the capillary tube contents were poured into a tube by rinsing with 1 mL Tryptone Salt Broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). The heat sensitivity parameter *z* is the increase in temperature which reduces the heating time by a factor of 10 with the same lethal efficiency (Ball 1923). For studied strains, the thermal inactivation kinetics showed a log-linear relationship between time and heating temperature. The *z*-value corresponds to the negative inverse of slope value and can be calculated as follows:

$$Z = -(t_1 - t_2) / \log(T_1/T_2) \quad (1)$$

RESULTS

Enumeration of microbial population and selection of isolates

Results for the mesophilic spore counts are presented in Figure 1. The spore counts of the milk powders varied from 10² cfu/g, to 10⁴ cfu/g.

Belgian and New Zealand milk powders were the most contaminated, whereas French and Danish powders were the least contaminated.

Isolates' genetic characterisation

All 139 mesophilic isolates were analysed using the RAPD technique along with an identification of 75 representative isolates of distinct RAPD profiles by 16SrRNA gene sequence partial analysis. A dendrogram was constructed from the representative isolates of each RAPD group (Figure 2). The results allowed us to distinguish 17 groups (G1 to G17). Seven of them (G1, G2, G3, G4, G7, G8 and G14) were represented by the *B. subtilis* group (including *B. subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens*), and seven others (G5, G6, G11, G12, G13, G16 and G17) were constituted by the *B. cereus* group. The last three groups (G9, G10 and G15) were multi-species groups.

Species distribution among the milk powder samples is shown in Figure 3. *Bacillus cereus* was the most common species, accounting for 37% of all isolates. It appeared in all 21 tested milk powder samples. *Bacillus cereus* was the most dominant isolate in French, New Zealand and Irish milk powders (Table 2). The discrimination between 24 *B. cereus* isolates by phylogenetic group, according to the Guinebretière *et al.*, 2008 classification, showed three groups: II (1 isolate), III (16 isolates) that contains cytotoxic strains and IV (7 isolates) (Figure 2). These results show the genetic diversity of *B. cereus* isolated from milk powder (Guinebretière *et al.* 2008).

The second most common mesophilic spore-former, *B. amyloliquefaciens*, was present in 17% of all isolates with higher contamination in powders from New Zealand

and Ireland. On the other hand, no *B. amyloliquefaciens* was isolated from Danish, Ukrainian, Argentina or Dutch milk powders.

Bacillus subtilis and *B. licheniformis* were the third most abundant isolates. Each one represented 11% of all tested strains. *Bacillus licheniformis* was present in all milk powder samples except those from Denmark and Argentina. It was the most dominant isolate in powders from India, Ireland and the Netherlands, followed by French milk powder.

Bacillus subtilis was found in more than half of the analysed milk powders. None were isolated from French, Indian, Belgian or Argentinian powders. *Bacillus subtilis* was dominant in Dutch, New Zealand, German and Irish milk powders.

The rest of the profiles represent 24%, of which 10% were represented by *Bacillus* sp. out of all isolates.

Enzymatic activity of isolated mesophilic strains

A test for spoilage enzyme production was performed on 38 isolates. Several specific media were used in order to achieve the tests. The results of the proteolytic, amyolytic and lecithinase activity of all isolates are given in Table 3. Those results showed that 84% of the isolates were positive for proteolytic activity, 36% for amyolytic activity and 44% for lecithinase. Of 14 isolates belonging to the *B. cereus* group (mainly groups III and IV), 92% had proteolytic activity. The higher enzyme activity index ≥ 2.5 was recorded with isolates from Irish milk powder. While moderate proteolytic activity with an enzyme activity index ≥ 1.5 was registered in four powder isolates from France and New Zealand, the remaining isolates had low proteolytic activity. For amyolytic activity, 71% of *B. cereus* isolates were positive, with more than 50% presenting moderate

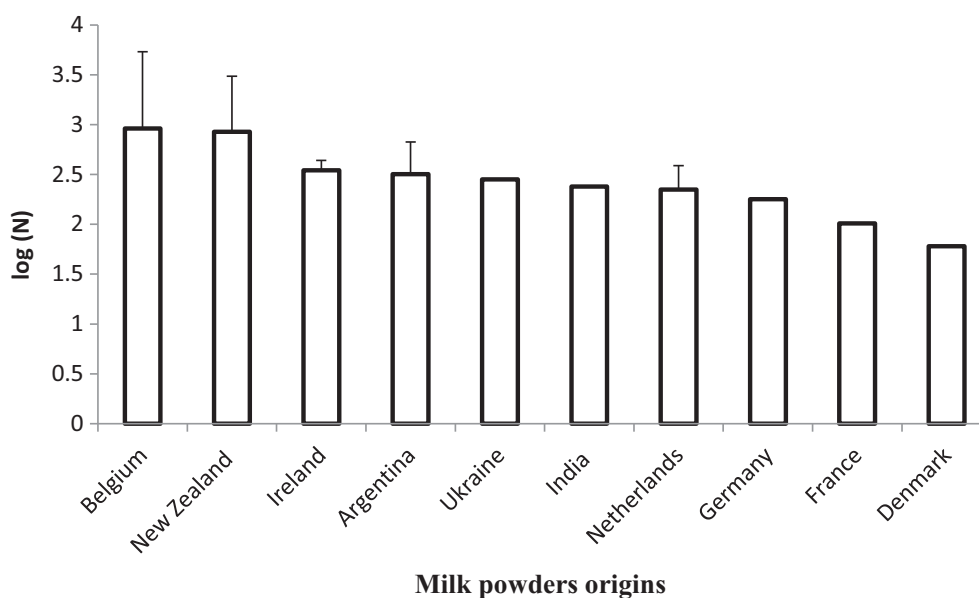


Figure 1 Enumeration of mesophilic spore count of different milk powders imported and marketed in Algeria.

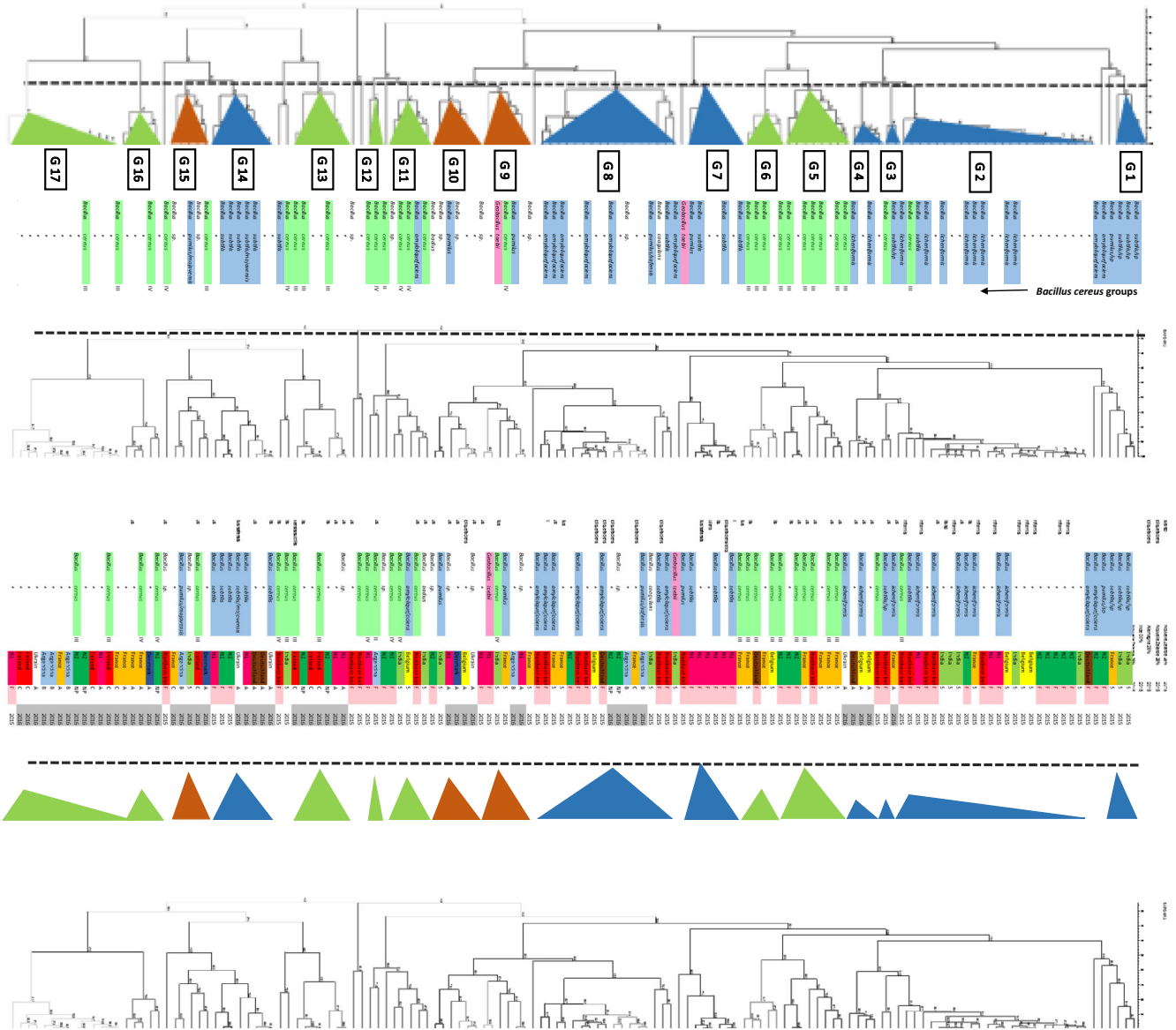


Figure 2 Dendrogram constructed using representative profiles after cluster analysis of RAPD fingerprints of spore-forming isolates derived from imported milk powders marketed in Algeria. The dendrogram was generated using the unweighted pair-group algorithm method with arithmetic averages with correlation levels expressed as percentage values of the Pearson correlation coefficient. The identity level (68%) for different genotype discrimination is represented by a dotted line.

activity. Two isolates from French and Irish powders had high amylolytic activity. For lecithinase activity, 78% of the isolates were positive. Those from French, New Zealand and Indian powders showed the highest activity. Three others had moderate activity and came from French, Indian and Irish powders.

Of 18 isolates belonging to the *B. subtilis* group, 77% had a proteolytic activity. More than half of *B. subtilis* (sensu stricto) obtained from Dutch and Ukrainian milk powders had high proteolytic activity. In total, 16% of the *B. subtilis* group was positive for amylolytic and 22% for

lecithinase activities. Three *B. subtilis* (sensu stricto) isolated from Dutch and New Zealand powders presented moderate amylolytic activity. No lecithinase activity was noted for *B. subtilis*.

Low proteolytic activity was observed for all *B. amyloliquefaciens* isolates and no *B. licheniformis* isolates showed this type of activity. Three *B. amyloliquefaciens* isolates from Irish milk powder had moderate lecithinase activity while *B. licheniformis* had no lecithinase activity. A *Geobacillus toebii* strain isolated from Indian milk powder exhibited low proteolytic activity and no amylolytic or

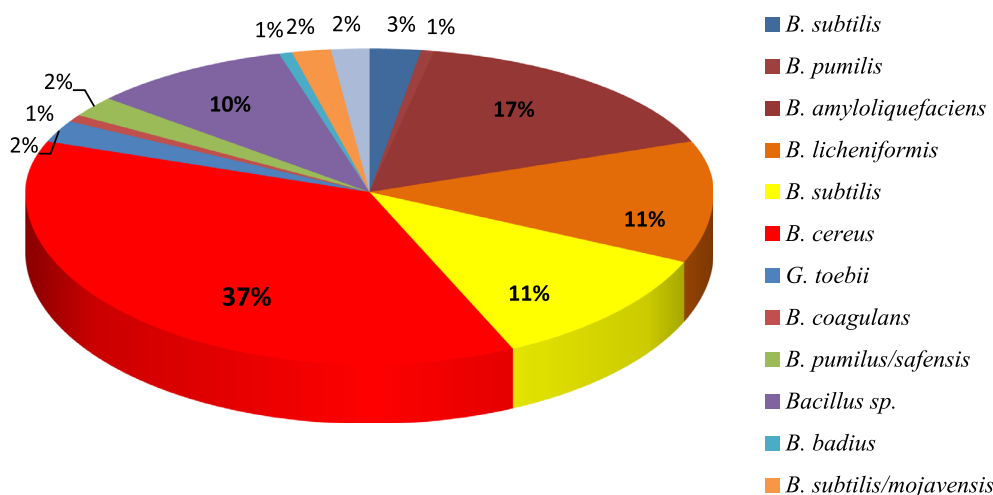


Figure 3 Occurrence of spore-forming isolates in the different milk powders (%).

Table 2 RAPD profile types of mesophilic spore-formers isolated from several milk powders marketed in Algeria.

Isolates	Origins										Total
	India	France	New Zealand	Germany	Belgium	Netherlands	Ireland	Ukraine	Argentina	Denmark	
<i>B. subtilis</i>	2	1	–	–	–	–	1	–	–	–	4
<i>B. pumilis</i>	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	1
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2	3	7	2	4	–	5	–	–	–	23
<i>B. licheniformis</i>	3	2	1	1	2	3	3	1	–	–	16
<i>B. subtilis</i>	–	–	2	2	–	8	2	1	–	1	16
<i>B. cereus</i>	3	12	9	1	2	3	15	1	4	2	51
<i>G. toebii</i>	1	–	–	–	–	2	–	–	–	–	3
<i>B. coagulans</i>	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
<i>B. pumilus/safensis</i>	–	1	–	–	–	–	–	–	1	–	3
<i>Bacillus sp.</i>	1	–	4	–	1	4	1	1	1	1	14
<i>B. badius</i>	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
<i>B. subtilis/mojavensis</i>	–	1	–	–	–	–	–	1	1	–	3
<i>B. pumilis</i>	1	1	–	–	–	–	1	–	–	–	3
Total isolates per origin	15	21	24	6	9	20	28	5	8	3	139

lecithinase activity were noted. Two *Bacillus sp.* isolates from New Zealand and Ukrainian powders had high proteolytic activity while one isolate from Germany showed high amylolytic and lecithinase activities.

Isolated mesophilic spore heat resistance analysis

Seven spores representing the dominant profiles: *B. cereus* (C9, C10 and C11), *B. subtilis* (T6), *B. licheniformis* (L5), *B. amyloliquefaciens* (A1) and *G. toebii* (G1), were selected for the heat resistance analysis. As shown in Table 4, all tested spores were treated at temperatures ranging from 80 °C to 105 °C, reduction times D varied from 183.7 min for *G. toebii* (G1) at 90 °C to 0.96 min for *B. amyloliquefaciens* (A1) at 100 °C.

The heat resistance parameter z varied from 6.54 °C for *B. cereus* (C11) to 18.57 °C for *B. subtilis* (T6).

DISCUSSION

The main objective of this study was to highlight mesophilic spore biodiversity in imported milk powders marketed in Algeria. Milk powders were imported from 10 countries: Argentina, Belgium, Denmark, France, Germany, India, Ireland, the Netherlands, New Zealand and Ukraine. This study is justified by the fact that in Algeria there are no scientific data on this subject and mesophilic spores’ capacity to produce enzymes and their thermal resistance must be checked. On the other hand, it is for the good of every Algerian citizen

Table 3 Proteolytic, amolytic and lipolytic activities of spore-formers isolated from milk powders marketed in Algeria.

Spore-former species	Strain	Powdered milk origin	Proteolytic activity index ^a (R/r)	Amylolytic activity index ^a (R/r)	Lipolytic activity index ^a (R/r)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	A1	France	1.21	0	0
	A2	New Zealand	1.25	0	0
	A3	Ireland	1.21	0	2
	A4	Ireland	1.19	0	1.25
	A5	Germany	1.08	0	1.5
	A6	Ireland	1.3	0	1.5
<i>B. cereus</i>	C1	France	2	2.8	1.22
	C2	New Zealand	2.33	ND	ND
	C3	Ireland	1.12	ND	2
	C4	Ireland	2.5	3	1.22
	C5	Ireland	ND	ND	0
	C6	Ireland	3	ND	0
	C7	India	1.22	2.11	1.63
	C8	France	1.5	2	1.66
	C9	Belgium	1.17	1.5	1.23
	C10	France	1.25	1.77	3.25
	C11	Germany	1.29	1.33	1.15
	C12	New Zealand	1.66	1.55	4.5
	C13	India	1.22	2.11	4
	C14	Argentina	1.36	1.3	1.33
<i>B. licheniformis</i>	L1	France	0	0	0
	L2	Ukraine	0	0	0
	L3	Belgium	0	0	0
	L4	Germany	0	ND	0
<i>B. majavensis/subtilis</i>	M1	Ukraine	2.25	ND	ND
<i>B. pumilis/safensis</i>	P1	Argentina	1.25	0	0
	P2	Argentina	3	0	0
<i>Bacillus</i> sp.	S1	Netherlands	1.18	0	0
	S2	New Zealand	3.1	ND	ND
	S3	Ukraine	3.5	ND	1.22
	S4	Germany	1.5	4	5
	S5	Netherlands	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	T1	New Zealand	1.44	2	0
	T2	Netherlands	3.5	ND	0
	T3	Ukraine	3	ND	0
	T4	New Zealand	1.44	2	0
	T5	Netherlands	3	2.14	0
<i>G. toebii</i>	G1	India	1.15	0	0

◻: No activity observed: Enzymatic activity index = 0; ◻: Low activity: Enzymatic activity index ≤ 1.50; ◻: Moderate activity: Enzymatic activity index between 1.51 and 2.50; ◻: High activity: Enzymatic activity index ≥ 2.50; ND, Not determinate.

^aEnzymatic activity index: width of lysis zone (R) relative to width of colony (r).

to focus the Algerian government's attention on this matter; ideally, convincing the government to set microbial criteria and limits for spore-forming bacteria in milk powders.

The results showed a variation in aerobic mesophilic spore milk powder contamination: 19% of samples showed counts of less than 10² cfu/g, whereas 66% of samples had

a count of between 10³ and 10⁴ cfu/g and 14% of samples had counts greater than 10⁴ cfu/g. The most contaminated samples originated from New Zealand and Belgium, while other samples from these countries had low numbers. Therefore, there was no correlation between the level of contamination and milk powder origin. In general, most samples

Table 4 Heat resistance of representative spore-formers isolated from milk powders marketed in Algeria.

Spore-formers	Milk powder origin	D _T values (min)						Z (°C)	Correlation
		80	90	95	97	100	105		
<i>B. cereus</i> C9	Belgium	78.82	13.46	3.32	–	–	–	11.16	–0.99
<i>B. cereus</i> C10	France	–	25.64	7.22	5.32	–	–	10.00	–0.995
<i>B. cereus</i> C11	Germany	–	6.03	1.04	–	–	–	6.54	–1.00
<i>B. licheniformis</i> L5	Netherlands	–	24.08	3.08	–	6.50	–	17.58	–0.629
<i>B. amyloliquefaciens</i> A1	France	–	15.22	3.83	–	0.96	–	8.34	–1.00
<i>B. subtilis</i> T6	Netherlands	–	16.01	9.24	–	4.64	–	18.57	–0.998
<i>G. toebii</i> G1	Netherlands	–	183.7	52.22	–	6.17	1.09	6.57	–0.996

exceeded (500/g to 1000/g) the tolerance limit for mesophilic spores fixed by the US Dairy Export Council (Watterson *et al.* 2014).

Spore loads in milk powders can be explained by powder's manufacturing conditions and parameters; essentially the heat treatment schedules applied to raw milk which can be more or less intense. The raw milk quality determines the heat treatment intensity which influences milk powder quality characterised by the Whey Protein Nitrogen Index. Evaporating and spray-drying conditions and parameters do not affect the rate of spores in the powders produced (Walstra *et al.* 2006).

In general, acceptable levels of milk powder contamination with spores are not always the same. They are based on each country's national standards and the customer's requirements in each business-to-business relationship. For example, the US Department of Agriculture stated that aerobic colony counts in dairy powders should be 10^4 cfu/g (FSAI 2014), and the Food Safety Authority of Ireland specify 10^5 cfu/g for Irish skimmed milk powder (Burke *et al.* 2018). It has been observed that there is a worldwide focus on developing new standardised methods for spore detection and identification in powdered milk and dairy products (Burke *et al.* 2018; Dettling *et al.* 2019).

Raw milk contamination with spore-forming bacteria occurs mainly on dairy farms (Borreani *et al.* 2019). However, spores isolated from powdered milk are different from those isolated from raw milk (Miller *et al.* 2015).

In this study, 139 isolates were identified by their RAPD profile. The dominant profiles represent four species: *B. cereus*, *B. amyloliquefacien*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*. In contrast with Rückert *et al.* (2004), who analysed milk powders from different countries, it is worth noting the presence of *B. cereus* in all analysed milk powders. It is also worth noting the affiliation of more than 66% of *B. cereus* isolates with the cytotoxic phylogenetic group III according to Guinebretière *et al.* (2008). In accordance with the results of this study and those of Lan *et al.* (2017), the

presence of these contaminants in powdered and raw milk may present a potential risk to the consumer. In this regard, the Algerian Ministry of Trade (2015), has estimated that 10% of milk and dairy products were involved in collective food-borne diseases. However, there is no information in Algeria on the prevalence of *B. cereus* in milk powder. Indeed, it is essential that the Algerian government and dairy producers carefully examine their needs in terms of importing and controlling imported powdered milk (Benamara 2016).

Another notable result is the presence of *B. amyloliquefaciens* in more than half of the analysed milk powders. It is the second most common spore with a rate of 17%. VanderKelen *et al.* (2016) in their study on raw milk and powdered milk suggested that *B. amyloliquefaciens* was less common in such products.

Bacillus licheniformis were present in 19 analysed powdered milk samples. It was also reported in the study by Sadiq *et al.* (2018) in Chinese powdered milk and by Rückert *et al.* (2004) in milk powders from different countries. Due to its ability to grow along the dairy processing continuum, *B. licheniformis* is recognised as one of the most common sporulated species that significantly affects the quality of dairy products, particularly milk powder (Wang *et al.* 2019).

In accordance with the results on New Zealand powders, *B. subtilis* can be found more often in milk powders (Reginensi *et al.* 2011). *Bacillus pumilis*, *B. coagulans* and *B. mojavensis* constituted a minor proportion of all spores. Other studies have also reported that they were minor contaminants in milk powders (Rückert *et al.* 2004; Reginensi *et al.* 2011; Vanderkelen *et al.* 2016). Burgess *et al.* (2017) noted that *G. toebii* can be found in the dairy environment.

With regard to enzymatic activity in this study, *B. cereus* groups III and IV, and the *B. subtilis* group isolated from the different milk powders, showed significant spoilage potential. Enzyme activity can be used as a first indicator of microbial spoilage potential in further milk powder utilisation. Following these results, 92%, 71% and 78% of

B. cereus strains produced protease, amylase and lecithinase, respectively. The fact that 77%, 22% and 16% of *B. subtilis* were positive for proteolytic, lecithinase and amylolytic activities, respectively, is also worth a mention. This is consistent with the results of Mehta *et al.* (2019), which showed that *Bacillus* strains isolated from milk powder and dairy products produce, at different levels, protease and lipase. Cosentino *et al.* (1997) reported that strains from dairy products had high hydrolytic activity on casein, starch and olive oil. The results presented in this study confirm the strong proteolytic activity of *B. cereus* and *B. subtilis*. In contrast with other studies (Lücking *et al.* 2013; Mehta *et al.* 2019), there was no sign of any proteolytic, amylolytic and lecithinase activities by *B. licheniformis*. However, *B. amyloliquefaciens* showed a low proteolytic activity.

Bacillus cereus, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* and *G. toebii* spores' heat resistance was variable. *D* values at 95–100 °C of *B. cereus* spores ranged from 1 to 7 min and *z*-values from 6.54 °C to 11.16 °C. These results agree with those reported by Janstova and Lukasova (2001). *Bacillus cereus* heat resistance varies in function by phylogenetic group. For *B. subtilis*, *D*_{100°C} was 4.64 in accordance with Anses (2011) data which ranged from 2.13 to 13.3 and the *z*-values from 7.4 to 15.7 °C. In the case of *B. licheniformis*, the *D*_{100°C} was 6.49 min, which was similar to the results reported by Lücking *et al.* (2013).

CONCLUSION

In this study, a variation in mesophilic aerobic spore contamination was recorded for most milk powder samples. The predominant profiles isolated were the *B. cereus* group followed by the *B. subtilis* group with *B. amyloliquefacian*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*. The presence of *B. cereus* groups III and IV represents a major threat to the safety of imported powdered milk in Algeria. Moreover, high proteolytic activity of *B. cereus* and *B. subtilis* groups was demonstrated, in contrast to the lecithinase activity which appears to be less important for the tested strains. *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* and *G. toebii* have shown a different thermal sensitivity. The presence of these spores in milk powder forces operators to use more severe heat treatment scales that will affect the quality of the end products. On the other hand, a practical comparison between the results of this study and the standards is not possible because there are no criteria for aerobic spores in milk powder indicated by the Algerian regulations. The levels and types of spore standards allowed in milk powders are not very exhaustive, except in the case of infant formula. For all these reasons, it is important that the Algerian government and professionals must take into consideration this matter concerning the spores' criteria in milk powder transactions. The result of this study suggests

that they must require less spore-laden powders especially for *B. cereus*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by PHC: Tassili. Code: N° 14MDU908 – Campus N31030WD. The assistance and the advice of Drs Florence Postollec – ADRIA Development, Quimper, France and Anne-Gabriel Mathot – LUBEM, Quimper, France, and Drs Imane Ichchou and Fatima Zohra Ghannemi, Tlemcen University, Algeria, are greatly acknowledged.

REFERENCES

- Alvarenga V O, Campagnollo F B, Pia A K R, Conceição D A, Abud Y, Sant'Anna C, Hubinger M D and Sant'Ana A S (2018) Quantifying the responses of three *Bacillus cereus* strains in isothermal conditions and during spray drying of different carrier agents. *Frontiers in Microbiology* **9** 11–13.
- Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) (2011) *Bacillus cereus* (French) [Internet document] URL <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0116Fi.pdf>. Accessed 17/07/2016.
- Ball C O (1923) Thermal process time for canned food. *Bulletin of the National Research Council* **37** 1–76.
- Baril E, Coroller L, Couvert O, Leguerinel I, Postollec F, Boulais C, Carlin F and Mafart P (2012) Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiology* **30** 29–36.
- Barrientos M and Soria C (2019) Dairy, dry whole milk powder imports by country in 1000 MT [Internet document] URL <https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=powdered-whole-milk&graph=imports>. Accessed 16/03/2020.
- Benamara R (2016) *Identification and characterization of Bacillus cereus spores isolated from Algerian cheese*. PhD Thesis, Tlemcen University Algeria.
- Borreani G, Ferrero F, Nucera D, Casale M, Piano S and Tabacco E (2019) Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium* spp. and *Paenibacillus* spp. spores in silage, total mixed ration, dairy cow feces, and raw milk. *Journal of Dairy Science* **102** 8273–8289.
- Burgess S A, Lindsay D and Flint S H (2010) Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* **144** 215–225.
- Burgess S A, Flint S H, Lindsay D, Cox M P and Biggs P J (2017) Insights in to the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC Microbiology* **17** 1–140.
- Burke N, Southern M, Ryan A and Adley C (2018) Investigating the current skim milk powder inspection strategies for improvements in process optimisation. *Food Control* **94** 17–21.
- Cosentino S, Mulargia A F, Pisano B, Tuveri P and Palmas F (1997) Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **38** 235–238.
- Dettling A, Doll E, Wedel C, Hinrichs J, Scherer S and Wenning M (2019) Accurate quantification of thermophilic spores in dairy powders. *International Dairy Journal* **98** 64–71.

- Eijlander R T, Hekezen R V, Bienvenue A, Girard V, Hoonstra E, Johnson N B, Meyer R, Wagendorp A, Walker D C and Wells-Bennik M H J (2019) Spores in dairy – new insights in detection, enumeration and risk assessment. *International Journal of Dairy Technology* **72** 303–315.
- FSAI (2014) *Guidelines for the Interpretation of Results of Microbiological Testing of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market (Revision1)*. Dublin, Ireland: Food Safety Authority of Ireland.
- Godon J J, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F and Moletta R (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **63** 2802–2813.
- Guinebretière M, Broussolle V and Nguyen-The C (2002) Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **40** 3053–3056.
- Guinebretière M, Thompson F L, Sorokin A *et al.* (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology* **10** 851–865.
- Guinebretière M, Velge P, Couvert O, Carlin F, Debuysse M and Nguyen-The C (2010) Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *Journal of Clinical Microbiology* **48** 3388–3391.
- Janstova B and Lukasova J (2001) Heat resistance of *Bacillus* spp. spores isolated from cow's milk and farm environment. *Acta Veterinaria Brunensis* **70** 179–184.
- Joffin J N and Leyral G (2001) *Microbiologie technique: Dictionnaire des techniques*, 3rd Ed. pp 163–164. Bordeaux: CRDP d'Aquitaine.
- Lan X, Wang J, Zheng N, Zhao S, Li S and Li F (2017) Prevalence and risk factors for *Bacillus cereus* in raw milk in Inner Mongolia, Northern China. *International Journal of Dairy Technology* **71** 269–273.
- Lücking G, Stoeckel M, Atamer Z, Hinrichs J and Ehling-Schulz M (2013) Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology* **166** 270–279.
- Mehta D S, Metzger L E, Hassan A N, Nelson B K and Patel H A (2019) The ability of spore-formers to degrade milk proteins, fat, phospholipids, common stabilizers, and exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science* **102** 10799–10813.
- Miller R A, Kent D J, Watterson M J, Boor K J, Martin N H and Wiedmann M (2015) Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *Journal of Dairy Science* **98** 8492–8504.
- Ministère du commerce (1999) Ministerial Decree of 27 October 1999 on the microbiological specifications of certain foodstuffs. <https://www.commerce.gov.dz/reglementation/arrete-interministeriel-du-24-janvier-1998>. Accessed 03/01/2020
- Pinto C L O, Souza L V, Meloni V A S, Batista C S, Silva R, Martins E M F, Cruz A G and Martins M L (2018) Microbiological quality of Brazilian UHT milk: identification and spoilage potential of spore-forming bacteria. *International Journal of Dairy Technology* **71** 20–26.
- Reginensi S M, González M J, Olivera J A, Sosa M, Juliano P and Bermúdez J (2011) RAPD based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International Journal of Food Microbiology* **148** 36–41.
- Rückert A, Ronimus R S and Morgan H W (2004) A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International Journal of Food Microbiology* **96** 263–272.
- Sadat A, Ezzatpanah H and Bakhoda H (2018) Rheological properties of instant milk-based puddings prepared with emulsifying salt-containing milk powders. *International Journal of Dairy Technology* **71** 791–800.
- Sadiq F A, Flint S and He G (2018) Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. *International Dairy Journal* **85** 159–168.
- Sambrook J and Russell D W (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 1st Ed. Chap 1, *Essentials*, pp. 1–78. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Setlow P (2014) Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of Bacteriology* **196** 1297–1305.
- Vanderkelen J J, Mitchell R D, Laubscher A, Black M W and Goodman A L (2016) Typing and tracking Bacillaceae in raw milk and milk powder using pyroprinting. *Journal of Dairy Science* **99** 146–151.
- Walstra P, Wouters J T M and Geurts T J (2006) *Dairy Science and Technology*, 2nd Ed. Chap 20, *milk powders*, pp. 513–535, London, New York: Taylor & Francis group.
- Wang N, Yuana L, Sadiq F A and Hea G (2019) Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* metabolites against biofilm formation by *Bacillus licheniformis* isolated from milk powder products. *Food Control* **106** 31–106721.
- Watterson M J, Kent D J, Boor K J, Wiedmann M and Martin N H (2014) Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of Dairy Science* **97** 2487–2497.
- Workman D (2019) Top milk imports by country [Internet document] URL <http://www.worldstopexports.com/international-markets-for-imported-milk-by-country>. Accessed 16/03/2020.
- Yildiz E and Ozcan T (2019) Functional and textural properties of vegetable-fibre enriched yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* **72** 199–207.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/305403150>

Microbial and Hygienic aspects of Dry Milk Powder

Article · January 2016

CITATIONS

24

READS

23,710

6 authors, including:



Mahendra Pal

Narayan Consultancy on Veterinary Public Health and Microbiology Anand India

604 PUBLICATIONS 3,198 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Jemberu Alemu

Gambella University

13 PUBLICATIONS 43 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Bhupendra Parmar

Anand Agricultural University

36 PUBLICATIONS 114 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



J.B. Nayak

Veterinarian college Anand Gujarat Kamdhenu University University

45 PUBLICATIONS 367 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Narayan Consultancy to give free technical expertise in Veterinary Mycology to the scientists, especially of poor resource nations [View project](#)



Remove heavy metals from the body naturally [View project](#)

Microbial and Hygienic aspects of Dry Milk Powder

Mahendra Pal*, Jemberu Alemu*, Selamawit Mulu*, Olga Karanfil** B.C.Parmar***, J. B. Nayak***

*Dept. of Microbiology, Immunology & Public Health, College of Veterinary Medicine and Agriculture, Addis Ababa University, P. B. 34, Debre Zeit, Ethiopia

**Ethiopian Meat and Dairy Industry Development Institute, P.B.1573, Debre Zeit, Ethiopia

***Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Science, Anand Agricultural University, Anand-388001, Gujarat, India
E-mail: Prof.Mahendra Pal: Email: palmahendra2@gmail.com

ABSTRACT

Many types of food products are prepared chiefly from the milk of cows, and also from the milk of other dairy animals. Some of the products, such as butter, cheese, dry milk powder, ice cream, and yoghurt are available worldwide. Converting milk into milk powder increases its shelf life, and enables it to be stored for extended period without substantial loss of quality, even at ambient temperatures. As we live in microbial world, there are ample opportunities for the milk to get contaminated at any stage of food chain. Microbes such as Aspergillus, Bacillus, Enterococcus, Micrococcus, Mucor, Penicillium, Rhizopus, and Streptococcus can cause spoilage of dried milk powder. High microbial load in milk and dairy products leads to spoilage, and economic losses to the producers. There are about 250 food-borne pathogens, which are implicated in food-borne illness resulting into considerable morbidity and mortality among consumers. Hence, microbial safety is an essential public health issue of developing as well as developed nations. The pathogens such as Escherichia coli, Listeria monocytogenese, Salmonella, and Shigella must be absent in dried milk powder. Microbiological and molecular techniques are employed to identify the organisms from dairy products. It is emphasized that good manufacturing practices with careful attention to quality of incoming milk, training of milk suppliers, and plant workers, temperature control, hygienic conditions, and sanitation of equipment and processing plants will significantly reduce the contamination with microbes. Furthermore, all government should start food safety policy with the objective of reducing food-borne illness among the consumers.

Key words: Dry milk powder, Good manufacturing practice, Hygienic aspects, Microbiological quality, Organisms, Public health, Sanitation

INTRODUCTION

Milk and dairy products being very rich in several nutrients, are relished by everybody throughout the world. In India, a wide variety of milk products are easily available in the market (Pal and Jadhav, 2013). Milk powder is made by removing water from liquid milk. Removing water is

necessary to reduce water activity for the prevention of microorganism growth. Dry milk is used to produce several products, such as cheese, ice cream, yoghurt, and whey powder. There are a multitude of products derived from dried milk. Moreover, the advantages of dry milk over liquid milk are better keeping quality, less storage space, and low shipping costs (Robert *et al.*, 2015).

Since antiquity drying is recognized as the method of preserving various foodstuffs, as it depletes the water necessary for the growth of microbes. According to Marco Polo's accounts of his travels in Asia, Mongolians produced milk powder by drying milk in the sun. Today, the milk powder is produced on a large scale in modern dairy plants. Skim milk powder has a maximum shelf life of about 3 years where as whole milk powder has a maximum shelf life of about 6 months (Flegam and Oluwaniyi, 2015).

The dairy based powders are not only used for recombination or reconstitution, but they can be exploited for their intrinsic functional properties for application as a food ingredient in several value-added foods, such as confectionery, bakery, and meat products. Knowledge and a basic understanding of the functional properties of milk powder will enable food processors to prepare value-added milk based powders. Powdered ingredients are stable and convenient for storage, and since the consumer never sees the food assembly process, any prejudices concerning the lower quality associated with dried ingredients is removed (Carlos *et al.*, 2000).

In recent days, there is great emphasis on adding value to powders, and therefore, an inclusive effort from dairy plant and powder processors, ingredient people, marketing experts is requisite to identify the means to add more value. Consumers are willing to pay more for milk powders if they can perceive high functionality and quality, as well as multifunctional properties. The thermophilic organisms can have significant economic consequences when they exceed specification limits, and may result in down grading of the products. As these have ability to produce extremely heat resistant spores, and thus are important source of pre- and post-pasteurization (Anup and Rupesh, 2012). The important quality parameters for milk powder are microbiological quality, and sensory characteristics, beside physical and chemical properties, which are mainly concerned with the content of moisture, fat, total protein, and non-protein nitrogen, lactose, titratable acidity, ash, and other nutrients such as calcium (Laszlo, 2007).

This paper is dedicated to late Dr. Martin Kaplan, who became the First Chief of the Veterinary Public Health in the World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Low water content (maximum 5%) of dried milk acts as an inhibitory factor with respect to any bacterial spores or vegetative cells that have survived the drying process. The microflora of dried milk powder depends on many factors including the number and type of bacteria present in the raw milk or milk byproducts, preheating temperatures, operating conditions of the evaporator, and dryer and plant hygiene. High numbers of microorganisms in the raw milk may result high numbers in the milk powder, and the decline in numbers as a result of exposure to heat, is offset by the removal of water in the powder (Ron *et al.*, 2006). Microbes are present everywhere, and hence, it is very likely and very easy for organisms to contaminate our food (Pal and Mahendra, 2015). Improper cleaning and sanitation of dairy equipments will lead to food poisoning due to contamination by microbes (Pal and Mahendra, 2015). Many microbes, which include bacteria (*Alkaligenese*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Hafnia*, *Micrococcus*, and *Streptococcus*), and fungi (*Aspergillus*, *Mucor*, and *Penicillium*) can cause spoilage of dried milk powder (Pal and Jadhav, 2013). Very recently, *Aspergillus fumigates*, *A.flavus*, *A.niger*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* and *Rhizopus* has been isolated from dry milk powder on APRM medium (M.Pal Personnel Communication). The microbial counts of dried milk powder has been reported by Salahudin and Naural (2006). The knowledge of microbes and their evolution is highly imperative to ensure safety and quality of dairy products. It is pertinent to mention that simple, easy, and low cost methods should be developed to detect the spoilage producing microbes in milk and milk products. Such methods will be very beneficial to poor resource countries, who may not easily afford expensive techniques.

Post processing contamination is a major factor impacting on contamination of milk powder as the raw material is often subjected to lethal temperature, which eliminates vegetative cells of pathogens. Milk powder outbreaks demonstrate that failure in preventive systems such as presence of water allowing microbial multiplications or presence of zones difficult to maintain and to clean (isolation from a drying tower) were the origin of contamination. In other cases, illness has been done due to contamination, and also abuse of reconstituted products (Ahmed *et al.*, 2014).

Microbial pathogens of major concern in both dried and infant milk formula includes *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*. These organisms may remain viable in milk powder for long period of time, and resume growth when the powder is reconstituted and stored at favorable temperature (Hafsa *et al.*, 2013). Many infectious diseases of multiple etiologies are potentially transmissible through milk (Pal, 2007). Milk may be contaminated through infected cow having tuberculosis, brucellosis, and mastitis and also from human carrier having typhoid fever, diphtheria, dysentery, and scarlet fever. It is mentioned that dairy cattle and their farm's environments contain *Listeria*, *Salmonella*, and pathogenic *Escherichia coli*. Consumption of raw or inadequately pasteurized milk is also associated with toxin-producing *E. coli*, *Salmonella* and *Listeria monocytogens* (Ahmed *et al.*, 2014). *Staphylococcus aureus* can also present in the cows udder and teats, and consequently contaminate the milk (Pal, 2001). However, it is recommended by the Codex Alimentarius Commission that all milk and liquid product should be pasteurized prior to

concentration before drying, but inadequate pasteurization may facilitate the survival of bacterial pathogen in dried milk. It is imperative to monitor every step of food production, from handling of raw products to preparation of finished foods.

No recent data are available in many countries about the microbiological quality of dried milk powder, however, some reports are available on the prevalence of microbial contamination of liquid milk and milk product. Therefore, this communication is designed to know hygienic and microbial aspects of dry milk powder.

MICROBES IN DRIED MILK POWDER

Salmonella

Salmonellae are Gram negative, small, non-spring, facultative anaerobic bacilli, which are readily destroyed by heat pasteurization of foods (Pal *et al.*, 2015b). As the water activity is reduced by addition of solutes or by removal of water, heat resistance increases markedly. In foods such as chocolate, several seconds at 105°C may be required to reduce *Salmonella* counts by 1 log cfu/g. There is a high probability of infections at doses of > 10⁵ cells but in foods containing high levels of fat and/or protein, such as chocolate, salami and cheddar cheese, infection can result from ingesting as few as <10 – 100 cells (Azza *et al.*, 2010). Globally, *Salmonella* infections cause about 93.8 million cases of gastroenteritis, and 155,000 deaths every year (Pal *et al.*, 2015b). Outbreaks of salmonellosis are generally caused by inadequate control of cooking temperatures, cross-contamination after cooking, slow rates of cooling, and poor refrigeration. Often implicated in outbreaks are improperly cleaned mass or domestic catering facilities, and involve raw milk, poultry, meat or eggs but also fresh produce, and dry foods as sources of the pathogen. Low level contamination of powdered infant milk formula with *Salmonella* has been associated with infection in infants (Salwa and Neimat, 2014).

Bacillus

Some strains of *Bacillus cereus* and, very rarely, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* can produce one or two types of toxins. Heat stable emetic toxin (cereulide) is produced by *B. cereus* in foods. Diarrhoeagenic toxin is produced only during growth in the gastrointestinal tract. *Bacillus cereus* spores survive in dry foods such as rice cereal, and in dry food processing environments for long periods of time, and can germinate and grow in reconstituted (rehydrated) products that are not properly processed or stored (Kithar *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2014a). *Bacillus cereus* is able to produce spores that can survive pasteurization, and survive the manufacturing process of powdered milk. It represents a problem when powdered milks are reconstituted and stored for prolonged periods at incorrect temperatures. Most *B.cereus* strains isolated from dairy products are able to grow, and produce toxins below 10°C. *Bacillus cereus* is the cause of two kinds of food-borne disease: an emetic (vomiting) intoxication due to the ingestion of a toxin (cereulide) preformed in the food and diarrheal infection due to the ingestion of bacterial cells/spores which produce enterotoxins in the small intestine (Pal *et al.*, 2014a). Although there is very little epidemiological evidence linking *B.cereus* to illness to infants, diarrhoea is a significant cause of ill health and death among infants, and children in developed countries (Robert *et al.*, 2015).

Thermostable *Staphylococcus aureus* enterotoxins

Thermostable *Staphylococcus aureus* enterotoxins are considered as one of the most prevalent cause of gastroenteritis worldwide, in which major symptoms are vomiting and diarrhoea occurs after ingestion of one or more preformed thermostable staphylococcal enterotoxins in food contaminated with *S. aureus* (Pal, 2001). In USA, 1 to 2 million cases of staphylococcal food poisoning is recorded every year. Staphylococcal enterotoxins are normally no or only slightly inactivated during food processing, storage, distribution or during the preparation of the food in kitchen. Therefore, if enterotoxigenic staphylococci are able to grow in food to high numbers (more than 10^5 to 10^6 cfu/g or ml) before they are killed. There is still a risk for intoxication with consumption of dried milk (Hafsa *et al.*, 2013).

S. aureus is particularly relevant to dried foods due to its tolerance of low water activity. *Staphylococcus aureus* is salt tolerant and can grow aerobically at water activity 0.83, although toxin formation has been recorded only at water activity e^a 0.87. Salted and cured food products, including ham, hard cheese and salami, and especially in foods where fermentation or drying have been delayed or in natural fermentations where starter cultures are not used, are at risk of staphylococcal growth, and toxin production. *Staphylococcus aureus* cannot grow at temperatures $<10^\circ\text{C}$, so control is best effected by adequate refrigeration (Glaya *et al.*, 2014).

Clostridium botulinum

Clostridium botulinum, an anaerobic, sporulated, Gram positive bacterium, is an important cause of food-borne disease. It may give rise to infant botulism, a toxico-infection, whereby low numbers of spores germinate in the gastrointestinal tract and produce toxin. Isolates of *C. botulinum* are cultured from milk. A case of infant botulism was associated with the consumption of reconstituted infant formula milk powder. Consuming low levels of *C. botulinum* spores can rarely pose a health issue to individuals older than one year old, unless they are devoid of intestinal microflora. As a matter of fact, children, and adults consume *C. botulinum* spores without ill effect when eating foods such as honey, vegetables that grow in or near the ground (such as carrots and potatoes), or smoked fish. Similarly, low numbers of clostridial spores in dried milk products or other dried foods do not present a health risk. A problem could occur if the product is rehydrated, and kept anaerobic at non-refrigeration temperatures, allowing the *C. botulinum* spores to germinate, grow, and produce neurotoxins. Hence, low acid foods are protected by canning to kill spores or through proper formulation or strict temperature control to prevent growth/toxin production (Pal *et al.*, 2014b).

However, infants less than one year old without a well-developed normal intestinal flora could contract infant botulism, if they ingest a sufficient number of spores from the environment, honey, or rarely, in infant formula. Children ages between 2 to 32 weeks of age appear to be at greatest risk; 99% of cases occur in children less than 1 year old and 94% of the cases occur in children less than 6 months old. As whey protein is used in infant formula, this recent report of *C. botulinum* spores is of particular concern to manufacturers of infant foods, and the dairy plants. *Clostridium botulinum* spores have also been detected in low numbers in milk, and it is believed that these originate

from the silage or bedding the animals were exposed to or the feces of infected cattle. Effective cleaning of udders prior to milking can significantly reduce spore counts in milk spores, including *C. botulinum*, and the spores can survive pasteurization and drying procedures, and can survive for very long periods of time in dried milk products (Ron *et al.*, 2006; Salwa and Neimat, 2014).

Clostridium Perfringens

Clostridium perfringens is a Gram positive, spore forming, anaerobic organism. Spores of *C. perfringens* can be found in soils and in the intestinal tracts of vertebrates (Pal, 2015). They survive well in dust and on surfaces and are resistant to routine cooking temperatures. Spores of *C. perfringens* have been found in powdered infant milk. Sporulation of large numbers of vegetative cells of *C. perfringens* in the gastrointestinal tract can result in the production of an enterotoxin, and the symptoms such as diarrhoea, abdominal cramps, and sometimes nausea may start 8 to 24 hrs after eating the food (Pal, 2015).

***Cronobacter* Species**

Cronobacter spp. formerly known as *Enterobacter* are opportunistic pathogens for vulnerable neonates, with infants becoming infected following the consumption of contaminated reconstituted powdered infant formula, a food that is most often based on dried milk powder. *Cronobacter* has been detected in several dry food processing facilities, on food contact surfaces and in retail bakeries. There is evidence for strains persisting in some of these environments. Because *Cronobacter*, like other *Enterobacteriaceae*, can survive the spray-drying process control in the production environment can be achieved through a combination of several measures including pasteurization prior to concentration and spray drying and control of the microbial ecology of the manufacturing facility (Carlos *et al.*, 2000).

Enteric Viral Pathogens

Viruses are increasingly being recognized as important etiological agents in outbreaks of food-borne illness in humans. Enteric viruses are a group of viruses that enter the body through the GI tract and are shed in the faeces. These viruses are important because they can enter the food chain via the faecal-oral route. Norovirus and hepatitis A virus are the most commonly recognized viral agents linked to food-borne illness in humans. Enteric viruses, including hepatitis virus, poliovirus, and coronavirus, are often spread by cross-contamination from infected individuals. Several of these viruses have been shown to adhere strongly to food contact surfaces and to fresh produce (Robert *et al.*, 2015). Poor sanitation and hygienic conditions in food industries can result into contamination of food (Pal and Mahendra, 2015).

Mycotoxigenic Moulds

Various mycotoxins including aflatoxins, ochratoxins, and fumonisins have been detected in a range of dry products, such as maize, rice, spices, coffee, cocoa, peanuts, tree nuts, seeds and dried fruits (Pal *et al.*, 2015a). Damaged, mould-infested peanuts stored in humid environments may pose a serious risk to consumers, as heat treatment is not always effective in destroying aflatoxins. Carryover of mycotoxins from raw commodities to dry products, and fermented beverages is a public health concern. Aflatoxins

produced by *Aspergillus flavus*, and *A.parasiticus*, are carcinogenic, mutagenic, and teratogenic (Pal *et al.*, 2015a). The ingestion of aflatoxin B1 in feedstuffs by the dairy animals lead to the excretion of aflatoxin M1 in the milk and milk products (Pal *et al.*,2015a).

Hygienic Aspects of Dried Milk Powder

Hygienic quality of dried milk powder can be maintained by observing the following steps (Pal, 2012).

1. It is important to mention that high microbial quality of raw milk must be used for the manufacturing of dried milk powder.
2. Roller drying is found effective as it kills most of the microbes.
3. Evaporators should be properly cleaned and sanitized as they may act as potential source of microbial contamination
4. Drying room should be maintained in highly sanitary conditions to prevent the contamination of the powder
5. Filtered air should be supplied for the driers, conveyers, cooling and air sweeping processes. Therefore, filter pads need periodical cleaning to remove the accumulated dust.
6. All vacuum pans, pipelines, concentration tank, packaging room, and storage container must be thoroughly cleaned and sanitized.

CONCLUSIONS

In many developing countries, the shortage in the milk supply requires increasing use of milk powder. The consumer reconstitutes the milk powder with hot beverages, frozen desserts, cheese, yoghurt, bakery products, soaps, and infant formula to make the nutritional content the same as the existing food. In spite of the high temperature attained in its processing, the dairy industry has always been conscious of the microbiological hazards associated with milk powder. It may be responsible for transmission of some diseases to the consumers, as food poisoning, especially with *Salmonella*, *Enterococcus*, and *Staphylococcus*.

Milk powder is generally considered a product of good microbiological quality. However, several factors may contribute to changes in its physical and chemical properties, which reduce shelf-life and thus its commercial value. The hygienic condition under, which raw milk is produced, can affect the quality of milk powder. Storage temperature and transportation may also influence the properties of milk powder. It is highly imperative that only pasteurized milk should be used to prepare died milk powder.

The regulations on microbiological quality of milk powder in some countries have established maximum levels for mesophilic bacteria, coliforms, *Staphylococcus* coagulase positive, and *Salmonella* species. Efforts of dairy plants to meet standard requirements have traditionally concentrated on applying high temperatures in order to reduce initial

bacterial loads of poor quality raw milk. This method, however, has been associated with low powder quality, mainly with respect to off-flavors, color changes and reduced stability after reconstitution. It is suggested that application of HACCP at each stage of food chain is pertinent in order to check the contamination of food from various microorganisms. Moreover, microbiological monitoring of milk and dairy products is highly emphasized from food safety point of view.

ACKNOWLEDGEMENT

We are very grateful to Prof.R.K.Narayan for going through our manuscript and giving his constructive suggestions.

REFERENCES

- Ahmed, M.M.M., Hafez, E.E., Mona, M.H, Hagar, A. A. and Mabrouk, Y.M. 2014. Detection of baby milk powder contamination by microorganisms. *World Applied Sciences Journal* 1: 93-98.
- Anup, S., Atanu, H. J. and Rupesh, S.C. 2012. Functionality of milk powders and milk-based powders for end use applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 1-11.
- Azza, M.M., Deeb,I.I., Al-Hawary, I.M and Doaa, M.H.A. 2010. Bacteriological investigation on milk powder in the Egyptian market with emphasis on its safety. *Global Veterinaria* 4: 424-433.
- Carlos, A.F.O., Lucinéia, M., Marcos, V.S., José, F.M., Aleksandrs, S. and Pedro, M.L.G.2000. Effect of microbiological characteristics of raw milk on the quality of whole milk powder. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 95-98.
- Falegan, C.R. and Oluwaniyi, T.T. 2015. Microbial composition, antibiotic sensitivity and proximate composition of popular imported powdered infant milk formulas sold in Ado Ekiti, Nigeria. *International Journal of Microbiology, Genetics and Monoclonal Biology Research* 1:10-24.
- Galya, B., Marian , M., Svetla, M., Velitchka, G. and Angel, A. 2014. Assessment of lactic acid bacteria and Enterobacteriaceae counts in Bulgarian probiotic products by TEMPO® System and ISO Methods. *Journal of Nutritional Health and Food Engineering* 1: 1-5.
- Hafsa ,A., Fouzia, S., Fakruddin, M.D., Kamrunnahar, Zahed ,U.M.K. and Suvamoy, D. 2013. Isolation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from full cream powder milk sold under market conditions at Dhaka, Bangladesh and their antibiotic susceptibility. *Journal of Advanced Scientific Research* 4: 27-31
- Kithar, R. M., Sabah, M. H., Al-Shatty, A.A. and. Al-Ka'abi, K. 2002. Microbial examination of some imported powder milk. *Journal of Agriculture* 2: 1-5.
- László, V. 2007. Microbiological quality of commercial dairy products. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* 1: 1-8.
- Pal, M. 2001. Epidemiology of staphylococcal food poisoning. *Beverage and Food World* 28: 11-13.
- Pal, M. 2007. *Zoonoses*. 2nd Ed. Satyam Publishers, Jaipur, India.
- Pal, M. 2012. Hygienic aspects of various milk products. Ph.D. Lecture Notes. Faculty of Veterinary Medicine, Addis Ababa University, Debre Zeit, Ethiopia. Pp.1-7.
- Pal, M. 2015. *The Complete Book on Waste Treatment Technologies*. 1st Ed. Nirr Project Consultancy Services, Kamla Nagar, Delhi, India.
- Pal, M., Asefa, M., Deressa, A. and Muzein, R.2014a. Processed foods and *Bacillus cereus* poisoning. *Beverage and Food World* 41: 41-43.
- Pal, M., Girzaw, F., Abera, F., Shukla, P.K. and Hazarika, R.A. 2015a. Mycotoxicosis: A growing concern to human and animal health. *Beverage and Food World* 42: 42-46, 50.
- Pal, M. and Jadhav, V.J.2013. Microbial contamination of various Indian milk products. *Beverage and Food World* 40: 43-44.
- Pal, M. and Mahendra, R. 2015. *Sanitation in Food Establishments*. Lambert Academic Publishing, Saarbruchen, Germany.
- Pal, M., Merera, O., Abera, F., Rahman, M.T. and Hazarika, R.A.2015b. Salmonellosis: A major foodborne disease of global significance. *Beverage and Food World* 42: 21-24.
- Pal, M., Mulu, S., Aduugna, F. and Alemu J.2014b. Canned foods and botulism. *Beverage and food World* 41: 1-3.
- Robert, M.K., Gerald, F.F., Colin, H., Catherine, S. and Paul, R.R. 2015. Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. *Nutrients* 7: 1217-1244.
- Ron, S.R., Andreas, R.K. and Hugh, W.M.2006. Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90 + year old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds Hut in Antarctica. *Journal of Dairy Research* 73: 235-243.
- Salahudin, A. and Nural, A.M. 2006. Microbial counts of dried powder milk available in local markets of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Microbiology* 23: 162-164.
- Salwa, A.A. and Neimat, A.E. 2014. Safety and quality of some imported milk powder sold in the Egyptian market. *International Journal of Science and Nutrition* 5: 399-406.

When Replying To Advertisements
Please Mention

BEVERAGE & FOOD WORLD

Article

Bacteriological quality of dry powder milk available in local markets of Bangladesh

Nazia Afrin* and Rasheda Yasmin Shilpi

Department of Botany, Jahangirnagar University, Savar, Dhaka-1342, Bangladesh

*Corresponding author: Nazia Afrin, Department of Botany, Jahangirnagar University, Savar, Dhaka-1342, Bangladesh. Phone: +8801705071024; E-mail: naziaafrin49@gmail.com

Received: 30 August 2018/Accepted: 25 September 2018/ Published: 30 September 2018

Abstract: Milk and milk powders are very rich in several nutrients and relished by everybody throughout the world. The present study was undertaken with the aim of investigating the bacteriological quality of locally available dry powder milk in Bangladesh. A total number of eight powder milk samples were collected from Gazipur city and its surrounding areas during the period from January 2017 to February 2017. The analysis comprised of enumeration of total viable bacterial count (TVBC), isolation of bacterial isolates and identification of pathogenic bacteria. Almost all the powder milk samples showed the total aerobic heterotrophic bacterial (TAHB) level above the standard acceptable range ($>10^4$ CFU/g). Both gram positive and gram negative pathogenic bacteria viz. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus*, *pseudomonas* sp. and *Enterobacter* sp. were isolated from studied samples through morphological and biochemical characteristics. *Pseudomonas* sp. were confirmed by API 20E. These results highlighted the necessity to maintain appropriate sanitary and hygienic measures at each critical point in order to safeguard consumers from food borne pathogens.

Keywords: pathogenic bacteria; powder milk; commercial local market; identification

1. Introduction

Dairy powders are a popular commodity due to their long shelf life, ease of storage and versatile nature. As milk and dairy products are very rich in several nutrients, they are relished by everybody throughout the world. Variety of dairy powders can be produced such as whole milk powder (WMP), skimmed milk powder (SMP), whey protein concentrate (WPC), whey protein isolate (WPI), milk protein concentrate (MPC), milk protein isolate (MPI), casein and caseinates (Lagrange *et al.*, 2015). Dairy powders can be used in fortification of other dairy products (Karam *et al.*, 2013), as well as an ingredient in a wide array of foods including soups and sauces, confectionary (Sharma *et al.*, 2012), infant formula, sports dietary supplements and in foods for health recovery (Gill *et al.*, 2001; Lagrange *et al.*, 2015). Moreover, the advantages of dry milk over liquid milk are better keeping quality, less storage space, and low shipping costs (Robert *et al.*, 2015). However, when controlling microbial loads of dairy powders, the increased production may create safety and economic risks to the dairy sector.

Milk powder is made by removing water from liquid milk. Removal of water is necessary to reduce water activity for the prevention of microorganism growth. Powder milk has a long shelf life than raw milk. Skim milk powder has a maximum shelf life of about 3 years where as whole milk powder has a maximum shelf life of about 6 months (Flegam and Oluwaniyi, 2015). Now a days, a great emphasis is given on adding value to powder milk. The important quality parameters for milk powder are microbiological quality, and sensory characteristics, beside physical and chemical properties, which are mainly concerned with the content of moisture, fat, total protein, and non-protein nitrogen, lactose, titratable acidity, ash, and other nutrients such as calcium (Laszlo, 2007). The thermophilic organisms have ability to produce extremely heat resistant spores and

can have significant economic consequences when they exceed specification limits. Thus, they may result in down grading of the products (Anup and Rupesh, 2012).

Microbial pathogens which are of major concern in dried milk include *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*. These organisms may remain viable in milk powder for long period of time, and resume growth when the powder is reconstituted and stored at favorable temperature (Hafsa *et al.*, 2013). Study performed in New Zealand for sample of milk powder revealed that it is contaminated by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* (Ronimus *et al.*, 2006). Another study of sample from different countries were examined, the dominated isolate was *Anoxybacillus flavithermus* followed by *Bacillus licheniformis* (Rucket *et al.*, 2004).

In our country in Bangladesh, the microbiological quality of dry milk powder is not known. There is no quality control system for the powder milk though they are popularly consumed by all age groups both in urban and rural areas. So, the present study was undertaken to assess the microbiological quality of powder milk, enumeration of the bacterial load, isolation and identification of the pathogenic bacteria from powder milk samples.

2. Materials and Methods

2.1. Sample collection

Eight powder milk samples were collected from different local market of Gazipur city and its surrounding area. The packets were cleaned by washing with sterile water followed by rubbing with 95% alcohol and opened in the laminar air flow using sterile scissors. All packaged samples were maintained with their expiration dates. The samples were preserved at 4°C for detailed study.

2.2. Isolation of bacteria

Bacterial enumeration and isolation was carried out by spread plate method in Nutrient Agar media (NA) (Eklund and Lankford, 1967) at adjusted pH 6. The microbiological condition of safety and hygiene were then assayed using the methods recommended by International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2005). The sample (0.1ml) of each dilution was taken onto each sterile petridish and evenly spread on the solid nutrient medium and incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, plates having well discrete colonies were selected for counting. Discrete bacterial colonies were isolated immediately after counting. Based on distinct colony morphology, further selection was made and isolates were purified by repeated streaking as well as stored in NA slants at 4°C for further analysis.

2.3. Microbial load determination

Microbial load was determined from the total number of discrete colonies counted after incubation. Isolated colonies were counted in colony formation unit (CFU per gram) as follows-Number of CFU/ g = Number of CFU/ (Volume plated in ml × total dilution used)

2.4. Identification of the isolates

The selected bacterial colonies were observed to study various characters *viz.* color, form, elevation, margin, surface, optical characters etc. according to Eklund and Lankford (1967). Bacterial colonies were cultured on different selective and differential media such as: MSA, SSA, EMB, MacConkey, Bouillon agar, King's B, Simon citrate etc. Different biochemical tests (Casein test, Fermentation test, Indole test, Starch hydrolysis test, Catalase test etc.) were also performed. Results of the physiological and biochemical tests of selected isolates were analyzed following Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath *et al.*, 1986), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan *et al.*, 1974), Manual of Microbiological Methods (SAB, 1957), Microbiological Methods (Collins *et al.*, 1984) and Understanding Microbes (Claus, 1995). Coagulase test, endospore staining and API 20 E (Holmes *et al.*, 1978) were used as a confirmation test of bacterial genus or species of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.

3. Results

A total of 24 bacterial isolates was obtained from powder milk samples. Mean heterotrophic bacterial load of the milk samples were ranged from 9.9×10^3 to 32.7×10^4 CFU/g on Nutrient Agar media. In case of powder milk, maximum heterotrophic bacterial counts were observed in the Sample-3 (Table1). While minimum heterotrophic bacterial counts were observed in the Sample-8 (Table1). According to guidelines elaborated by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2005), the total bacterial count in powder milk below 10^4 CFU/g is indicative of their acceptable quality, the counts of 10^4 to 10^5 CFU/g indicates their permissible quality, whereas bacterial count exceeding 10^5 CFU/g is unacceptable. In view of

these guidelines, CFU results showed marginally acceptable quality of the analyzed milk samples (Table1). All the powder milk samples exceeded the acceptable limits except one. But none of them exceeded the unacceptable limit.

In the present study, *Staphylococcus aureus* (Plate1B), *Staphylococcus epidermidis* (Plate1B), *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. were identified through their respective color in specific culture media. In addition, results of biochemical tests (Table3) of different isolates revealed that out of 24 isolates 18 isolates were gram positive while the rest were gram negative (Plate1D) and rod shaped. Among the gram-positive isolates 12 were cocci (Plate1C) and 6 were rod shaped. All the isolates were catalase positive, casein negative, lactose fermentation negative and indole negative. Out of 24 isolates only 8 isolates were positive in starch hydrolysis test (Plate1E) and 6 were positive in endospore staining which showed the presence of *Bacillus* sp. Only 6 isolates showed positive result in citrate test (Plate1F). Among 12 cocci shaped bacteria 9 were positive for coagulase test which confirmed the presence of *Staphylococcus aureus*. API 20 E test confirmed the presence of *Pseudomonas* sp.

Table 1. Bacterial load of different samples.

Samples	CFU (average)	m*	M*
Sample-1	25x10 ⁴		
Sample-2	22x10 ⁴		
Sample-3	32.7x10 ⁴		
Sample-4	8.3x10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵
Sample-5	19.9x10 ⁴		
Sample-6	15.3x10 ⁴		
Sample-7	3.4x10 ⁴		
Sample-8	9.9x10 ³		

*m, acceptable level and values above it are marginally acceptable or unacceptable in the terms of the sampling plan and
 *M, a microbiological criterion which separates marginally acceptable quality from defective quality according to ICMSF. Bacterial load represents as CFU/g

Table 2. Bacterial isolates on different selective and differential media.

Bacterial isolates	MSA	EMB	Mac-conkey	SSA	Bouillon	Simon citrate	Kings B	BGA
PP 1	NG	Colorless	Pink	Pink	White	Blue	White	NG
PP 2	NG	NG	Pink	NG	White	Blue	White	NG
MP 3	Yellow	Colorless	NG	NG	White	NG	White	NG
MP 4	NG	Colorless	NG	NG	White	NG	White	NG
FP 5	NG	Colorless	Colorless	NG	White	NG	Greenish Yellow	NG
FP 6	Pink	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
MP 7	Yellow	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
DD 1	NG	Colorless	Pink	Pink	White	Blue	White	NG
DD 2	NG	NG	Pink	NG	White	Blue	White	NG
DD 3	NG	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
DD 4	Yellow	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
DD 5	NG	NG	Pink	NG	White	Blue	White	NG
NP 1	Pink	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
NP 2	Yellow	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
NP 3	Yellow	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
NP 4	NG	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
NP5	NG	NG	NG	NG	Off white	NG	White	NG
NP 6	NG	NG	NG	NG	Off white	NG	White	NG
NP 7	NG	NG	NG	NG	Off white	NG	White	NG
NP 8	Yellow	Colorless	NG	NG	White	NG	White	NG
NP 9	Yellow	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
NP10	Yellow	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
NP11	Pink	NG	NG	NG	White	NG	White	NG
NP12	Yellow	NG	NG	NG	White	NG	White	NG

NG* No Growth

Table 3. Biochemical characteristics of the bacterial isolates.

Isolates	Catalase test	Casein test	Fermentation test	Indole test	Starch hydrolysis	Gram staining	Endospore staining	Coagulase test
PP 1	+	-	-	-	-	-	NA	NA
PP 2	+	-	-	-	+	-	NA	NA
MP 3	+	-	-	-	+	+	-	+
MP 4	+	-	-	-	+	+	+	-
FP 5	+	-	-	-	-	-	NA	NA
FP 6	+	-	-	-	-	+	-	-
MP 7	+	-	-	-	+	+	-	+
DD 1	+	-	-	-	+	-	NA	NA
DD 2	+	-	-	-	-	-	NA	NA
DD 3	+	-	-	-	+	+	+	-
DD 4	+	-	-	-	+	+	-	+
DD 5	+	-	-	-	-	-	NA	NA
NP 1	+	-	-	-	-	+	-	-
NP 2	+	-	-	-	-	+	-	+
NP 3	+	-	-	-	-	+	-	+
NP 4	+	-	-	-	-	+	+	-
NP5	+	-	-	-	-	+	+	-
NP 6	+	-	-	-	-	+	+	-
NP 7	+	-	-	-	+	+	+	-
NP 8	+	-	-	-	-	+	-	+
NP 9	+	-	-	-	-	+	-	+
NP10	+	-	-	-	-	+	-	+
NP11	+	-	-	-	-	+	-	-
NP12	+	-	-	-	-	+	-	+

*NA – Not Available

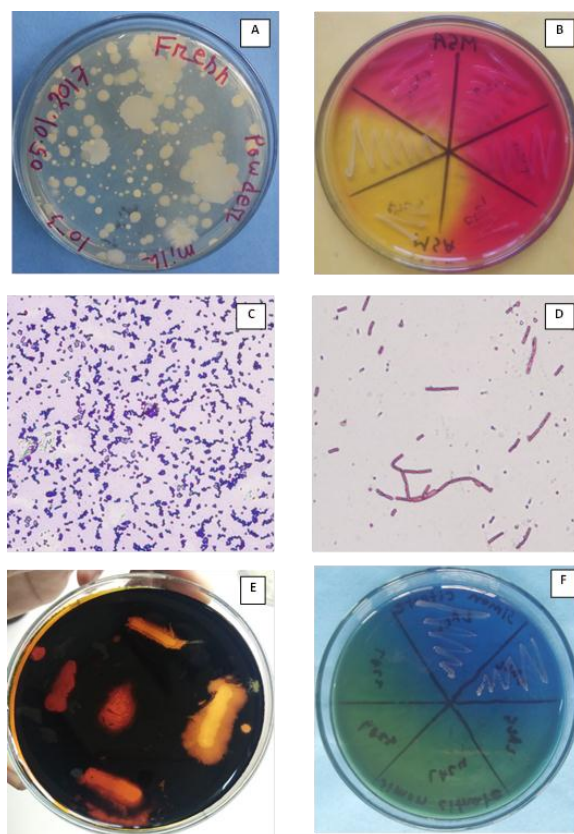


Plate 1. Bacterial colonies on nutrient agar (A), *Staphylococcus aureus* (yellow colonies) and *S. epidermidis* (pink colonies) on MSA media (B), gram staining represents gram positive (cocci shaped) *S. aureus* (C) and rod shaped gram negative *Enterobacter* (D), starch hydrolysis test (E), Simon citrate test (F).

4. Discussion

The knowledge of microbes and their evolution is highly imperative to ensure safety and quality of dairy products (Ahmed *et al.*, 2014). Numerous studies have documented that powder milk could be contaminated by bacteria. The microbial count of dried milk powder has been reported by Salahudin and Naural (2006). Common contaminants identified in dairy powders include species of Bacilli, many of which are capable of forming endospores (Checinska *et al.*, 2015). Taxa other than Bacilli have also been found to contaminate powdered dairy products includes *Clostridium halophilum*, *Klebsiella oxytoca* (Buehner *et al.*, 2015), *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi/haemolyticum*, *C. sporogenes* (Barash *et al.*, 2010), *Staphylococcus aureus* (Zhang *et al.*, 2015), and *Cronobacter sakazakii* (Minami *et al.*, 2012). These findings are in agreement to our study where we identified *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. from different samples. Similar finding was also reported by Hafsa *et al.* (2013). Pal (2011) identified *Staphylococcus aureus* which can be present in the cow's udder and teats, and consequently contaminate the milk.

The sources of microbial contamination of dry milk powder are many. Microorganisms that contaminate powder milk may come from air, dust, soil, water, insects, humans, storage containers and handling and processing equipment. Bacteria can originate from the soil (Heyndrickx, 2011), feces, bedding, feed, or milking equipment (Gleeson *et al.*, 2013), or can enter the raw milk via contaminated teats, milking cups and bulk tanks. Additionally, contamination can occur during transport from the farm to the processing plant (Pantoja *et al.*, 2011), and also within the processing facility itself from poor handling and contaminated equipment (Burgess *et al.*, 2010; Faille *et al.*, 2014). High numbers of microorganisms in the raw milk may result high numbers in the milk powder, and the decline in numbers as a result of exposure to heat, is offset by the removal of water in the powder (Ron *et al.*, 2006). Thus, improper cleaning and sanitation of dairy equipments will lead to food poisoning due to contamination by microbes (Pal and Mahendra, 2015). In addition, the formation of homogeneous or heterogeneous multicellular bacterial communities on the surface of processing equipment in the form of biofilms is a particular concern for the dairy processing sector and, when present, can lead to recurring problems of microbial contamination (Branda *et al.*, 2001; Faille *et al.*, 2014).

On the other hand, it has been shown that the spore-forming bacterial composition of raw milk differs considerably from their associated dairy powders (Miller *et al.*, 2015), highlighting that the processing of milk into powder changes the composition of the specific spore-formers present. Post-production, powders can be stored for extended periods and in the absence of water, bacterial metabolic activity and growth is limited (Deng *et al.*, 2012), thus preventing spoilage and product defects. However, under these conditions, bacterial spores can remain dormant until more favorable conditions are encountered, when germination and outgrowth can proceed (Setlow, 2003, 2014). In spray-drying the amount of heating to which contaminating bacteria may be exposed are insufficient for the drying process to decontaminate the milk even in respect of relatively heat-sensitive pathogens such as *Salmonella*. Besides, post-processing contamination of the powder milk from food production environments occur. Therefore, milk for spray-drying should be pasteurized first and care should be taken that there is no possibility of recontamination between pasteurizer and drier (Harrigan, 1998).

5. Conclusions

From the present study it can be concluded that dry powder milk can be frequently contaminated by pathogenic and spore forming bacteria. Both pre pasteurization and post pasteurization contamination occur. Therefore, low cost, simple and easy methods should be developed to detect the spoilage producing bacteria in milk and milk products. Such methods would be very beneficial to poor resource countries like Bangladesh. All milk and liquid product should be pasteurized prior to concentration before drying and post processing contamination should be checked. Finally, it is imperative to monitor every step of food production, from handling of raw products to preparation of finished foods in order to protect consumers from food borne illness.

Acknowledgements

The authors would like to thank to Md. Shakhawate Hossain for his critical review of the manuscript.

Conflict of interest

None to declare.

References

Ahmed MMM, EE Hafez, MH Mona, AA Hagar and YM Mabrouk, 2014. Detection of baby milk powder contamination by microorganisms. W. App. Sci. J., 1: 93-98.

- Anup S, HJ Atanuand SC Rupesh, 2012. Functionality of milk powders and milk based powders for end user applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 11: 1-11.
- Barash JR, JK Hsia and SS Arnon, 2010. Presence of soil-dwelling Clostridia in commercial powdered infant formulas. *J. Pediatr.*, 156: 402–408.
- Branda SS, JE Gonzalez-Pastor, S Ben-Yehuda, R Losick and R Kolter, 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 11621-11626.
- Buchanan RE and NE Gibbons, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed.). The Williams and Wilkins Company, USA. pp. 1268.
- Buehner KP, S Anand and GD Djira, 2015. Prevalence of thermotolerant bacteria and spores in nonfat dry milk powders of Midwest origin. *J. Dairy Sci.*, 98: 2861–2866.
- Burgess SA, D Lindsay and SH Flint, 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *Int. J. Food Microbiol.*, 144: 215–225.
- Checinska A, A Paszczynski and M Burbank, 2015. *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 6: 351–369.
- Claus GW, 1995. *Understanding microbes* (4th ed.). W.H. Freeman and Company, New York. pp. 547.
- Collins CH and Lyne PM, 1984. *Microbiological methods* (5th ed.). Butter worth and Co. Publisher Ltd, London. pp. 448.
- Deng X, Li Z and W Zhang, 2012. Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiol.*, 30: 311–315.
- Eklund C and CE Lankford, 1967. *Laboratory manual for general microbiology*. Prentice-Hall International Inc., London. pp. 299.
- Faille C, T Benezech, G Midelet-Bourdin, Y Lequette, M Clarisse and G Ronse, 2014. Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiol.*, 40: 64–74.
- Falegan CR and TT Oluwaniyi, 2015. Microbial composition, antibiotic sensitivity and proximate composition of popular imported powdered infant milk formulas sold in Ado Ekiti, Nigeria. *Int. J. Microbiol. Gen. Mol. Biol. Res.*, 1: 10-24.
- Gill HS, KJ Rutherford and ML Cross, 2001. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J. Clin. Immunol.*, 21: 264–271.
- Gleeson D, A O'Connell and K Jordan, 2013. Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk-tank milk. *Irish J. Agric. Food Res.*, 52: 217–227.
- Hafsa A, S Fouzia, MD Fakruddin, Kamrunnahar, UMK Zahed and D Suvamoy, 2013. Isolation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from full cream powder milk sold under market conditions at Dhaka, Bangladesh and their antibiotic susceptibility. *J. Adv. Sci. Res.*, 4: 27-31.
- Heyndrickx M, 2011. The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Appl. Environ. Soil Sci.*, Article ID 561975, 11 pages.
- Holmes B, WR Willcox and SP Lapage, 1978. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. *J. Clinical Pathol.*, 31: 22-30.
- ICMSF, 2005. Spices, herbs and vegetable seasonings. In: *ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (Ed.), Microorganisms in Foods, Microbial Ecology of Food Commodities*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London. pp. 360-372.
- Jay JM, 1970. *Modern food microbiology*. New York. Van Nostr and Reinhold.
- Karam MC, C Gaiani, C Hosri, J Burgain and J Scher, 2013. Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: a review. *J. Dairy Res.*, 80: 400–409.
- Lagrange V, D Whitsett and C Burris, 2015. Global market for dairy proteins. *J. Food Sci.*, 80: 16–22.
- László V, 2007. Microbiological quality of commercial dairy products. *Appl. Microb.*, 1: 1-8.
- Miller RA, DJ Kent, MJ Watterson, KJ Boor, NH Martin and M Wiedmann, 2015. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *J. Dairy Sci.*, 98: 8492–8504.
- Minami J, T Soejima, T Yaeshima and K Iwatsuki, 2012. Direct real-time PCR with ethidium monoazide: a method for the rapid detection of viable *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *J. Food Prot.*, 75: 1572–1579.
- Pal M, 2001. Epidemiology of staphylococcal food poisoning. *Beverage and Food World*, 28: 11-13.
- Pal M and R Mahendra, 2015. *Sanitation in Food Establishments*. Lambert Academic Publishing, Saarbruchen, Germany.

- Pal M and VJ Jadhav, 2013. Microbial contamination of various Indian milk products. Beverage and Food World, 40: 43-44.
- Pantoja JC, DJ Reinemann and PL Ruegg, 2011. Factors associated with coliform count in unpasteurized bulk milk. J. Dairy Sci., 94: 2680–2691.
- Reves FJ, HJ Bastias, RM Gutierrez and LMde Rodriguez, 2007. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. J. Food Microbiol., 24: 1-6.
- Robert MK, FF Gerald, H Colin, S Catherine and RR Paul, 2015. Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. Nutrients, 7: 1217-1244.
- Ron SR, RK Andreas and WM Hugh, 2006. Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90 + year old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds Hut in Antarctica. J. Dairy Res., 73: 235–243.
- Ronimus SR, A Ruckert and WH Morgan, 2006. Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90+ year old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds Hut in Antarctica. J. Dairy Res., 73: 235-243.
- Ruckert AS, R Ronimus and WH Morgan, 2004. Based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. Int. J. Food Micrbiol., 96: 263 -272.
- SAB (Society of American Bacteriologists), 1957. Manual of microbiological methods. McGraw Hill Inc., New York. pp. 315.
- Salahudin A and AM Nural, 2006. Microbial counts of dried powder milk available in local markets of Bangladesh. Ban. J. Microbiol., 23: 162-164.
- Setlow P, 2003. Spore germination. Curr. Opin. Microbiol., 6: 550–556.
- Setlow P, 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. J. Bacteriol., 196: 1297–1305.
- Sharma A, AH Jana and RS Chavan, 2012. Functionality of milk powders and milk-based powders for end use applications-a review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 11: 518–528.
- Sneath PHA, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt, C Frank, R Prager, W Rabsch, S Broll and F Feil, 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology (9th ed.), vol. 2. Williams and Wilkins. Baltimore, London. pp. 1599.
- Zhang Z, W Liu, H Xu, ZP Aguilar, NP Shah and H Wei, 2015. Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products. J. Dairy Sci., 98: 1625–1633.