

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



Université Frères Mentouri Constantine 1

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie Appliquée

قسم البيولوجيا التطبيقية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master Professionnalisant

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité : Bio-industrie, Analyse et Contrôle (BAC)

Intitulé:

**Evaluation de fiabilité des systèmes de stérilisation et
détection de microorganismes récalcitrants.**

Présenté par :

Benayad Boutiena et Meziane Nahla

Devant le jury :

Présidente : Dr. KARA ALI Mounira M.C.A Université Frères Mentouri Constantine 1.
Rapporteur : Pr. KACEM CHAUCHE Noredine Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1.
Examinatrice : Dr. CHERFIA Radia M.C.B Université Frères Mentouri Constantine 1.

Année universitaire 2020 – 2021

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.



Nous exprimons nos profonds remerciements à notre rapporteur, le Professeur **KACEM CHAUCHE Noredine**, chef de Département de biologie appliquée, Université frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté la prise en charge de ce mémoire, nous le remercions pour sa disponibilité, pour les efforts qu'il a consentis durant la réalisation de ce mémoire. Ce travail témoigne de sa confiance. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.



Nous remercions également chaleureusement **Dr. CHERFIA Radia M.C.B** au Département de biologie appliquée, Université frères Mentouri Constantine 1, pour sa disponibilité, ses conseils, elle nous a permis de réaliser la partie pratique dans les meilleures conditions, sa compétence, sa patience, son soutien dans les moments les plus difficiles, son enthousiasme et l'attention particulière et pour examiner ce travail.



Nous adressons tous nos remerciements à l'ensemble des membres du jury:
Dr. KARA ALI Mounira, M.C.A au
Département de biologie appliquée, Université frères Mentouri Constantine 1
pour avoir accepté de présider ce jury.

Nous remercions l'ensemble des enseignants de nos années universitaires, spécialité Bio-industrie, Analyse et Contrôle (BAC) et tout le personnel du Département de Biologie Appliquée

Dédicaces

Avec l'aide du Tout Puissant, j'ai pu réaliser ce travail et c'est avec un grand plaisir que je le dédie :

▣ À mon très cher père **Saad**,

Qui a été à mes cotés tout au long de ce travail, tes conseils m'ont suivi .Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde, c'est grâce à toi que je suis arrivée à ce point-là.

▣ À ma très chère mère **Soumia**,

À celle qui m'a donné la vie. Maman aucune dédicace ne pourrait exprimer toute l'estime et toute la reconnaissance que j'éprouve à ton égard. Que ce travail puisse encore t'honorer et faire ta fierté, je prie dieu qu'il te garde, te donne la santé.

▣ À mes chères Sœurs, **Assil, Anfel, Aridj et Ritej**
merci pour êtres toujours présentes à mes cotés.

▣ À mon binôme **Meziane Nahla** Pour son soutien moral, sa patience, sa sympathie et sa compréhension tout au long de ce travail.

▣ A mes amies que J'aime beaucoup **Hiba, Sana, Manel, khadija Chayma** pour les liens forts d'amitié qui nous unissent et les meilleurs moments que nous avons passé ensemble.

Enfin, à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail



Je dédie ce Modeste travail à :

- A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié et m'a encouragé durant mon parcours scolaire, l'homme à qui je dois ma vie, ma réussite

tout mon respect,

A toi mon père **Slimane**

- A la femme qui m'a donnée la vie et l'amour, qui ma donnée la tendresse et le courage pour réussir, et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, aucun dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que dieu te préserve et te procure santé et longue

de vie

Mon adorable mère **Wahiba**

- À mon mari: **Abdessamed** pour son soutient morale tout au long de ce travail et son encouragements pour surmonter mes difficultés.

- À mes Frères : **Imad** et **Nour Elislem** pour leur aide et leur soutient qui m'ont permis de surmonter mes difficultés et pour leurs encouragements.

- Sans oublier mon binôme **BENAYAD BOUTIENA** pour ses efforts, sa patience, et son soutien moral tout au long de ce travail

A toute personne qui m'a aidé de près ou de loin pour réaliser ce travail



Table des matières

Introduction.....	1
1- Synthèse bibliographique	3
1.1- Méthodes de stérilisation.....	3
1.1.1- Stérilisation thermique.....	3
1.1.1.1- Autoclavage.....	3
1.1.1.2- Tyndallisation.....	5
1.1.1.3- chaleur sèche « four Pasteur ».....	5
1.1.1.4- Pasteurisation.....	6
1.1.2- Stérilisations non thermiques.....	7
1.1.2.1- Lumière ultra- violette.....	7
1.1.2.2- Filtration.....	8
1.1.2.3- Agents chimiques.....	11
1.1.2.4- Champs électriques pulsés.....	12
1.1.2.5- Stress osmotique	12
1.2- Microorganismes.....	13
1.2.1- Bactéries.....	13
1.2.1.1- Bactéries sporulantes.....	14
- <i>Bacillus cereus</i>	15
- <i>Clostridium perfringens</i>	17
1.2.1.2- Bactéries non sporulantes.....	19
- <i>Escherichia coli</i>	19
1.2.2- Moisissures.....	20
- <i>Aspergillus flavus</i>	21
1.3- Mécanisme de résistance des microorganismes	23
1.3.1- Haute température.....	23
1.3.2- Haute pression.....	24
1.3.3- Lumière ultraviolette	25
2- Matériel et méthodes.....	26
2.1- Microorganismes testés.....	26
2.1.1- Isolement de <i>Clostridium perfringens</i>	26
2.1.2- Réactivation des souches microbiennes.....	27
2.2-Techniques de stérilisation.....	27
2.2.1-Autoclavage.....	27
2.2.2- Chaleur humide discontinue.....	28

2.2.3- Chaleur sèche « Four Pasteur ».....	28
2.2.4- Pasteurisation.....	29
2.2.5- Lumière ultraviolette.....	30
2.2.6- Osmose « Eau pure ».....	31
2.3- Dénombrement des cellules microbiennes vivantes.....	31
3- Résultats et discussion.....	32
3.1- Autoclavage.....	32
3.2- Chaleur humide discontinue.....	34
3.3- Chaleur sèche « Four Pasteur ».....	36
3.4- Pasteurisation.....	37
3.5- Lumière ultraviolette.....	39
3.6- Osmose « eau pure ».....	44
4- Conclusion et perspectives.....	47
5- Références.....	48
Abstract	
الملخص	
Annexes	
Résumé	

Liste des figures

Figure 1	Autoclave à chargement vertical.....	4
Figure 2	Four Pasteur.....	6
Figure 3	Schéma explicatif du processus de pasteurisation.....	7
Figure 4	Position du rayonnement ultraviolet dans le spectre électromagnétique	8
Figure 5	Filtration de l'air	9
Figure 6	Principe de stérilisation par champs électriques pulsés.....	12
Figure 7	Structure des endospores.....	14
Figure 8	Différentes formes de <i>Bacillus cereus</i> sous microscope optique.....	16
Figure 9	Différentes formes de <i>Clostridium perfringens</i> sous microscope optique.....	17
Figure 10	Gangrène gazeuse.....	18
Figure 11	Morphologie d' <i>Escherichia coli</i>	19
Figure 12	Morphologie d' <i>Aspergillus flavus</i>	22
Figure 13	Aspergillose broncho-pulmonaire allergique.....	23
Figure 14	Prélèvement des échantillons (2021).....	26
Figure 15	Effet de l'autoclavage sur les microorganismes.....	27
Figure 16	Différentes étapes de stérilisation par chaleur humide discontinue.....	28
Figure 17	Four Pasteur.....	29
Figure 18	Effet des rayons UV sur la molécule d'ADN.....	30
Figure 19	Effet de l'autoclavage sur les microorganismes test.....	32
Figure 20	Influence de l'autoclavage sur le nombre des cellules microbiennes vivantes.....	33
Figure 21	Effet du chauffage humide discontinu sur les microorganismes.....	34
Figure 22	Influence de chauffage humide discontinu sur le nombre des cellules microbiennes vivantes.....	35
Figure 23	Effet de la chaleur sèche « four Pasteur » sur les microorganismes test.....	36
Figure 24	Effet de Pasteurisation sur les microorganismes test.....	38

Figure 25	Influence de pasteurisation sur le nombre des cellules microbiennes vivantes	38
Figure 26	Effet de l'UV sur <i>E. coli</i>	40
Figure 27	Effet de l'UV sur <i>B. cereus</i>	40
Figure 28	Effet de l'UV sur <i>C. perfringens</i>	41
Figure 29	Effet de l'UV sur <i>A. flavus</i>	42
Figure 30	Effet de l'eau pure sur les bactéries test.....	44
Figure 31	Effet de l'eau pure sur <i>A. flavus</i>	45

Liste des abréviations

<i>A. flavus:</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
Aw:	L'activité d'eau
<i>B. cereus:</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BN:	Bouillons Nutritif
<i>C. perfringens:</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
D:	Distance
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
GN:	Gélose Nutritive
PDA:	Potato Dextrose Agar
pH:	Potentiel Hydrogène
SASP:	Small Acid-Soluble Protein
SP:	Spore Photoproduct
TSA:	Gélose Tryptone-Soja
UV:	Ultraviolet
VF:	Viande Fois
IB:	Indicateur Biologique
DPA :	Acide dipicolonique

Introduction

Introduction

La contamination biologique correspond à la présence d'un élément biologique indésirable ; bactérie, champignon, virus et toxine dans un produit, ou dans l'environnement ; eau, air et surface. Elle peut avoir des conséquences importantes tant sur le plan économique que sur le plan de la santé humaine car les agents biologiques peuvent être l'origine de maladies chez l'homme : infections, intoxications, allergies et cancers. Pour cela, les industries de différents secteurs en l'occurrence ; agro-alimentaires, pharmaceutiques, micro-électroniques...; recherchent des moyens pour réduire et éliminer cette contamination (Emilie et *al.*, 2018).

En effet, la contamination est combattue par la stérilisation qui est un processus de destruction complète de toutes les formes de vie en particulier les microorganismes et les autres agents biologiques tels que les prions présents dans une surface, un objet ou un fluide spécifique (Guerrouf et *al.*, 2020).

Les moyens de stérilisation peuvent être des traitements thermiques qui détruisent les microorganismes en provoquant une coagulation des protéines et une dégradation des structures chromosomiques du noyau des microorganismes (Julia et *al.*, 2018). Ou bien des rayonnements électromagnétiques; UV, Bêta, Gamma et X ; qui assurent un bombardement plus ou moins fortement énergétiques détruisant ainsi les structures internes du noyau des microbes (ADN ou ARN) (Saharnaz et *al.*, 2020). De plus, la voie chimique de la stérilisation met le germe en contact avec des molécules chimiques spécifiques; l'oxyde d'éthylène et le peroxyde d'hydrogène; détruisant généralement le métabolisme et surtout le noyau du germe (Namitaet *al.*, 2018).

Ces méthodes de stérilisation sont confrontées un grand défi qui est l'incapacité de détruire les microorganismes récalcitrants qui ont la faculté de former des spores, hautement résistantes aux divers facteurs de stress et de traitements draconiens et sévères, qui peuvent survivre durant des périodes de temps extrêmement longues (Jui-Hong et *al.*, 2018). Pour cela, les spores microbiennes sont utilisées comme indicateurs biologiques (IB) pour vérifier l'efficacité des techniques de stérilisation (Johnson, 2012).

De ce fait, il n'existe pas une technique de stérilisation universelle, pour cela un système de stérilisation très efficace, surtout, pour inactiver les microorganismes récalcitrants doit être sélectionné. Dans cette optique, il nous a donc paru nécessaire de mener cette étude dans le but de mettre la lumière sur :

- ❖ Evaluation de fiabilité de six différents systèmes de stérilisation ; thermiques et non thermiques sur quelques microorganismes.
- ❖ Détermination de la méthode de stérilisation la plus performante par rapports aux autres techniques.
- ❖ Détermination des microorganismes récalcitrants.

Ce mémoire est scindé en trois grandes parties :

- Synthèse bibliographique qui rassemble des données générales, partagée en deux chapitres ; le premier focalise sur différents systèmes de stérilisation et le deuxième sur les microorganismes;
- Description des protocoles expérimentaux utilisés; isolements et réactivation des microorganismes test, différentes techniques de stérilisation appliquées et dénombrement;
- Présentation des résultats obtenus avec leurs discussions et une conclusion finale.

Synthèse bibliographique

1- Synthèse bibliographique

1.1- Méthodes de stérilisation

La stérilisation est une technique destinée à éliminer tous les microorganismes pathogènes qui comprennent les deux formes ; végétatives et sporulées des germes (Emilie, 2009; Guerrouf et *al.*, 2020). Deux types de stérilisation peuvent être distingués selon leur nature ; thermique et non thermique.

1.1.1- Stérilisation thermique

La stérilisation par chaleur consiste à la destruction des microorganismes à une température élevée, généralement supérieure à 100°C, pendant une durée suffisante pour inhiber les enzymes et détruire la totalité des microorganismes (Emilie, 2009). En effet, plusieurs techniques thermiques peuvent être distinguées ; autoclavage, tyndallisation, chaleur sèche, pasteurisation, etc.

1.1.1.1- Autoclavage

L'autoclavage est la destruction des microorganismes par le chauffage à lieu sous pression de la vapeur d'eau, à une température de 100 à 130°C pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients (Erpicum, 2003).

- Efficacité

Pendant la période de chauffage, la vapeur au contact de l'objet à stériliser est toujours à une température plus élevée que celui-ci, par conséquent elle se condensera sur ce dernier. A l'équilibre thermique, en particulier à la fin de la période de chauffage, le poids de la vapeur contenue dans l'autoclave est faible. De ce fait, l'eau condensée est environ mille fois plus dense que la vapeur. Cette densité plus élevée de la phase liquide autorise des transferts de chaleur pour assurer l'effet sporicide en quelques minutes. De ce fait, l'eau en phase liquide permet d'obtenir un effet sporicide rapide, cependant l'eau en phase vapeur permet de mettre à profit deux propriétés essentielles des gaz ; leur possibilité de diffuser dans toutes les directions et la très grande quantité de chaleur libérée lors de la condensation des gaz (enthalpie de vaporisation) (Dominique, 2019).

Trois paramètres sont à prendre en compte pour la stérilisation par l'autoclave (Figure 1) ; pression, température et temps de stérilisation (Brunod, 1997). En effet, 20 min à 120°C suffisent à tuer tous les microorganismes, même les spores bactériennes les plus résistantes (Asimus, 2002). L'autoclave induit la dénaturation des macromolécules bactériennes par

l'hydrolyse partielle des chaînes peptidiques et la modification de la perméabilité de la membrane des spores (Cherif, 2020).

L'action conjuguée de l'humidité et de la chaleur permet la dénaturation des protéines bactériennes par hydrolyse, où, les molécules d'eau viennent former des liaisons hydrogènes avec les groupes CO et NH des protéines, déstabilisent ainsi leur conformation naturelle et inhibent les mécanismes de duplication moléculaire (Howard, 2004).

Selon Chenafa et Derbal (2016), la procédure de stérilisation par l'autoclave est résumée dans 4 phases principales:

- 1) Phase de montée de la pression et de la température de l'eau qui sera soit transformée en vapeur, soit en eau surchauffée. Cette première phase se fait par différentes phases de mise sous vide. Le but étant d'atteindre un vide parfait.
- 2) Phase de stérilisation avec une pression constante durant un laps de temps donné.
- 3) Phase de diminution du couple eau / pression pour une redescente de la chaleur.
- 4) Phase de disparition totale de la pression pour un retour à la pression atmosphérique normale.

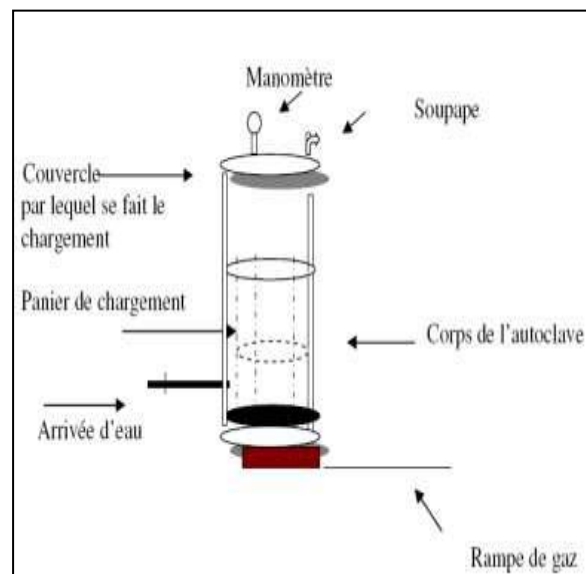


Figure 1 Autoclave à chargement vertical (Anonyme 1).

Les principaux avantages d'autoclavage sont la haute efficacité, la destruction rapide d'organismes unicellulaires, la destruction de la totalité des microorganismes pathogènes et il ne produit pas de résidus toxiques (Chenafa et Derbal, 2016). L'autoclavage a aussi des inconvénients ; risque de dénaturer certaines substances telles que les sucres, les protéines et les vitamines (Labrouzi, 2019).

1.1.1.2- Tyndallisation

La tyndallisation est une méthode de stérilisation en plusieurs temps, inventée en 1876 par l'Irlandais John Tyndall, pour obtenir une meilleure conservation. Elle est utilisée pour tuer les endospores résistantes à la chaleur (Banupriy et *al.*, 2020). Elle consiste d'une série de 3 pasteurisations d'une heure de temps à 70-80°C qu'elles sont séparées par un intervalle de 24h à température ambiante. La période de repos permettra aux spores de germer en cellules bactériennes qui seront tuées par le chauffage du lendemain sans l'emploi d'une température excessive (Banupriy et *al.*, 2020).

- Efficacité

Le processus de tyndallisation est généralement efficace, mais cela n'est pas considéré comme totalement fiable pour détruire certaines spores thermorésistantes qui peuvent survivre, germer et se multiplier plus tard. Donc, la méthode de tyndallisation est relativement simple mais elle est peu longue (Vandeweyer, 2020).

1.1.1.3- Chaleur sèche « four Pasteur »

La chaleur sèche tue les microorganismes en combinant l'oxydation des protéines par l'oxygène de l'air et l'enlèvement de l'eau qui est indispensable au maintien de la structure protéique (Clem, 1992).

Le stérilisateur du type Poupinel (Figure 2) ressemble à un four ménagé, non vitré et hermétique, muni de grilles permettant d'y déposer les paquets. La chaleur sèche de cet appareil ne peut s'utiliser que sur les matériaux supportant des températures élevées comme les instruments métalliques, la verrerie et éventuellement le papier et les tissus. La verrerie à stériliser doit être propre et parfaitement sèche, éventuellement bouchée avec du coton et emballée dans du papier solide. Elle est alors disposée à l'intérieur du four et subit un chauffage à des températures variantes (Cherif, 2019).

Dans cette technique, deux paramètres sont à prendre en compte ; le temps de stérilisation et la température, où 30 min de stérilisation à 170°C suffisent à détruire tous les microorganismes, mêmes les spores bactériennes les plus résistantes (Tredese, 2006).



Figure 2 Four Pasteur (Maghi et *al.*, 2016).

Le principal avantage du four Pasteur est la répartition homogène de la chaleur dans l'enceinte par un système de ventilation qui assure une stérilisation homogène de matériaux (Tredese, 2006). Actuellement, la chaleur sèche n'est plus utilisée en chirurgie humaine à cause de ses inconvénients, de l'avènement de nouvelles méthodes de stérilisation et surtout parce qu'elle est inefficace pour stériliser les agents transmissibles non conventionnels (Beal et *al.*, 2000). Il est techniquement impossible de mettre un capteur de température au cœur de la charge, il y aura donc un décalage entre la température indiquée et celle réellement obtenue au cœur (Brunod, 1997). De plus, le temps nécessaire est considérablement plus long que celui pour d'autres méthodes de stérilisation (Tredese, 2006).

1.1.1.4- Pasteurisation

La pasteurisation est un traitement thermique d'un produit à des températures comprises entre 60 et 100°C durant 15 s et le refroidissement doit se faire dans l'immédiat (Figure 3) (Fellows, 2017) pour détruire la totalité des microorganismes pathogènes non sporulés et réduire significativement la flore végétative. De ce fait, elle présente donc un inconvénient majeur qui est l'incapacité de détruire les flores sporulées (Cnokaert, 2017).

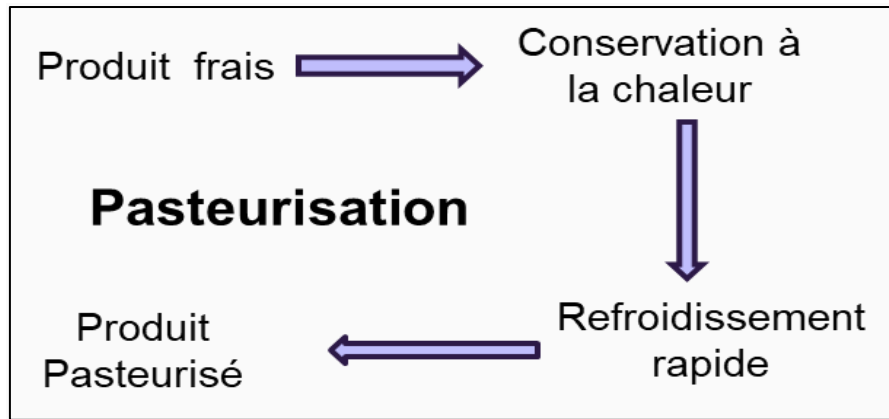


Figure 3 Schéma explicatif du processus de pasteurisation.

- Efficacité

Les activités biologiques inactivées par la pasteurisation sont les flores non pathogènes d'altération des aliments, les flores pathogènes et toxigènes (*Salmonella*, *Brucella*, *Listeria*, etc.), les enzymes endogènes comme la lipoxigénase du soja, l'oxygénase qui catalyse l'oxygénation des acides gras polyinsaturés, la plasmine présente dans le lait et les enzymes intracellulaires nuisibles (Cnokaert, 2017).

1.1.2- Stérilisation non thermique

La stérilisation non thermique correspondante à la destruction des microorganismes sans l'utilisation des températures élevées (Emilie, 2009). Elle comprend nombreuses techniques.

1.1.2.1- Lumière ultraviolette

La lumière ultraviolette (UV) constitue le meilleur exemple de rayonnements non ionisants. Cette méthode est efficace pour la stérilisation des dispositifs de laboratoires et elle nécessite de contrôler un seul paramètre qui est la dose de radiations. Elle est très utilisée en milieu industriel, pour la préparation de divers matériaux qui ne supportent pas les autres moyens de stérilisation ; physiques et chimiques (Cherif, 2020).

L'UV est aussi utilisée pour limiter la présence des microbes dans l'air et dans les laboratoires de recherche pour préparer les plans de travail stériles (Gore, 2021). Dans lequel, l'UV détériore l'ADN des cellules qui y sont exposées en provoquant la formation de liaisons entre des molécules adjacentes de thymine dans un des brins d'ADN. L'anomalie produite empêche la réplication correcte de l'ADN lors de la reproduction de la cellule. Les rayonnements UV les plus efficaces pour la destruction de microorganismes ont une longueur d'onde de 260 nm (Figure 4), les rayons de cette longueur d'onde sont plus facilement absorbés par l'ADN cellulaire. En effet, les UV sont connus pour leur caractère mutagène (Gore, 2021).

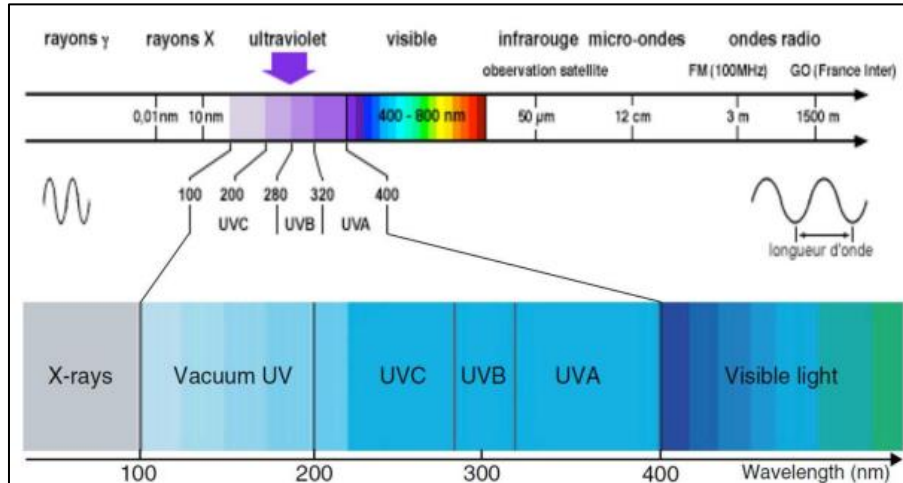


Figure 4 Position du rayonnement ultraviolet dans le spectre électromagnétique (Yin et al., 2013).

- Efficacité

Les rayonnements de cette technique de stérilisation, UV, sont très bactéricide mais peu pénétrants. Ils sont généralement utilisés pour une stérilisation superficielle des instruments, des surfaces et d'atmosphère des enceintes. Ils sont évidemment très efficaces, mais aussi très dangereux qu'ils sont arrêtés par le moindre obstacle (Cherif, 2020).

1.1.2.2- Filtration

C'est une méthode de séparation membranaire par laquelle les microorganismes et quelques virus sont séparés de mélanges liquides (Guinochet, 1994). Cette technique est utilisée pour stériliser les milieux liquides, de faible viscosité, sensibles à la chaleur (Goulet, 2003). Selon la taille des pores du filtre, la filtration est distinguée en microfiltration et ultrafiltration.

- **Microfiltration** qui élimine les microorganismes en suspension et certains virus. Pour réaliser cette filtration, des membranes dont la taille des pores est comprise entre 0,1 et 10 µm ont été utilisées pour éliminer toutes les bactéries (Anonyme 2, 2020).

- **Ultrafiltration** qui élimine la totalité des virus dont la taille des pores des membranes de l'ultrafiltration est comprise entre 0.001 à 0.1 µm (soit 1 à 100 nm). Elle bloque donc les bactéries, les levures et la plupart des virus (Anonyme 2, 2020).

La filtration a une forte capacité de rétention des microorganismes et leurs niveaux de performances relativement constants en cours de filtration (Jean, 2015), de plus elle peut être utilisée comme alternative de stérilisation par chaleur en cas des produits sensibles à la chaleur. Mais la filtration peut seulement être appliquée pour les produits non visqueuses (Goulet, 2003).

- Filtration de l'air des locaux

L'accumulation de poussières peut provoquer la prolifération des microorganismes (Desmons, 2009). Pour cela, la filtration est la méthode adéquate pour protéger les personnes et les processus industriels et débarrasser l'air des polluants ; champignons et bactéries allergènes et pathogènes. Elle protège les équipements des locaux contre les poussières pour augmenter, principalement, leur durée de vie et diminuer leur maintenance (Yakoubi et *al.*, 2018).

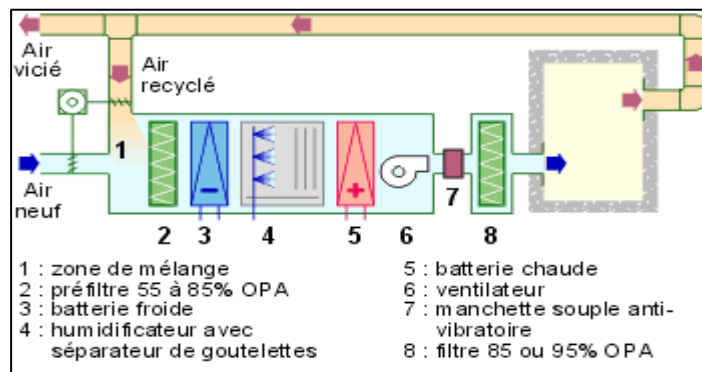


Figure 5 Filtration de l'air (Yakoubi et *al.*, 2018).

Deux types de filtres peuvent être distingués selon la taille des contaminants à capter; primaire et secondaire (Yakoubi et *al.*, 2018). Les filtres primaires ont pour protéger les équipements contre les poussières grossières, les fragments de feuilles et les insectes susceptibles de s'y trouver. Cependant, les filtres secondaires qui doivent être changés périodiquement ont pour capter les microparticules ; microorganismes (Yakoubi et *al.*, 2018).

Les filtres à couche poreuse peuvent aussi être classés en fonction de leur efficacité en trois groupes (Tableau 1):

- Filtres à moyenne efficacité (classes G1 à G4) : Filtre plan ;
- Filtres à haute efficacité (classes F5 à F9) : Filtre à poches, filtre plissé ;
- Filtres à très haute efficacité ou absolus (classes H10 à H14) : Filtres à haute performance HEPA (*high-efficiency particulate air*) (Sofia, 2006).

Tableau 1 Différentes classes des filtres (Sofia, 2006).

Eléments à filtrer	Classe	Applications
Insectes, fibres textiles cheveux, sables, cendres, pollen, ciment.	G1 G2	- Utilisations simples (protection contre les insectes).
	G3 G4	- Pré filtre et filtre pour les installations de protection civile. - Evacuation de l'air des cabines de peinture, des cuisines. - Protection anti-pollution pour les climatiseurs (par exemple de fenêtre). - Pré filtre pour les classes de filtration F6 à F8.
Pollen, ciment, particules salissantes (poussière), germes, poussières chargées de bactéries.	F5	- Filtre sur l'air neuf des locaux à faible exigence (ateliers, garages, entrepôts).
	F5 F6 F7	- Pré filtre et filtre pour les centrales de traitement de l'air. - Filtre final dans les installations de climatisation pour magasins, bureaux et locaux de fabrication. - Pré filtre pour classes F9 à H12.
Fumées d'huile et de suie agglomérées, fumée de tabac, fumée d'oxyde métallique.	F7 F5 F9	- Filtre final dans les installations de climatisation pour bureaux, locaux de fabrication, hôpitaux, centrales électriques, locaux ordinateurs. - Pré filtre pour filtres absolus et filtres à charbon actif.
Germes, bactéries, virus, fumée de tabac, fumée d'oxyde métallique.	H10 H11 H12 H13 H14 U15 U16	- Filtre final pour locaux à haute exigence, laboratoires, alimentation, pharmacies, mécanique de précision, industrie optique et électronique.
	H11 H12	- Filtre final pour salles blanches.
Vapeur d'huile et suie en formation, particules radioactives.	H13 H14 U15 U16	- Filtre final pour salles blanches Filtre final pour salle d'opération. - Filtre final pour évacuation d'air des installations nucléaires.

1.1.2.3- Agents chimiques

Les agents chimiques sont utilisés pour la désinfection des salles, des plans de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Les désinfectants chimiques courants comprennent les alcools, le chlore, les composés chlorés, le glutaraldéhyde, l'orthophtalaldéhyde, le peroxyde d'hydrogène, les composés phénoliques, les biguanides et les composés d'ammonium quaternaire (Syed, 2014).

- Gaz plasma de peroxyde d'hydrogène

Cette technique est une stérilisation à basse température, réalisée par combinaison des effets du peroxyde d'hydrogène et du plasma de peroxyde d'hydrogène. Sous leurs actions, les acides nucléiques et la membrane des microorganismes sont détruits. Ce procédé s'applique aux matériels thermosensibles. L'action microbicide du peroxyde d'hydrogène est basée sur son pouvoir oxydant qui détruit de façon irréversible les systèmes actifs des cellules de microorganismes (Vallée, 2020).

- Oxyde d'éthylène

L'oxyde d'éthylène (OE ; 1, 2-Epoxyéthane), le plus simple des éthers cycliques, est un gaz incolore très diffusible avec une odeur éthérée. C'est aussi un gaz inflammable et explosif à une température ambiante. Il est également soluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques (Ahid et *al.*, 2005).

Cet oxyde a une haute efficacité de stérilisation où il atteint les principaux constituants de la matière vivante (ADN, protéines, vitamines, enzymes, etc.). Ainsi, il enlève aux microorganismes leur faculté de reproduction par une réaction d'alkylation des acides nucléiques des cellules par hydroxyéthylation irréversible au niveau de l'azote des bases puriques des phosphates et de certaines protéines. Ce gaz possède des propriétés bactéricides, fongicides, virucides et sporicides, il est donc actif contre tous les microorganismes connus, sauf les prions (Ahid et *al.*, 2005).

Le principal avantage de la stérilisation par les agents chimiques est le pouvoir stérilisant efficace à basse température, ils sont donc utilisables pour la stérilisation des matériaux sensibles à la vapeur d'eau et à la chaleur. Par contre, ils ont des inconvénients ; le pouvoir d'explosion en présence d'oxygène et d'air et la toxicité (Vallée, 2020).

1.1.2.4- Champs électriques pulsés

Ce traitement consiste à appliquer une haute tension sous forme de courtes impulsions électriques à un produit placé entre deux électrodes (Figure 6) (Semmaks, 2018). L'intensité d'électricité varie généralement de 0,1 à 5 kV/cm durant 10-1000 μ s pour le traitement des cellules végétatives et jusqu'à 15-80 kV/cm durant 1-5 μ s pour l'inactivation des spores (Pierson, 2000 ; Vorobiev, 2010).

Le principe d'action de cette technique consiste à créer des pores dans la membrane cellulaire (Semmaks, 2018), où l'exposition de la membrane à un champ électrique entraîne une accumulation des charges en surface de la membrane, ce qui augmente le potentiel transmembranaire. Cette accumulation des charges, de signes opposés, provoque une compression de la membrane cellulaire puis une rupture membranaire qui provoque par suite une lyse cellulaire (Savova, 2008).

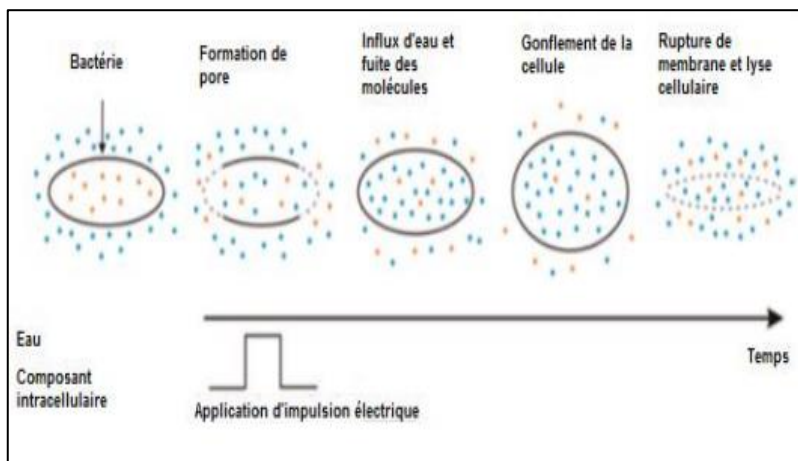


Figure 6 Principe de stérilisation par champs électriques pulsés (Zelmat, 2017).

1.1.2.5- Stress osmotique

Le stress osmotique correspond à une diminution ou une augmentation de l'osmolarité de l'environnement de la bactérie (Csonka, 1989). Donc, il y'a deux types de stress osmotique ; le stress hypo-osmotique correspond à une diminution rapide de l'osmolarité du milieu extérieur, choc hypo-osmotique, qui provoque un afflux d'eau dans la cellule, par conséquent une augmentation du volume cellulaire et de la pression de turgescence (Baliarda, 2003). Alors que, le stress hyper-osmotique correspond à une augmentation soudaine de l'osmolarité de l'environnement entraîne le mouvement de l'eau de la cellule vers l'extérieur ; où le volume du cytoplasme diminue. Ce phénomène de plasmolyse peut être détecté instantanément par une augmentation de la turbidité du milieu (Koch, 1984 ; Angelis et Gobbetti, 2004).

En effet, les microorganismes se développent des mécanismes d'adaptation pour peuvent se vivre sous stress osmotique (Galinski, 1995). En cas de stress hypo-osmotique, les microorganismes mettent en place des mécanismes d'afflux de solutés via des systèmes spécifiques (transporteurs secondaires) et non spécifiques (canaux mécanosensibles), afin de diminuer la pression de turgescence cellulaire (Alatou, 2019). En cas de stress hyper-osmotique, les microorganismes ont deux stratégies d'osmorégulation qui ont été décrits pour affronter le choc hyper-osmotique ; l'accumulation de sel dans le cytoplasme et l'accumulation de solutés compatibles (Alatou, 2019).

1.2- Microorganismes

Les microorganismes, aussi appelés microbes ou protistes, forment un ensemble d'organismes vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu qui est leur seul point commun, car ils diffèrent par leur morphologie, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie (Perry et *al.*, 2004). Il est possible de distinguer, d'une part les micro-organismes procaryotes qui ne possèdent pas de noyau comme les bactéries et d'une autre part les microorganismes eucaryotes qui ont un noyau. En effet, les eucaryotes microscopiques comprennent les champignons en l'occurrence ; levures et moisissures, ainsi les deux types de protistes ; algues et protozoaires (Prescott et *al.*, 2003).

1.2.1- Bactéries

Une bactérie est un être vivant unicellulaire procaryote de petite taille varie entre 1 à 10 μm et de morphologie variable qui présente des caractéristiques propres (Hahn et *al.*, 2004). Elle a aussi une membrane cytoplasmique entouré d'une paroi cellulaire; un polymère unique entrelacé appelé peptidoglycane rend la paroi rigide. Son cytoplasme ne contient que des ribosomes et un seul ADN double brin chromosomique (Tortora et *al.*, 2012).

Les bactéries n'ont pas de noyau, mais tous les éléments chimiques de l'acide nucléique et des protéines sont présents. Bien que leurs besoins nutritionnels varient considérablement, la plupart des bactéries sont libres de vivre, si on leur donne une source d'énergie appropriée. Elles se divisent par fission binaire et peuvent être cultivées en culture artificielle (Kenneth et *al.*, 2004). En effet, certaines espèces de bactéries peuvent sporuler comme *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens*, alors que les autres ne forment jamais de spores comme *Escherichia coli*.

1.2.1.1- Bactéries sporulantes

Contrairement aux bactéries à Gram-, certaines bactéries à Gram + peuvent fabriquer des endospores (Figure 7) (Jui- Hong et *al.*, 2018).

Ces endospores sont constituées d'ADN bactérien, de protéines, d'acide dipicolonique (DPA) et de ribosomes qui est utilisé dans une réactivation ultérieure. Elles ont une paroi protectrice épaisse avec une membrane interne, un peptidoglycane très solide qui forme la paroi des spores et un cortex. Par conséquent, les endospores peuvent tolérer n'importe quelle insulte, elles peuvent survivre pendant des centaines d'années (Henrique et *al.*, 2007). Elles sont également résistantes aux températures élevées, mais pas supérieures à 100°C qu'elles peuvent les tuer. En effet, la germination des endospores est le processus de leur réactivation, une fois elles sont exposées à l'eau, où elles gonflent et toutes leurs parois protectrices éclatent (Jui-Hong et *al.*, 2018).

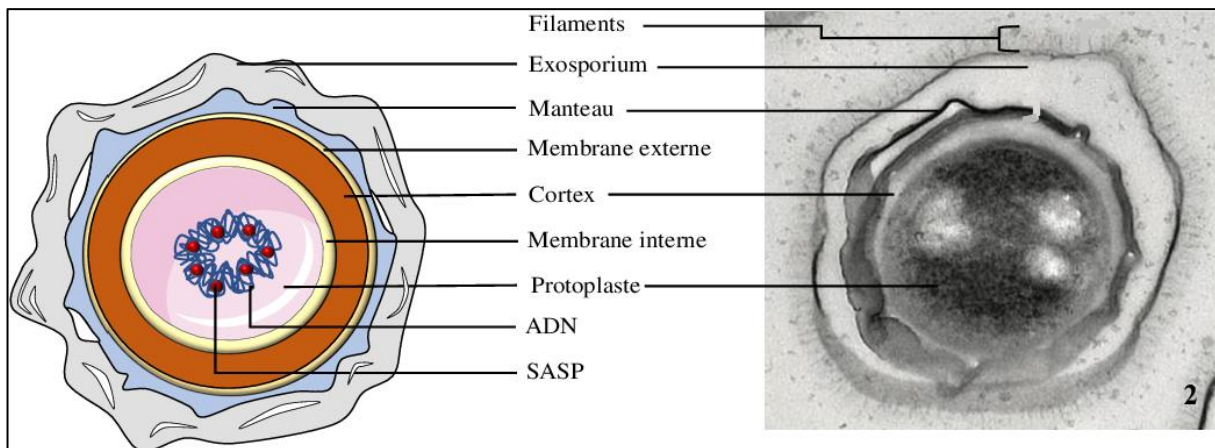


Figure 7 Structure des endospores (Modugno, 2018).

Les endospores peuvent survivre à des agressions environnementales qui tueraient normalement la bactérie, forme végétative. Ces contraintes comprennent la température élevée, l'irradiation UV, la dessiccation, les dommages chimiques et la destruction enzymatique, où, les propriétés de résistance extraordinaires des endospores les rendent d'une importance particulière parce qu'elles ne sont pas facilement tuées par de nombreux traitements antimicrobiens (Jhon, 2018). De ce fait, différents microorganismes forment des spores, mais les endospores des bactéries à Gram + sont les plus résistantes aux conditions difficiles (Jhon, 2018). Alors, l'endospore est le facteur décisif qui distingue la désinfection de la stérilisation, car cette dernière doit la tuer (Jui-Hong et *al.*, 2018). Certaines bactéries sont sporulantes en l'occurrence *Bacillus* et *Clostridium*.

- *Bacillus cereus*

Le genre *Bacillus* est un groupe de bactéries extrêmement diversifié qui comprend à la fois l'agent causal de la fièvre charbonneuse, ainsi que plusieurs ses espèces synthétisent des antibiotiques importants (Ivanova et *al.*, 2003). En plus, ce genre bactérien a des utilisations médicales, où ses spores, en raison de leur extrême tolérance à la chaleur et aux désinfectants, sont utilisées pour tester l'efficacité des techniques de stérilisation thermique et les désinfectants chimiques. Ce genre est également utilisé dans l'industrie de la fabrication de détergents pour sa capacité à synthétiser des enzymes importantes (Graumann et *al.*, 2007).

Caractéristiques et taxonomie

Bacillus cereus est une bactérie à Gram +, anaérobie facultative, sporulée que l'on trouve couramment dans le sol et les aliments. Le nom spécifique, *cereus*, signifiant « cireux » en latin, fait référence à l'apparition de colonies cultivées sur gélose au sang (Ryan et *al.*, 2004). La croissance de cette bactérie est observée à des températures situant entre 10-20 °C et 35-45 °C, où la température optimale étant d'environ 37 °C (Murray et *al.*, 2007).

La morphologie de cette bactérie correspond à un grand bacille en forme de bâtonnet de 1 µm de largeur et 3 à 4 µm de longueur, elle est mobile grâce à une ciliature péritriche (figure 8) (Vilain et *al.*, 2007). Sa structure cellulaire se compose d'une membrane interne et d'un peptidoglycane épais qui sert à maintenir la forme cellulaire (Ticknor et *al.*, 2001), où, la partie polysaccharide représente 50% de la paroi cellulaire et se compose d'un polysaccharide neutre composé de N-acétylglucosamine. Alors que, la partie acide de la paroi cellulaire est composée d'une unité tétrasaccharidique répétée. Par ailleurs, 5% de la paroi cellulaire est constituée d'acides techoïques de type ; N-acétylglucosamine, galactose, glycérol et phosphore (Severin et *al.*, 2004).

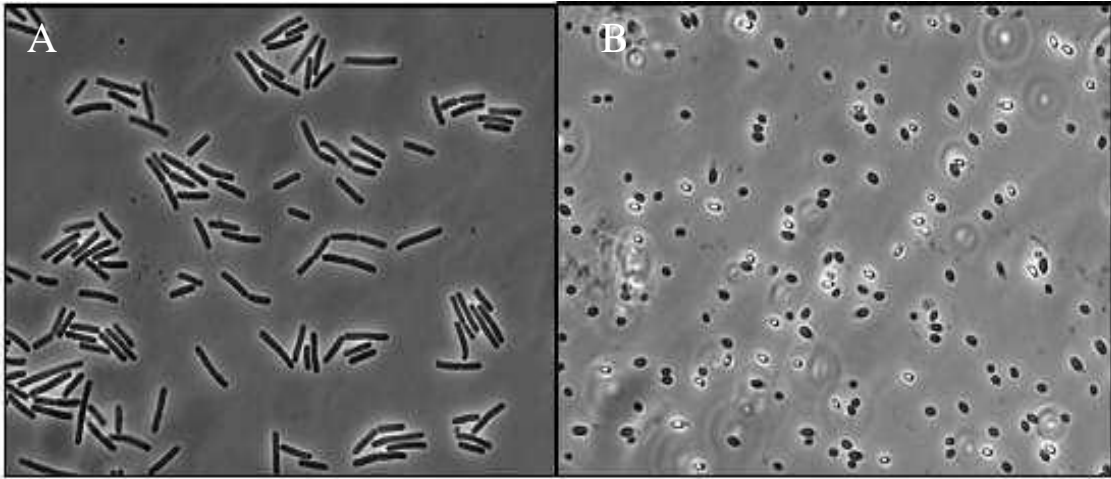


Figure 8 Différentes formes de *B. cereus* sous microscope optique ;

A : cellules végétatives, B : spores dormantes (corps réfringent) ou spores en germination (corps opaque) (Laouami, 2012).

Selon Gordon *et al.* (2000), les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en 3 groupes définis suivant la morphologie, la position et la déformation de la spore. *B. cereus* fait partie du groupe I, où la clé de détermination des espèces de ce groupe prend en compte la forme et la position de la spore qui est sphérique ou ovoïde, centrale ou terminale; respectivement. Ce groupe est constitué des bacilles dont le diamètre est supérieur à $1\mu\text{m}$ et contenant des inclusions de poly-beta-hydroxybutyrate. Sur le plan taxonomique, *B. cereus* est classée parmi les Firmicutes.

Règne : *Bactéria*

Embranchement : *Firmicutes*

Ordre : *Bacillales*

Famille: *Bacillacées*

Genre : *Bacillus*

Espèce : *B. cereus*

Ecologie et pathologie

B. cereus interagit avec d'autres micro-organismes de la rhizosphère et les racines des plantes environnantes. Ces dernières, racines des plantes, bénéficient de la présence de cette bactérie car elle est capable d'inhiber les maladies des plantes causées par des agents pathogènes de protestation et d'améliorer également la croissance des plantes (Jensen *et al.*, 2003). Elle produit naturellement les antibiotiques Zwittermicine A et Kanosamine qui inhibent la croissance des agents pathogènes des plantes, des oomycètes, de certains champignons et de quelques espèces bactériennes (Peterson *et al.*, 2004). En tant que bactérie omniprésente, de

petites quantités sont consommées par les êtres humains à partir des aliments. Par conséquent, elle contribue à la microflore intestinale humaine. De plus, *B. cereus* peut provoquer des intoxications alimentaires et des infections en tant qu'agent pathogène opportuniste (Felis et al., 2007). Par ailleurs, elle peut produire six types de toxines, à savoir cinq entérotoxines et une toxine émétique, qui peuvent être thermostables ou thermolabiles (Logan et al., 2007).

- *Clostridium perfringens*

Les clostridies se sont des anaérobies à Gram+ sporulés, bien que certaines espèces soient microaérophiles. Ils sont connus pour produire une variété de toxines dont certaines sont mortelles (Maczulak, 2011).

Caractéristiques et taxonomie

Clostridium perfringens est un bacille mésophile qui a une température de croissance optimale de 37° C (Kiun et al., 2018). C'est un agent pathogène non mobile qui produit des endospores. Cette bactérie produit de l'énergie par respiration anaérobie en utilisant des composés autres que l'oxygène tels que le nitrate, comme accepteur final d'électrons (Caim et al., 2017).

C. perfringens est une bactéries à Gram + en forme de tige de diamètre de 5 µm sur 1 µm (Figure 9) (Ryan et al., 2004). Elle possède les caractéristiques typiques des bactéries à Gram+; une paroi cellulaire épaisse protectrice composée de peptidoglycane entourant une membrane interne (Caim et al., 2017).

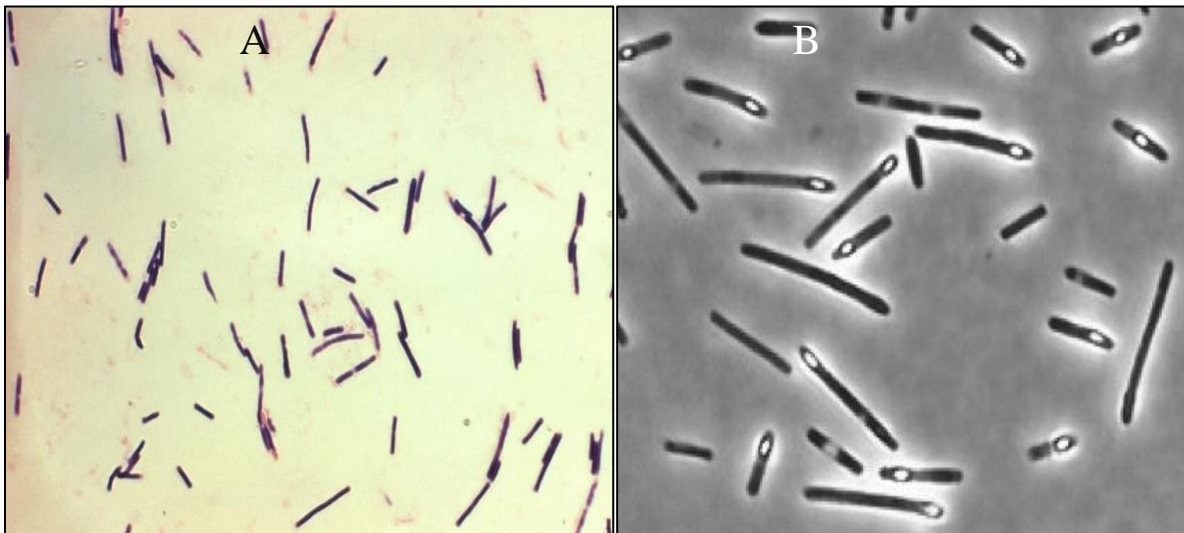


Figure 9 Différentes formes de *C. perfringens* spores sous microscope optique.

A: cellules végétatives. B: spores (Meyer, 2021).

Sur le plan taxonomique, *C. perfringens* est classé parmi les Firmicutes.

Règne : *Bactéria*

Embranchement : *Firmicutes*

Classe : *Clostridia*

Ordre : *Clostridiales*

Famille : *Clostridiaceae*

Genre : *Clostridium*

Espèce : *C. perfringens*

Ecologie et pathologie

C. perfringens est un agent pathogène dont les cibles principales sont les êtres humains et les animaux. Cette bactérie peut se trouver dans de nombreux habitats différents, tels que la flore normale du tractus gastro-intestinal (GI) humain et l'environnement comme les eaux usées et le sol (Tohru et *al.*, 2002).

Plusieurs maladies courantes sont associées à cette bactérie, *C. perfringens* ; l'intoxication alimentaire, la gangrène gazeuse (figure 10) et nombreuses maladies vétérinaires. En effet, *C. perfringens* entérotoxine (CPE) est le principal facteur virulent qui déclenche de nombreuses maladies GI critiques (John et *al.*, 1999). Cette bactérie est aussi classé en cinq sérotypes A, B, C, D et E selon les toxines extracellulaires secrètes; alpha, bêta, epsilon et iota (Deepa et *al.*, 2007).



Figure 10 Gangrène gazeuse (Larry et Bush, 2020).

1.2.1.2- Bactéries non sporulantes

Il existe plusieurs espèces bactériennes pathogènes non sporulantes telles que ; *Salmonella enterica*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*.

- *Escherichia coli*

Escherichia coli est devenu un organisme modèle pour l'étude de nombreux processus essentiels de la vie, en raison de son taux de croissance rapide et de ses besoins nutritionnels simples. Les recherches ont des informations bien établies sur la génétique d'*E. coli*. Pour cela, actuellement, les chercheurs intéressent plus sur cette bactérie que sur autres organismes vivants (Abbott et al., 2003).

Caractéristiques et taxonomie

Escherichia coli, également appelée colibacille et abrégée en *E. coli*, est une bactérie intestinale des mammifères, asporulée et très commune chez l'être humain (Nataro et al., 2007). Elle peut se déplacer au moyen de flagelles péritriches ou être immobile. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie (Farmer et al., 2007).

E. coli est un bacille à Gram -, sa taille varie en fonction des conditions de croissance entre 0,5 et 3 μm , de poids de 0,5 à 5 picogrammes (Figure 11) (Nataro et al., 2007). Elle possède une paroi cellulaire qui se compose d'une membrane extérieure contenant des lipopolysaccharides, un espace périplasmique avec une couche de peptidoglycane, une membrane cytoplasmique interne. Certaines souches sont capables d'accepter et de transférer le plasmide à une destination et en provenance d'autres bactéries. Cette propriété permet à *E. coli* de survivre dans des mauvaises conditions (Reed et al., 2005).

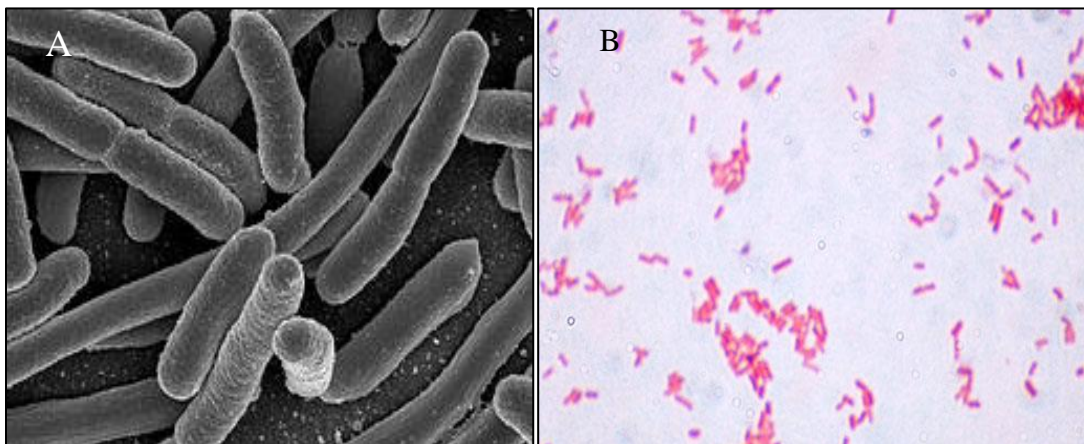


Figure 11 Morphologie d'*E. coli* ; **A** : *E. coli* sous microscope électronique (Bouzide, 2019). **B** : *E. coli* en coloration de Gram sous microscope optique (Boulade, 2019).

E. coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Règne : *Bacteria*

Embranchement : *Proteobacteria*

Classe : *Gamma Proteobacteria*

Ordre : *Enterobacterales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Escherichia*

Espèce : *E. coli*

Ecologie et pathologie

E. coli peut couramment être trouvée dans l'intestin inférieur des êtres humains et des mammifères. Lorsque *E. coli* est localisé dans le gros intestin humain, elle peut aider les processus de digestion ; la dégradation, l'absorption des aliments et la production de vitamine K (Parry, 2007). *E. coli* peut également être trouvée dans des environnements à des températures plus élevées, comme sur le bord des sources chaudes. Elle est également utilisée comme un indicateur dans le domaine de la purification de l'eau (Barnich et al., 2007).

Certaines souches de cette espèce, *E. coli*, peuvent provoquer des infections graves chez de nombreux animaux ; les moutons, les chevaux, les chiens, etc. Cette bactérie peut pareillement causer des infections des voies urinaires. *E. coli*O157:H7 est l'une des souches les plus infectieuses qui provoquent une intoxication alimentaire (Champman et al., 2002).

1.2.2- Moisissures

Les moisissures se sont des microorganismes eucaryotes, hétérotrophes et filamenteux. Elles sont formées de nombreux filaments minces et enchevêtrés (Nicklin et al., 2000). En effet, les champignons filamenteux sont des organismes ubiquitaires, on les trouve dans le sol, l'air, sur les revêtements de l'homme, des animaux et des plantes (Figarella et al., 2007). Certaines moisissures vivent en symbiose avec les végétaux (Nicklin et al., 2000), des autres sont des parasites des végétaux comme le genre *Alternaria* ou des animaux et des saprophytes qui se développent sur des déchets organiques tels que le *Penicillium* (Dedet, 2007).

La structure des moisissures repose sur leur appareil végétatif appelé thalle, constitué d'hyphes ou cellules allongées en forme de filaments tubulaires de 2 à 10 µm de diamètre. Ces hyphes comprennent les organites classiques d'une cellule : noyau, mitochondrie,

cytoplasme et vésicules. Ils peuvent être cloisonnés ou non et leur association forme le mycélium (Boudih, 2011).

Les moisissures ont deux types de reproduction ; asexuée au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croît et se développe sur un substrat et sexuée implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés (Boudih, 2011). La plupart des moisissures se sont des pathogènes opportunistes comme l'*Aspergillus flavus* et le *Penicillium marneffeii*, profitant d'un affaiblissement de l'hôte pour provoquer une infection.

- *Aspergillus flavus*

L'*Aspergillus* fait partie du phylum des Ascomycota. Il existe plus de 185 espèces connues, l'espèce la plus célèbre de ce genre est *A. flavus*, qui produit de l'aflatoxine (Bacchus et al., 2005).

Caractéristiques et taxonomie

L'*A. flavus* est une moisissure aérobie, relativement ubiquiste, elle semble passer la majeure partie de sa vie à se développer en tant que saprophyte dans le sol, où elle joue un rôle important en tant que recycleur de nutriments soutenu par les débris végétaux et animaux (Scheidegger et al., 2003).

La température optimale de sa croissance est 30°C, mais elle peut croître à des températures de 12 - 48°C (Hedayati et al., 2007). Cette espèce fongique se développe mieux avec une activité de l'eau (A_w) entre 86 et 96 % (Vujanovic et al., 2001). Cette moisissure est diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes et 13 071 gènes (Yu et al., 2005). Elle se reproduit d'une façon asexuée par le développement des mycéliums à partir d'une spore soit d'un fragment de mycélium ou d'une façon sexuée lorsque des souches de type d'accouplement opposé sont cultivées ensemble (Bruseal, 2009).

La colonie d'*A. flavus* a une couleur verte-jaune, relativement plane avec une marge blanche de 1 à 2 mm et une texture poudreuse, alors que le revers est jaunâtre. Les conidiophores sont longs et rugueux et les têtes aspergillaires sont majoritairement radiées, bisériées et splittent en vieillissant. La vésicule de l'*A. flavus* est subglobose de 10 à 65 μm de diamètre, tandis que les conidies sont oblongues et lisses ou légèrement rugueuses (Figure 12) (Samson et al., 2006).

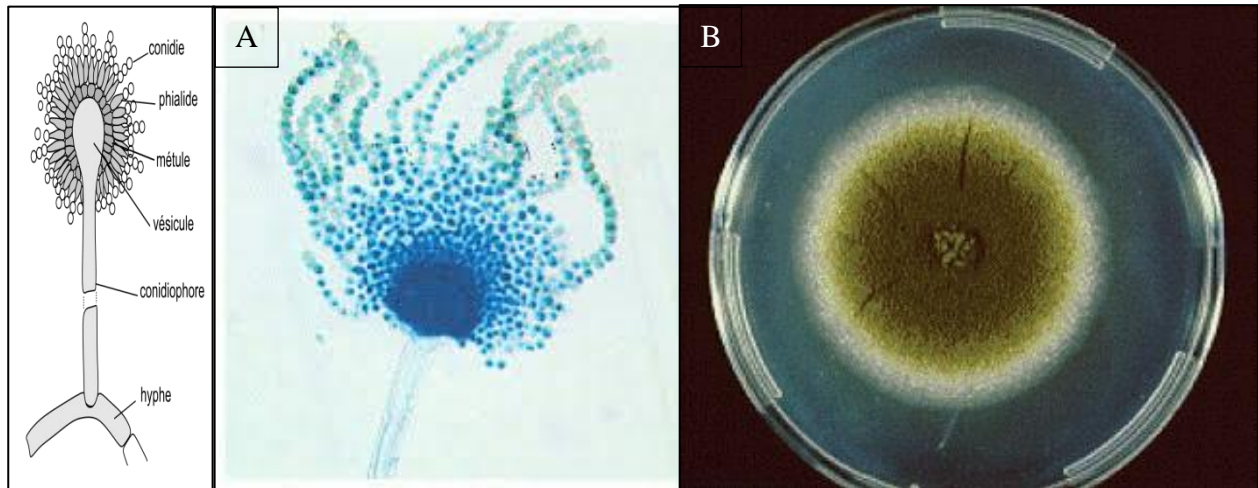


Figure 12 Morphologie d'*A. flavus*.

A: Aspect microscopique (Pasqualotto, 2007), **B :** Aspect macroscopique (Azzahra, 2021).

La classification d'*Aspergillus* est basée principalement sur des différents caractères morphologiques et cultureux (Hedayati et al., 2007) :

Règne : *Fungi*

Embranchement : *Ascomycata*

Classe : *Eurotiomycetes*

Ordre : *Eurotiales*

Famille : *Aspergillaceae*

Genre : *Aspergillus*

Espèce : *A. flavus*

Ecologie et pathologie

A. flavus habite un large éventail d'environnements, où la prévalence de cette moisissure a conduit certains chercheurs à la considérer comme omniprésente. Elle pousse plus facilement sous des climats chauds et prospères sous des latitudes tropicales. Plus précisément, cette espèce répond le mieux aux températures comprises entre 36°C et 38°C. De plus, cette moisissure fleurit dans des endroits plus secs comme les régions désertiques (Scheidegger, 2003). Elle s'agit principalement d'un saprophyte présent dans le sol pour recycler les nutriments. Ce germe est également un parasite opportuniste capable d'infester large gamme d'hôtes ; aviaires, mammifères et plantes (Klich, 2007).

Cette espèce fongique élabore divers mycotoxines, surtout les aflatoxines comme l'aflatoxine B1 ; cette mycotoxine hépato-toxique est l'un des hépato-carcinogènes les plus puissants

connus à l'heure actuelle (Elhimare et *al.*, 2017). Les aflatoxicoses aiguës ou chroniques ont fréquemment été observées chez les volailles, les porcins, les jeunes ovins et bovins, ainsi que les truites.

En effet, les matières premières susceptibles d'être contaminées par les aflatoxines sont principalement l'arachide et les grains (Bruseal, 2009). *A. flavus* présente également un important pouvoir pathogène attaquant principalement les voies respiratoires de l'homme et des animaux. C'est l'un des principaux responsables des aspergilloses bronchiques allergiques (Figure 13) (Hedayat et *al.*, 2007).

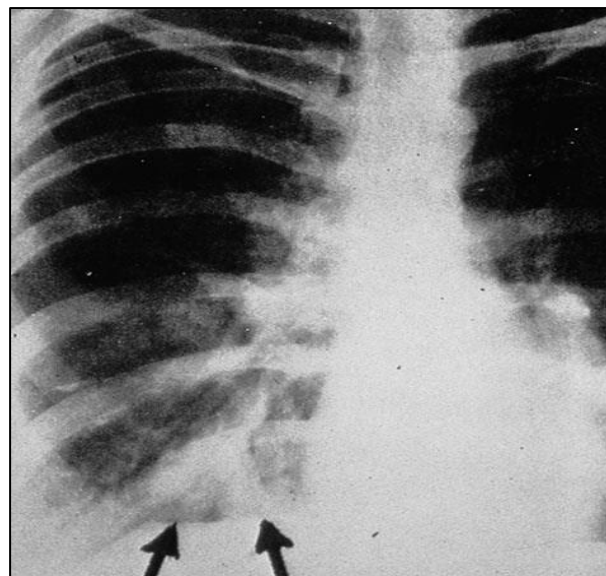


Figure 13 Aspergillose broncho-pulmonaire allergique (Golinval, 2007).

1.3- Mécanismes de résistance des microorganismes

La résistance d'un microorganisme face aux divers facteurs de stress; haute température, haute pression, lumière ultraviolette, etc ; dépend de son état physiologique et la composition du milieu où il se trouve. En effet, la cellule stressée se développe lentement mais acquiert un niveau de protection au stress supérieur à celui d'une cellule en croissance normale (Alatou, 2019).

1.3.1- Haute température

Les hautes températures induisent des altérations au niveau des différents constituants biochimiques des microorganismes (Cunault, 2012). Pour cela, ces microorganismes développent des mécanismes de résistance à ces températures élevées ; l'accumulation des composés organiques tels que les sucres, les polyalcools et les acides aminés, qui induit une

diminution de l'activité de l'eau et fait une déshydratation partielle pour augmenter leur thermorésistance (Marechal,1999 ; Erwan, 1971), ainsi la synthèse des protéines spécifiques modifiant la perméabilité membranaire et augmentant la capacité de résistance de ces microorganismes à des températures potentiellement mortelles (Cunault, 2012 ; Bimbenet et *al.*, 2002 ; Albers et *al.*, 2000).

Les constituants chimiques de la membrane cytoplasmique de certains microorganismes; en particulier les acides gras plus longs, plus saturés, avec des cyclisations ou des glycophospholipides susceptibles qui forme des monocouches (Bennett, 2006), les protéines et les viscosants comme le cholestérol (Madigan et *al.*, 2010), augmentent le point de fusion de la membrane et même sa stabilité à plus hautes températures qui peuvent atteindre 140-150°C (Holden et *al.*, 2004).

Certaines bactéries mésophiles et thermophiles sont également capables de former des endospores, telles que *Bacillus* et *Clostridium*, qui ont une structure unique en multicouches, véritable barrage au stress environnemental (Cunault, 2012).

Par ailleurs, lors de stress modéré, certains microorganismes possèdent des enzymes ; comme la ligase et la catalase, qui permettent de réparer les dommages thermiques causés notamment à l'ADN (Cunault, 2012).

1.3.2- Haute pression

L'inactivation de microorganismes par hautes pressions est principalement attribuée aux dommages causés aux membranes et aux protéines de transport (Daryaei et *al.*, 2016). En effet, les cellules soumises à un stress hyperbare, activent des réponses spécifiques telles que l'augmentation du nombre d'acides gras insaturés dans les lipides membranaires. Cette dernière, d'une part augmente la fluidité membranaire de la cellule et d'une autre part préserve la fonctionnalité de la membrane en compensant l'effet rigidifiant de la pression (Simonin et *al.*, 2012).

Certaines bactéries synthétisent des protéines de réparation des dommages causés par la pression (Lerasle et *al.*, 2012).

La formation des endospores est aussi considérée comme un mécanisme de résistance aux pressions élevées (Cunault, 2012).

1.3.3- Lumière UV

L'irradiation des microorganismes par les UV induit un changement photochimique de l'ADN, qui peut conduire à la mort de la cellule. Ces changements due à la taille ; plus l'organisme ciblé est petit, plus il sera résistant (Rahman, 2007), le stade de croissance et le Gram de la bactérie; les bactéries à Gram+ sont généralement plus résistantes que les bactéries à Gram- (Philip, 2003).

De ce fait, le système de réparation des mutations induit par l'UV, l'addition covalente d'un groupement méthyle sur la cytosine par les méthyltransférases de l'ADN (Rottach et al., 2009) et la formation des endospores chez les bactéries sporulantes comme *B. cereus* et *C. perfringens* (Ghosal et al., 2005 ; Mahapatra et al., 2005) sont les systèmes de résistance les plus développés chez les microorganismes contre l'effet mortel de l'UV.

Matériel et méthodes

2- Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) et aussi au niveau des laboratoires pédagogiques de la Faculté SNV (laboratoires 14 et 9), Université Frères Mentouri Constantine 1.

Cette étude a pour but d'évaluer la fiabilité de quelques systèmes de stérilisation et de détecter les micro-organismes récalcitrants. En effet, différentes méthodes de stérilisation ont été vérifiées sur distincts microorganismes ; *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Clostridium perfringens* et *Aspergillus flavus*.

2.1- Microorganismes test

Dans ce travail, trois souches bactériennes et une moisissure ont été utilisées. En effet, un isolat bactérien ; *Clostridium sp.* ; a été isolé à partir d'oued de la région de Constantine, Cité les frères Brahmia -Lemleche- (Mai 2021) (Figure 14) et deux souches bactériennes ; *E. coli* et *B. cereus* ; ainsi une moisissure *A. flavus* ont été ramenées à partir du laboratoire LaMyBAM.

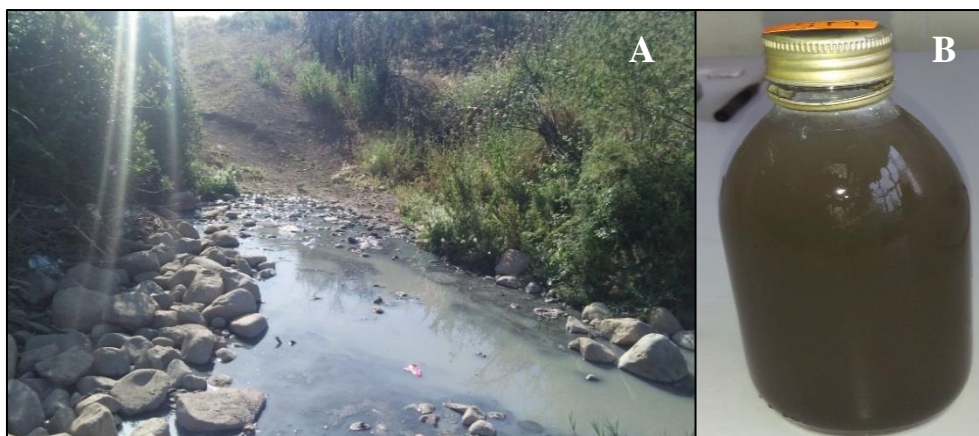


Figure 14 Prélèvement des échantillons (2021);
A: Zone de prélèvement, **B:** Flacon de prélèvement.

2.1.1- Isolement de *Clostridium perfringens*

L'isolement a aseptiquement été effectué grâce à l'utilisation des flacons stérils, où l'endroit de prélèvement a été homogénéisé à l'aide d'une spatule puis les flacons ont été ouverts et immergés à une profondeur de 15 cm dans l'eau. Quand les flacons sont pleines, ils ont rapidement été refermés. En effet, la méthode des dilutions décimales a été utilisée pour l'isolement de *C. perfringens* dans un milieu sélectif, viande foie additionné d'alun de fer et de sulfite de sodium. Tout d'abord, le flacon de prélèvement a été homogénéisé par agitation puis plusieurs dilutions ont été effectuées de 10^{-1} jusqu'à 10^{-5} dans l'eau physiologique stérile (Haichour, 2013). Ultérieurement, dans des boîtes de Pétri, 1 mL de chaque dilution avec une petite quantité de milieu de culture ont été ajoutés puis homogénéisés. Après refroidissement, une autre couche du

milieu de culture a été additionnée pour assurer l'anaérobiose. Ensuite, les boîtes de Pétri ont été incubées, après solidification du milieu, à 37°C pendant 24- 48 h (Zenati, 2018).

2.1.2- Réactivation des souches microbiennes

La réactivation des souches bactériennes ; *E. coli* et *B. cereus* ; a été réalisée à partir des cultures bactériennes jeunes sur des boîtes de Pétri en milieux de cultures sélectifs ; Hektouene et gélose Tryptone-Soja (TSA), respectivement, par la méthode des stries. Ensuite, les boîtes préparées ont été incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 h (Haichour, 2013).

En outre, à partir d'une culture jeune d'*A. flavus*, un disque fongique a été formé à l'aide d'une pipette Pasteur, ensuite il a été transféré par l'anse de platine et renversé dans un milieu sélectif, gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA), où la gélose est en contact avec la culture. Les boîtes préparées ont ensuite été incubées dans l'étuve à 30°C pendant 5 jours (Guiraud, 1998).

2.2- Techniques de stérilisation

Six différentes méthodes de stérilisation ; autoclavage, chauffage humide discontinu, chaleur sèche « four Pasteur », pasteurisation, lumière ultraviolette et osmose « eau pure » ; ont été appliquées sur les trois bactéries ; *E. coli*, *B. cereus* et *C. perfringens* ; et la moisissure *A. flavus*.

2.2.1- Autoclavage

L'action conjuguée de l'humidité et de la chaleur de l'autoclave permet la dénaturation des protéines bactériennes par hydrolyse (Figure 15) (Galtier, 1996).

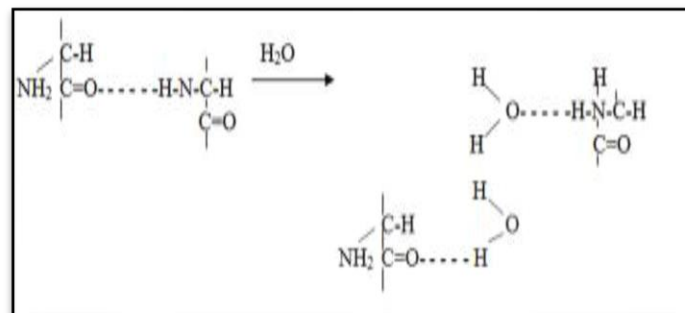


Figure 15 Effet de l'autoclavage sur les microorganismes (Philip, 2003).

En effet, les conditions standards de la stérilisation par l'autoclave sont une exposition du matériel ou du produit durant 20 min à une température de 120°C et une pression de 1bar (Philip, 2003).

Un autoclave est un récipient fermé hermétiquement, où son font est remplis par l'eau. Puis l'eau, remplisse la rampe de gaz à l'extérieur de l'appareil, est chauffée (Piettre, 2007).

Un protocole précis doit être respecté pour réaliser l'autoclavage. Les bactéries ; *B. cereus*, *E. coli* et *C. perfringens* ; et la moisissure *A. flavus* ont été cultivées dans des tubes de Bouillon Nutritif (BN) à 37°C pendant 24 h et à 30 °C pendant 5 jours, consécutivement. Après l'incubation, les tubes ont été mis dans l'autoclave à 120°C pendant 20 min. Ensuite et à partir des tubes stérilisés dans l'autoclave, l'ensemencement de chaque microorganisme a été effectué sur le milieu solide préconisé et les boîtes ont enfin été incubées dans l'étuve dans les mêmes conditions précédentes.

2.2.2- Chauffage humide discontinu

Le chauffage humide discontinu consiste d'une série de trois pasteurisations de 10 min à 90°C. Ces trois pasteurisations ont été séparées par un intervalle de 24 h à une température ambiante, ce qui permet la germination et la destruction des spores sans l'emploi d'une température excessive (Cherif, 2019).

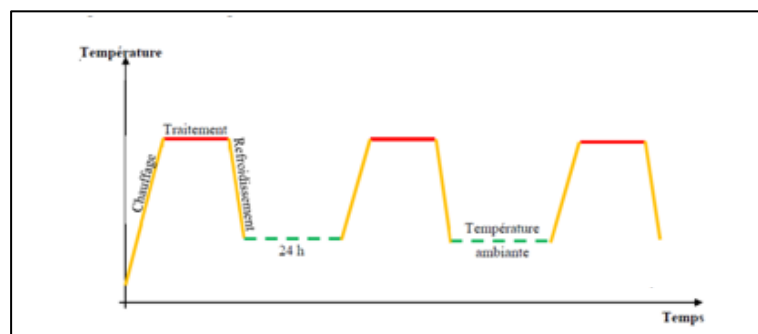


Figure 16 Différentes étapes de stérilisation par chauffage humide discontinu (Cherif, 2019).

Afin de vérifier l'efficacité de la stérilisation par chauffage humide discontinu, une méthode précise a été appliquée. Les trois bactéries ; *B. cereus*, *E. coli* et *C. perfringens* avec la moisissure *A. flavus* ont été cultivées dans un BN à 37°C pendant 24 h et à 30°C pendant 5 jours, consécutivement. Après l'incubation, les tubes ont été mis dans le bain marie à 90°C pendant 10 min puis ils ont été refroidis par l'eau froide à 4°C. Trois pasteurisations ont successivement été accomplies, séparées par une incubation d'un intervalle de 24 h à une température ambiante. Après chaque série de pasteurisation et à partir des tubes pasteurisés, l'ensemencement de chaque microorganisme sur le milieu solide préconisé a ensuite été effectué. Les boîtes ensemencées ont enfin été incubées dans les mêmes conditions de chaque microorganisme.

2.2.3- Chaleur sèche « four Pasteur »

La chaleur sèche détruit les micro-organismes en combinant l'oxydation des protéines par l'oxygène de l'air et l'enlèvement de l'eau qui est indispensable au maintien de la structure protéique (Gardès, 1990).

Le four Pasteur (Figure 17) est une armoire métallique de grandeur variable à double parois chauffée par des résistances électriques, où le courant d'air chaud émit est réparti de façon uniforme à l'intérieur grâce à un système de ventilateurs, l'appareil est muni d'un thermomètre et d'un thermostat (Gardès, 1990).



Figure 17 Four Pasteur.

De ce fait, quelques colonies d'*E. coli* et de *B. cereus*, et deux à trois disques de *C. perfringens* et d'*A. flavus* ont aseptiquement été déposés au centre des boîtes de Pétri en verre stériles. Ensuite, ces boîtes ont été mises à stériliser au four Pasteur à trois températures différentes ; 150, 180 et 200 °C durant 10 min.

Après la stérilisation, 1 mL d'eau physiologique stérile a été versé dans les boîtes de Pétri, puis ce dernier a été homogénéisé avec les résidus d'incinération des colonies à l'aide d'une micropipette. Ensuite, 0,1 mL de chaque suspension des résidus microbiens d'*E. coli*, de *B. cereus* et d'*A. flavus* a été prélevé et ensemencé sur le milieu préconisé. De même pour *C. perfringens*, une petite quantité de milieu VF a aseptiquement été coulée et homogénéisée avec la suspension et après la solidification de la première couche du milieu, une deuxième couche de milieu a encore été coulée pour assurer l'anaérobiose. Enfin, toutes les boîtes préparées ont été incubées dans les mêmes conditions, à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et 30°C pendant 5 jours pour la moisissure (méthode de laboratoire).

2.2.4- Pasteurisation

La pasteurisation consiste à chauffer des produits liquides pendant quelques minutes ou secondes à une température entre 63 et 95° C. Puis à les refroidir rapidement à 4-14°C pour détruire la totalité des microorganismes pathogènes non sporulés et réduire significativement la flore végétative présente dans un produit (Cherif, 2019).

Afin de réaliser la pasteurisation, un protocole précis doit être respecté. Les bactéries ; *B. cereus*, *E. coli* et *C. perfringens* ; et la moisissure *A. flavus* ont été cultivées dans des tubes de BN à 37°C pendant 24 h et à 30°C pendant 5 jours, consécutivement. Après l'incubation, les tubes ont été mis dans le bain marie à 90°C pendant 10 min, puis, ils ont été refroidis par l'eau froide à 4°C. Ensuite, à partir des tubes pasteurisés, l'ensemencement de chaque microorganisme a été effectué sur le milieu solide préconisé et les boîtes ont enfin été incubées dans l'étuve dans les mêmes conditions précédentes (Cherif, 2019).

2.2.5- Lumière ultraviolette

La lumière UV inactive les microorganismes par la dégradation de leurs acides nucléiques. En effet, l'ARN et l'ADN absorbent les hauts niveaux d'énergie associés aux ondes courtes, principalement à 254 nm, de la lumière UV. Cette absorption d'énergie forme de nouvelles liaisons entre les nucléotides adjacents, créant des doubles liaisons ou des dimères. La formation de dimères bloque le processus de réplication (Figure 18) (Gore, 2021).

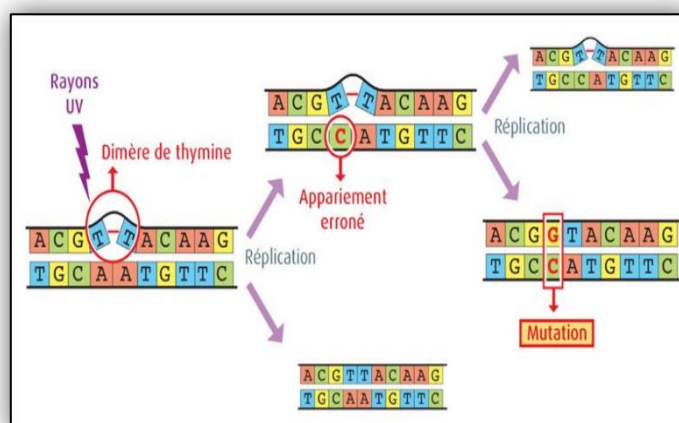


Figure 18 Effet des rayons UV sur la molécule d'ADN (Philip, 2003).

Dans ce travail, la lampe UV portable utilisée pour réaliser la stérilisation par l'irradiation ultraviolette est munie par un filtre pour disposer des UV-C à 254 nm et à 265 nm. Ce dispositif a permis de traiter des échantillons à distances et temps bien précis.

Les rayons UV ont directement été appliqués sur des boîtes de Pétri contenant des souches microbiennes jeunes de 24 h pour *E. coli*, *C. perfringens* et *B. cereus* ; et de 5 jours pour *A. flavus*. Ces boîtes ont été traitées aux différents couples de distances et de temps (Tableau 2), où un papier aluminium est placé sous les boîtes pour accentuer l'effet réfléchissant du rayonnement UV. Ensuite, les souches traitées par UV ont été réactivées sur les milieux préconisés et les boîtes ont encore été incubées dans les mêmes conditions précédentes (Gore, 2021).

Tableau 2 différents couples distances et temps.

Distances	Temps
D ₁ = 46cm	30 min
	1 h
	1 h 30 min
	2 h
	3 h
	4 h
D ₂ = 2cm	30 min
	1 h
	1 h30 min
	2 h
	3 h
	4 h

2.2.6- Osmose « eau pure »

L'osmose est la diffusion de l'eau du milieu le moins concentré en solutés (solution hypotonique) vers le milieu la plus concentré en solutés (solution hypertonique) à travers une membrane semi- perméable. La cellule est dite turgescente quand le milieu extracellulaire est hypotonique par rapport au milieu intracellulaire (Bolard, 2012).

Dans cette étude, pour évaluer l'effet de l'eau pure sur les microorganismes test, quelques colonies jeunes d'*E. coli* et de *B. cereus*, ainsi deux disques de *C. perfringens* et d'*A. flavus* ont été mis dans des tubes d'eau pure stériles, ensuite les tubes ont été laissés à température ambiante. Puis, la tolérance des microorganismes dans l'eau pure a été vérifiée après des périodes différentes ; 2 h, 1 jour, 2 jours, 8 jours, 15 jours et 30 jours ; par leur réactivation sur leurs milieux solides spécifiques. Enfin, l'incubation des boîtes a été faite dans les mêmes conditions précédentes ; où les bactéries ont été incubées à 37°C pendant 24 h et la moisissure à 30°C pendant 3-5 jours.

2.3- Dénombrement des cellules microbiennes vivantes

Le nombre des cellules microbiennes vivantes avant et après la stérilisation par l'autoclave, le chauffage humide discontinu et la pasteurisation a été calculé par la méthode du nombre le plus probable « NPP » en utilisant le tableau de Mac Grady (Annexe 2).

Résultats et discussion

3- Résultats et discussion

Les résultats obtenus dans le présent travail résument l'évaluation de fiabilité des systèmes de stérilisation ; autoclavage, chauffage humide discontinue, chaleur sèche «four Pasteur», pasteurisation, lumière ultraviolette et osmose «eau pure»; sur quelques souches microbiennes ; trois bactéries en l'occurrence *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens* et une moisissure, *Aspergillus flavus* ; ainsi la détection des microorganismes récalcitrants.

3.1- Autoclavage

Les résultats de stérilisation des quatre microorganismes test ; *E. coli*, *B. cereus*, *C. perfringens* et *A. flavus* ; par l'autoclave sont montrés dans les figures ci-dessous (figures 19 et 20).

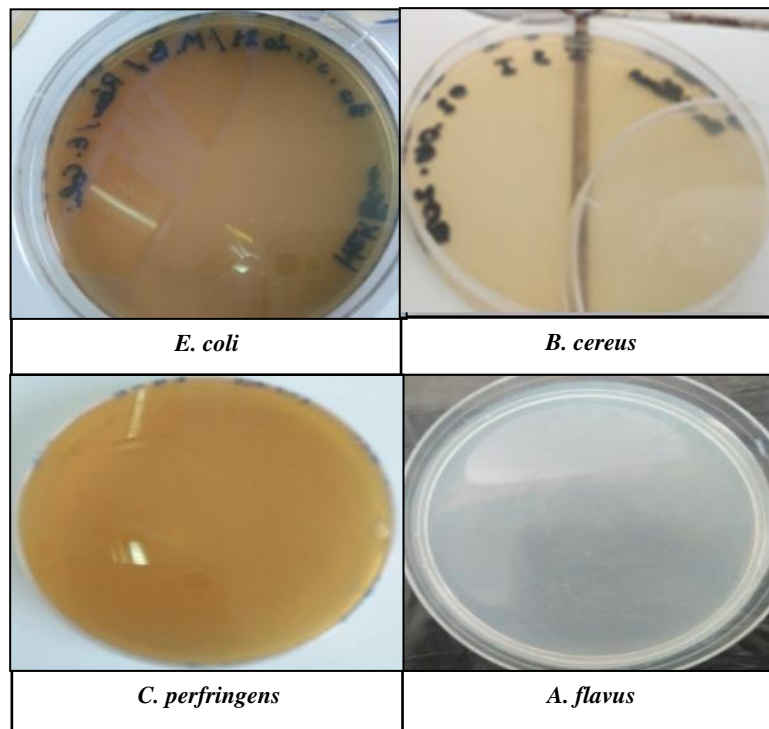


Figure 19 Effet de l'autoclavage sur les microorganismes test.

La figure 19 révèle que l'autoclavage a développé une forte efficacité de stérilisation quelle que soit la nature du microorganisme. Du fait, aucune croissance microbienne n'a été observée.

Afin de vérifier l'effet de l'autoclavage sur le nombre des cellules microbiennes vivantes, la méthode de dénombrement du nombre le plus probable (NPP) a été appliquée sur tous les microorganismes test avant et après la stérilisation (Annexe 2).

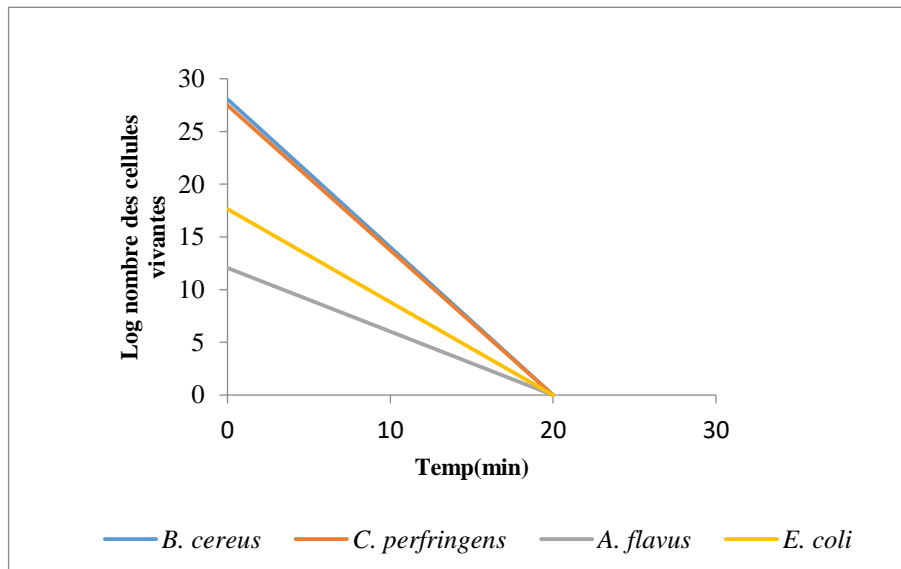


Figure 20 Influence de l'autoclavage sur le nombre des cellules microbiennes vivantes.

La figure 20 montre une diminution du nombre des cellules vivantes de toutes les espèces microbiennes jusqu'à leur destruction totale après 20 min de stérilisation par l'autoclave.

Ces résultats significatifs peuvent être expliqués par le mode d'action de l'autoclave qui fonctionne suivant le principe de la chaleur humide sous pression; où cette dernière détruit les microorganismes par la coagulation et la dénaturation irréversibles des enzymes (Nomal et *al.*, 2017). En plus, cette action assure la dénaturation des protéines bactériennes par hydrolyse. Les molécules d'eau forment des liaisons hydrogènes avec les groupes C-O et N-H des protéines des microorganismes et déstabilisent leurs conformation naturelle, ce qui aboutit à l'inhibition des mécanismes de duplication moléculaire entraînant la mort du microorganisme (Camille, 2018).

Nos résultats corroborent ceux de Lin et *al.* (2018) qui ont trouvé que les mesures de la décontamination de masques respiratoires filtrants par l'autoclave atteignent le taux germicide de 99 à 100 %. En effet, *Food and Drug Administration* (FDA) Américain a approuvé que l'autoclave soit un désinfectant de grande efficacité. Nos résultats peuvent aussi être comparables à ceux trouvés par Huesca et *al.* (2018) qui ont affirmé l'efficacité du traitement des spores de *Geobacillusstearo thermophilus*, qui sont très résistantes à la chaleur humide, par l'autoclave à vapeur. De ce fait, les spores sont utilisées comme indicateurs biologiques (IB) pour vérifier l'efficacité de la stérilisation par l'autoclave, où leur totale destruction signifie la fiabilité du procédé. En outre, une étude plus récente de Jain et *al.* (2021) a constaté que les échantillons de déchets infectieux autoclavés à 120 °C pendant 20 min ne présentaient aucune croissance microbienne.

Ces résultats peuvent également être expliqués par la propriété la plus spectaculaire des spores qui est la résistance à la chaleur humide. Car les spores d'un certain nombre d'espèces sont plus résistantes que les formes végétatives du même microorganisme (Nomal et *al.*, 2017). En effet, l'assurance de l'efficacité de l'autoclave est mandaté par les agences de réglementation qui nécessite de démontrer la destruction complète des spores d'une souche suffisamment résistante, où cette destruction peut évidemment être prouvée par l'incapacité de grand nombre de spores traitées de former des nouvelles colonies (Huesca et *al.*, 2018).

3.2-Chauffage humide discontinu

Les résultats de la stérilisation par le chauffage humide discontinu des trois bactéries ; *E. coli*, *B. cereus* et *C. perfringens* ; et de la moisissure *A. flavus* sont présentés dans les figures ci-dessous.

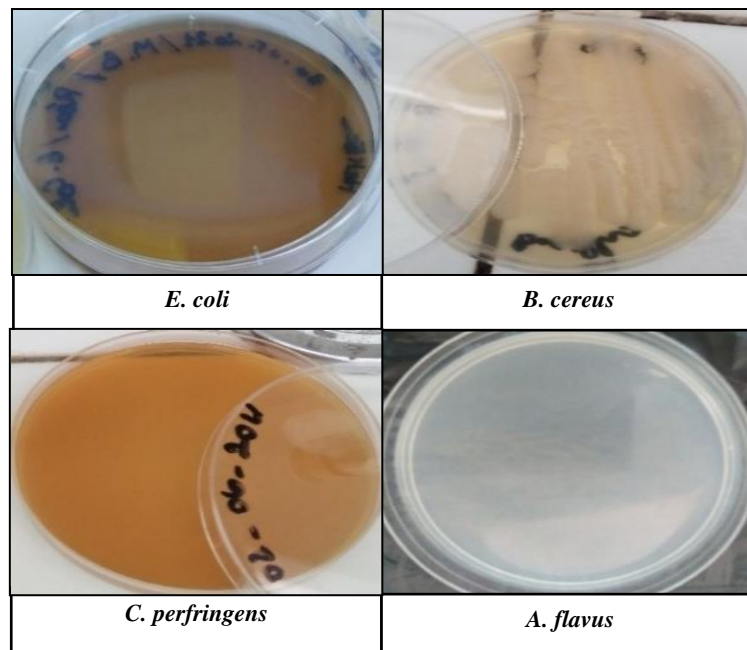


Figure 21 Effet du chauffage humide discontinu sur les microorganismes test.

Les résultats illustrés dans la figure 21 révèlent que le chauffage humide discontinu a la capacité d'inactiver *E. coli*, *C. perfringens* et *A. flavus*. En revanche, ce système de stérilisation n'était pas efficace sur la bactérie *B. cereus*.

Afin d'évaluer l'effet de chauffage humide discontinu sur le nombre des cellules microbiennes vivantes, la méthode de NPP a été appliquée sur tous les microorganismes test avant et après la stérilisation (Annexe 2).

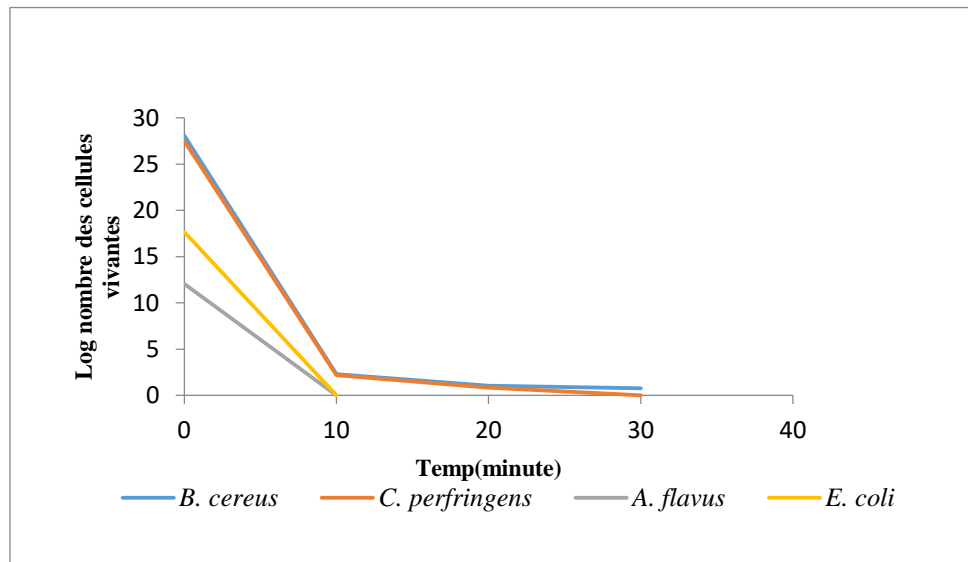


Figure 22 Influence du chauffage humide discontinu sur le nombre des cellules microbiennes vivantes.

Les courbes de la figure 22 montrent une diminution importante de nombre des cellules microbiennes vivantes jusqu'à leur inactivation après 3 jours de traitement, sauf *B. cereus* qui reste vivante après la stérilisation par cette technique.

Nos résultats sont effectivement comparables à ceux de Diouf (1995) qu'il a observé une réduction significative de nombre des spores de *C. perfringens* après la stérilisation par la même méthode. Les mêmes résultats ont été déclarés par la recherche de Valero et al. (2007), où les spores de *B. cereus* ont été récupérées après le traitement de bouillon de carotte par le chauffage humide discontinu. Par ailleurs, la nouvelle étude de Guérin et al. (2019) a montré que cette méthode de stérilisation a inactivé toutes les formes végétatives des bactéries. En effet, ces chercheurs ont modifié les paramètres de ce processus par l'addition d'oxygène durant la stérilisation pour augmenter la fiabilité de cette dernière et ils ont trouvé que les spores restent toujours résistantes à cet effet. En outre, le travail de Banupriy et al. (2020) a révélé une destruction totale des coliformes, totaux et fécaux, et de la moisissure *Aspergillus* ainsi une réduction de nombre des endospores des bactéries anaérobies après le traitement par le chauffage humide discontinu.

Au contrairement à nos résultats, l'étude de Kim et al. (2012) a indiqué que le processus de stérilisation par le chauffage humide discontinu avec l'injection de dioxyde de carbone a affaibli le nombre de spores de *B. cereus*. Ce résultat a été confirmée par Kaishev (2020) qui a conclu que cette méthode ; chauffage humide discontinu ; a une grande efficacité sur les spores de la bactérie sporulante *B. cereus*.

En effet, l'efficacité de ce système de stérilisation due à la combinaison entre la chaleur et l'humidité qui induit une dénaturation totale des protéines bactériennes des cellules végétatives, où les intervalles laissés entre les chauffages permettent aux spores de donner des nouvelles bactéries qui sont ensuite éliminées lors de l'augmentation de la température suivante (Davis, 1940).

3.3- Chaleur sèche « four Pasteur »

Les résultats de la stérilisation par la chaleur sèche « four Pasteur » des trois bactéries ; *E. coli*, *B. cereus* et *C. perfringens* ; et de la moisissure *A. flavus* sont manifestés dans la figure ci-dessous.

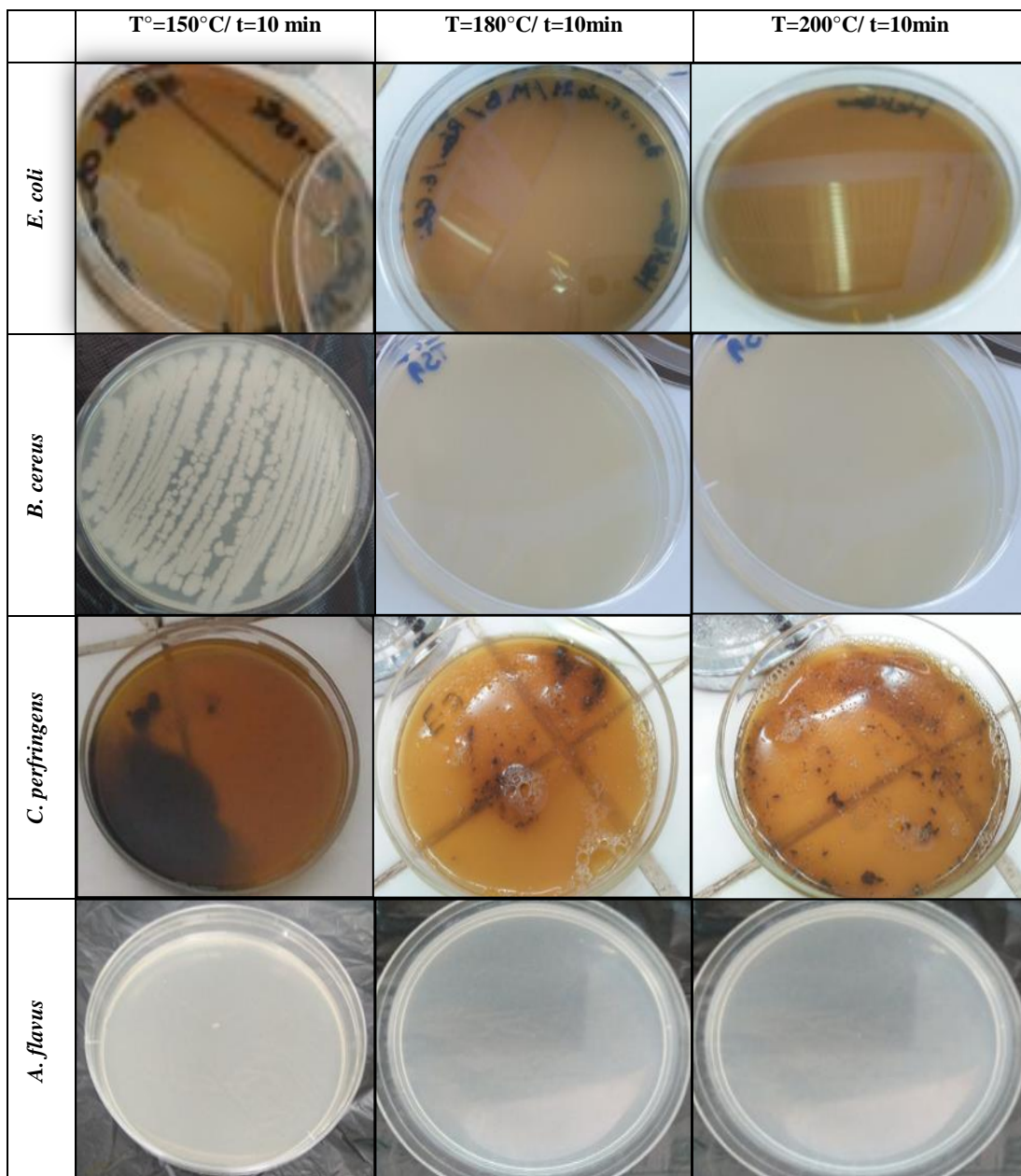


Figure 23 Effet de la chaleur sèche sur les microorganismes test.

La figure 23 représente l'effet de la chaleur sèche sur les microorganismes test, où cette technique de stérilisation est seulement efficace dès 180°C et plus sur les bactéries sporulantes ; *B. cereus* et *C. perfringens*. Alors que, 150°C est suffisante pour détruire *E. coli* et *A. flavus*.

Ces résultats significatifs peuvent être expliqués par le mode d'action du four Pasteur qui est utilisé comme un agent stérilisant l'oxygène de l'air, où l'oxydation des protéines bactériennes par ce dernier assure l'inactivation de microbes (Dominique, 2019). Par ailleurs, la chaleur sèche entraîne une dessiccation et des modifications de la pression osmotique qui dues à l'évaporation de l'eau (Nomalet *al.*, 2017).

Nos résultats sont corroborés par Adityas *et al.* (2020) qui ont trouvé que la cellule végétative des bactéries meurt à 60-80°C. De plus, la recherche de Dominique, (2019) a confirmé que la chaleur sèche entre 160°C et 180°C est efficace pour inactiver toutes formes de vie incluant les spores bactériennes.

En outre, l'impact de la température diffère d'un microorganisme à l'autre en raison des différences dans leurs structures et constituants biochimiques existants (Charles, 2020). En effet, les spores de *C. perfringens* sont très résistantes à la chaleur sèche très élevée, cependant les cellules végétatives de la même bactérie sont moins résistantes (Prabhat *et al.*, 2016). Par ailleurs, *B. cereus* est également hautement résistante à divers facteurs de stress tels que la température élevée puisque elle a une couche protectrice supplémentaire, l'exosporium, constituée d'une couche basale paracristalline et une sieste externe formée principalement par la glycoprotéine de type collagène BclA (Lanzilli *et al.*, 2020). D'ailleurs, les altérations des constituants du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram + peuvent apparaître à des températures plus élevées que celles conduisant à l'inactivation des bactéries à Gram- (Charles, 2020). En effet, un stress thermique modéré peut induire des vésiculations voire conduire à une perte de la membrane externe qui entraîne une perméabilisation de l'espace inter-membranaire (Charles, 2020).

Les endospores bactériennes sont structurellement caractérisées par un cytoplasme déshydraté entouré de plusieurs couches protectrices ; un cortex de type peptidoglycane, qui sont le facteur majeur de la résistance à la chaleur sèche élevée (Lanzilli *et al.*, 2020).

3.4- Pasteurisation

Les résultats de la vérification de la résistance des trois bactéries ; *E. coli*, *B. cereus*, *C. perfringens* ; et de la moisissure *A. flavus* à la pasteurisation sont présentés dans la figure ci-dessous.

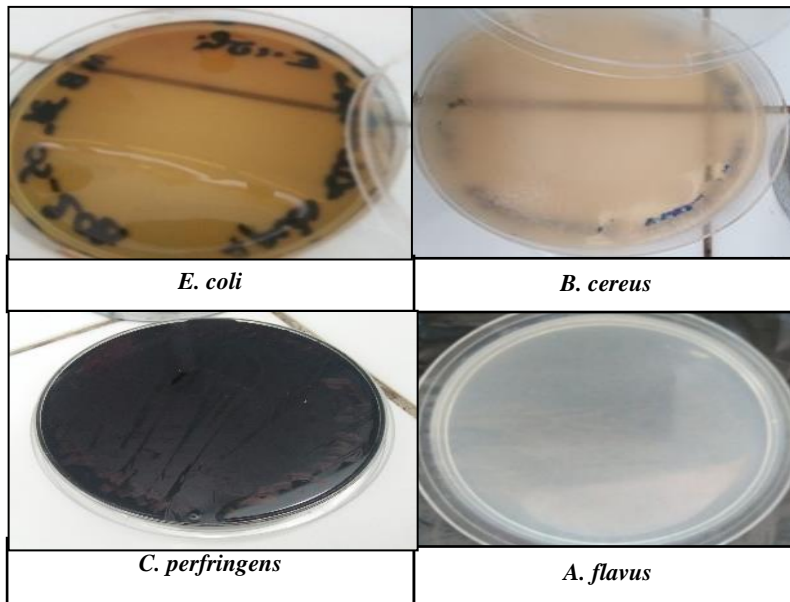


Figure 24 Effet de la pasteurisation sur les microorganismes test.

La figure 24 indique que la pasteurisation n'est pas fiable pour la destruction des bactéries sporulantes *B. cereus* et *C. perfringens*. Alors que cette méthode est efficace de détruire, complètement, *E. coli* et *A. flavus*.

Afin de vérifier l'effet de pasteurisation sur le nombre des cellules microbiennes vivantes, la méthode de NPP a été appliquée sur tous les microorganismes test avant et après la stérilisation (Annexe 2).

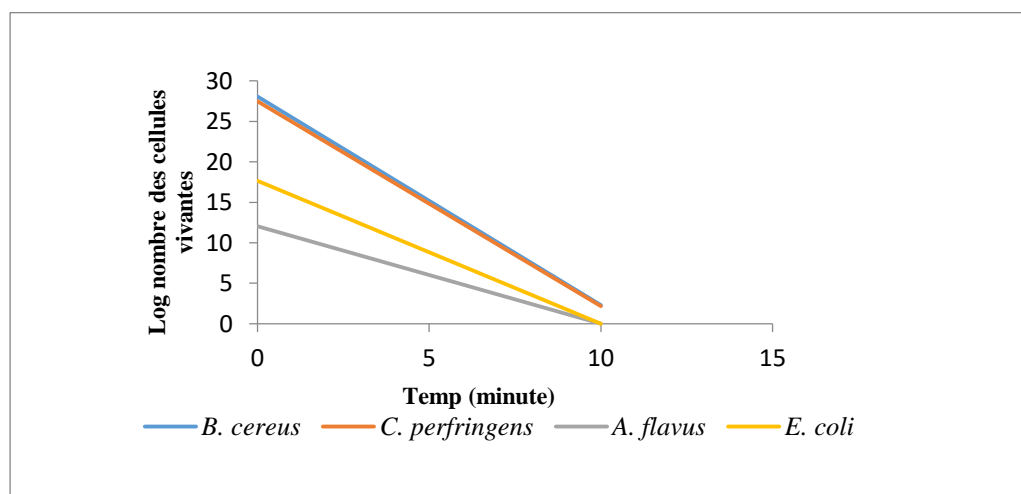


Figure 25 Influence de pasteurisation sur le nombre des cellules microbiennes vivantes.

La figure 25 montre une décroissance du nombre des cellules microbiennes vivantes après 10 min de traitement, où une diminution du nombre des cellules d'*E. coli* et *A. flavus* jusqu'à leur absence a été remarquée. En revanche, les bactéries sporulantes *B. cereus* et *C. perfringens* n'étaient pas totalement inactivées après la pasteurisation.

Ces résultats peuvent être similaires à ceux d'une étude précédente qui a montré une réduction remarquable de nombre de souches microbiennes, principalement les bactéries thermosensibles comme *E. coli*, quelle que soit l'échelle de la pasteurisation appliquée (Hassan et al., 2015). En plus, nos résultats sont en ligne avec Dettling et al. (2019) qui ont trouvé qu'un traitement thermique de pasteurisation à 80°C suffisant pour une destruction totale des formes végétatives, alors que toutes les spores restent viables dans les mêmes conditions. En outre, le travail actuel est semblable à une étude de Katabehei et al. (2019) qui a constaté que la pasteurisation est efficace pour éliminer tous les agents pathogènes du fromage ; les coliformes comme *E. coli* et les moisissures.

De plus, nos résultats sont corroborés par Azevedo et al. (2009) et Idohou et al. (2018) qui ont trouvé que cette méthode est suffisante pour détruire toutes les espèces du genre *Aspergillus*. En outre, les moisissures et les bactéries de forme végétative sont sensibles à la chaleur élevée qui induit des altérations au niveau de leurs différents constituants biochimiques (Charles, 2012). En effet, un stress thermique modéré peut induire des vésiculations, voire conduire à une perte de la membrane externe d'*E. coli* qui entraîne une perméabilisation de l'espace inter-membranaire (Tsuchido et al., 1985). Par ailleurs, la chaleur de la pasteurisation peut évidemment provoquer la coagulation des protéines (Cunault, 2012).

En outre, les bactéries sporulantes ; *B. cereus* et *C. perfringens* ; ont une forte résistance à la pasteurisation à 90°C pendant 10 min. Ces résultats sont comparables à ceux de Sadiq et al., (2016) qu'ils ont révélé un pourcentage de 100 % de survie des spores, après une pasteurisation à 100°C pendant 30 min, de toutes les souches d'essai. Où, la pasteurisation n'induit pas de dommages significatifs sur les enveloppes internes et externes ainsi que sur le cortex des endospores (Cunault, 2012).

3.5- Lumière ultraviolette

Les résultats de la stérilisation par la lumière ultraviolette des trois bactéries ; *E. coli*, *B. cereus* et *C. perfringens* ; et de la moisissure *A. flavus* sont présentés dans les figures ci-dessous.

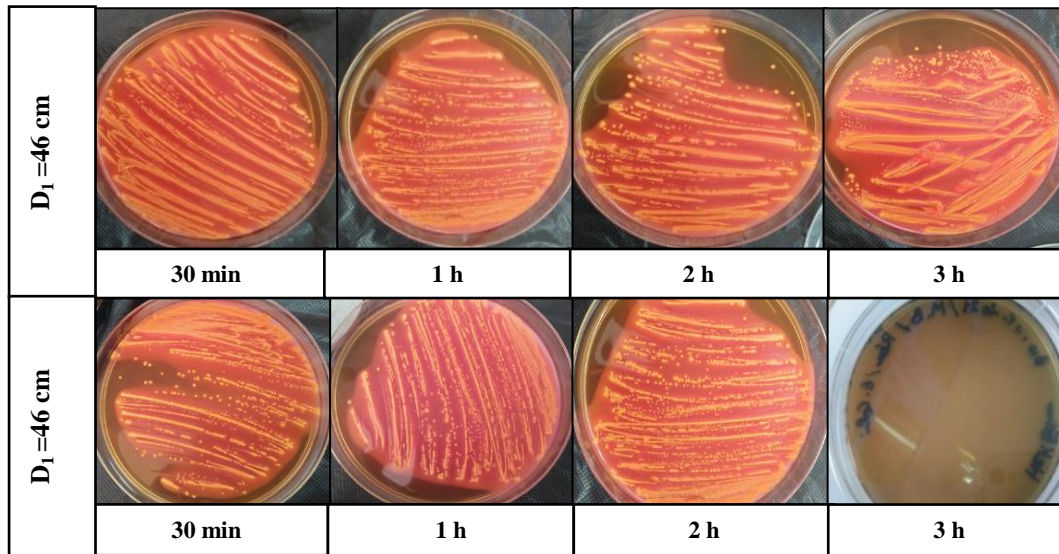


Figure 26 Effet de l'UV sur *E. coli*

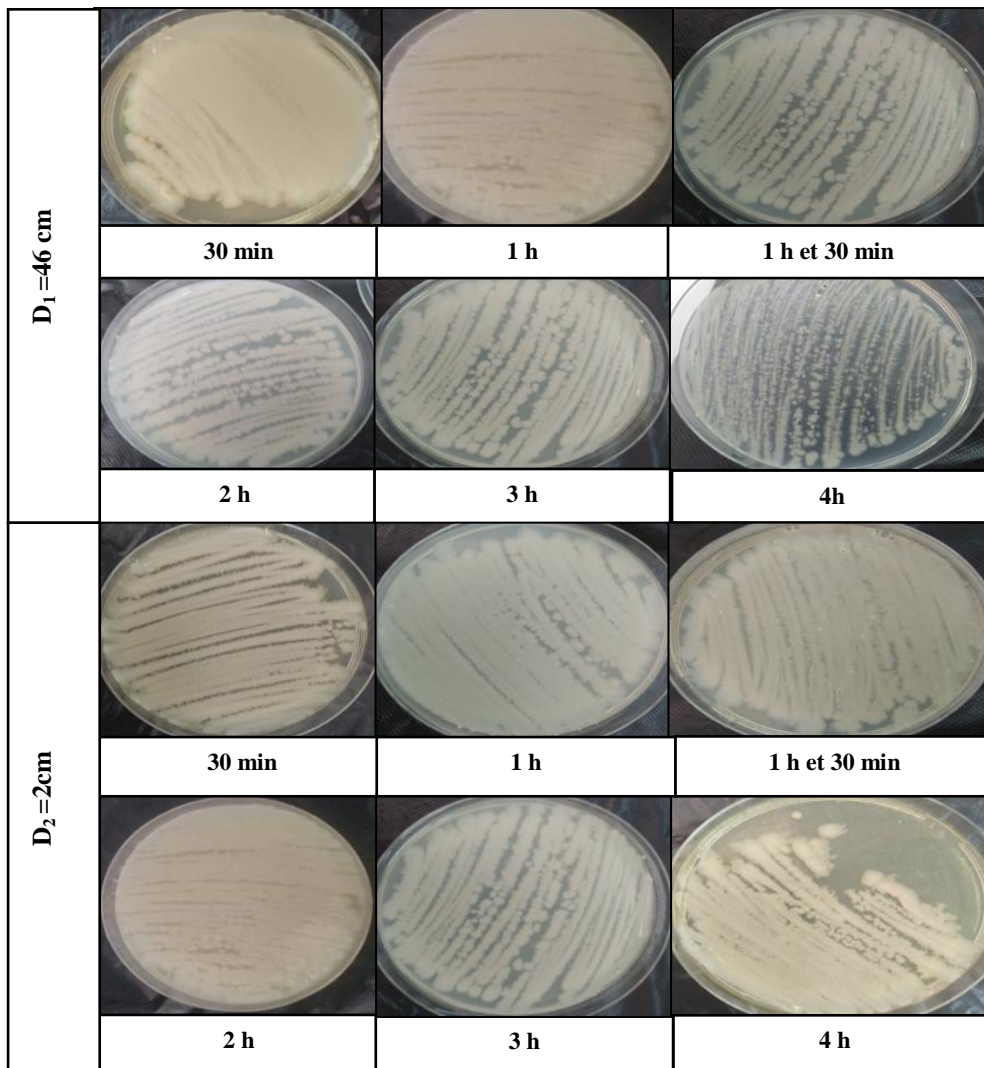


Figure 27 Effet de l'UV sur *B. cereus*.

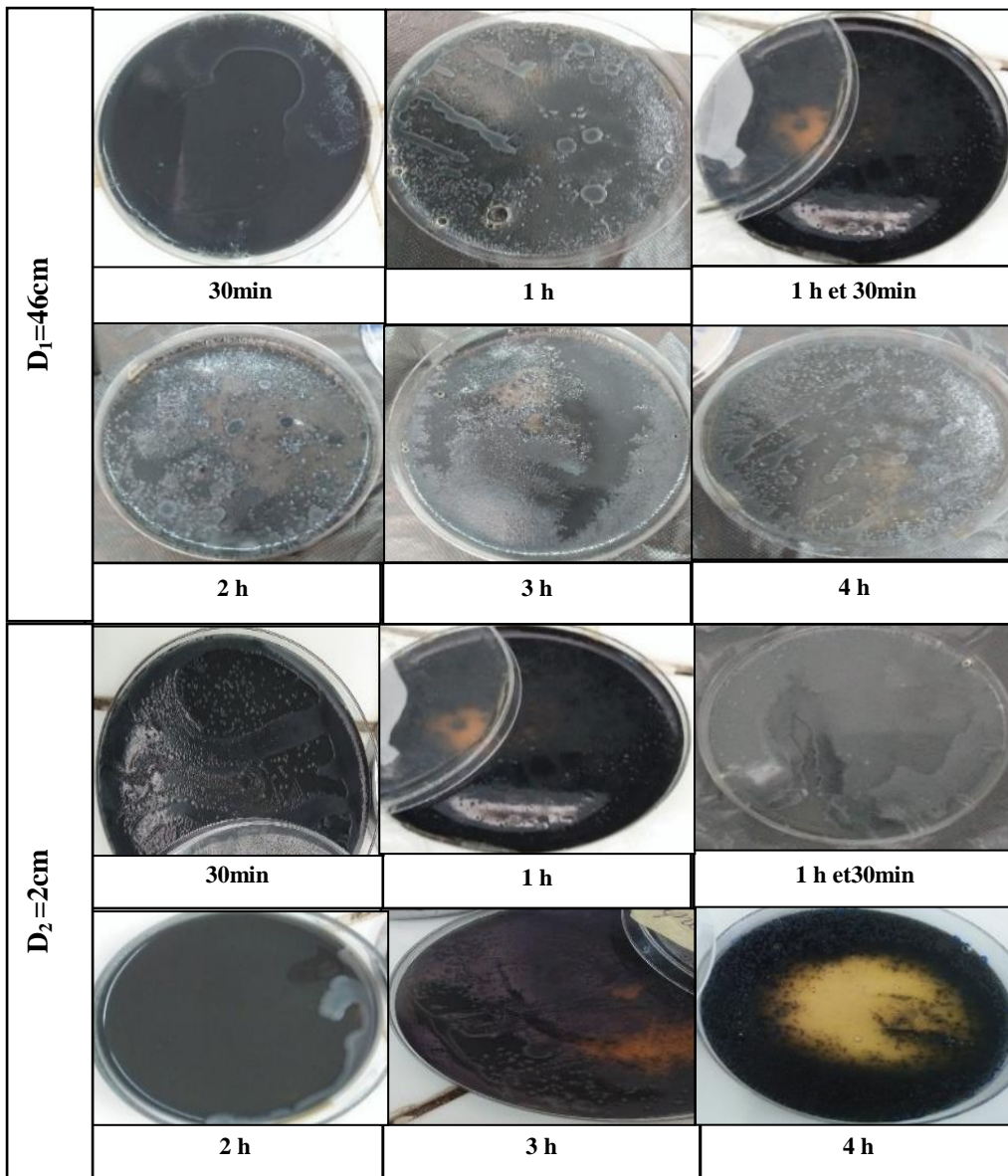


Figure 28 Effet de l'UV sur *C. perfringens*.

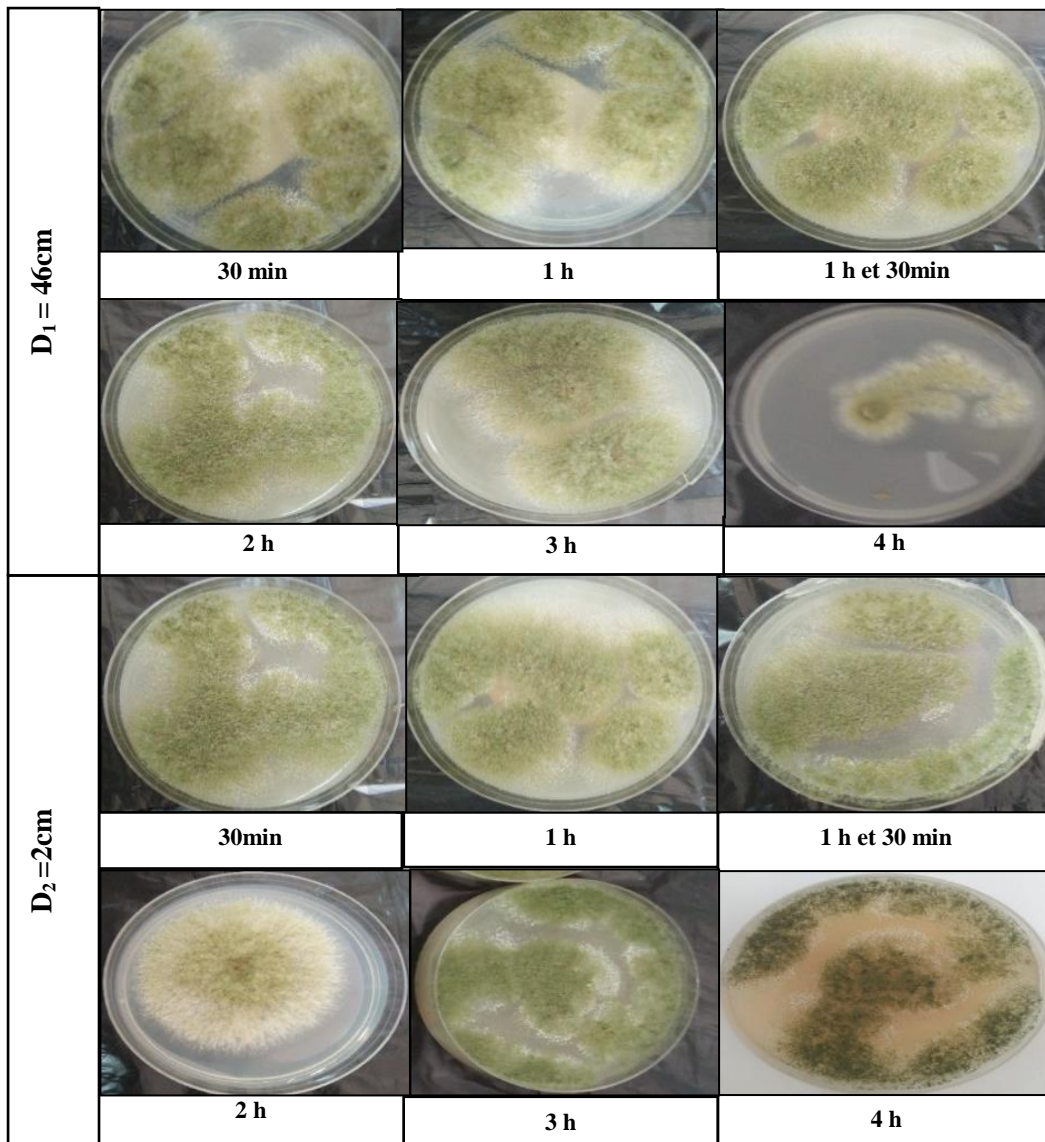


Figure 29 Effet de l'UV sur *A. flavus*.

Les figures 27, 28 et 29 révèlent que l'irradiation ultraviolette n'est pas fiable pour inactiver *B. cereus*, *C. perfringens* et *A. flavus*; respectivement, et que ces microorganismes ont développé une très forte résistance à cette méthode de stérilisation. En revanche, l'UV a détruit *E. coli* après 3 h de traitement à une distance de 2 cm (Figure 26), donc il y a une différence significative entre les temps de 30 min et 3h et les distances de 46 cm et 2 cm. De ce fait, le couple temps- distance de traitement a un effet important sur cette bactérie.

Nos résultats sont similaires à ceux de Hassen *et al.* (2000) qui ont constaté que l'UV est plus efficace sur les bactéries à Gram-. En revanche, une étude précédente a montré que *E. coli* testée est sensible au UV avec 74 à 99 % d'inhibition, cette inhibition est croissante avec le temps d'application de 5s à 45 s (Oulahal, 2008). Les résultats de la présente étude peuvent également être semblables à ceux d'un autre travail de Hema *et al.* (2018) qui ont constaté que

la stérilisation par UV est efficace pour la réduction de la charge microbienne de la viande de chèvre, où une destruction complète d'*E. coli* a été observée.

Nos résultats sont aussi corroborés par Oulahal (2008) qui a approuvé que les spores d'*Aspergillus* ont une très forte résistance à l'UV en comparaison avec les cellules végétatives bactériennes. Une autre recherche de Sisti *et al.* (2017) a confirmé que *A. flavus* a une très forte résistance aux irradiations UV par rapport aux autres espèces du genre *Aspergillus*. Cette tolérance est due à leur structure cellulaire particulière qui inclut la présence de pigments chez les champignons mélanisés. Nos résultats ont aussi montré qu'un traitement de 4h par UV n'était pas efficace du tout pour inactiver *A. flavus*. Cependant Kye-Hwan *et al.* (2020) ont constaté que 2 h de temps d'irradiation UV étaient suffisamment efficaces pour réduire 90 % d'*A. flavus* présente sur les grains de café torréfiés.

Les souches bactériennes ; *B. cereus* et *C. perfringens* ; sont aussi absolument résistantes à l'UV. Cette très grande résistance acquise durant la sporulation est due d'une part à la photochimie spécifique de l'ADN des spores et d'une autre part à la réparation du matériel génétique durant la germination (Philip, 2003). En effet, le cœur de la spore, où est contenu l'ADN, possède une faible teneur en eau. Cette nouvelle photochimie peut être expliquée par la déshydratation de leur cœur durant la sporulation qui provoque un changement de conformation de l'ADN (Setlow, 2001). Contrairement aux cellules végétatives ; où l'irradiation à 254 nm génère des dimères, comme photoproduits majeurs, entre les bases pyrimidiques adjacentes, principalement entre les thymines (liaisons notées TT). Le nombre de liaisons TT formées chez les spores est très faible et ne contribue pas de manière significative à leur destruction (Setlow, 2001). De plus, l'ADN des spores irradiées à 254 nm contient un autre photoproduit, appelé spore photoproduit (SP), formé entre deux thymines adjacentes issues du même brin d'ADN (Philip, 2003).

Par rapport aux résultats des études précédentes d'Oulahal (2008), de Hema *et al.* (2018) et de Kye-Hwan *et al.* (2020) sur l'efficacité de l'UV pour inactiver certains microorganismes, la lampe UV portable utilisée dans la présente étude est moins efficace car elle était incapable de détruire *B. cereus*, *C. perfringens* et *A. flavus* et n'a pas inactivé *E. coli* qu'après 3 h de traitement ; cette durée est extrêmement longue.

3.6- Osmose « eau pure »

Les résultats de la stérilisation des trois bactéries ; *E. coli*, *B. cereus* et *C. perfringens* ; et de la moisissure *A. flavus* par choc hypo-osmotique sont montrés dans les figures ci-dessous.

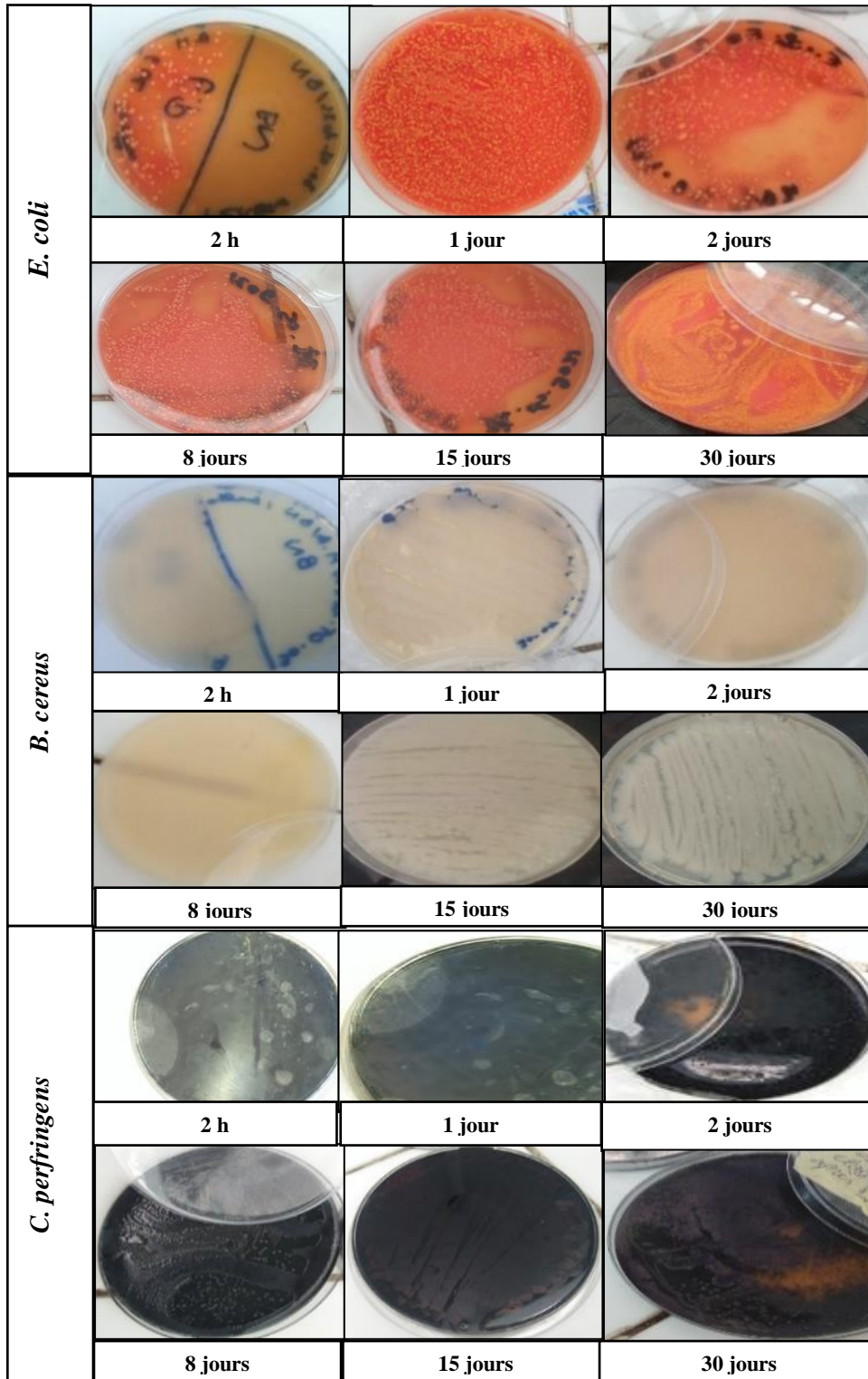


Figure 30 Effet de l'eau pure sur les bactéries test.

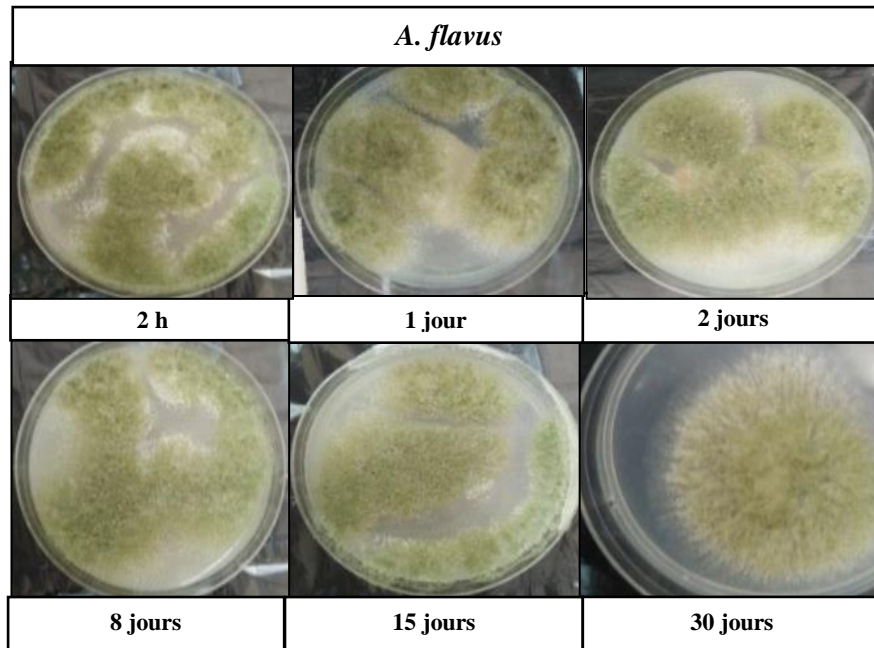


Figure 31 Effet de l'eau pure sur *A. flavus*.

Les figures 30 et 31 représentent l'effet de l'eau pure qui est un milieu à une faible osmolarité par rapport au milieu intracellulaire sur les quatre microorganismes test, où tous ces microorganismes ont développé une résistance à la pression osmotique exercée par l'eau pure ; choc hypo-osmotique. Cette résistance protège la cellule contre la lyse cellulaire grâce à un mécanisme approprié. Ce mécanisme, appelé osmoadaptation, décrit l'ensemble des manifestations physiologiques et génétiques de l'adaptation microbienne à un environnement de forte ou de faible osmolarité (Galinski, 1995).

Ces résultats sont comparables à ceux signalés par Boulhidja et *al.* (2017) qui ont révélé qu'une diminution rapide de l'osmolarité du milieu extérieur ne provoque en général qu'une faible augmentation du volume cellulaire. Cette résistance au choc hypo-osmotique peut être expliquée par la rigidité de la paroi bactérienne qui protège les bactéries contre les variations de la pression osmotique. Ce mécanisme d'afflux d'eau à travers des canaux aqueux appelés aquaporines, est utilisé afin de diminuer la pression de turgescence cellulaire (Yu-Ling, 2011).

En effet, *B. cereus* et *C. perfringens* se sont des bactéries à Gram+, donc la rigidité de leur paroi permet à la cellule de supporter des pressions élevées jusqu'à 100 atm (Carpita, 1985).

À titre de comparaison et à partir de l'ensemble des résultats précédents, l'autoclavage est considéré la méthode la plus efficace parce qu'elle est la plus rapide, microbicide et sporicide sur les microorganismes test par rapport aux autres cinq techniques de stérilisation utilisées dans cette étude ; chauffage humide discontinu, chaleur sèche, pasteurisation, UV et osmose. Ce résultat intéressant est corroboré par celui de plusieurs travaux qui ont découvert que l'autoclavage est le système de stérilisation le plus performant par rapport à l'utilisation de micro-onde (Monteiro et *al.*, 2018), de glutaraldéhyde, de rayonnement UV et de désinfectant à base de plantes (Kotwal et *al.*, 2021).

Conclusion et perspectives

4- Conclusion et perspectives

Afin d'évaluer la fiabilité des techniques de stérilisation sur les microorganismes récalcitrants, l'efficacité de six méthodes de stérilisation a été testée en utilisant; l'autoclavage, le chauffage humide discontinu, la chaleur sèche « four Pasteur », la pasteurisation, l'UV et l'osmose « eau pure », où des inconvénients et des avantages de chaque méthode peuvent être signalés. De ce fait, l'autoclavage à une température de 120°C avec une pression de 1 bar pendant 20 min atteint une efficacité germicide à 100 %. Par ailleurs, il doit mettre la lumière sur l'efficacité de la stérilisation par la chaleur sèche « four Pasteur » dès 180 °C et plus sur les bactéries sporulantes. D'après les résultats obtenus, on peut conclure que les bactéries sporulantes en l'occurrence ; *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens* sont hautement résistantes aux nombreux traitements sévères ; la température élevée et l'irradiation germicide ultraviolette. En conséquence l'autoclavage est la méthode de stérilisation la plus performante par rapport aux autres techniques étudiées.

En terme de perspective, notre recherche mérite d'être pour suivie par :

- Évaluation de l'efficacité des autres systèmes de stérilisation tels que ; l'infrarouge, la micro-onde, la haute pression hydrostatique, la filtration, le plasma froid et l'éthanol.
- Etude des interrelations entre les processus de stérilisation par combinaison de deux méthodes au même temps ; chimique et physique.
- Examen de la résistance des autres espèces microbiennes pathogènes pour l'homme aux différents traitements de stérilisation.

Références bibliographiques

5- Références bibliographiques

Ahid S., Meddah S., Cherrah Y. (2005). Stérilisation à l'oxyde d'éthylène en milieu hospitalier. service de pharmacie hospitalière hopital Ibn Sina. CHU de Rabat.

Alatou R. (2018). Réponse au Stress Osmotique. Université Frères Mentouri Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département de Microbiologie.

Ali Hassan A., Eystein S., Claus B., Truls N. (2015). Microbial effect of steam vacuum pasteurisation implemented after slaughtering and dressing of sheep and lamb. *Meat Science*. 99 : 32-37.

Alizée G., Claire D., Thierry C. (2019). Impact of temperature and oxygen on the fate of *Bacillus weihenstephanensis*. *Food-based medium* 83 : 175-180.

Angelis M., Gobbetti M. (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics. Wiley Analytical Science journals* 4 : 106-122.

Anna D., Etienne D., Carolin W., Jorg H., Siegfried S., Mareike W. (2019). Resistant moulds as pasteurization target for cold distributed high pressure and heat assisted high pressure processed fruit products. *Journal of Food Engineering* 282 : 109998.

Anonyme1: https://www.msmanuals.com/fr/professional/multimedia/image/v26443924_fr2021.

Anonym3: <https://www.inrae.fr/en/news/disrupting-cell-cell-communication-suppress-virulence-bacterium-bacillus-cereus>.

Anonyme 2 : <https://www.siva-unit.com/procedes/procedes-de-filtration-membranaires/filtrationtangentielle/microfiltration/#:~:text=La%20microfiltration%20est%20une%20technique,en%20suspension%20dans%20un%20liquide>.

Asimus E. (2002). Eviter l'introduction de germes: les conditions de l'asepsie (Publi-information spécial chirurgie), Vétquinol, Toulouse.

Baliarda A. (2003). Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragénococcus* : approches physiologiques et génétiques. Département sciences de l'environnement.

- Balkan B., Ertan F. (2005). Production and properties of alpha-amylase from *Penicillium chrysogenum* and its application in starch hydrolysis. Prep Biochem Biotechnol Journal .35(2):169-78.
- Banupriya S., Kumaresan G., Kathirvelan C. (2020). Effect of tyndallisation process on microbial quality and shelf life of Gulabjamun. The Pharma Innovation Journal 50:165-187.
- Barbosa-Canovas G. V., Pierson M. D., Zhang Q. H. (2000). Pulsedelectricfields. 65 : 65-79.
- Boudih S. (2011). Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers : évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro. Sciences agricoles. Université Paris-Est.
- Boulade M. (2019). Imagerie SPR optimisée en résolution pour l'étude et la détection de bactéries. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes. Français
- Bouzide D. (2019). Cours de microbiologie général.
- Brunod F. (1997). La stérilisation. Hôpital Purpan.
- Byrne B., Dunne G., Bolton D. J. (2006). Thermal inactivation of *Bacillus cereus*.
- Caim K., Raymond S., Alexander S., Pachori P., Lindsay J. (2017). Probing Genomic Aspects of the Multi-Host Pathogen *Clostridium perfringens* Reveals Significant Pangenome Diversity, and a Diverse Array of Virulence Factors. Frontier microbiology 10: 3389.
- Cerrutti P., Terebiznik M. R., Jagus R., Pilosof A. M. (2001). Combined effect of water activity and pH on the inhibition of *Escherichia coli* by nisin. Journal of Food Protection, 64(10): 1510–1514.
- Charles C. (2012). Développement d'une méthode d'hygiénisation thermique des effluents au moyen d'échangeurs de chaleur. Ecole doctorale Sciences de la matière.
- Clem M. F. (1992). Sterilization and antiseptics in Auer J.A., Equine surgery, Philadelphia: Saunders. *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. Food Microbiol 23:803-808.
- Coote P. J., Jones M. V., Seymour I. J., Rowe D. L., Ferdinando D. P., McArthur J., Cole M. B. (1994). Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 140(8): 1881.

- Csonka L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Journals Microbiological reviews* 53: 121-147.
- Dedet JP. (2007). La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. Dunod, Paris. 163 :37-74.
- Deepa R., Mahfuzur R. (2007). Production of small, acid-soluble spore proteins in *Clostridium perfringens* nonfoodborne gastrointestinal disease isolates. *Microbiol January* 53: 514-518.
- Duouf F. (1995). Etude du comportement des spores de *Clostridium perfringens* lors de traitements thermiques a basses températures. faculté de Sciences biologiques.
- Elhimare N., Gherras S. (2017). Etude mycologique et indentification des souches fongique toxigènes isolée des amandes et arachides. Mémoire master. Univercité de Tlemcene.
- Farmer J., Boatwright K. D., Janda J. M. (2007). *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. *Manual of Clinical Microbiology* 9: 649-669.
- Felis G. E., Dellaglio F., Torriani S. (2009). Taxonomy of probiotic microorganisms. *Springer Science, Business Media* 9:161-164.
- Fellows P. (2017). *Food Processing Technology Principles and Practice*. Woodhead Publishing Series in Food Science. *Technology and Nutrition Journal* 10(7): 563–578.
- Figarella J., Leyral A., Terret M. (2007). *Microbiologie technique Dictionnaire des techniques*. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, Bordeaux.
- Filipa V. M., Silva E. (2020). Resistant moulds as pasteurization target for cold distributed high pressure and heat assisted high pressure processed fruit products. *Journal of Food Engineering* 282 :109-198.
- Gardès J. C. (1990). Stérilisation du matériel, in *L'infection en chirurgie orthopédique*. Cahiers de la Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFCOT).
- Gould GW. (2006). History of science-spores. *Journal of Applied Microbiology* 101:507-513.
- Hahn M. W., Lunsdorf H., Schauer M., GHofle M., Boenigk J., Stadler P. (2003). Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied Environmental Microbiology Journal* 69:1442-1451.

- Halima D. (2010). Résistance au stress salin osmoprotection chez les bactéries lactique. Faculté science. département de biotechnologie.
- Handijatno D., Tacharina M., Raharjo D. (2020). The effect of cooking methods to the existence of *Bacillus.sp.* Faculty of Veterinary Medicine. Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
- Hassen A., Mahrouk M., Ouzari H., Cherif M., Boudabous A., Damelincourt J. (2000). UV disinfection of treated wastewater in a large scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device. *Bioresource Technology* 74:141-150.
- Hedayati M. T., Pasqua L., Warn A., Denning D. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
- Hema L., Ajit K., Demirci A., Govind K. (2018). Evaluation of non-thermal hurdle technology for ultraviolet-light to inactivate *Escherichia coli* K12 on goat meat surface. *Food Control* 90: 113-120.
- Hernando D. (2015). Water Content and Total Count of Microbial on Cattle Meat from Slaughter House at Bandar Lampung. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu* 3(1): 61–67.
- Huesca L., Espitia M., Suvira K., Rosenbeck G., Korza B. (2018). Effects of steam autoclave treatment on *Geobacillus stearothermophilus* spores. *Emerging Microbes Infections Jurnal*. 6 (112): 103.
- Idohou V., Egue F., MadodeY. E., Chadare F. J. (2018). Effect of different pasteurization schemes on baobab nectar quality. *Laboratory of Food Sciences*: 55: 218-223.
- Jain R., Joshi D., Dhuria S., Manohar S. (2021). Evaluation of efficacy of autoclave and microwave for sterilization of biomedical waste. *The Pharma Innovation Journal* 10(7): 18-20.
- Jensen G., Hansen B., Eilenberg J., Mahillon J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* 5(8): 631–640.
- Jin-Hong Y. (2018). Review of Disinfection and Sterilization –Back to the Basics. Department of Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea 50(2) : 101-109.

- John F., Kodai K., Kimberly B., Eva U., Bruce A. (1999). Identification of a *Clostridium perfringens* Enterotoxin Region Required for Large Complex Formation and Cytotoxicity by Random Mutagenesis. *Infect Immun Journal*, 67(11): 5634-5641..
- Julien V. (2020). Stérilisation à basse température par diffusion de peroxyde d'hydrogène : principes de fonctionnement, de validation et de libération des charges. Université Grenoble Alpes -UFR Pharmacie.
- Juteau P. (2006). Review of the use of aerobic thermophilic bioprocesses for the treatment of swine waste. *Livestock Science*, 102(3):187-196.
- Kaishev V. (2021). Ensuring Raw Dairy Biological Safety by Tyndallization. *Engineering, Management, Applied Sciences and Technologies* 12(5):1-9.
- Katabehei Moradi Z., Nasiri N., Tabari A., Kioumars H. (2019). Investigating and Comparing the Physicochemical, Microbial and Sensory Characteristics of Traditional and Pasteurized Siahmazgi Cheese. *Saudi Journal of Nursing and Health Care* 55(10): 650.
- Kenneth J., Ray C., George R. (2004). *Sherris Medical Microbiology*.
- Kim H., Bang J., Kim Y., Beuchat L. R., Ryu J. H. (2012). Reduction of *Bacillus cereus* spores in sikhye, a traditional Korean rice beverage, by modified tyndallization processes with and without carbon dioxide injection. *Letters in Applied Microbiology* 55 :218-223.
- Kiu R., Hall L. J. (2018). An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging Microbes Infections journal* 7 (4): 141.
- Klich M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology* 8:713–722.
- Koch A. L. (1984). Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic challenge. *Journal of bacteriology* 159 (3): 914-924.
- Kye-Hwan B., Shin-Young P. Dong-Un L. Hyang-Sook C. (2020). Effect of UV-C irradiation on inactivation of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* and quality parameters of roasted coffee bean (*Coffea Arabica*) 37: 507-518.
- Labbe R., Juneja V. (2017). *Clostridium perfringens*. *Foodborne Diseases Journal* 235–242.

- Lanzilli M., Petrillo C., Donadio G., Baccigalupi L., Ricca E. (2020). *Bacillus subtilis* builds structurally and functionally different spores in response to the temperature of growth. *Environmental Microbiology*, 22(1): 170–182.
- Laouami S. (2012). Métabolisme et toxinogénèse de *Bacillus cereus* : rôles de l'enzyme fermentaire Ldh A et du régulateur rédox Rex. Sciences agricoles. Université d'Avignon.
- Larry M., Bush M. D. (2020). Infections clostridiennes des tissus mous : Gangrène gazeuse; myonécrose clostridienne. Schmidt College of Medicine, Florida Atlantic University.
- Lin T., Tang C., Hung P., Hua Z., Lai Y. (2018). Relative survival of *Bacillus subtilis* spores loaded on filtering facepiece respirators after five decontamination methods. 28:754-762.
- Logan N. A., Rodrigez-Diaz M. (2006). *Bacillus spp.* and related genera. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology journal*, 9(2): 139-158 .
- Maaichia S., Touati K. (2020). Evaluation de la qualité physicochimique et bactériologique du lait pasteurisé et du lait UHT pendant la période de consommation. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers.
- Maghi w., Elarouci M., Meriouli Y. (2016). Contribution à l'étude de la qualité physicochimique et microbiologique du fromage fondu pasteurisé. Université M'hamed Bougara Boumerdes.
- Mariamichela L., Claudia P., Giuliana D., Loredana B., Ezio R. (2020). *Bacillus subtilis* builds structurally and functionally different spores in response to the temperature of growth. *Environmental Microbiology* 22(1): 170–182.
- Mathai J., Tristram S., Nagle J., Zeidel M. (2008). Structural determinants of water permeability through the lipid membrane. *general physiology* 131(1): 69-76.
- Mesquita J., Teixeira MA., Brandao S. (1998). Tindalization of goats milk in glass bottles. *American. Microbiol Journal* 2(3) :p. 803-808.
- Meyer C. (2021). Dictionnaire des Sciences Animales On line. Montpellier, France, Cirad. <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/>.

- Miloudi K. (2018). Contribution à l'étude de l'extraction des huiles essentielles par champ électrique pulsé haute tension. Faculté de Génie électrique Département d'Électrotechnique. Université Djillali Liabes de Sidi- Bel-Abbes .Algérie.
- Modugno C. (2018). Effets d'un traitement combinant hautes pressions et biopréservation sur l'inactivation et la reprise de croissance des spores de Bacillus et Clostridium. Université de Bourgogne Franche-Comte École doctorale Environnement-Santé.
- Muriel B. C. (2003). Protéines et paroi chez *Aspergillus fumigatus*. Protéines et paroi chez *Aspergillus fumigatus* . Institut Pasteur.
- Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (2007). Manual of Clinical Microbiology . American Society of Microbiology Press 1: 1152-1172.
- Nasraoui B. (2015). Les champignons et pseudo-champignons pathogènes des plantes cultivées. Biologie, Nouvelle systématique, Interaction pathologique. Publication de l'INAT.
- Nataro J. P., Bopp C. A., Fields P. I., Kaper J. B., Strockbine N. A. (2007). *Escherichia, Shigella and Salmonella*. Manual of Clinical Microbiology 9:670-687.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Edition Berti.
- Nomal C., Zhang S., Zhang L., Lan R., Zhou X. (2018). Thermal Evaluation of new technique of sterilization using biological indicator. Bioresource Technology Journal 4(65): 121-130.
- Nomal S., Yogesh V., Rathod P. (2017). Evaluation of new technique of sterilization using biological indicator. Bioresource Technology Journal 3(2): 71–77.
- Olivier T., Skurnik D., Picard B., Denamur E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology 8(3):207-17.
- Oulahal N. (2008). Effet des ultra-violets sur les microorganismes de contamination de la tomate. The Pharma Innovation Journal 9(6): 12-20.
- Oulahal N. (2008). Effet des ultraviolets sur les microorganismes de contamination de la tomate. Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire.
- Parry S. (2007). *E. coli: Environmental Health Issues of VTEC O157*. London; New York: Spon Press.

Permatasari T., Sumarlan S. (2013). Test on Making Marning Jagung Using Autoclave. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis Dan Biosistem*1(1) : 69-75.

Peterson S., Dunn A., Klimowicz A., Handelsman J. (2004). Peptidoglycan from *Bacillus cereus* Mediates Commensalism with *Rhizosphere Bacteria* from the Cytophaga-Flavobacterium Group. *Applied Environmental Microbiology* 72(8): 21-.54.

Pol I., van-Arendonk W., Mastwijk H., Krommer J., Smid E., Moezelaar R. (2001). Sensitivities of Germinating Spores and Carvacrol-Adapted Vegetative Cells and Spores of *Bacillus cereus* to Nisin and Pulsed-Electric-Field Treatment. *Applied Environmental Microbiology* 67(4): 1693–1699.

Raper K. B., Fennel D. I. (1965). *The Genus Aspergillus*. Book 686p.

Reed L. (2005). Model Driven Analysis of *Escherichia coli* Metabolism. University of California.

Russell A. D. (2003). Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science Progress* 1(2): 115-137.

Ryan K. J., George R. C. (2004). *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Disease*. 4th edition, New York: McGraw-Hill 727-730.

Sadiq F. A., Flint S., Guo-Qing H. (2018). Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. *International Dairy* 85 :159-168.

Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J., Filtenborg O. (2004). Identification of the common food and airborne fungi, *Aspergillus*. In *Introduction to Food and Airborne Fungi*. Utrecht: Centraalbureauvoor Schimmekultures 1873 : 1-186.

Scheidegger K. A., Payne G. A. (2003). Unlocking the Secrets Behind Secondary Metabolism: A Review of *Aspergillus flavus* from Pathogenicity to Functional Genomics. *Journal of Toxicology* 22:423-459.

Schiavano G. (2017). Ultraviolet germicidal irradiation in tap water contaminated by *Aspergillus spp.* Department of Biomolecular Sciences, Hygiene Section. University of Urbino Carlo Bo.

Semmaks A. (2018). Contribution à l'étude de l'extraction des jus et des huiles végétales par champ électrique pulsé. Faculté de Génie électrique. Université Djillali Liabes de Sidi- Bel-Abbes .Algérie.

Setlow P., Wang G., Paredes S., Sarker M .,Green C. (2012). Effects of wet heat treatment on the germination of individual spores of *Clostridium perfringens*. Microbiol 1(13):824-836.

Severin A., Tabei K., Tomasz A. (2004). The structure of the cell wall peptidoglycan of *Bacillus cereus* RSVF1, a strain closely related to *Bacillus anthracis*. Microbial Drug Resistance 10(2): 77-82.

Sheth., Yogesh V., Rathod., Pratima R., Shenoi., Deepa D., Shori., Rajiv T., Khode., Amruta P. (2017). Evaluation of new technique of sterilization using biological indicator. from Journal of Conservative 20(5):346-350.

Silva C. F., Azevedo R. S., Braga C., Silva R., Eustáquio D., Schwan R., F. (2009). Microbial diversity in a Bagasse-Based compost prepared for the production of *agaricus brasiliensis*. Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. Brazilian Journal of Microbiology 50(2): 101-109.

Sporeed J. (2005). Model Driven Analysis of *Escherichia coli* Metabolism.

Syed S. (2014). Nettoyage, désinfection, et stérilisation.

Talukdar K., Pathima U., Ashfaque H., Mahfuzur R. (2016). Inactivation strategies for *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells. Prabhat American Society for Microbiology, 83(1): 2-16.

Thierry S. (2011). Etude de la diversité génétique d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydo philapsittaci* chez les oiseaux et mise au point de modèles expérimentaux aviaires. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement.

Thomson J., Miller J. M. (2003). Specimen collection, transport, and processing: bacteriology, Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington.

Ticknor O., Kolsto A., Hill K., Keim P., Laker M., Tonks M., Jackson P. (2001). Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Soil Isolates. Applied Environmental Microbiology 67(10): 4863–4873.

- Tohru S., Kaori O., Hideki H., Kenshiro O., Atsushi Y., Tadayoshi S., Naotake O. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci* 99(2): 996-1001.
- Tsuchido T., Katsui N., Takeuchi A., Takano M., Shibasaki I. (1985). Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Applied and environmental microbiology* 50: 298-303.
- Vilain S., Luo Y., Hildreth M., Brozel V. (2006). Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied Environmental Microbiology* 72(7): 4970-7.
- Vilain S., Luo Y., Hildreth M., Brozel V. (2006). Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied Environmental Microbiology* 72(7):4970–4977.
- Vorobiev E., Lebovka N. (2010). Enhanced extraction from solid foods and biosuspensions by pulsed electrical energy 2 : 95-108.
- Vujanovic V., Smoragiewicz W., Krzysztyniak K. (2001). Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. *Environ Toxicol* 16 :1-8.
- Wang G., Paredes-Sabja D., Sarker M. R., Green C., Setlow P.(2012). Effects of wet heat treatment on the germination of individual spores of *Clostridium perfringens*.
- Wijnands L., Dufrenne J., Zwietering M. H., Leusden F. (2006). Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *Food Microbiology* 112 : 120-128.
- Wilson W., Sande M., Drew W.(2001). Current diagnosis and treatment in infectious diseases.
- Yogesh V., Rathod., Pratima R., Shenoj., Deepa D., Shori., Rajiv T., Khode., Amruta P. (2017). Khadse Evaluation of new technique of sterilization using biological indicator. *Conservative Department of Conservative Dentistry and Endodontics* 3(1):51-57.
- Yu J., Cleveland T. E., Nierman W. C., Bennett J. W. (2005). *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Rev Iberoam Micol* 22(4) :194-202.

Zelmat A. (2017). Analyse des effets du champ électrique pulsé haute tension sur le tissu cellulaire : Application à la pomme de terre. Université Mohamed Boudiaf d'Oran.

Zhang S., Zhang L., Lan R., Zhou X., Kou X., Wang S. (2018). Thermal inactivation of *Aspergillus flavus* in peanut kernels as influenced by temperature, water activity and heating rate. Food Microbiology.

Abstract

Abstract

This work focuses on the reliability assessment of some sterilization systems and the detection of recalcitrant microorganisms. Indeed, six sterilization systems were developed to achieve our objectives; autoclaving, discontinuous wet heat, dry heat “Pasteur oven”, pasteurization, UV and osmosis “pure water”. Furthermore, four microorganisms; three bacteria, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*, in addition to one fungus *Aspergillus flavus* were tested using the previous six techniques. The obtained results revealed that the autoclaving has obviously developed high sterilization efficiency on all tested microorganisms; in contrast, the discontinuous wet heat has only been the capacity to inactivate three microorganisms; *E. coli*, *C. perfringens* and *A. flavus*; whereas this method was not reliable to destroy *B. cereus*. The dry heat method is only effective at 180°C and more on *B. cereus* and *C. perfringens*, while 150°C has been sufficient to destroy *E. coli* and *A. flavus*. Besides, the pasteurization has inactivated *E. coli* and *A. flavus*, while it was not reliable for the destruction of both sporulated bacteria *B. cereus* and *C. perfringens*. Likewise, the ultraviolet irradiation absolutely destroyed *E. coli* only; however, this method was not reliable for inactivating *B. cereus*, *C. perfringens* and *A. flavus*. Unlike the previous sterilization systems, all the studied microorganisms exhibited a significant resistance to hypo-osmotic shocks exerted by pure water. As a result, the most efficient sterilization method under the experimental conditions is autoclaving at 120°C with a pressure of 1 bar for 20 min.

Keywords: Sterilization systems, recalcitrant microorganisms, reliability, autoclaving, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*.

المخلص

المخلص

تتناول هاته الدراسة موضوع تقييم فعالية بعض وسائل التعقيم والكشف عن الكائنات الحية الدقيقة المقاومة. من اجل الوصول لاهداف هذه الدراسة تم تقييم مدى فعالية ستة أنظمة تعقيم مختلفة؛ الأوتوكلاف و الحرارة الرطبة المتقطعة و فرن باستير و البسترة و الأشعة فوق البنفسجية والمياه النقية. في تثبيط أربعة كائنات حية دقيقة منها ثلاث أصناف من البكتيريا؛ *Escherichia coli* و *Bacillus cereus* و *Clostridium perfringens*؛ وعفن *Aspergillus flavus*. بينت النتائج المتحصل عليها ان الأوتوكلاف له كفاءة تعقيم عالية جدا نظرا لقضائه على جميع الكائنات الحية الدقيقة المختبرة ، يليه التعقيم بواسطة الحرارة الرطبة المتقطعة والتي كانت لها القدرة على تثبيط ثلاثة كائنات دقيقة هي: *E. coli* و *C. perfringens* و *A. flavus* كما أن التعقيم الحراري الجاف بواسطة فرن باستور سجل فعالية عند 180 درجة مئوية فما فوق على البكتيريا المقاومة؛ *B. cereus* و *C. perfringens*؛ في حين أن 150 درجة مئوية كانت كافية للقضاء على *E. coli* و *A. flavus* أما البسترة فليست بوسيلة يمكن الاعتماد عليها للتخلص من البكتيريا المقاومة كونها لم تقض تماما على *B. cereus* و *C. perfringens* بينما قضت على الكائنات الحية الدقيقة غير المقاومة. *E. coli* و *A. flavus* من ناحية أخرى ، فإن الإشعاع فوق البنفسجي اوقف تمامًا نشاط *E. coli* بينما لم يكن له تأثير على *B. cereus* و *C. perfringens* و *A. flavus*. كما ان جميع الكائنات الحية الدقيقة التي تمت دراستها أظهرت مقاومة للضغط الأسموزي المطبق من قبل المياه النقية. من خلال النتائج المحصل عليها نستنتج أن أكثر طرق التعقيم كفاءة في الشروط التجريبية المطبقة هي التعقيم عند 120 درجة مئوية وضغط يساوي 1 بار لمدة 20 دقيقة.

الكلمات المفتاحية : أنظمة التعقيم ، الكائنات الحية الدقيقة المقاومة ، الفعالية ، الأوتوكلاف، *Bacillus cereus*، *Clostridium perfringens*.

Annexes

Annexes

Annexe 1 Composition et préparation des milieux de culture.

Milieu de culture	Composition	Référence
Eau physiologique	- Chlorure de sodium (NaCl) 9g. - Eau distillée 1000 mL	Thomson et Miller, 2003.
Bouillon nutritif (BN) pH 6,8	- Peptone 5 g - Extrait de viande 3 g - Eau distillée 1000 mL	Eaton <i>et al.</i> , 1995.
Gélose nutritive (GN) pH 7.2	- Peptone 10 g - Extrait de viande 5 g - Chlorure de sodium 5 g - Gélose 15 g - Eau distillée 1000 mL	Guiraud, 1998
Potato dextrose agar (PDA) pH 5,6	Laver et couper en petits cubes 200g de pommes de terre non pelées. Puis les mettre dans un litre d'eau distillée et porter à l'ébullition. Ecraser, filtrer et compléter un litre. - Pomme de terre 20 g - Glucose 20g - Agar 15g - Eau distillée 1000 mL	Larpent, 1997
Trypticase Soy agar (TSA) pH 7,3	- Tryptone 15 g - Peptone papainique de soja 5 g - Chlorure de sodium 5g - Agar 15 g - Eau distillée 1000 mL	Downes <i>et al.</i> , 2001
Hektoen pH 7,5	- Protéose peptone 12 g - Extrait de levure 3 g - Chlorure de sodium 5 g - Thiosulfate de sodium. 5 g - Sels biliaires 9 g	S. Kings <i>et al.</i> , 2020

	<ul style="list-style-type: none"> - Citrate de fer ammoniacal 1,5 g - Salicine 2g - Lactose 12 g - Saccharose 12 g - Fuchsine acide .0, 1 g - Bleu de bromothymol 0,065 g - Agar 14 g - Eau distillée 1000 mL 	
<p>Milieu Viande foie (VF) (pH 7,4)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Base viande foie 30 g - Glucose 2 g - Agar 6 g <p>Pour des colonies observables de <i>Clostridium</i> il faut ajouter les deux réactifs d'alun de fer et sulfite de sodium.</p> <p>Faire fondre un flacon de 225 ml de gélose viande foie (VF) au bain- marie bouillant et y maintenir pendant 10 minutes .pour chasser les gaz dissous, refroidir à 50°C environ et ajouter à ce flacon 3.75 ml d'alun de fer et 9.375ml sulfite de sodium.</p>	Anonyme, 2010

NB: Les milieux de cultures doit être stérilisés par autoclavage à 120°C et 1 bar pendant 20 min.

Annexe 2 Dénombrement par la méthode de Nombre le Plus Probable (NPP)

- Dénombrement avant la stérilisation (NPP)

	<i>E. coli</i>								
Dilution	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Résultat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Dilution	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹⁶	10 ⁻¹⁷	10 ⁻¹⁸
Résultat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---

<i>A. flavus</i>									
Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Résultat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Dilution	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-13}	10^{-14}	10^{-15}	10^{-16}	10^{-17}	10^{-18}
Résultat	+++	+++	++-	+-	---	---	---	---	---

<i>B. cereus</i>										
Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Résultat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Dilution	10^{-11}	10^{-12}	10^{-13}	10^{-14}	10^{-15}	10^{-16}	10^{-17}	10^{-18}	10^{-19}	10^{-20}
Résultat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Dilution	10^{-21}	10^{-22}	10^{-23}	10^{-24}	10^{-25}	10^{-26}	10^{-27}	10^{-28}	10^{-29}	10^{-30}
Résultat	+++	+++	+++	+++	++-	+++	+++	+-	+-	---

<i>C. perfringens</i>										
Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Résultat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Dilution	10^{-11}	10^{-12}	10^{-13}	10^{-14}	10^{-15}	10^{-16}	10^{-17}	10^{-18}	10^{-19}	10^{-20}
Résultat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Dilution	10^{-21}	10^{-22}	10^{-23}	10^{-24}	10^{-25}	10^{-26}	10^{-27}	10^{-28}	10^{-29}	10^{-30}
Résultat	+++	+++	+++	+++	++-	+++	+-	+-	+-	---

- Dénombrement après pasteurisation (NPP)

<i>B. cereus</i>					<i>C. perfringens</i>					
Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Résultat	+++	++-	+-	---	---	+++	++-	+-	---	---

- Dénombrement Après stérilisation par chauffage humide discontinu (NPP)

<i>B. cereus</i>					<i>C. perfringens</i>					
Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Résultat	++-	---	---	---	---	+-	---	---	---	---

NB : Loi de dénombrements par NPP : $N = \text{NPP} / V \text{ inoculum} * Fd$

N : Nombre des cellules.

NPP : Nombre le plus probable obtenu par lecture de la table de Mac Grady

V : Volume de l'inoculum.

Fd : Facteur de dilution

Annexe 3 Résultats de Dénombrement par la méthode de NPP avant et après la stérilisation.**1-** Dénombrement avant et après l'autoclavage (NPP).

	<i>E. coli</i>		<i>B. cereus</i>		<i>C. perfringens</i>		<i>A. flavus</i>	
Temps (min)	0	20	0	20	0	20	0	20
Nombre des Cellules	$4.5 \cdot 10^{17}$	0	$1.15 \cdot 10^{28}$	0	$3 \cdot 10^{27}$	0	$1.1 \cdot 10^{12}$	0

2- Dénombrement avant et après la chaleur humide discontinue (NPP).

	<i>B. cereus</i>				<i>C. perfringens</i>			
Temps (min)	0	10	20	30	0	10	20	30
Nombre des cellules	$1.15 \cdot 10^{28}$	$2 \cdot 10^2$	$1.1 \cdot 10$	$0.6 \cdot 10$	$3 \cdot 10^{27}$	$1.5 \cdot 10^2$	$1.1 \cdot 10$	$0.7 \cdot 10$

	<i>E. coli</i>		<i>A. flavus</i>	
Temps (min)	0	10	0	10
Nombre des Cellules	$4.5 \cdot 10^{17}$	0	$1.1 \cdot 10^{12}$	0

3- Dénombrement avant et après la pasteurisation (NPP).

	<i>E. coli</i>		<i>B. cereus</i>		<i>C. perfringens</i>		<i>A. flavus</i>	
Temps (min)	0	20	0	20	0	20	0	20
Nombre des Cellules	$4.5 \cdot 10^{17}$	0	$1.15 \cdot 10^{28}$	$2 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^{27}$	$1.5 \cdot 10^2$	$1.1 \cdot 10^{12}$	0

Tables de Mac Grady

2 tubes par dilution		3 tubes par dilution					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.5	001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.5	010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.9	011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.9	020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.6	100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	1.2	101	0.7	221	3.0	321	15.0
110	1.3	102	1.1	222	3.5	322	20.0
111	2.0	110	0.7	223	4.0	323	30.0
120	2.0	111	1.1	230	3.0	330	25.0
121	3.0	120	1.1	231	3.5	331	45.0
200	2.5	121	1.5	232	4.0	332	110.0
201	5.0	130	1.6	300	2.5	333	140.0
210	6.0	200	0.9	301	4.0		
211	13.0						
212	20.0						
220	25.0						
221	70.0						
222	110.0						

Université : Frères Mentouri, Constantine 1	Présenté par: Meziane Nahla et Benayad Boutiena
Département : Biologie Appliquée	Date de soutenance: 12/ 09/ 2021
Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master professionnalisant en Bio-industrie, Analyse et Contrôle (BAC)	
Thème : Evaluation de fiabilité des systèmes de stérilisation et détection des micro-organismes récalcitrants.	
<p>Résumé</p> <p>Le présent travail porte sur l'évaluation de la fiabilité de quelques systèmes de stérilisation et la détection de microorganismes récalcitrants. En effet, six systèmes de stérilisation ont été testés pour atteindre nos objectifs en l'occurrence ; autoclavage, chauffage humide discontinu, chaleur sèche « four Pasteur », pasteurisation, UV et osmose « eau pure ». En effet, quatre microorganismes ; trois bactéries ; <i>Escherichia coli</i>, <i>Bacillus cereus</i> et <i>Clostridium perfringens</i> et une moisissure <i>Aspergillus flavus</i> ont été testées par rapport à leur résistance aux effets stérilisant des procédés précédents. Les résultats obtenus révèlent que l'autoclavage a développé une forte efficacité de stérilisation sur tous les microorganismes test en revanche, le chauffage humide discontinu avait la capacité d'inactiver, dans les conditions expérimentales, trois microorganismes ; <i>E. coli</i>, <i>C. perfringens</i> et <i>A. flavus</i>, alors que, cette méthode n'avait pas d'effet remarquable sur <i>B. cereus</i>. La stérilisation par la chaleur sèche développait un effet à partir de 180°C sur <i>B. cereus</i> et <i>C. perfringens</i> et à 150°C cette technique n'avait d'effet que sur <i>E. coli</i> et <i>A. flavus</i>. Les résultats obtenus ont, en outre, montré que la pasteurisation développait un effet désactivant sur <i>E. coli</i> et <i>A. flavus</i>, cependant, cette technique n'a montré aucun effet sur les bactéries sporulantes ; <i>B. cereus</i> et <i>C. perfringens</i>. Par ailleurs, l'irradiation ultraviolette n'a montré qu'un effet stérilisant remarquable sur <i>E. coli</i>. Contrairement aux systèmes de stérilisation précédents, tous les microorganismes étudiés ont, significativement, montré une résistance aux chocs hypo-osmotiques exercés par l'eau pure. De l'ensemble des résultats, il s'avère que la méthode la plus performante dans les conditions expérimentales est l'autoclavage à 120°C avec une pression de 1 bar pendant 20 min.</p> <p>Mots clés: techniques de stérilisation, microorganismes récalcitrants, autoclavage, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Clostridium perfringens</i>.</p>	
Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM).	
Laboratoires 14 et 9, FSNV, Université Frères Mentouri Constantine 1.	
Jury d'évaluation:	
Présidente :	Dr. KARA ALI Mounira M.C.A Université Frères Mentouri Constantine 1.
Rapporteur :	Pr. KACEM CHAOUCHE Noredine Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1.
Examinatrice :	Dr. CHERFIA Radia M.C.B Université Frères Mentouri Constantine 1.
Année universitaire : 2020-2021	