

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCCEN



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers.

Département de Biologie.

MÉMOIRE

Présenté par

MSEMO JAMAL JUMA

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Microbiologie et Contrôle de Qualité

Thème,

**L'effet du nettoyage et désinfection sur les biofilms de
Bacillus cereus dans l'industrie laitière.**

Soutenu le 30/06/2022, devant le jury composé de :

Président	BARKA Mohamed Salih	Pr	Univ-Tlemcen
Examineur	KHADIR Abel Mounaim	MCA	Univ-Oran
Promotrice	CHERIF ANTAR Asmaa	MCB	Univ-Tlemcen

Année universitaire 2021-2022.

Remerciements :

Merci à Dieu Tout-Puissant de m'avoir donné la patience, la force, le courage et la persévérance afin de terminer ce travail.

En tout premier lieu, Je remercie mon encadrant **Dr CHERIF ANTAR Asma** enseignante (MCB) à Institut des sciences et techniques appliquées ISTA, Université de Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur d'encadrer et sur tout pour m'avoir soutenu et guidé tout au long de mon travail. Sa patience, son optimisme et sa croyance en moi m'ont poussé de donner le meilleur de moi-même et qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à ma soutenance, de lire ce manuscrit et d'évaluer ce modeste travail :

PRESIDENT : BARKA Mohamed Salih un professeur de l'Université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire et pour toutes les informations et les conseils qu'elle nous a donnée au cours de nos années universitaires.

EXAMINATEUR : KHADIR Abel Mounaim, Maitre de conférences class A, à l'Université de d'Oran, qui m'a fait l'honneur d'examiner ce modeste travail et participer à la soutenance.

Je remercie également **Madame BELLIFA Samia** la responsable de la formation et son équipe pédagogique d'avoir nous assurée une formation de très haut niveau. Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la finalisation de mon travail.

Dédicace :

Avant tout, je dois remercier mes parents pour leur amour, leurs sacrifices et leur soutien indéfectible tout au long de ma vie. Merci à vous deux de m'avoir donné la force et les outils pour atteindre les étoiles, cela n'avait jamais été dans mon imagination pour y parvenir auparavant mais vous avez rendu possible, C'est avec une sincère gratitude et une chaleureuse considération que je dédie ce travail à mon père HAMIS NGURIDADA MSEMO et son épouse bien-aimée HUSNA MGEMELA MPOGEJI. Je vous serai toujours redevable.

J'ai eu l'honneur de dédier ce travail au professeur DALI youcef Majda. Chef du département de biologie à la faculté SNV/STU Université de Tlemcen, pour ses conseils, son soutien et sa confiance sans fin, elle a été une figure importante pour moi dans un moment difficile de ma carrière universitaire. Pour tout ce qu'elle m'a fait, je prie Allah Tout-Puissant de lui permettre de témoigner de la réalité de ses rêves dans sa vie.

Aussi, aux membres de ma famille, mon frère et mes sœurs avec qui nous avons traversé vents et marées lors de ce voyage aventureux.

À mes camarades Mussa Kombo, Mwanahija Said, Kokou Kévin Tsogbegan & Hollines Julai pour leur tolérance et leur soutien lors de la réalisation de ce travail.

À mes chers amis, camarades de classe et tous ceux qui ont été impliqués d'une manière ou d'une autre dans cette réalisation.

Résumé

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste à Gram positif qui survit aux traitements thermiques tel que la pasteurisation en raison de la sporulation. Non seulement les spores elles-mêmes peuvent survivre longtemps dans un environnement difficile, mais aussi son biofilm connu par sa forte résistance aux détergents, désinfectants et antibiotiques.

Dans les industries laitières, où les biofilms de *bacillus cereus* prédominent, diverses méthodes ont été mises en place afin de les éradiquer, d'améliorer la qualité des produits finis et d'éviter les dommages économiques causées. Une procédure comme le nettoyage en place (CIP) a été établi et optimisée par la suite pour améliorer l'efficacité de la lutte contre ces bactéries en biofilm.

Cette recherche bibliographique vise à évaluer l'efficacité des procédés de nettoyage et de désinfection dans l'élimination du biofilm de *Bacillus cereus* dans les industries laitières. Deux d'articles scientifiques ont été étudié et qui portent sur la même thématique. Le premier article traite l'effet des méthodes sèches sur l'élimination du biofilm de *B.cereus* et le seconde porte sur l'efficacité de différents désinfectants sur les biofilms de *B.cereus*. Les résultats ont montré une meilleure efficacité de la lumière UV-C sur les biofilms de *B.cereus* formés sur les surfaces en acier inoxydable. Alors que l'acide peracétique et l'hypochlorite de sodium n'étaient pas efficaces pour éliminer les biofilms formés sur des coupons en acier inoxydable immergés dans du lait.

Mots clés : *B.cereus*, Biofilm, nettoyage en place, désinfection, acier inoxydable.

ملخص

Bacillus cereus هو أحد مسببات الأمراض الانتهازية إيجابية الجرام التي تنجو من العلاجات الحرارية مثل البسترة بسبب الأوباع. ليس فقط الجراثيم نفسها يمكنها البقاء على قيد الحياة لفترة طويلة في بيئة قاسية ، ولكن أيضًا البيوفيلم المعروف بمقاومته القوية للمنظفات والمطهرات والمضادات الحيوية.

في صناعات الألبان ، حيث تسود الأغشية الحيوية العسوية ، تم تنفيذ طرق مختلفة من أجل القضاء عليها وتحسين جودة المنتجات النهائية وتجنب الضرر الاقتصادي الناجم. تم إنشاء إجراء مثل التنظيف في المكان (CIP) ثم تم تحسينه لاحقًا لتحسين فعالية مكافحة هذه البكتيريا في الأغشية الحيوية.

يهدف هذا البحث الببليوغرافي إلى تقييم فعالية عمليات التنظيف والتطهير في القضاء على *Bacillus cereus* biofilm في صناعات الألبان. تمت دراسة مقالتي علميتين تتعلقان بنفس الموضوع. تتناول المقالة الأولى تأثير الطرق الجافة على التخلص من بكتيريا *B. cereus* biofilm وتتناول الثانية فعالية المطهرات المختلفة على الأغشية الحيوية *B. cereus*. أظهرت النتائج كفاءة أفضل لضوء UV-C على الأغشية الحيوية *B. cereus* المتكونة على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ. بينما لم يكن حمض البيروكسيتيك وهيبوكلوريت الصوديوم فعالين في إزالة الأغشية الحيوية المتكونة على كوبونات الفولاذ المقاوم للصدأ المغمورة في الحليب.

الكلمات المفتاحية: *B. cereus* ، Biofilm ، التنظيف في المكان ، التطهير ، الفولاذ المقاوم للصدأ.

ABSTRACT:

Bacillus cereus is an opportunistic gram-positive pathogen that survives heat treatments such as pasteurization due to sporulation. Not only the spores themselves can survive for a long time in a harsh environment, but also its biofilm has been known for its strong resistance to detergents, disinfectants and antibiotics.

In the dairy industries, where *bacillus cereus* biofilms predominate, various methods have been implemented in order to eradicate them, improve the quality of the finished products and avoid the economic damage caused. A procedure such as cleaning in place (CIP) was established and subsequently optimized to improve the effectiveness of the fight against these bacteria in biofilm.

This bibliographic research aims at evaluating the effectiveness of cleaning and disinfection processes in the elimination of *Bacillus cereus* biofilm in dairy industries. Two scientific articles have been studied and which relate to the same theme. The first article deals with the effect of dry methods on the elimination of biofilm of *B.cereus* and the second deals with the effectiveness of different disinfectants on *B.cereus* biofilms.

The results showed better efficacy of UV-C light on *B.cereus* biofilms formed on stainless steel surfaces. While peracetic acid and sodium hypochlorite were not effective in removing biofilms formed on stainless steel coupons immersed in milk.

Keywords: *B.cereus*, Biofilm, cleaning in place, disinfection, stainless steel.

Liste des figures :

Table de matière	x
Figure 1 : Colonies de <i>B. cereus</i> isolés dans la laiterie A après 24h d'incubation à 30°C sur milieu mannitol egg-yolk polymyxin, MYP (A), gélose Luria-Bertani (B) et gélose au sang (C) (Malek, 2013).....	6
Figure 2 : Morphologie de <i>Bacillus cereus</i> sporulant (A & B) sur le microscope électronique à balayage(MEB) avec les inclusions blanches (spore) (site web1)	8
Figure 3 : Structure générale de genre <i>Bacillus</i> (Encyclopedia Britannica.inc, 2014).	9
Figure 4 : Observation et description de la structure des spores de <i>Bacillus</i> (Bressuire-Isoard, 2015).....	10
Figure 5 : Formation et dispersion d'un biofilm bactérien (Tremblay <i>et al.</i> , 2014).....	14
Figure 6 : Schéma illustrant un modèle exemplaire de l'exosporium de groupe <i>Bacillus cereus</i> (Stewart, 2015).....	16
Figure 7 : Spore de <i>B. cereus</i> montrant les structures des spores adhérents l'exosporium et les appendices impliqués dans l'adhésion aux surfaces.....	17
Figure 8 : Mécanisme d'action de détergent.....	22
Figure 10 : Cercle de Sinner.....	25
Figure 11 : Un système automatique de CIP.....	27
Figure 12 : Schéma simplifié d'une procédure CIP conventionnelle en cinq étapes et d'une stratégie CIP améliorée en trois étapes (Malek, 2019).	30
Figure 13 : Formation de biofilm et procédure de désinfection.	34
Figure 14 : Organigramme de la conception expérimentale, décrivant toutes les étapes de cette étude.....	38
Figure 15 : prototype expérimental utilisé dans cette étude, en acier inoxydable AISI 304 avec finition sanitaire.	40
Figure 16 : Effet des protocoles de désinfection contre le biofilm de <i>Bacillus cereus</i> formé sur de l'acier inoxydable et du polypropylène. a : éthanol à 70 %, b : produit du commerce, c : chaleur sèche, d : lumière UV-C, e : ozone gazeux, f : hypochlorite de sodium (200 mg/l) pH 7 et g : hypochlorite de sodium (200 mg/l) pH 11 ; (---) compter en dessous de la limite de détection (< 1,69 log UFC/cm ²). N0, population initiale ; N, population après traitement. Les barres représentent l'écart type. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.	46

Figure 17 : observation microscopique de l'évolution biofilm de <i>bacillus cereus</i> en acier inoxydable AISI 304.....	49
--	----

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Distinction de membre de groupe Bacillus par de facteur de virulence majeur du groupe <i>Bacillus cereus</i> , Entérotoxine (Ehling-Schulz <i>et al.</i> , 2019) :.....	7
Tableau 02 : Mode d'action des principaux désinfectants (CAPP-Info, 2007) :	24
TABLEAU 3 Comptes moyens de <i>Bacillus cereus</i> s.s. dans les biofilms collés sur des surfaces en acier inoxydable AISI 304 en contact avec du lait étamé, contaminé et pasteurisé ; lait tyndallisé contaminé par des spores ; et du lait tyndallisé contaminé par des cellules végétatives.	48

Abbreviations:

ADN :	Acide Désoxyribose Nucléique
ANOVA :	Analyse de Variance Unidirectionnelle
ARN :	Acide Ribose Nucléique
BHI :	Brain -Heart Infusion Broth
CIP:	Cleaning in Place
CSH	traitement à l'hypochlorite de sodium.
CSP	traitement à l'acide peracétique ;,
EPS :	Substances Polymères Extracellulaires
GI:	Gastro-intestine
IPA :	D'Alcool Isopropylique
LPS :	Lipopolysaccharides
MEB :	Microscopique Electronique à Balayage
MYP:	Mannitol egg-yolk Polymyxin
N&D :	nettoyage et désinfection
NEP:	Nettoyage en Place
NHE :	L'Entérotoxine non Hémolytique
NLPRP3 :	La Protéine-3 du Récepteur nod-like
PP :	Polypropylene
RU :	L'humidité Relative
SS:	Stainless steel (acier inoxydable)
TCP:	Tindalized, Contaminated, and Pasteurized milk/ lait tindalisé, contaminé et pasteurisé.
TCS:	lait tindalisé contaminé par des spores
TCV:	lait tindalisé contaminé par du cellule végétatif avec adhérence
TM :	Le Lait Tyndallisé
TSA :	Trypticase Soya Agar
TSB:	Bouillon Trypticase Soja

Table de matière

INTRODUCTION GENERALE	1
INTRODUCTION GENERALE :	2
PARTIE I :	4
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE 1 : BACILLUS CEREUS.....	5
1.1. CARACTERISTIQUES DE <i>BACILLUS CEREUS</i> :	5
1.2. ÉCOLOGIE DE BACILLUS CEREUS :	6
1.3. STRUCTURE DE B. CEREUS :	8
1.3.1 ENDOSPORE :	9
1.4 PATHOGENICITE DE BACILLUS CEREUS :	10
CHAPITRE 2 : GENERALITES SUR LES BIOFILMS	12
2.1. DEFINITION ET CARACTERISTIQUES DES BIOFILMS :	12
2.2 CYCLE DE DEVELOPPEMENT DU BIOFILM :	13
2.2.1. LA FIXATION, (ADHERENCE) :	13
2.2.2. LA CROISSANCE :	13
2.2.3. LA MATURATION :	13
2.2.4. DISPERSION :	14
2.3. ROLE DE L'EPS EN CONSOLIDATION DU BIOFILM :	15
2.4. FACTEUR INFLUENÇANT LA FORMATION DE BIOFILM :	15
2.4.1. Facteur lié à la structure cellulaire de bactéries :	15
2.4.2. DES SPORES :	15
2.4.3. L'EXOSPORIUM ET LES APPENDICES :	16
2.5. Les facteurs liés aux surfaces :	17
2.5.1. La charge de surface et le caractère hydrophobe des matériaux :	17
2.5.2 La rugosité (propriété topographique de matériel) :	18
2.5.3 Facteurs environnementaux :	18
2.6. BIOFILM DE <i>B.CEREUS</i> EN INDUSTRIE LAITIERE :	18
2.7. STRATEGIE DE LUTTER CONTRE DE BIOFILM :	19
CHAPITRE 3 : NETOYAGE ET DESINFECTION	20

3.1. DEFINITION DU NETTOYAGE :	20
3.2. Définition de la désinfection :	20
3.3. ROLE DE LA DESINFECTION EN INDUSTRIE LAITIERE :	20
3.4. LES AGENTS DE NETTOYAGE (DETERGENT) :	21
3.4.1. Les agents de surface (surfactants) :	22
3.4.2. Les détergents minéraux :	22
3.4.3. Le détergent enzymatique /Biologique :	23
3.4.3.1 Le choix de détergent :	23
3.5. LES AGENTS DESINFECTANTS EN INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE :	24
3.6. EFFICACITE DU NETTOYAGE ET DESINFECTION : CERCLE DE SINNER :	25
3.6.1. L'action Chimique :	25
3.6.2. L'action Mécanique :	26
3.6.3. La température :	26
3.6.4. Le temps d'action :	26
3.7. AS :	26
3.8. Cleaning in place (CIP/ NEP) :	27
3.9. Le nettoyage Enzymatique :	28
3.10. Biocides naturels :	29
PARTIE II :	31
MATERIEL ET METHODES :	31
ARTICLE 1 : L'EFFET DES METHODES DE DESINFECTION A SEC SUR LE BIOFILM DE <i>BACILLUS CEREUS</i> (HARADA ET NASCIMENTO, 2021) PUBLIE PAR LE <i>BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY</i>.	32
1.1. INTRODUCTION :	32
1.2. METHODOLOGIE :	33
1.2.1. SOUCHES BACTERIENNES :	33
1.2.2. FORMATION DE BIOFILM :	33
1.2.3. PROCEDURES DE DESINFECTION :	34
1.2.3.1 L'hypochlorite de sodium :	34
1.2.3.2. Ozone :	35
1.2.3.3. Chaleur sèche :	35
1.2.3.4. Rayonnement UV-C :	35
1.2.3.5. Éthanol 70% :	35
1.3. DESINFECTANT SEC COMMERCIAL :	36
1.3.1 Dénombrement des cellules sessiles viables :	36
1.4. ANALYSES STATISTIQUES :	36

ARTICLE 2 : EFFICACITE DE DIFFERENTS DESINFECTANTS SUR LES BIOFILMS DE BACILLUS CEREUS SENSU STRICTO SUR LES SURFACES EN ACIER INOXYDABLE EN CONTACT AVEC LE LAIT. (SILVA ET AL., 2018) PUBLIE PAR JOURNAL FRONTIERES EN MICROBIOLOGIE.	37
2.1. INTRODUCTION.	37
2.2. MATERIEL ET METHODES :	38
2.2.1 <i>Expérience 1</i> :	38
2.2.2. <i>Expérience 2</i> :	41
2.2.3. <i>Expérience 3</i> :	41
2.3. <i>Assainissement des coupons en acier inoxydable par le système Clean-In-Place (CIP), simulé à l'échelle pilote</i> :	41
2.4. <i>Quantification de la population bactérienne et de l'adhésion aux surfaces des coupons</i> :	42
2.5. <i>Analyse topographique des coupons des surfaces en acier inoxydable</i> :	43
2.6. <i>Analyses statistiques</i> :	43
PARTIE III :	44
RESULTATS ET DISCUSSION.	44
3.1 RESULTAT :	45
3.2. RESULTATS :	47
3.3. DISCUSSION.....	50
CONCLUSION GENERALES.....	54
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	56
ANNEXES.....	69

Introduction Générale

1.1. Introduction Générale :

Les biofilms sont des communautés de micro-organismes attachés aux surfaces biotiques ou abiotiques établissant des structures tridimensionnelles composées de bactéries entourées d'une matrice auto-fabriquée (**Hall-Stoodley et al., 2004; Costerton et al., 1999**).

Bacillus cereus est une bactérie à Gram positif, pathogène opportuniste qui survit aux traitements thermiques appliqués aux industries laitières comme la pasteurisation en raison de sa capacité de sporulation. Non seulement les spores elles-mêmes peuvent survivre longtemps dans des environnements hostiles (**Cano et Borucki, 1995**), mais aussi son biofilm a été une grande menace en raison de divers mécanismes de résistance aux détergents, désinfectants et antibiotiques, exposés par des substances polymériques supplémentaires, l'expression des gènes par l'eDNA et ses puissance de dispersion (**Mulcahy et al., 2008; Donlan et Costerton, 2002; Sutherland, 2001**).

Le biofilm est connu pour être un problème très difficile dans divers domaines, sur tout en industries alimentaires y compris les industries laitières, provoquant une recontamination persistante des produits finaux et des contaminations croisées au sein des chaînes de production, tout en réduisant l'efficacité de l'équipement lui-même (**Marchand et al., 2012; Park et al., 2004**).

Dans les industries laitières, lorsque les biofilms de *bacillus cereus* prédominent, diverses méthodes ont été mises en place afin de les éliminer et d'améliorer la qualité des produits finis, d'éviter les dommages des équipements et les pertes économiques. Une procédure de nettoyage en place CIP a été établi et même optimisée pour améliorer l'efficacité dans la lutte contre ces bactéries en mode biofilm (**Bremer et al., 2009; Vlková et al., 2008; Bremer et al., 2006**).

L'objectif de cette étude est d'optimiser quelques protocoles de nettoyage et désinfection pour réduire et/ou éliminer les biofilms de *B.cereus* isolés de l'industrie laitière. Malheureusement ce travail na pas été réalisé vu les circonstances exigées par la pandémie du Covid-19. Pour cela, deux travaux qui portent sur la même thématique ont été sélectionnés afin d'être étudiier et analyser. Le premier travail réalisé par Harada et Nascimento en 2021 porte sur l'effet de la désinfection par des méthodes sèches sur les biofilms de *B.cereus*. Le second article réalisé par Silva et ses collaborateurs (2018)

porte sur l'efficacité de différents désinfectants sur les biofilms de *B.cereus* formés sur les surfaces en acier inoxydable en contact avec le lait.

Le présent manuscrit est structuré comme suit : la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique donnant des généralités sur le sujet. La partie suivante est la méthodologie qui porte sur l'analyse de la partie expérimentale des articles analysés. Les résultats et leur discussion seront présentés en dernière partie. Une conclusion pour conclure le travail.

Partie I :

Synthèse

Bibliographique

CHAPITRE 1 : BACILLUS CEREUS

1.2. Caractéristiques de *Bacillus cereus* :

Bacillus cereus (*B. cereus*) est un agent pathogène contaminant des aliments qui peut produire des toxines. Il s'agit d'une bactérie à gram-positive, anaérobie facultative, productrice de toxines, présente dans le sol, la végétation et les aliments, provoquant des maladies intestinales accompagnées de nausées, de vomissements et de diarrhée. Il a d'abord été isolé de l'air dans une étable en 1887 par Grace et Percy Frankland.

Bacillus signifie « Rod /verge » tandis que le nom spécifique, cereus, qui signifie « cireux /waxy » en latin, fait référence à l'apparition de colonies cultivées sur de la gélose au sang MYP et la gélose Luria-Bertani (**figure1**). *B. cereus* peut se développer à des températures allant de 5°C à 50°C avec une température de croissance optimale entre 28°C et 35°C (**Messelhäusser et al., 2007**). Certaines souches sont nocives pour l'homme et provoquent des maladies d'origine alimentaire. Elles ont été associées à de graves infections chez des hôtes immunodéprimés et peuvent provoquer une septicémie ainsi qu'une endophtalmie, pouvant entraîner une perte de vision (**Ehling-Schulz et al., 2019**). Les cellules de *Bacillus cereus* interviennent dans la dégradation de la lécithine par synthèse des lécithinase, acidification d'acétone, réduction des nitrates, assimilation du citrate et du formate, fermentation des glucides, elles ne fermentent pas le mannitol (**Stenfors Arnesen et al., 2008**).

Ces bactéries se trouvent couramment dans l'environnement et peuvent contaminer les aliments. Elles peuvent se multiplier rapidement à température ambiante avec une toxine préformée abondamment présente. Lorsqu'elle est ingérée, cette toxine peut provoquer une maladie gastro-intestinale qui est la manifestation la plus connue de la maladie. Les syndromes gastro-intestinaux (GI) associés à *B. cereus* comprennent :

- Le syndrome diarrhéique : une maladie sans symptômes significatifs de l'intestin supérieur et un syndrome principalement gastro-intestinal supérieur avec nausées.
- Le syndrome émétique : vomissements sans diarrhée (**Majed et al., 2016**).

Lorsque la toxine émétique (cereulide) est produite dans les aliments, des vomissements surviennent après l'ingestion d'aliments contaminés. Le syndrome diarrhéique survient lorsque des entérotoxines sont produites dans l'intestin, suite à l'ingestion d'aliments contaminés par *B. cereus*.

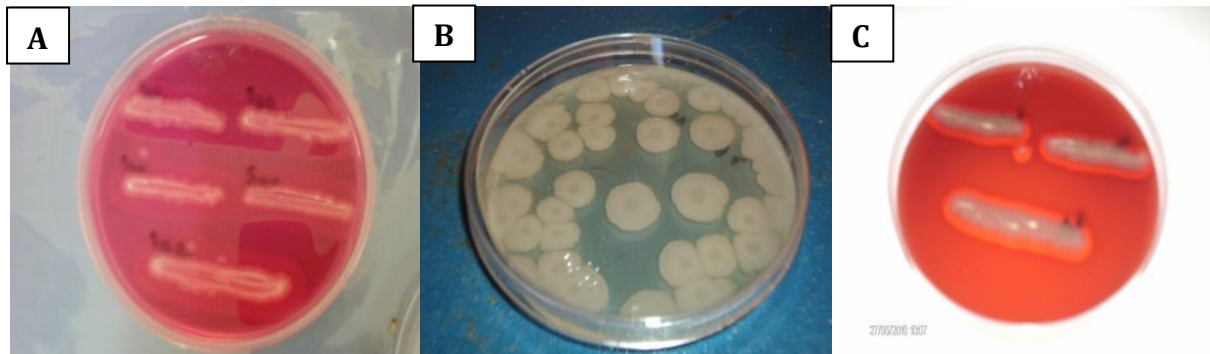


Figure 1 : Colonies de *B. cereus* isolés dans la laiterie A après 24h d'incubation à 30°C sur milieu mannitol egg-yolk polymyxin, MYP (A), gélose Luria-Bertani (B) et gélose au sang (C) (Malek, 2013).

1.3. 1.2. Écologie de *Bacillus cereus* :

B. cereus est une bactérie commune, présente de manière omniprésente dans l'environnement. Elle a la capacité de former des spores, ce qui lui permet de survivre plus longtemps dans des températures extrêmes et dans d'autres environnements hostiles. Par conséquent, on la trouve comme contaminant de divers aliments. *B. cereus* isolé du sol, des légumes, du lait, des céréales, des épices, du riz frit, de la volaille et des viandes cuites, des soupes et des desserts (Fiedler *et al.*, 2019).

Cette bactérie entre en compétition avec d'autres micro-organismes tels que *Salmonella* et *Campylobacter* dans l'estomac, sa présence réduit le nombre de ces micro-organismes. Chez les animaux destinés à l'alimentation tels que les poulets, les lapins et les porcs, certaines souches inoffensives de *B. cereus* sont utilisées comme additif alimentaire probiotique pour réduire la présence de *Salmonella* dans les intestins et le caecum des animaux (Cutting, 2011). *B. cereus* et d'autres membres de *Bacillus* ne sont pas facilement tués par l'alcool, ils sont connus pour coloniser les liqueurs distillées et

les tampons et tampons imbibés d'alcool en nombre suffisant pour provoquer une infection.

Le « groupe *Bacillus cereus* » comprend plusieurs espèces de *Bacillus* dont la phylogénie est étroitement liée. Les membres les plus étudiés du groupe, *Bacillus anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis* sont connus pour leur potentiel pathogène (tableau 1) (Ehling-Schulz *et al.*, 2019).

B.anthraxis est l'agent causal de l'anthrax, aussi une souche atténuée de *B. anthracis* a servi de premier vaccin bactérien vivant (le vaccin du charbon). Certaines souches de *B. cereus* sont communément reconnues comme des agents d'intoxication alimentaire, mais les souches peuvent également provoquer des infections localisées des plaies et des yeux ainsi que des maladies systémiques (Majed *et al.*, 2016). Certaines souches de *B.thuringiensis* sont des entomopathogènes et ont été commercialisées pour être utilisées comme biopesticides, tandis que certaines souches ont été signalées comme provoquant une infection chez les personnes immunodéprimées (Ehling-Schulz *et al.*, 2019). Donc ces organismes collectivement représentent des microbes d'une grande importance économique, médicale et de bio défense.

Tableau 1 : Distinction de membre de groupe *Bacillus* par de facteur de virulence majeur du groupe *Bacillus cereus*, Entérotoxine (Ehling-Schulz *et al.*, 2019) :

Toxines	Types de toxines	<i>B.anthraxis</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i> ²
Toxine charbonneuse (PA, LF, EF)	Toxines AB	+	(+) ^a	- 3
				4
Toxine émétique (cereulide)	Toxine depsipeptidique thermostable	-	+	- 5
				- 6
				- 7
Entérotoxines (Nhe, Hbl,CytK)	Toxines formatrices de porogènes	(-) ^b	+	+ 8
				+ 9
				10
Toxines insecticides	Toxines insecticides	-	-	+ 11
				+ 12

(Cry,Cyt,Vip,Sip)				13
				14

A : pour certaines souches rares

b : le gène nhe est présent mais inactif

1.4. 1.3. Structure de *B. cereus* :

B.cereus peut être reconnu au microscope par son site de formation intercellulaire. Leur taille est celle d'une bactérie à Gram positive de 1 x 3-4 µm, en forme de bâtonnet. *B. cereus* possède un chromosome circulaire mesurant 5 411 809 nucléotides de longueur et a été entièrement séquencé à l'aide de la méthode de séquençage Shot-gun. La structure du génome de *B. cereus* se compose de 5481 gènes, 5234 codant pour des protéines, 147 ARN structuraux et 5 366 opérons d'ARN, Un groupe de gènes intéressant trouvé dans son génome code pour la voie métabolique de l'arginine désaminase (**Premkrishnan et al., 2021**).

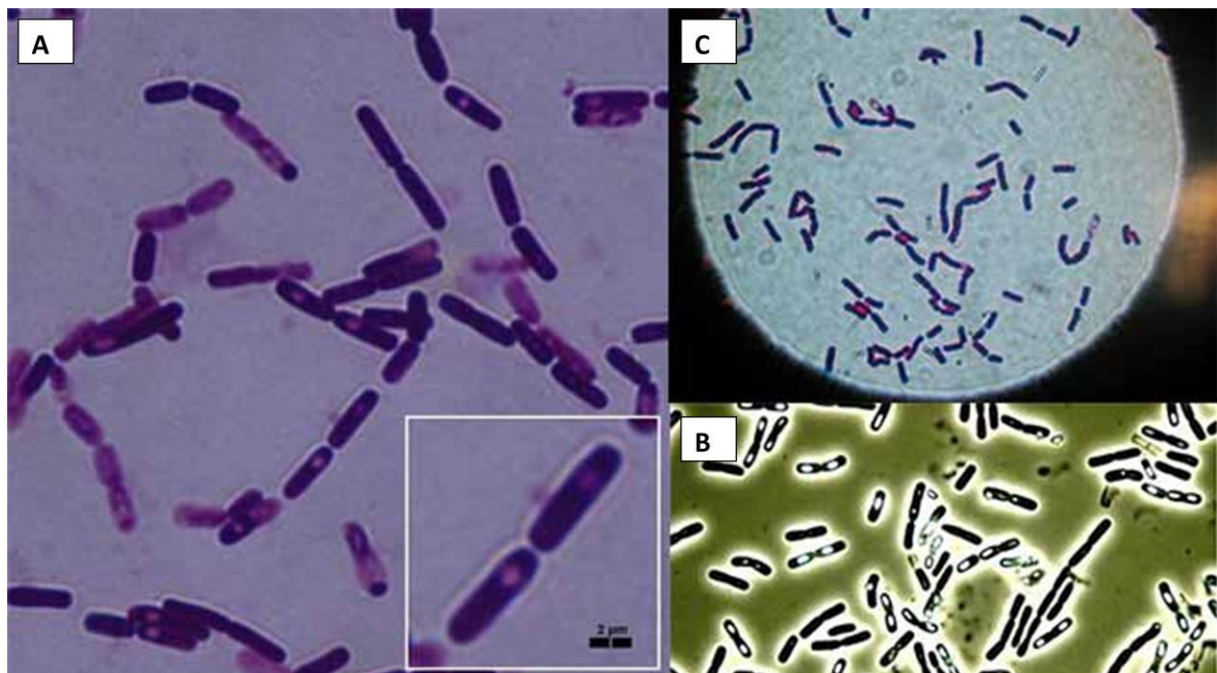


Figure 2 : Morphologie de *Bacillus cereus* sporulant (A & B) sur le microscope électronique à balayage (MEB) avec les inclusions blanches (spore) (site web1)

Comme le montre la figure 3, sa structure cellulaire se compose d'une membrane interne et d'un peptidoglycane épais qui a pour fonction de maintenir la forme cellulaire (capsule).

La paroi cellulaire de *B. cereus* est une structure à l'extérieur de la cellule qui forme la deuxième barrière entre la bactérie et l'environnement, tout en maintenant la forme de la tige et en résistant à la pression générée par le gonflement de la cellule.

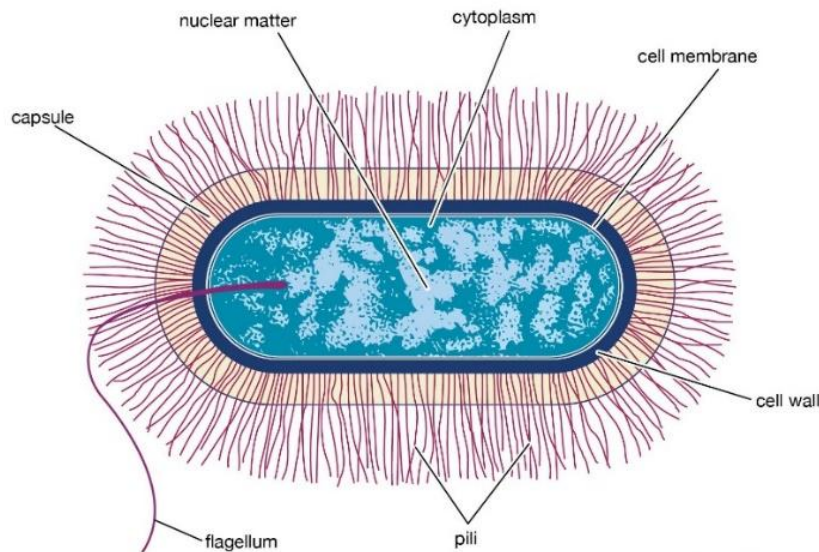


Figure 3 : Structure générale de genre *Bacillus* (Encyclopedia Britannica.inc, 2014).

1.5. 1.3.1 Endospore :

Les endospores sont des structures bien connus et l'origine de résistance chez *B. cereus*. Lorsque les cellules de certaines bactéries à Gram-positives, par exemple *Bacillus spp* et *Clostridium spp*, rencontrent des stress environnementaux tels que la privation de nutriments, elles forment une structure dormante appelée endospore par un phénomène de sporulation (**figure 3 A et B**). Les spores bactériennes peuvent survivre dans cet état de dormance pendant de nombreuses années (**Nicholson et al., 2000; Kennedy et al., 1994; Ohye et Murrell, 1973**).

La spore est composée par des acides nucléiques (ADN et ARN) et des protéines. Elle est entourée d'une paroi sporale d'un cortex fait par dipicolinate de calcium (peptidoglycane), d'une double tunique constituée de protéines fibreuses et l'exosporium les plus externe qui faciliter son adhésion sur la surface comme elle être présent en **figure 4** ci-dessous. Il est à noter que son cytoplasme est déshydraté pour maintenir l'état de dormance pendant longtemps, (**Kennedy et al., 1994**). Certaines études suggèrent qu'elles peuvent même persister pendant des millions d'années (**Cano et Borucki, 1995**). Face au défi de survivre à de longues périodes de dormance, les spores ont développé de nombreux mécanismes pour se protéger des dommages, qui

servent également à les protéger des procédures modernes de désinfection/stérilisation (Setlow, 2006).

Les spores peuvent survivre dans un état métaboliquement inactif pendant de nombreuses années jusqu'à ce que les conditions deviennent favorables à la germination. Les spores résistent aux températures extrêmes, aux radiations, à la dessiccation, aux produits chimiques agressifs et aux dommages physiques (Setlow, 1994)). C'est cette caractéristique hautement résistante qui en fait un tel problème dans l'industrie alimentaire, où *Bacillus cereus* est couramment responsable de maladies d'origine alimentaire (Bottone, 2010).

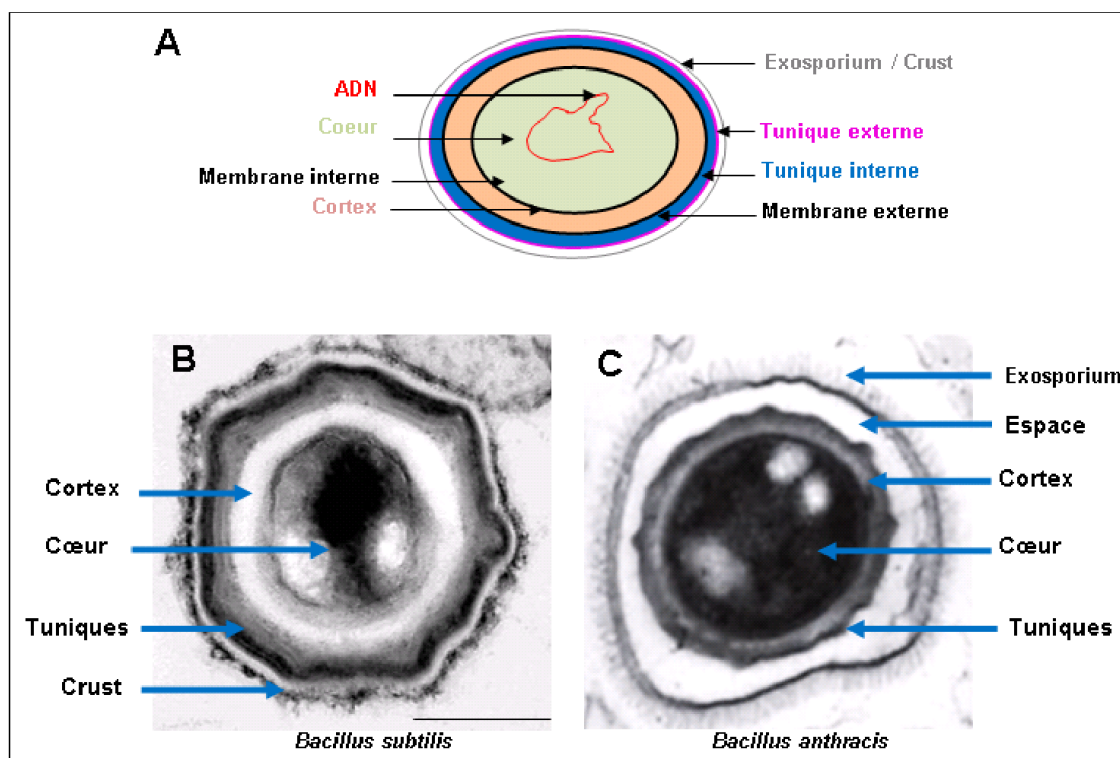


Figure 4 : Observation et description de la structure des spores de *Bacillus* (Bressuire-Isoard, 2015).

1.6. 1.4 Pathogénicité de *Bacillus cereus* :

La pathogénicité de *B. cereus*, qu'elle soit intestinale ou non, est intimement associée à la production d'exo-enzymes destructrices des tissus. Parmi les toxines sécrétées figurent quatre hémolysines, trois phospholipases distinctes et trois entérotoxines porogènes. Les entérotoxines qui activent la protéine-3 du récepteur nod-

like (NLRP3) sont l'hémolysine BL (HBL), l'entérotoxine non hémolytique (NHE) et la cytotoxine K. Dans l'intestin grêle, les cellules végétatives, ingérées sous forme de cellules viables ou de spores, produisent et sécrètent une entérotoxine protéique et induisent un syndrome diarrhéique. Le céréulide est un peptide cyclique codé par un plasmide, qui est produit dans les produits alimentaires et ingéré sous forme de toxine formée **(Enosi Tuipulotu *et al.*, 2021; Fox *et al.*, 2020; Jeßberger *et al.*, 2014; Bottone, 2010).**

Dans l'industrie alimentaire, les spores de *B. cereus* sont particulièrement gênantes car les spores peuvent être réfractaires à la pasteurisation et aux rayons gamma, et leur nature hydrophobe leur permet d'adhérer aux surfaces **(Rolny *et al.*, 2014; Rönner *et al.*, 1990).**

CHAPITRE 2 : GENERALITES SUR LES BIOFILMS

1.7. 2.1. Définition et caractéristiques des Biofilms :

Pendant des générations, les microbiologistes ont étudié les cellules microbiennes uniquement dans leur état planctonique ou cultivées en laboratoire sous forme de colonies monospécifiques sur des milieux nutritifs. La recherche a cependant révélé que les bactéries se fixent préférentiellement sur une variété de surfaces et que les communautés bactériennes présentent des propriétés, des comportements et des stratégies de survie qui dépassent de loin leurs capacités en tant que bactéries individuelles. Ces communautés bactériennes fixées aux surfaces sont appelées « biofilm » (**Van Houdt et Michiels, 2010; Costerton et al., 1999**). Par exemple, les biofilms microbiens tolèrent naturellement des doses d'antibiotiques jusqu'à 1 000 fois supérieures aux doses qui tuent les bactéries planctoniques (**Ceri et al., 2010; Olson et al., 2002**).

Les biofilms sont des communautés de micro-organismes attachés à la surface établissant des structures tridimensionnelles composées de bactéries entourées d'une matrice auto-fabriquée (**Hall-Stoodley et al., 2004; Costerton et al., 1999**). Ils sont maintenus ensemble grâce à cette matrice appelée « substances polymères extracellulaires » ou « EPS ». Les cellules produisent des EPS et sont maintenues ensemble par ces brins, ce qui leur permet de développer des communautés complexes, tridimensionnelles, résilientes et attachées. Les biofilms peuvent être aussi minces que quelques couches de cellules ou plusieurs pouces d'épaisseur, selon les conditions environnementales indiquées (**Skandamis et Nychas, 2012; Sutherland, 2001**).

Le biofilm se forme lorsque les bactéries adhèrent aux surfaces dans des environnements humides en excréant une substance visqueuse ressemblant à de la colle appelée EPS pour substance polymère extracellulaire (**O'Toole et al., 2000**). Les sites de formation de biofilm comprennent toutes sortes de surfaces, elles peuvent être des surfaces vivantes comme des cellules muqueuses, des plantes, des tissus corporels, des organes... ou des surfaces inertes, y compris des matériaux naturels et artificiels au-dessus et au-dessous du sol, des métaux, des plastiques, des matériaux d'implants médicaux. Nous pouvons donc affirmer que partout où vous trouvez une combinaison d'humidité, de nutriments et d'une surface, vous êtes susceptible de trouver du biofilm. **Richards et Melander, (2009)** ont estimé d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm.

2.2 Cycle de développement du biofilm :

La formation du biofilm se fait en quatre étapes successives selon **Otto et al., (2012)** comme suit :

1.8. 2.2.1. La fixation, (adhérence) :

Des bactéries planctoniques isolées évoluant librement dans un milieu liquide se fixent sur une surface (adhésion réversible) et s'organisent en amas. Les propriétés physicochimiques de la surface bactérienne sont importantes en déterminant l'adhérence des cellules pendant ce premier attachement. L'exosporium et les appendices s'impliquent dans le phénomène d'adhésion (**Van Loosdrecht et al., 1990**). L'adhérence bactérienne est également affectée par la disponibilité nutritive dans le milieu environnant dont on parle de matière organique. Cette adhérence est maintenue par des forces de Van der Waals, les forces électrostatiques et les interactions hydrophobes.

1.9. 2.2.2. La croissance :

Après l'adhérence de bactérie sur une surface, ces dernières vont se multiplier pour former de macro colonies, et développer la protection contre le pouvoir thermique, chimique, et physique. C'est en cette phase où EPS sont formés qui vont améliorer la protection des bactéries à l'intérieur du biofilm contre différents agents chimiques (**Anand et al., 2014**). L'EPS recouvre les bactéries à l'intérieur ce qui empêche les désinfectants ou même les antibiotiques d'atteindre leur cible.

1.10. 2.2.3. La maturation :

Le biofilm arrive à maturation. Il acquiert alors une structure tridimensionnelle et des microenvironnements s'instaurent en soi, il forme des espaces, des canaux qui permettent de fluides de traverser le biofilm, d'alimenter et d'excrer. Il représente un vrai modèle de la ville avec des autoroutes, des entrées, des sorties, des routes et des accès. Le biofilm peut être considéré comme un gel à l'intérieur duquel se trouvent des micro-organismes. Entre les micro-colonies se trouvent des canaux où circule l'eau qui transporte les nutriments pour les cellules et qui véhicule les déchets produits par le biofilm (**Vaughan, 2009**).

Les contacts rapprochés entre les micro-organismes favorisent le transfert horizontal du matériel ce qui facilite la propagation des gènes de résistance (*Trautner et Darouiche, 2004*).

1.11. 2.2.4. Dispersion :

Quand l'épaisseur du biofilm atteint un seuil maximal, Les microorganismes rentrent dans des relations compétitives entre eux pour des ressources nutritifs et d'espace ce qui entraîne le détachement de quelques bactéries de biofilm. La dispersion peut être initiée par différents facteurs y compris les forces de cisaillement et la différenciation cellulaire telle que l'activation des fonctions de motricité de type swimming (Stoodley et al., 1998) ou bien la dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire (Lequette et al., 2010) ou de substrat sur lequel le biofilm est attaché et la production d'agents tensioactifs (Tremblay et al., 2014). Ces amas bactériens se détachent pour former des foyers infectieux secondaires est considérée comme cruciale pour la propagation et l'auto-renouvellement de la communauté bactérienne (Renner et Weibel, 2011).

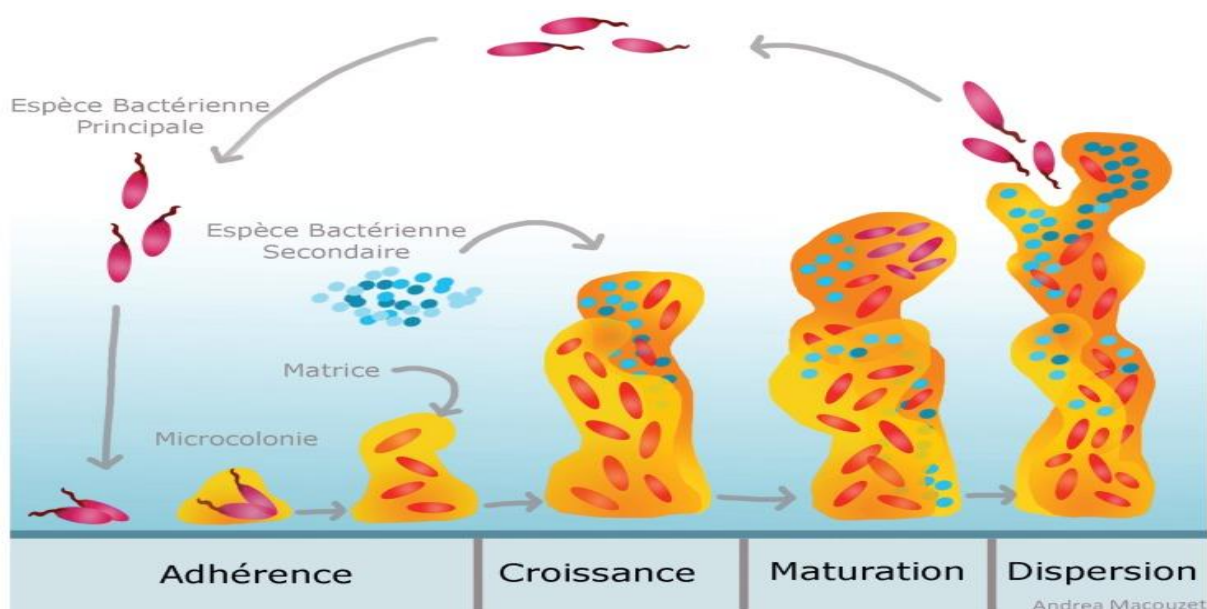


Figure 5 : Formation et dispersion d'un biofilm bactérien (*Tremblay et al., 2014*).

1.12. 2.3. Rôle de l'EPS en consolidation du Biofilm :

La formation de la matrice du biofilm induit un environnement unique pour les bactéries qui permet le mode de vie dynamique du biofilm. Les biofilms, et le mode de vie qui en résulte, se construisent selon des étapes précises et définies, produisant une communauté bactérienne. Les micro-organismes des biofilms vivent dans une matrice auto-produite de substances polymères extracellulaires hydratées (EPS) qui forment leur environnement immédiat. Les EPS sont principalement des polysaccharides et des protéines qui constituent 75–89 % de la composition des EPS du biofilm, selon **Tsuneda et al., (2003)**, le reste sont des acides nucléiques et des lipides.

La matrice d'EPS est un moyen permettant la communication (Quorum sensing) et la coopération entre les cellules dans un agrégat microbien (**Skandamis et Nychas, 2012**). Selon **Sutherland, (2001)**, les EPS sont responsables de la liaison entre les cellules et d'autres particules environnantes (cohésion) et avec la surface (adhérence), ils assurent la stabilité mécanique des biofilms, assurent leur adhésion aux surfaces et forment un réseau cohésif de polymères tridimensionnels qui interconnecte et immobilise de manière transitoire les cellules des biofilms.

De plus, la matrice du biofilm agit comme un système digestif externe en maintenant les enzymes extracellulaires à proximité des cellules, leur permettant de métaboliser les biopolymères dissous, colloïdaux et solides (**Flemming et Wingender, 2010**).

1.13. 2.4. Facteur influençant la formation de biofilm :

2.4.1. Facteur lié à la structure cellulaire de bactéries :

Ces sont des structures microbiennes qui jouent des rôles indispensables pour l'adhérence cellulaire sur une surface. Dans le cas de *Bacillus cereus* impliquant :

1.14. 2.4.2. Des spores :

Lorsque les cellules de certaines bactéries à Gram-positives, par exemple *Bacillus* et *Clostridium Spp.*, rencontrent des stress environnementaux tels que la privation de nutriments, elles forment une structure dormante appelée endospore. De plus, les spores adhèrent généralement davantage aux surfaces hydrophobes et hydrophiles que les cellules végétatives (**Kotiranta et al., 1998; Rönner et al., 1990**). Les spores

bactériennes peuvent survivre dans cet état de dormance pendant de nombreuses années (**Kennedy *et al.*, 1994**).

Les spores possèdent un cortex qui s'est formé par le dipicolinate de calcium (peptidoglycane) et qui lui confère son hydrophobicité. C'est cette caractéristique hautement résistante qui en fait un tel problème dans l'industrie alimentaire. Les spores de chaque organisme étaient plus hydrophobes que les cellules végétatives. La nature hydrophobe des spores de *Bacillus* et de *Clostridium* suggère que les interactions hydrophobes peuvent jouer un rôle dans l'adhésion de ces spores aux surfaces (**Wiencek *et al.*, 1990**).

2.4.3. L'exosporium et les appendices : L'exosporium et les appendices (figure 6) sont susceptibles de jouer de multiples rôles dans l'interaction de la spore avec son environnement surtout l'attachement sur un support. L'exosporium contribue à la protection contre les dommages induits par les macrophages (**Kailas *et al.*, 2011**) tandis que les enzymes de l'exosporium modèrent les réponses aux germes (**Todd *et al.*, 2003**). Les propriétés adhérentes exercées par l'exosporium indiquent un rôle dans la fixation aux surfaces peut avoir des implications importantes pour le développement de protocoles de décontamination (**Brahmbhatt *et al.*, 2007**).

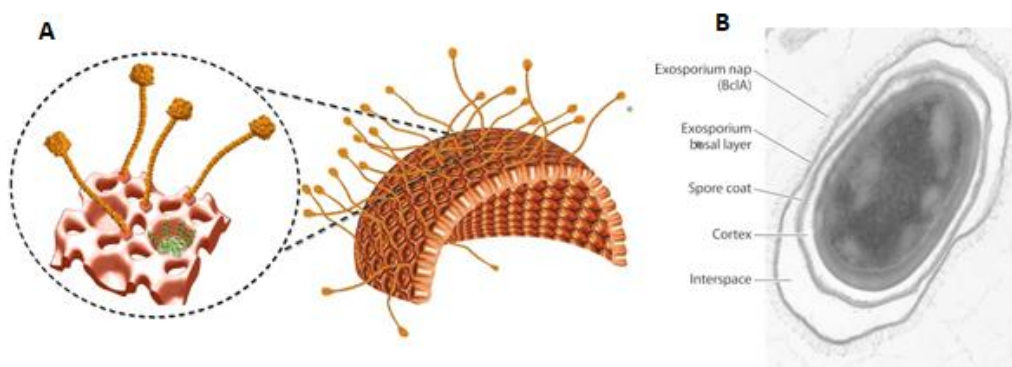


Figure 6 : Schéma illustrant un modèle exemplaire de l'exosporium de groupe *Bacillus cereus* (**Stewart, 2015**).

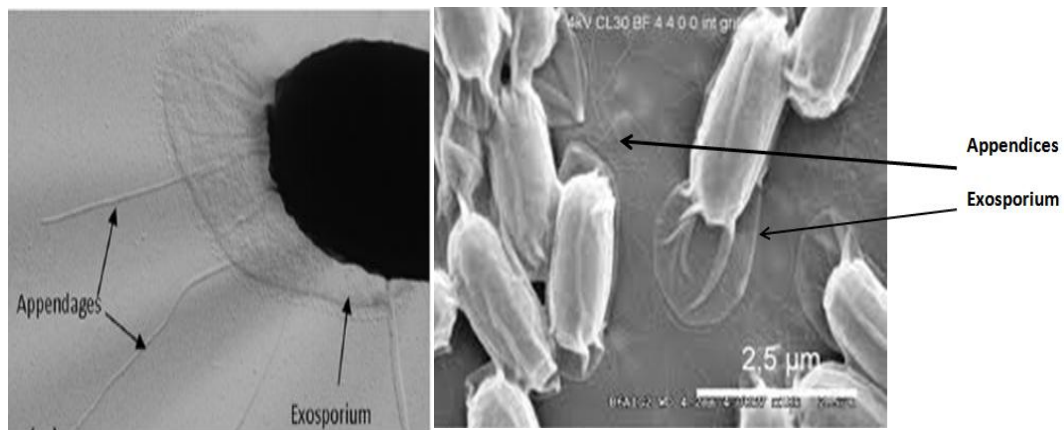


Figure 7 : Spore de *B. cereus* montrant les structures des spores adhérents l'exosporium et les appendices impliqués dans l'adhésion aux surfaces.

2.5. Les facteurs liés aux surfaces :

Parmi le facteur liée aux surface influençant la formation du biofilm, citons le statut hygiénique de matériaux, la rugosité, la capacité d'être facilement nettoyé et désinfecté et l'hydrophobicité (**Van Houdt et Michiels, 2010**).

En industrie laitière, Les matériaux les plus couramment utilisés sont les aciers inoxydables AISI 304 (à usage ordinaire) et 316 L (à usage industrielle), Les polymères et les caoutchoucs parce qu'ils répondent exactement aux exigences des matériaux en contact avec les aliments (**Fratamico, 2009**). Ces exigences se résument en :

- Neutres sur les plans chimique, bactériologique et organoleptique,
- Résistants à la corrosion,
- Faciles à nettoyer.

Malgré l'acier inoxydable répond parfaitement aux exigence ci-dessus mais l'augmentation de l'hydrophobicité du matériel en acier inoxydable ou même du téflon induit l'augmentation de l'adhésion des spores de *Bacillus cereus* (**Marchand et al., 2012; Bremer et al., 2009**).

2.5.1. La charge de surface et le caractère hydrophobe des matériaux : Des forces électrostatiques d'attraction ou de répulsion due aux charges (le pH et la composition ionique) des surfaces sont manifestées lors de l'approche de la bactérie. Selon **Lerebour et al., (2004)**, rendre la surface d'un matériau hydrophobe et apolaire pourrait réduire l'adhésion microbienne et les liens adhésifs entre le micro-organisme et le matériaux. Cependant la charge de surface peut aussi être modifiée par l'adsorption de protéines,

qui a lieu au cours des premières étapes de l'adhésion. Cette adsorption augmente avec l'hydrophobicité du support (**Nikkhah et al., 2012**).

2.5.2 La rugosité (propriété topographique de matériel) : La rugosité semble jouer un rôle important dans l'adhésion bactérienne. L'influence de la rugosité du support reste tout de même un paramètre très discuté dans la littérature (**Peng et al., 2001**). Des Chercheurs suédois ont comparé le développement de biofilms sur des échantillons d'acier Inoxydable présentant différents états de surface, exposés à de l'eau potable municipale. Après 167 jours, ils constatent qu'un acier inoxydable mat rugueux était 1,4 fois plus recouvert de micro-organismes que l'acier électropoli (**Pedersen, 1990**).

2.5.3 Facteurs environnementaux :

On parle des facteurs comme la concentration du nutriment, le pH, la température qui se trouve dans l'entourage du biofilm et qui peuvent affecter l'attachement des bactéries à une surface. Pour des espèces de *Pseudomonas*, le phosphore, l'azote, et le fer (micronutriments) peuvent exercer un effet crucial sur la structure de biofilm (**Monds et al., 2007**). Une augmentation de vitesse d'écoulement ou de concentration en éléments nutritifs peut augmenter l'attachement, si ces facteurs ne dépassent pas les niveaux critiques (**Stoodley et al., 1998**).

Le pH et la température du milieu ont également une influence sur le degré d'adhérence des micro-organismes. C'est le cas pour le *Pseudomonas fragi* qui avait montré une adhérence maximale sur des surfaces d'acier inoxydable à la gamme de pH optimale pour son métabolisme c'est-à-dire des pH de 7 à 8 (**Stanley, 1983**).

1.15. 2.6. Biofilm de *B.cereus* en Industrie laitière :

Dans l'industrie laitière, *Bacillus cereus* représente plus de 12% de la flore microbienne constitutive de biofilms (**Sharma et Anand, 2002**). Le *Bacillus cereus* constitue un réservoir important de contaminations microbiennes qui est aussi récurrent dans des industries laitières due à son biofilm (**Marchand et al., 2012; Peng et al., 2001**) et ses spores qui peuvent survivre à la plupart des traitements thermiques et à l'irradiation aux rayons gamma (**Malek, 2019; Kotiranta et al., 1998**).

Le biofilms peut se former en n'importe quel site dans la chaîne de transformation du lait y compris les tanks de stockage du lait et le système de canalisation ainsi que les appareils de traitement, homogénéisateur et pasteurisateurs qui est aussi reconnu d'être source de contamination du lait traité par des germes d'altérations ainsi que des pathogènes (**Marchand *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2004**) en raison de la durée du développement du biofilms sur les équipements laitiers qui est très courte (entre 8-12 h), avec des nombres de bactéries souvent supérieurs à 10^6 bactérie/cm² et le risque de transfert de ces bactéries au lait est grand, par conséquent la diminution de leur sécurité et durée de vie (**Bremer *et al.*, 2009**).

Parce que le biofilm sont naturellement résistant au traitement thermique et aux agents antimicrobiens, et sont difficiles à éliminer même avec des procédures de nettoyage et de désinfection classique (**Bremer *et al.*, 2006**) en raison de la ré-adhésion des bactéries à la surface des équipements du système de canalisation du lait survient même durant le nettoyage en place, un phénomène soulignée par **Le Gentil *et al.*, (2010)**.

1.16. 2.7. Stratégie de lutter contre de Biofilm :

Les stratégies de lutte contre les biofilms dans les industries agroalimentaires sont jusqu'à présent essentiellement basées sur l'action des agents antimicrobiens, antibiotiques ou biocides, et se heurtent encore au problème crucial de la résistance sessile. Il est bien évident que la résistance aux agents antimicrobiens est bien étudiée et son mécanisme est bien élucidé par plusieurs scientifique (**Ceri *et al.*, 2010; Flemming et Wingender, 2010; Van Houdt et Michiels, 2010**).

Mais il manifeste fortement sa difficulté car son phénotype toute entière est impliqué pour la résistance depuis matrice organique entant que une barrière diffusionnelle(**Sutherland, 2001**), des composant tels que ADNe ont été récemment impliqués (**Mulcahy *et al.*, 2008**), inhérente à l'expression dans les biofilms de gènes spécifiques réprimés à l'état planctonique (*Donlan et Costerton, 2002*).

CHAPITRE 3 : NETOYAGE ET DESINFECTION

1.17. 3.1. Définition du nettoyage :

Le nettoyage est une opération qui sert à éliminer les souillures y compris les matières minérales, la matière organique et les débris microbiennes sur la surface déjà contaminée. La souillure dont on parle, est une complexe structure constituer de :

- Matière minérales (tartre provenant de la dureté de l'eau, des calcaires, des silicates...)
- Matière organique (matière grasse, protéine, et sucre)
- Souillure biologique (microorganisme et les acides Nucléiques)

3.2. Définition de la désinfection :

La désinfection a pour le but de détruire et d'éliminera les microorganismes qui restent après le procédé de nettoyage, autrement dit que c'est le procédé qui suit après le nettoyage d'une surface. La désinfection tue les cellules végétatives mais pas des endospores.

Ces deux procédés ont des actions complémentaires, la deuxième dépend de la première, le nettoyage participe à l'efficacité de désinfection car elle élimine jusqu'à 90% des microorganismes présents sur la surface contaminée. La désinfection est efficace si la concentration des microorganismes n'est pas si importante, Dans le cas contraire l'efficacité dépendra aussi du temps le contact, désinfectants et de type de surface. **(Coyette et Mergeay, 2013).**

Donc il s'avère nécessaire de nettoyer les surfaces notamment celles des équipements laitiers avant de les désinfecter ou de les stériliser en raison de l'impact de la matière organique (notion de biofilm).

1.18. 3.3. Rôle de la désinfection en industrie laitière :

Le but du nettoyage et la désinfection (N&D) est d'éliminer les souillures et les résidus chimiques et de détruire les microorganismes contaminer les surfaces. Pour les industries agroalimentaires y compris l'industrie laitière, le N&D se fait de la même manière pour combattre les microbes présents dans la ligne de production (canalisation

et des tuyaux) des appareils, des emballages qui sont toujours en contact avec des aliment (**Vlková et al., 2008**). Le N&D est nécessaire car :

- La qualité des produit finis est étroitement influencée par la présence des microorganismes d'altérations présent en biofilm sur la surface interne de la ligne de production.
- Les débris provenant des matières premières en industrie alimentaire fortement lie au bon film de conditionnement ce qui va favoriser davantage l'adhésion des microorganismes et par conséquent la formation de biofilm. L'efficacité de désinfection dépend fortement de la quantité initiale des souillures,
- L'assurance de bon nettoyage et désinfection chaque fois avant et tout juste après la production prouver d'être une moyenne si importante d'assurer la qualité attendue de produit finis et sa conformité aux normes, Celle-ci nous protéger contre la perte économique.
- Les biofilms formés dans ligne de production en industrie alimentaire peuvent contenir des bactéries pathogènes, ce qui présente un grand risque pour la santé du consommateur.

1.19. 3.4. Les agents de nettoyage (détergent) :

Les détergents sont des molécules ou de produit amphiphile avec la tendance à se placer en structures sphériques appelée les micelles, au centre de celle-ci on trouve la particule de saleté. Le détergent forme de micelle qui reste en suspension lorsqu' il interagit avec de l'eau. Quand nous agitons l'eau contenant le détergent, les salissures hydrophobes (exp : huile, graisse, ...) s'associent mieux avec la partie centrale des micelles qui est hydrophobe. Ainsi, les salissures se trouvent en suspension dans les micelles et se détache de leur support facilement lors du rinçage (figure 8) (**Kosswig, 2000**).

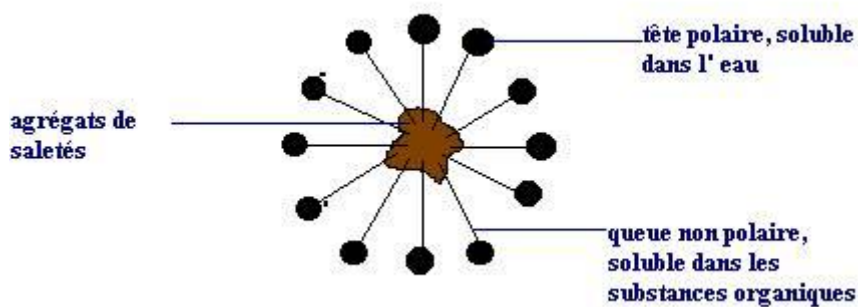


Figure 8 : Mécanisme d'action de détergent

3.4.1. Les agents de surface (surfactants) :

Les agents de surfaces sont des composés tensioactifs tendent à réduire la tension superficielle d'un liquide dans lequel elle est dissoute. L'agent de surface tensioactif est une substance telle qu'un détergent qui, lorsqu'il est ajouté à un liquide, réduit sa tension superficielle, augmentant ainsi ses propriétés d'étalement et de mouillage. Étant donné que les tensioactifs agissent principalement dans les systèmes aqueux, il convient de classer les tensioactifs selon la structure chimique de leurs groupes hydrophile. Les groupements hydrophiles apolaire renfermant en générale de 10 à 20 atomes de carbone qui définissent leur nature chimique comme suivant **(Kosswig, 2000)**.

Les agents de surface anionique ont un groupement polaire acide tels que Les savons ou sels alcalins d'acide gras., peuvent être d'excellents bactéricides, Les agents de surface cationiques sont des inhibiteurs de corrosion en milieu acide **(Fait et al., 2019)**. Les agents de surface non-anioniques exemple des alcools gras et Les agents de surface amphotères comme classé **(Kosswig, 2000)**.

3.4.2. Les détergents minéraux :

Les acides forts, dissolvent les minéraux : Ca, Mg, etc. et les sucres : L'acide phosphorique ou nitrique, les plus utilisés. Ils sont d'excellents détergents et bactéricides. L'acide chlorhydrique (moins utilisée). L'acide sulfurique passivé possède une excellente action bactéricide, même vis-à-vis des spores.

Les alcalis forts sont d'excellents détergents avec effet bactéricides exemple La soude caustique (NaOH) qui possède également une action sporicide et virucide. Le détergent est en général constitué d'une base KOH ou NaOH (ex. soude NaOH) qui solubilise les protéines et saponifie les graisses, de tensioactif qui solubilise les graisses, et de complexant du calcium car l'eau dure nettoie mal (**Park *et al.*, 2004**). Les plus efficaces, les moins chères, mais les plus corrosives qui ne sont pas le cas en Acier inox.

3.4.3. Le détergent enzymatique /Biologique :

Le détergent biologique utilise des enzymes hydrolytiques dont la protéase, la polysaccharidase et la lipase, permettant la dégradation de la matrice organique et le décrochage des biofilms (**Lequette *et al.*, 2010; Stanga, 2010**). Parfois une enzyme spécifique peut être utilisée par exemple dans le cas de *Bacillus*, il est préférable d'utiliser les serines protéases, avec *Pseudomonas* ce sont les polysaccharidase qui sont plus efficaces.

3.4.3.1 Le choix de détergent :

Ce n'est pas évident que tous les détergent peuvent s'appliquer à la désinfection de la même surface, car les surface eux même possède des propriétés différentes chimiquement, biologiquement et morphologiquement ... etc. mais aussi ont souligné de point que c'est le même caractère pour des agents. C'est pour cette raison le choix du détergent (figure 9) reste toujours nécessaire (**Massicotte *et al.*, 2009**).



Figure 9 : Détergents appliqués en industrie agro-alimentaire.

Un détergent idéal a les caractéristiques suivantes :

- Action rapide sur les microbes (le désinfectant doit offrir un maximum d'efficacité avec un temps de contact le plus court possible).
- Compatible avec d'autres produits chimiques et avec l'équipement.
- Etre conforme aux normes ou aux bonnes pratiques pour assurer la santé et la sécurité du personnel.
- Solubilité élevée dans l'eau.
- Facile à nettoyer.
- Pas d'effet indésirable sur les produits alimentaire et sur la surface.

1.20. 3.5. Les agents désinfectants en industrie agro-alimentaire :

L'hypochlorite de sodium contient de l'hydroxyde de sodium qui retarde l'évaporation du chlore gazeux au cours de son entreposage d'une part. Cette composition en fait à la fois un oxydant et un corrosif qui peut attaquer de nombreux types de surfaces (**Massicotte, 2009**). D'autres part, il y a des oxydants incluant le peroxyde, l'acide peracétique, le peroxyphthalate, le perglutarate et le peroxymonosulfate. Les désinfectants appliqués sont résumés avec leur mode d'action dans le tableau ci-dessous :

Tableau 02 : Mode d'action des principaux désinfectants (CAPP-Info, 2007) :

	Classes	Cible et mode d'action
1	Alcools	Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines.
2	Aldéhydes	Altération de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines.
3	Ammonium quaternaire	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires et lyse de la cellule.
3.	Biguanides	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires, coagulation du cytosol.
4.	Halogénés (chlorés et	Destruction des protéines membranaires et

	iode)	chromosomiques (halogénéation).
5.	Oxydants	Production de radicaux libres qui interagissent avec les lipides, protéines et ADN.

1.21.

1.22. 3.6. Efficacité du nettoyage et désinfection : cercle de Sinner

Le Chimiste allemand Sinner regroupe quatre paramètres en cercle appelé cercle de Sinner qui donne des assurances de **La qualité d'un bon nettoyage**. Dans la situation idéale, les 4 facteurs ont la même importance. Ce genre de situation se produit rarement, voire jamais. Donc lors d'un défi d'un facteur, la recomposasson se fait par de l'un aux autres cela veut dit que si l'un change, les autres augmenteront en proportion.

Ces 4 facteurs sont (figure 10) :

- Action chimique
- Température
- Action mécanique
- Temps

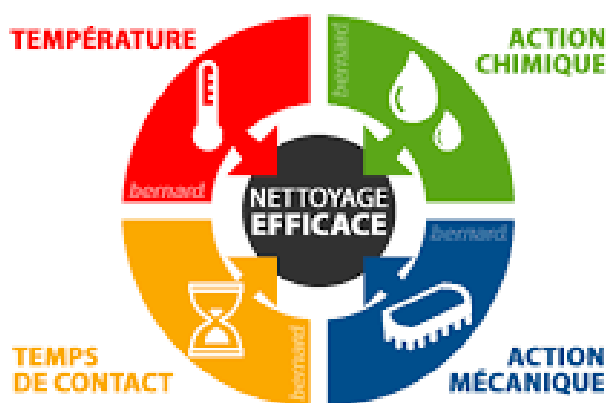


Figure 10 : Cercle de Sinner

3.6.1. L'action Chimique : C'est l'action d'une solution détergente. La concentration de produit pur contenu dans la solution fera varier le poids de ce facteur. Il est indispensable de respecter la dilution de produit dans les opérations de nettoyage. Le surdosage et le sous dosage ont des incidences sur le résultat obtenu. A noter aussi que

parfois un agent est plus efficace à plus faible concentration par exemple l'éthanol à 70% est plus efficace que l'éthanol à 95% car son activité augmente avec l'eau.

3.6.2. L'action Mécanique : C'est l'action apportée par l'utilisation de matériel, tel que les mono-brosses, les frottoirs ou les auto-laveuses, jet haute pression, bac à ultrason, pour créer un frottement ou une pression. Cependant, lors des opérations de nettoyage, l'action mécanique doit être limitée afin d'éviter les altérations du support (risque d'abrasion).

3.6.3. La température : Il s'agit de la température du produit appliqué, la température ambiante, la température de la surface à nettoyer, la température de l'eau de rinçage, l'eau chaude favorise la détergence d'un produit, et les différents pouvoirs (pouvoir mouillant, séquestrant). Malgré la température élevée soit bonne pour le nettoyage, il suffit de suivre la température optimale d'après le fabricant (**Deal et al., 2016**). Le glutaraldéhyde et les composés d'ammonium quaternaire, par exemple, sont complètement inefficaces à des températures de 4°C ou moins.

3.6.4. Le temps d'action : Le temps d'action de contact est fortement lié à l'action chimique. C'est le temps nécessaire pour que le détergent réagisse avec les salissures afin de pouvoir les déloger, et désinfecter les surfaces. Laisser le produit chimique agir accroît son pouvoir nettoyant comme indiqué par études de **Massicotte et al., (2009)**. C'est particulièrement visible lors des opérations de décapage au mouillé : laisser agir la solution décapante permet de décoller, dissoudre et ramollir les couches (**Choma et al., 2000**).

1.23. 3.7. La procédure de nettoyage et désinfection

Il y a deux ou trois techniques les plus répandus en industrie laitière sont :

- Cleaning in place (CIP) / Nettoyage En Place -NEP
- Nettoyage enzymatique
- Biocides naturels

3.8. Cleaning in place (CIP/ NEP)

C'est un système automatisé de nettoyage des installations fermées sans démontage. Sachant que les lignes de production en industries laitière sont composées par des systèmes de canalisation, des tuyaux, des homogénéisateurs dont la plupart sont fermés, du coup ce système de nettoyage est appliqué où les solutions de lavage et désinfection circulent dans le circuit et nettoie la ligne de production. Le nettoyage de circulation utilise différents cycles avec produits de lavage et de rinçage piloté automatique par un programmeur central (figure 11).

Park et al., (2004) a constaté la procédure et l'efficacité de protocole CIP dans l'élimination des bactéries à Gram positif connues par leur capacité à former des biofilms dans les équipements laitiers, telles que les *streptocoques thermophiles* et les espèces de *Bacillus*. Dans l'industrie laitière, l'efficacité avec laquelle les opérations du nettoyage et de désinfection sont effectuées affecte considérablement la qualité des produits finis (**Bremer et al., 2009; Park et al., 2004**). Généralement, le procédé standard inclut les étapes suivantes :

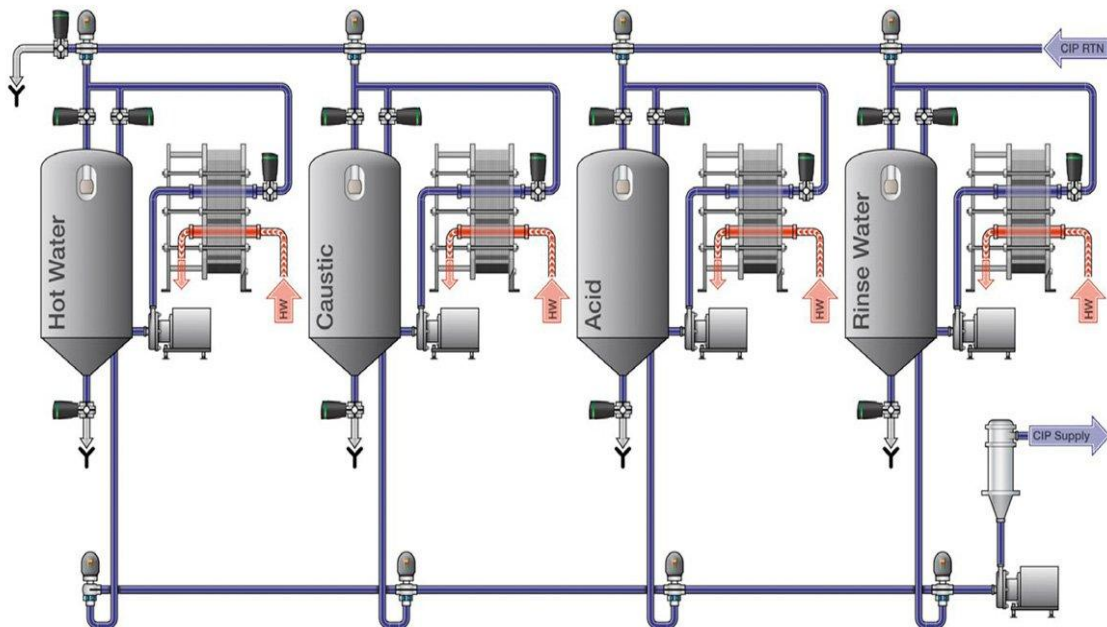


Figure 11 : Un système automatique de CIP

Les étapes de CIP :

- I. Un pré-rinçage avec de l'eau froide
- II. Nettoyage alcali : Malgré son effet corrosif pour d'autre surface inerte, le NaOH le plus pratique pour des industries laitières où il ne montre pas ces effets en acier inoxydable. Le système fait passer le NaOH de 1 à 2% pendant 10 minutes à 80°C servant à solubiliser des salissures organiques
- III. Rinçage intermédiaire
- IV. Nettoyage acide : faire circuler l'acide nitrique, (HNO₃) à 0.5 ou 1% pendant 5 minutes à 70°C servant à l'élimination des souillures minérales
- V. Enfin, rinçage final qui a le but d'éliminer des souillure et des résidus de produit chimique préalablement appliqués et re-établir le pH initiale du système (**Bremer et al., 2009; Park et al., 2004**).

Il est à noter que l'augmentation de la concentration de NaOH à 1,5 % et le temps d'action à 30 min améliore l'efficacité du CIP sur le biofilm de *B. cereus* (**Kumari et Sarkar, 2014**).

Cependant l'efficacité du CIP dans l'élimination du biofilm dans l'environnement laitier est remise en doute par plusieurs travaux qui ont montré une recontamination des surfaces durant l'application même du CIP, en raison de la ré-adhésion des cellules, en particulier les spores de *Bacillus* (**Le Gentil et al., 2010**).

3.9. Le nettoyage Enzymatique :

C'est l'approche anti-biofilm, où le détergent biologique incorpore des enzymes hydrolytiques comme des protéases, des polysaccharase et des lipases employés afin de digérer la matrice extracellulaire du biofilm, le fait qui permet au désinfectant d'atteindre leur cible plus facilement (**Leslie 2011; Lequette et al., 2010 ;**).

L'incorporation des enzymes dans les solutions de nettoyages utilisées dans le système CIP ou la combinaison de différents détergents alcalins ont amélioré l'efficacité du CIP dans l'élimination du biofilm (**Lequette et al., 2010; Stanga, 2010**).

Depuis que les alcalins solubilisent les souillures organiques (origine de biofilm) ils deviennent obligatoirement appliqués dans les industrie laitière tandis que les nettoyages acides sont occasionnellement employés afin d'éviter la formation de pierre

de lait due à la présence de fortes concentrations des minéraux (**Simões et al., 2010**). Cependant, le nettoyage acide peut être indispensable pour des germes qui ont montré une résistance alcaline comme des spores de *Bacillus cereus*. Une étude réalisée par **Shaheen et al., (2010)**, a montré qu'un traitement acide (HNO_3 à 0,9 %) a permis d'inactiver les spores de *B. cereus* alcali-résistantes.

3.10. Biocides naturels :

Plusieurs études ont proposé utilisation des biocides naturels tels que les huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales pour la lutte contre la résistance des microorganismes aux produits chimiques (désinfectant), dus à leurs activités antimicrobiennes et anti biofilms.

Une étude menée par **Kalai et al., (2018)** a montré que la combinaison d'une huile essentielle de thym, riche en cervacrol, avec des acides organiques ou des détergents du CIP (NaOH-HNO_3) augmente l'efficacité des solutions désinfectantes ainsi obtenues sur des biofilms de *B. cereus*.

L'utilisation des huiles essentielles végétales peut développer des goûts ou des odeurs indésirables dans des produits finis mais ce n'est pas le cas si les huiles essentielles sont combinées entre elles ou avec certains agents chimiques permettent d'éviter le développement de goûts et d'odeurs associés à ces produits (**Burt et al., 2005; Pei et al., 2009; Tajkarimi et al., 2010**).

Le Protocole de nettoyage et désinfections naturelle (BIOCIDES) implique juste trois étapes :

- I. D'abord sera le pré- rinçage avec de l'eau froide
- II. Ensuite, désinfection par des combinaisons des produits alcalins et des biocides naturels (Huile essentielle)
- III. Enfin, Rinçage final qui sert le même but que le protocole à 5 étapes.

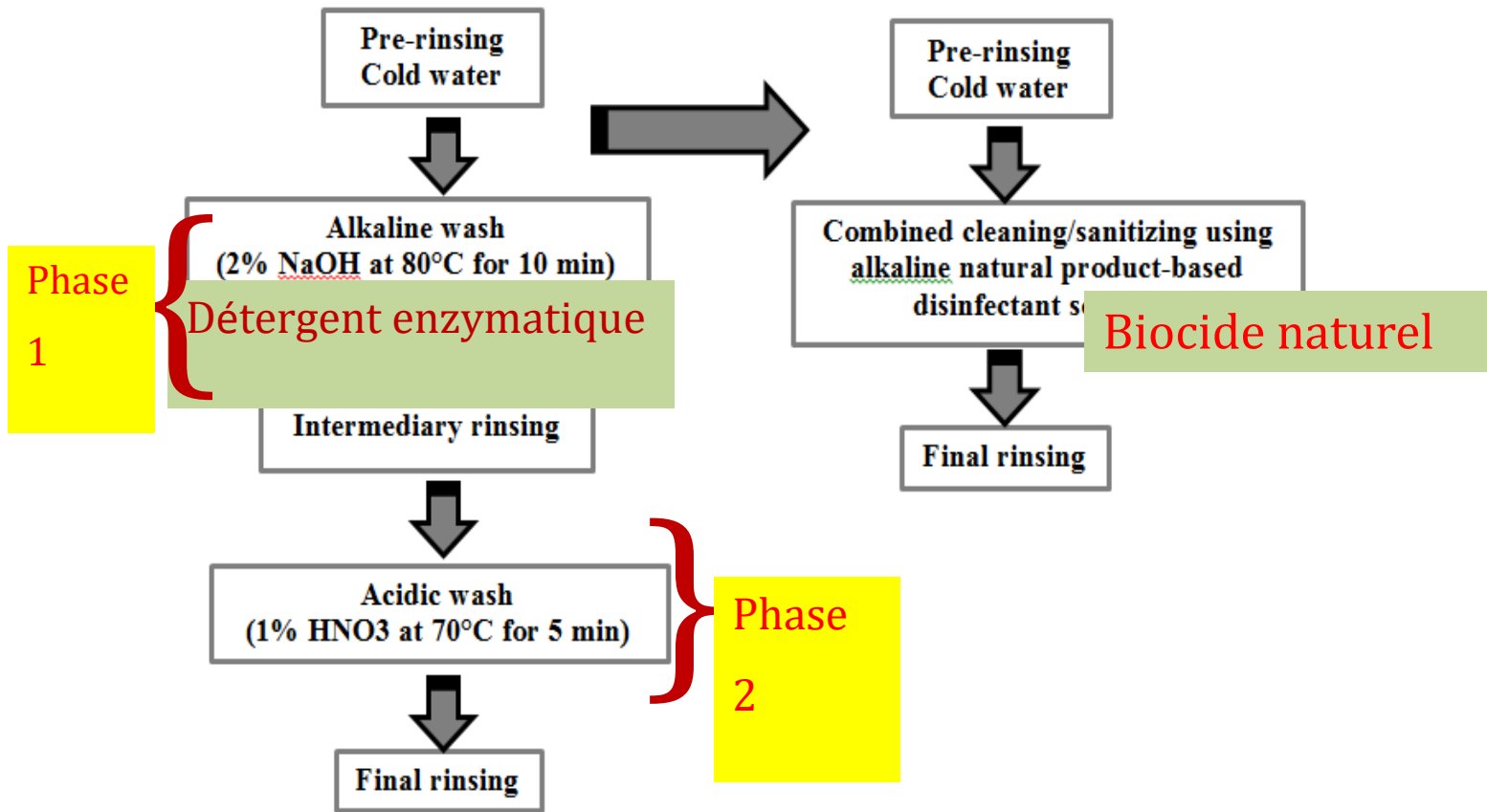


Figure 12 : Schéma simplifié d'une procédure CIP conventionnelle en cinq étapes et d'une stratégie CIP améliorée en trois étapes (Malek, 2019).

Partie II :

Matériel et méthodes

Article 1 : L'effet des méthodes de désinfection à sec sur le biofilm de *Bacillus cereus* (Harada et Nascimento, 2021)

Publié par le *Brazilian Journal of Microbiology*.

1. Introduction :

Dans l'industrie alimentaire, en raison de la présence de différentes bactéries et gemmes pouvant affecter les produits alimentaires, un programme de nettoyage et de désinfection efficace est crucial pour prévenir l'accumulation de saleté ainsi que l'adhésion microbienne sur les surfaces (**Peng *et al.*, 2001**). Certaines de ces bactéries qui peuvent contaminer les aliments comprennent *Salmonella spp.* et *Bacillus cereus*. Cette dernière est un agent pathogène d'origine alimentaire et un bon producteur de biofilm qui peut contaminer et persister dans l'environnement de transformation des aliments à haute et à faible activité hydrique et qui peut facilement se propager et contaminer les environnements de production alimentaire (**Majed *et al.*, 2016; Simões *et al.*, 2010**). Les aliments à faible teneur en humidité (LMF) sont définis comme des aliments qui ont une activité de l'eau $\leq 0,85$ tandis que les aliments à forte humidité en ont plus d'un 1.

Le contrôle de l'hygiène dans les usines de LMF est pour éviter l'augmentation de l'humidité. Dans différents scénarios, la désinfection à sec est une étape clé pour garantir la sécurité des aliments. Les alcools, la chaleur sèche, le rayonnement UV-C et l'ozone gazeux sont des méthodes sèches qui ne produisent pas de résidus toxiques, tandis que les alcools sont couramment utilisés comme désinfectants de surface (**Harada et Nascimento, 2021; Peng *et al.*, 2001**). Leurs principaux avantages sont l'évaporation rapide, l'absence de résidus et l'effet de pénétration. Des réductions d'environ 1,0 log UFC/cm² sur le biofilm de *B. cereus* ont été observées sur des coupons en acier inoxydable (SS) et en polypropylène (PP) exposés à l'éthanol (70 % v/v)(**Thomas, 2012**).

Cet article traite l'évaluation de l'efficacité de l'ozone gazeux, de la chaleur sèche, des UV-C, de l'éthanol à 70 % et d'un désinfectant commercial à base d'ammonium quaternaire et d'alcool isopropylique (IPA) sur le biofilm de *B. cereus* formé sur des coupons SS et PP. Ces méthodes de désinfection à sec ont ensuite été comparées à l'hypochlorite de sodium (200 mg/l), l'agent de désinfection le plus couramment utilisé

dans l'industrie alimentaire, afin d'obtenir des méthodes à sec efficaces sur le biofilm de *B. cereus*.

1.1. Méthodologie

1.2. Souches bactériennes :

Trois souches de *B. cereus* ATCC14579, NCTC11143 (type émétique) et NCTC11145 (type diarrhéique) isolées d'une ferme, de vomi humain et d'un pain de viande, respectivement, ont été utilisées dans cette étude pour composer un pool. Les cultures mères ont été conservées à - 80°C dans un bouillon trypticase soja (TSB, Difco, MD, USA) avec 15 % (v/v) de glycérol. Chaque souche a été cultivée deux fois dans du TSB (Difco) pendant 24 h à 37°C, suivie d'un ensemencement sur la gélose Trypticase Soy (TSA, Difco) et incubée dans les mêmes conditions. Les colonies isolées ont été prélevées et diluées dans une solution saline à 0,85 % (équivalent à 1,0 McFarland). Ensuite, l'inoculum a été préparé à partir d'un pool contenant un volume égal de chaque souche diluée dans du TSB jusqu'à la concentration finale d'environ 7 log UFC/ml.

1.3. 1.2.2. Formation de biofilm :

L'expérience a été réalisée sur des coupons SS AISI 304 et PP (1 cm²). Toutes les surfaces ont été préalablement préparées selon **(da Silva Fernandes et al., 2015)**. Les procédures comprenaient un lavage avec un détergent neutre, un rinçage à l'eau distillée, une immersion dans de l'éthanol à 70% (v/v) pendant 1 h, un rinçage et un séchage à température ambiante. Après cela, les coupons SS ont été stérilisés pendant 15 min à 121°C et les coupons PP ont été exposés à la lumière ultraviolette dans une hotte à flux laminaire pendant 30 min de chaque côté. Ensuite, des plaques TSA recouvertes de papier filtre (*Whatman Qualitative Grade 2, UK*) ont été inoculées avec 1,5 ml du pool de *B. cereus* et agitées doucement. Ensuite, les coupons ont été placés au centre des plaques **(Oja et al., 2014; Charaf UK, et al, 1999)**. Les plaques ont été scellées avec du parafilm pour éviter la dessiccation et incubées pendant 4 jours **(Fig. 12)** Les environnements de traitement et d'emballage du LMF sont généralement maintenus à température ambiante ; ainsi, l'incubation a été maintenue à 25°C.

1.4. 1.2.3. Procédures de désinfection

Après la période d'incubation, deux coupons de chaque matériau (SS et PP) ont été retirés des plaques et immergés dans une solution saline à 0,85 % pendant 1 min pour éliminer les cellules planctoniques. Ensuite, ils ont été maintenus dans une hotte à flux laminaire pendant 10 min pour sécher. Après cette période, les coupons ont été exposés aux méthodes de désinfection à sec pendant 5, 10, 15 et 30 min (**Figure 1**). Les coupons avec un biofilm de *B. cereus* mais n'ayant subi aucun traitement de désinfection ont été considérés pour le temps zéro (0 min). Des tests antérieurs ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative ($p > 0,05$) entre le nombre de cellules sessiles sur deux coupons du même matériel de surface. Tous les essais ont été effectués trois fois.

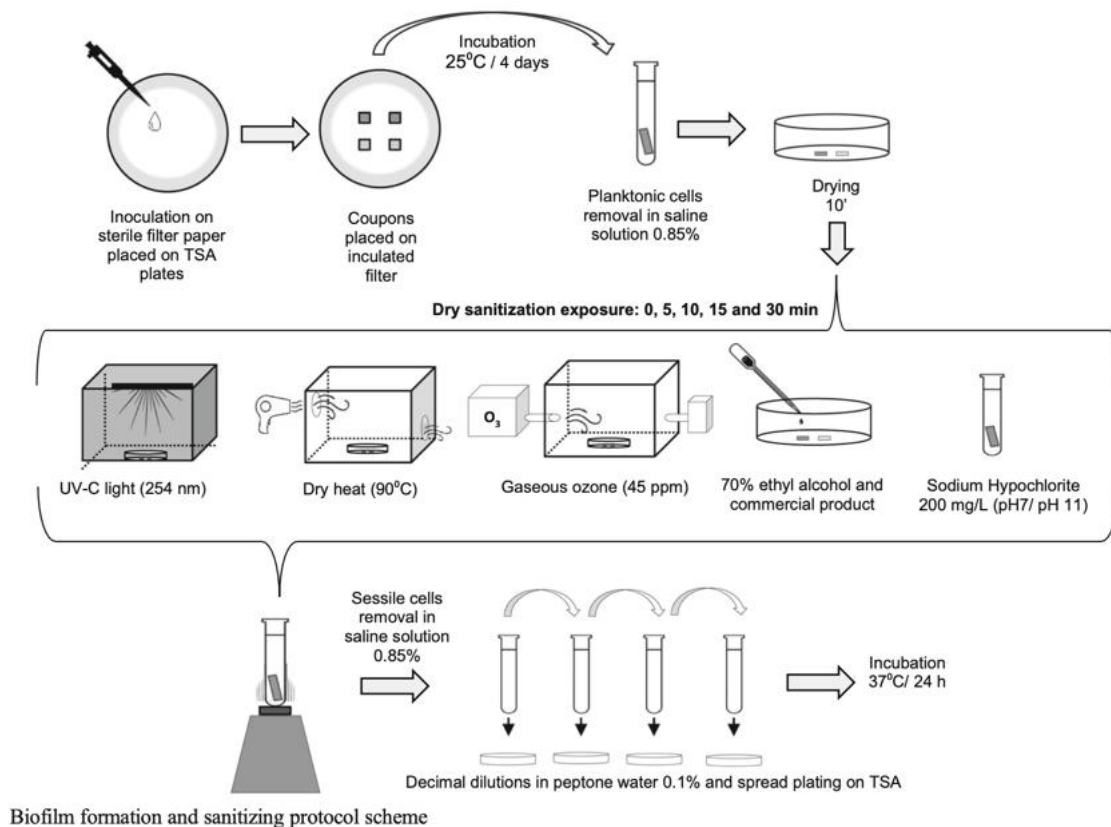


Figure 13 : Formation de biofilm et procédure de désinfection.

1.2.3.1 L'hypochlorite de sodium :

Deux solutions différentes d'hypochlorite de sodium (200 mg/l) ont été testées : sans correction de pH (pH 11) et avec correction de pH (pH 7), ajustées avec l'acide chlorhydrique (*Merck, Allemagne*) 0, 1 N. Les solutions ont été préalablement titrées

selon la méthodologie de l'Organisation nationale de normalisation brésilienne (**ABNT NBR 9425 (2005)**). Après chaque temps d'exposition, les coupons ont été neutralisés par immersion dans 5 mL de solution saline à 0,85 % additionnée de thiosulfate de sodium à 1% (Synth, Brésil) pendant au moins 5 min (**da Silva Fernandes et al., 2015**).

1.2.3.2. Ozone :

Les coupons SS et PP ont été placés dans une boîte de Pétri stérile et exposés à l'ozone gazeux à l'intérieur d'une boîte acrylique hermétique (37 × 2 × 25 cm). Le gaz a été généré à l'aide du générateur Ozoxi (*Ozoxi, Brésil*). Les concentrations à l'intérieur de la boîte ont été mesurées avec un analyseur d'ozone (UV-100, EcoSensors, USA) et maintenues à 45 ± 2 ppm (**Nicholas et al., 2013**). La température et l'humidité relative (RU) ont été mesurées avec le capteur AM2302/DHT22 (Aosong, Chine) et maintenues à environ 25 °C/50 % RU.

1.2.3.3. Chaleur sèche :

Les coupons SS et PP ont été placés dans une boîte de Pétri stérile au centre d'une boîte en verre (30 × 15 × 19 cm). Ensuite, ils ont été exposés à un flux d'air chaud parallèle continu d'environ 2,0 m/s appliqué avec un souffleur de chaleur (*Taiff, Brésil*). Un filtre à membrane (0,8 µm, Millipore, S-Pack, Merck, Allemagne) a été utilisé pour couvrir la sortie d'air. La température était contrôlée par un thermocouple (PT100, testo 112, Allemagne) et maintenue à 90 ± 2 °C (*Andrade Nj*).

1.2.3.4. Rayonnement UV-C :

Les coupons SS et PP ont été exposés au rayonnement UV-C à l'intérieur d'une boîte noire opaque (30 × 15 × 15 cm). Ils ont été placés dans une boîte de Pétri stérile au centre de la boîte, à 15 cm sous une lampe UV-C de 8 W (OSRAM, GmbH, Italie). Un radiomètre (Maestro, Gentec, Canada) surveillait le débit de dose d'UV-C délivré, environ 6,5 mW/cm² (**Sommers et al., 2010**).

1.2.3.5. Éthanol 70% :

La solution d'éthanol à 70% (v/v) a été distribuée sur les coupons SS et PP jusqu'à couvrir toute la surface (environ 45 µl-1). Après chaque temps d'exposition, les coupons ont été neutralisés par immersion dans 5 ml de Letheen Broth (LB, Acumedia, MI, USA) additionné de Tween 80 (Sigma Aldrich, Allemagne), pendant la même durée que les traitements (**Chojecka et al., 2017**).

1.5. 1.3. Désinfectant sec commercial :

La composition du produit commercial consistait en chlorure de dodécyl diméthyl ammonium (0,015%), séquestrant, alcool isopropylique (25%) et eau. Le même protocole décrit pour l'éthanol 70% a été utilisé.

1.3.1 Dénombrement des cellules sessiles viables :

Après chaque traitement et temps testé, les coupons SS et PP ont été immergés dans 5 ml de solution saline à 0,85% et vortexés avec des billes de verre pendant 1 min pour éliminer les cellules sessiles (**Giaouris et al., 2005**). Des coupons neutralisés, exposés à des solutions d'éthanol à 70%, de produit commercial et d'hypochlorite de sodium, ont été soumis à cette étape dans le même tube contenant la solution de neutralisation avec des billes de verre.

Des dilutions décimales ont été préparées dans de l'eau peptonée à 0, 1% et étalées sur TSA suivies d'une incubation à 37°C pendant 24 h. Les colonies typiques ont été confirmées par culture dans un milieu sélectif Mannitol Egg Yellow Polymyxin Agar (MYP, Acumedia, MI, USA) et test d'hémolyse (*ES EN*). Les résultats ont été exprimés en log UFC/cm² et la limite de détection était de 1,69 UFC/cm².

1.6. 1.4. Analyses statistiques :

Le taux de réduction ($\log N/N_0$) du biofilm de *B. cereus* a été analysé avec une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) et le test de Tukey pour déterminer s'il y avait des différences significatives ($p < 0,05$) entre les traitements, les surfaces, et les temps d'exposition à l'aide du logiciel SAS (version 9.4, SAS Institute, Cary, NC).

Article 2 : Efficacité de différents désinfectants sur les biofilms de *Bacillus cereus Sensu Stricto* sur les surfaces en acier inoxydable en contact avec le lait. (Silva et al., 2018) publié par journal frontières en microbiologie.

1.7. 2.1. Introduction.

Dans l'industrie laitière, des résidus de lait peuvent parfois persister à la surface des équipements en acier inoxydable formant une fine couche riche en nutriments appelée film de conditionnement qui rend ces surfaces plus sujettes à l'adhésion bactérienne et à la formation consécutive de biofilms. Les rapports de présence de *B. cereus* dans les produits commerciaux sont récurrents et ceci en raison de la matrice extracellulaire, présente dans les biofilms, qui constitue une structure stable qui protège les bactéries contre l'action des agents désinfectants (**Majedet al., 2016; Salustianoet al., 2010; Simões et al., 2010**) et l'expression des différents gènes dans la population multicellulaire induit la persistance de contamination croisée et la résistance du biofilm aux désinfectants (**Singh et al., 2017; Wood et al., 2013**).

Bien que le système de « nettoyage en place » (CIP) soit couramment utilisé par les industries pour contrôler les biofilms dans les chaînes de traitement du lait (**Bremer et al., 2006**), la contamination et la détérioration des produits causées par les biofilms sont encore des problèmes récurrents. Les micro-organismes du groupe *B. cereus* compromettent la qualité et la sécurité microbiologique du lait et des produits laitiers. (**Kumari et Sarkar, 2014 ; Simões et al., 2010**).

De nombreuses recherches ont été menées sur la formation de biofilms mais peu sur l'efficacité des procédés de lutte contre les biofilms formés par la bactérie *B. cereus*, principalement ceux adhérant aux surfaces en acier inoxydable.

Ces études montrent clairement l'importance de déterminer l'efficacité des solutions et des désinfectants utilisés dans les procédures CIP pour l'élimination des bactéries liées aux surfaces en acier inoxydable, pour cela, l'efficacité de désinfectants notamment l'acide peracétique et de l'hypochlorite de sodium, en système CIP est évaluée.

L'induction de biofilm a été réalisée par le lait tyndallisé, contaminé expérimentalement par des spores et lait tyndallisé contaminé par des cellules végétatives de *B. cereus ssp.*

1.8. 2.2. Matériel et méthodes :

Une souche de *Bacillus cereus* s.s. préalablement génétiquement séquencé (SAMN07414939 – BioProject PRJNA 390851) et phénotypiquement considéré comme producteur de biofilm a été sélectionnée pour la présente étude, qui a été réalisée en trois expériences séparées (Figure 1), chacune avec trois répétitions, comme décrit en détail dans les sessions suivantes. Initialement, le lait utilisé dans l'étude était tyndallisé, pour permettre l'élimination totale possible des bactéries sporulées. Ensuite, le lait a été expérimentalement contaminé par la souche de *B. cereus* s.s. choisi. Des coupons d'acier inoxydable ont été immergés dans le lait contaminé pendant 10 h pour permettre la formation de biofilm à sa surface. Postérieurement, les coupons ont été désinfectés et l'efficacité de la désinfection a été évaluée sur la base des comptages de la population bactérienne collée avant et après le processus.

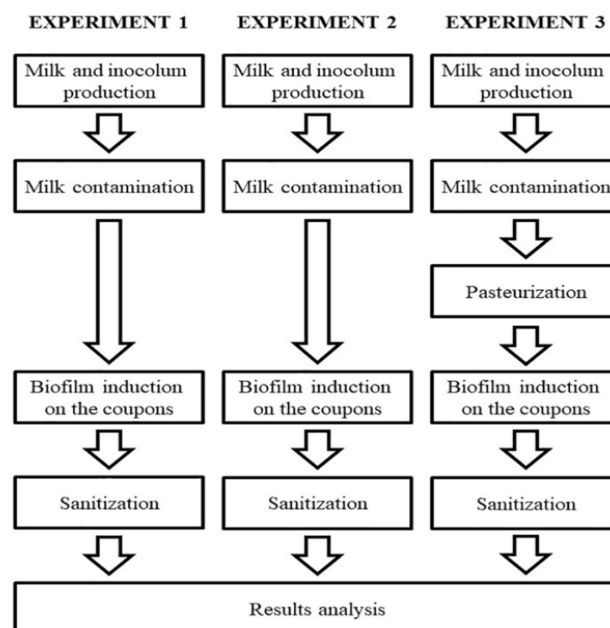


Figure 14 : Organigramme de la conception expérimentale, décrivant toutes les étapes de cette étude.

2.2.1 Expérience 1 :

Un inoculum de cellules végétatives de *B. cereus* (SAMN07414939 – BioProject PRJNA 390851) a été produit pour contaminer le lait tyndallisé. Pour cela, 10 µL de

l'isolat conservé en stock ont été transférés dans des tubes à essai contenant 5 ml de Brain-Heart Infusion Broth (BHI) et incubés à 30°C pendant 12 h, en effectuant le comptage de la population dans 1 mL de la culture au moment de l'utilisation.

Pour s'assurer que la production de biofilm était limitée aux cellules végétatives de *B. cereus* s.s. incubé un lait exempt de contamination a été préparé. Pour cela, 30 litres de lait cru ont été soumis au processus de tyndallisation. La tyndallisation a été réalisée dans l'industrie laitière du City Campus Fernando Costa (PUSP-FC), situé à Pirassununga, SP, Brésil. L'équipement utilisé comprend la yaourtière (composée d'une cuve de fermentation en acier inoxydable - Mec M[®]BR), avec contrôle de la température, couplée par des tubes à un pasteurisateur. Auparavant, les équipements étaient mécaniquement nettoyés et désinfectés avec de l'hydroxyde de sodium, de l'acide nitrique et de l'acide peracétique à des concentrations de 0,05 % à 25°C pendant 1 h. Des écouvillons ont été prélevés avant et après la désinfection afin d'évaluer l'efficacité du processus dans l'équipement et les tuyaux.

La tyndallisation a été réalisée avec une série de chauffages : d'abord, le lait a été chauffé à 80°C pendant 10 min, puis refroidi à 30°C pendant 30 min, puis réchauffé à 95°C pendant 20 min. L'ensemble du processus a été répété trois fois adaptés par **(Kim et al., 2012)**. Trente litres de lait cru ont été étamés et pompés à travers les tuyaux du réservoir de réception du lait cru à la machine de pasteurisation. Parmi ceux-ci, 10 litres ont été pasteurisés et emballés dans des sacs en polyéthylène d'une capacité de 1 litre. Postérieurement, le Lait Tyndallisé (TM) a été transporté au Laboratoire de Qualité des Produits Animaux (Quali-POA) et stocké sous réfrigération jusqu'au moment de l'analyse.

Un prototype expérimental (**Figure 14**) a été réalisé en acier inoxydable AISI 304, avec des coupons dont les dimensions étaient de 3,5 × 1,5 cm et 1 × 1 cm (coupons A et B, respectivement), et préparé pour l'adhésion de *B. cereus* s.s., et une étagère d'une capacité de 30 coupons **(Oliveira et al., 2010)**.

- **Les coupons A** ont été réalisés pour effectuer les comptages bactériens, présentant une surface plus adéquate à la quantification afin que la population adhérente ne soit pas sous-estimée.

- **Les coupons B** ont été produits exclusivement pour effectuer l'analyse topographique après l'induction du biofilm, adaptée à la taille et à la capacité du canon de Microscopie Electronique à Balayage.

Le prototype a été préalablement désinfecté par abrasion mécanique avec une éponge et un détergent neutre, suivi d'une solution d'hydroxyde de sodium à 1 %, d'une immersion dans de l'alcool à 70 % et d'un autoclavage.

Pour créer un film de conditionnement dans les surfaces des coupons en acier inoxydable, similaire à celui que l'on trouve dans les industries alimentaires, 21 coupons (18 coupons A et 3 coupons B) ont été disposés dans l'étagère et ont été totalement immergés dans 1 litre de TM à l'intérieur d'un bécher stérile sous agitation pendant 1 h à température ambiante. L'ensemble du processus s'est déroulé dans une enceinte de sécurité biologique. Postérieurement, pour assurer la stérilité après la procédure, trois coupons A ont été soumis à une quantification bactérienne avec des écouvillons de surface. Les coupons ont été transférés de manière aseptique dans des boîtes de Pétri stériles avec du papier filtre avec la surface d'échantillonnage retournée et séchées à 60°C pendant 2 h.

Dans l'ordre, la contamination du lait a été effectuée en transférant 1 litre de TM dans un bécher stérile contenant un prototype avec 18 coupons (15 coupons A et 3 coupons B) pour induire l'adhésion bactérienne, 2 ml de l'inoculum ont été ajoutés à ce lait à température ambiante, restant incubés sous agitation pendant 10 h pour induire l'adhésion de *B. cereus s.s.*

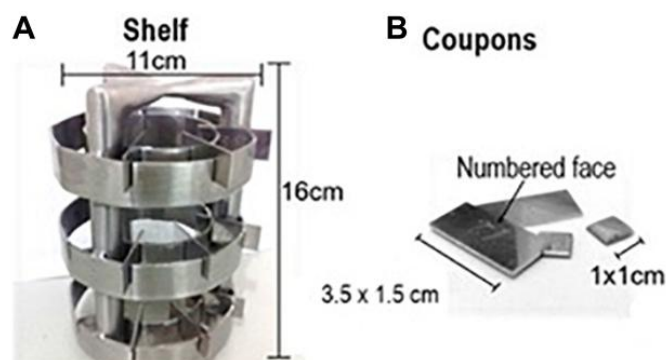


Figure 15 : prototype expérimental utilisé dans cette étude, en acier inoxydable AISI 304 avec finition sanitaire.

2.2.2. Expérience 2 :

Dix microlitres de la culture de *B. cereus* s.s. en stock ont été transférés dans la Tryptone Soya Agar (TSA) et incubés pendant 7 jours à 30°C pour induire la production de spores. Dans l'ordre, la surface de la gélose a été lavée avec 5 ml d'eau distillée stérile. Le mélange a été transféré dans des tubes stériles puis centrifugé pendant 20 min. Le surnageant a été jeté et remis en suspension avec de l'eau distillée stérile, suivi d'une nouvelle centrifugation, en répétant le processus trois fois.

Postérieurement, la suspension a été soumise à un choc thermique à 80°C pendant 1 min suivi d'un refroidissement pendant 1 min pour inactiver les cellules végétatives (Giffel et al., 1997). L'absence de cellules végétatives a été confirmée par la coloration de Wirtz-Conklin et le comptage des *B. cereus* s.s. a été réalisé en utilisant 1 ml de la culture au moment de l'utilisation.

Dans cette expérience, le lait tyndallisé sans contamination a également été utilisé, comme décrit dans l'expérience 1. Le TM a été transporté au laboratoire Quali-POA et réfrigéré jusqu'au moment de l'analyse. Ensuite, la contamination a été réalisée en ajoutant 2 ml de l'inoculum dans un litre de TM et le reste de l'expérience a suivi les mêmes étapes de l'expérience 1.

2.2.3. Expérience 3 :

Pour la troisième expérience le même inoculum produit dans l'expérience 1 a été utilisé. Après la tyndallisation du lait cru, 10 litres de TM ont été pompés jusqu'au réservoir de réception de lait cru, où 15 ml de l'inoculum de cellules végétatives de *B. cereus* s.s. ont été ajoutés. Le TM (à 30°C) a été homogénéisé, pasteurisé et emballé dans des sacs en polyéthylène. Après cela, le lait a été transporté au laboratoire, où il a été réfrigéré jusqu'au moment de la prochaine analyse et le reste de l'expérience a suivi les mêmes étapes de l'expérience 1.

2.3. Assainissement des coupons en acier inoxydable par le système Clean-In-Place (CIP), simulé à l'échelle pilote :

Le même processus de désinfection a été répété pour trois expériences. Après l'incubation pendant 10 h, le prototype contenant 15 coupons (12 coupons A et 3 coupons B) avec biofilm collé a été soumis au processus de désinfection. Cette étape était composée de sept étapes, chacune impliquant une solution normalement utilisée dans

l'industrie laitière, comme la montre la (fig 15). Le prototype expérimental a été immergé dans les béciers, stérilisé, et maintenu sous agitation et chauffage sur un agitateur magnétique.

La désinfection a commencé avec de l'eau à température ambiante pendant 1 min, suivie d'une solution alcaline (hydroxyde de sodium à 2%) à 60°C pendant 10 min, de l'eau distillée stérile à température ambiante pendant 1 min, une solution acide (acide nitrique à 2%) à 60°C pendant 10 min, et lavé à nouveau avec de l'eau distillée stérile à température ambiante. Dans cette étape, le deuxième lot d'échantillons des coupons A a été collecté.

Le processus CIP a été achevé après la désinfection avec une solution à 0,1 % d'acide per acétique et d'hypochlorite de sodium à 0,02 %, tous deux à température ambiante pendant 10 min, suivi d'un rinçage à l'eau distillée stérile à température ambiante pendant 1 min. Pour le contrôle négatif, le processus de désinfection a été effectué en utilisant uniquement de l'eau, sans l'aide des désinfectants. A l'issue de cette étape, la troisième et dernière procédure de collecte des coupons A a été effectuée, en triple exemplaire, et les coupons B, individuellement réservés dans des boîtes de Pétri stériles avec papier filtre, où sont restés à 30°C pendant 24 h.

2.4. Quantification de la population bactérienne et de l'adhésion aux surfaces des coupons :

Pour quantifier la population bactérienne, des aliquotes de 1 ml de lait et des écouvillons de surface ont été prélevés. Des dilutions en série ont été effectuées en utilisant de l'eau peptonée stérile à 0,1%, puis 0,1 mL des mélanges ont été transférés dans de la TSA et de la gélose au jaune d'œuf mannitol poly myxine (MYP) en utilisant la technique de revêtement de surface. Les plaques ont été incubées à 30°C pendant 24 à 48 h.

Pour quantifier la population adhérant aux coupons, ils ont été lavés puis des écouvillons ont été étalés sur les surfaces. Le premier lot d'échantillons a été lavé avec un tampon phosphate pour éliminer les résidus de lait, suivi de lavages supplémentaires avec de l'eau distillée stérile, une solution saline de tween 80 peptone (H2Osp-Tween) et de nouveau de l'eau distillée stérile. Sur les deuxièmes et troisièmes lots d'échantillons, les coupons ont été lavés avec de l'eau distillée stérile H2Osp-Tween et de nouveau de l'eau distillée stérile.

Trois coupons ont été prélevés dans chaque lot, à l'aide d'un écouvillon stérile pour chaque coupon, qui a ensuite été immergé dans des tubes contenant 9 ml d'eau peptonée stérile à 0,1%. Des dilutions en série ont été effectuées, suivies d'un étalement dans du TSA et du MYP à 30°C pendant 24 à 48 h.

2.5. Analyse topographique des coupons des surfaces en acier inoxydable :

Après incubation pendant 24 h, les coupons B ont été apportés au laboratoire de microscopie électronique de l'École des sciences agraires et vétérinaires de l'Université d'État de Sao Paulo (UNESP), situé à Jaboticabal, SP, Brésil. Les coupons ont été immergés dans une solution fixante (Karnovsky modifié : glutaraldéhyde 2,5%, formaldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium 0,05 M à pH 7,2 et CaCl₂ 0,001 M) pendant au moins 72 h.

Postérieurement, les coupons ont été lavés avec un tampon phosphate, fixés pendant une nuit dans du tétr oxyde d'osmium à 1%, déshydratés à l'aide d'un gradient d'éthanol (25, 50, 70, 90 et 100%), séchés au point critique et métallisés dorés (**Bossola, J. J., et Russell, L. D., 1998**). Ensuite, les images topographiques des surfaces des coupons ont été obtenues à l'aide d'une microscopie électronique Zeiss EVO MA-10.

2.6. Analyses statistiques :

Les résultats du dénombrement de la population ont été analysés par ANOVA et test T au niveau de signification de 5%.

Partie III :

Résultats et

discussion.

3.1 Résultat : L'effet des méthodes de désinfection à sec sur le biofilm de *Bacillus cereus* (Harada et Nascimento, 2021) Publié par le Brazilian Journal of Microbiology.

Après 4 jours à 25°C, le nombre de cellules sessiles du pool de 3 souches de *B. cereus* était de 5,4 et 6,1 log UFC/cm² sur les coupons SS et PP, respectivement. Le temps d'incubation nécessaire à la formation du biofilm a été établi lors d'essais préliminaires.

L'efficacité de sept protocoles de désinfection contre le biofilm de *B. cereus* formé sur des coupons SS et PP a été évaluée pendant cinq temps d'exposition différents (Fig. 16). Il n'y avait pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les traitements au cours des 15 premières minutes d'exposition. Cependant, après 30 min, sur SS, les performances des UV-C étaient supérieures ($p < 0,05$) à celles de l'éthanol et du produit commercial. De plus, sur le PP, les UV-C et l'ozone diffèrent ($p < 0,05$) des autres traitements secs.

En général, l'éthanol présentait les réductions les plus faibles du biofilm de *B. cereus* ($< 0,5$ log UFC/cm²) sur les deux surfaces (Fig. 16a). Le produit commercial, à base d'IPA et de composé d'ammonium quaternaire, avait un résultat similaire d'éthanol sur PP, avec une réduction maximale de 0,62 log UFC/cm². Sur SS, la plus grande réduction a été observée après 5 min de traitement, 1,08 log UFC/cm² (Fig. 16b).

L'exposition à la chaleur sèche (90°C) a entraîné des réductions allant de 0,53 à 1,43 log UFC/cm² sur SS, alors que des oscillations de la charge de biofilm au cours du temps ont été observées sur PP (Fig. 16c). L'effet de la lumière UV-C contre le biofilm de *B. cereus* sur SS présentait une tendance linéaire. En revanche, sur le PP, comme indiqué pour la chaleur sèche, une oscillation du nombre de biofilms a été observée. Cependant, sur les deux surfaces, la réduction maximale s'est produite après 30 min, 2 log UFC/cm² (Fig. 16d). Contrairement aux UV-C, l'ozone gazeux a montré une plus grande action sur SS dans les 10 premières minutes, suivie d'une phase stable. Sur PP, il y a eu une augmentation de la réduction tout au long du temps d'exposition, jusqu'à atteindre 2,16 log UFC/cm² après 30 min.

Les solutions d'hypochlorite de sodium (200 mg/l) avec et sans correction du pH ont causé les plus grandes réductions sur le biofilm de *B. cereus*. Les deux solutions ont montré une tendance de comportement similaire ($p > 0,05$), avec une forte baisse au

cours des 5 premières minutes, suivie d'une phase de décélération (Fig. 16f, g). L'hypochlorite de sodium sans correction du pH (pH 11) a entraîné des réductions allant jusqu'à 2,64 sur SS et 2,92 log UFC/cm² sur PP. La solution à pH 7 a réduit la population de biofilm en dessous de la limite de détection (< 1,69 log UFC/cm²) après 10 et 15 min, sur SS et PP, respectivement.

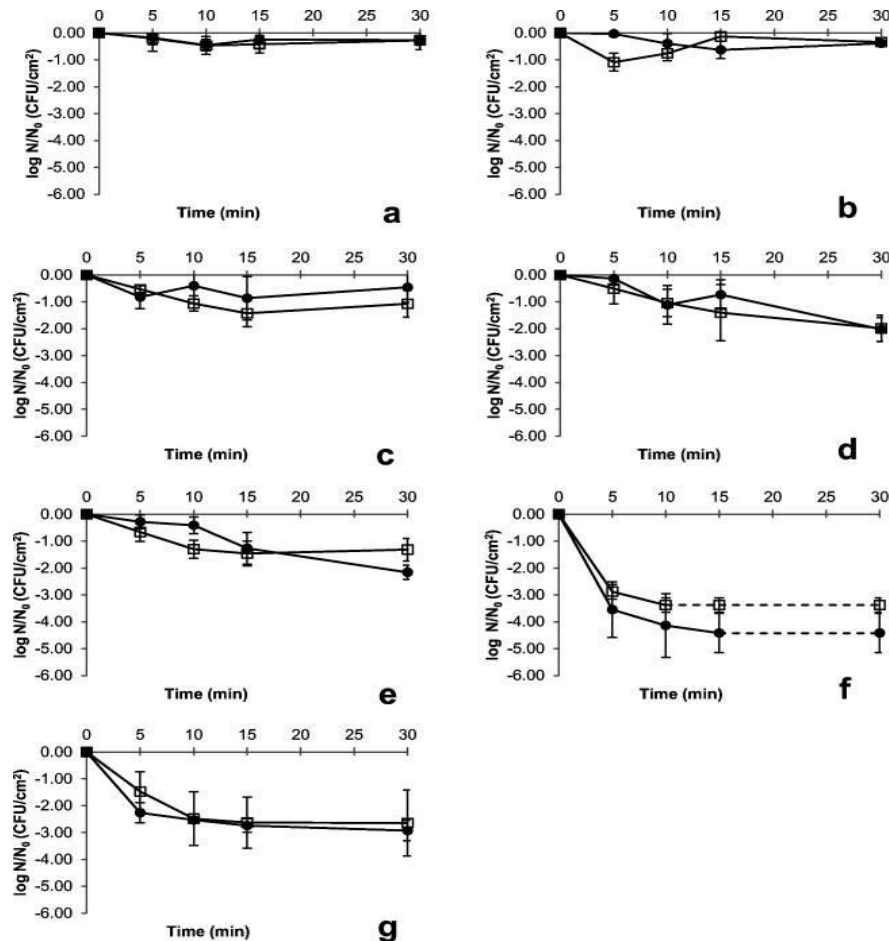


Figure 16 : Effet des protocoles de désinfection contre le biofilm de *Bacillus cereus* formé sur de l'acier inoxydable et du polypropylène. a : éthanol à 70 %, b : produit du commerce, c : chaleur sèche, d : lumière UV-C, e : ozone gazeux, f : hypochlorite de sodium (200 mg/l) pH 7 et g : hypochlorite de sodium (200 mg/l) pH 11 ; (---) compter en dessous de la limite de détection (< 1,69 log UFC/cm²). N₀, population initiale ; N, population après traitement. Les barres représentent l'écart type. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

3.2. Résultats : Efficacité de différents désinfectants sur les biofilms de *Bacillus cereus* Sensu Stricto sur les surfaces en acier inoxydable en contact avec le lait. (*Silva et al., 2018*) publié par journal frontières en microbiologie.

Dans la contamination expérimentale, $2,4 \times 10^9$ à $7,2 \times 10^{10}$ UFC.L⁻¹ de lait ont été inoculés, résultant en des populations de $1,1 \times 10^8$ et $7,6 \times 10^9$ UFC.Ml⁻¹ de lait au bout de 10 h. La formation et l'adhésion de biofilms ont été observées dans les trois catégories évaluées – TCP, TCS et TCV -, comme le montre le tableau 3. La moyenne de *B. cereus* s.s. Des populations dans les biofilms adhérant aux coupons A variaient de $6,3 \times 10^5$ à $3,1 \times 10^7$ UFC/cm², sans différences significatives ($p > 0,05$) entre les trois catégories étudiées ; c'est-à-dire qu'il n'y avait pas de différence entre l'adhésion des spores et des cellules végétatives.

La microscopie électronique à balayage a révélé l'adhérence des cellules végétatives de *B. cereus* s.s. à la surface de l'acier inoxydable (Figure 17A) et production d'une supposée matrice extracellulaire (Figure 17B).

Après la désinfection des coupons par le système CIP, simulé à l'échelle pilote, malgré la réduction du nombre de *B. cereus*, qui variait entre $3,6 \times 10^5$ et $1,1 \times 10^7$ UFC/cm², l'élimination du biofilm n'était pas complète avec les désinfectants testés. Les biofilms ont évolué vers des stades plus structurés (figures 17C, 17D) et des résidus organiques du lait ont été observés (figure 17E).

Le nombre de *B. cereus* dans les coupons nettoyés avec de l'eau uniquement, de l'acide peracétique et de l'hypochlorite de sodium variait de $1,5 \times 10^5$ à $8,7 \times 10^6$, $2,5 \times 10^5$ à $8,5 \times 10^6$ et $3,0 \times 10^4$ à $4,6 \times 10^6$, respectivement. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée ($p > 0,05$) entre les populations après l'application des désinfectants et après la simple utilisation d'eau dans l'étape finale de la procédure CIP, qui a été simulée à l'échelle pilote.

TABLEAU 3 | Comptes moyens de *Bacillus cereus* s.s. dans les biofilms collés sur des surfaces en acier inoxydable AISI 304 en contact avec du lait étamé, contaminé et pasteurisé ; lait tyndallisé contaminé par des spores ; et du lait tyndallisé contaminé par des cellules végétatives.

Treat ment	CFU/cm ²				
	CA	CC	NC	CSP	CSH
TCP	3.4 × 10(7) ± 3,07	1,1 × 10(7) ± 8,39	8.1 × 10(6) ± 4,36	5.8 × 10(6) ± 4,86	4.6 × 10(6) ± 4,47
TCS	6.3 × 10(5) ± 2,72	3,6 × 10(5) ± 5,25	1,5 × 10(5) ± 7,20	2.5 × 10(5) ± 2,40	3.0 × 10(4) ± 2,69
TCV	3,1 × 10(7) ± 1,93	8,1 × 10(6) ± 2,45	8,7 × 10(6) ± 4,99	8.5 × 10(5) ± 8,05	5.5 × 10(4) ± 5,30

lait TCP, tyndallisé, contaminé et pasteurisé ; TCS, lait tyndallisé contaminé par des spores ; TCV, lait tyndallisé contaminé par du végétatif avec adhérence ; CC, coupon nettoyé ; NC, contrôle négatif ; CSP, traitement à l'acide peracétique ; CSH, traitement à l'hypochlorite de sodium. Les comptes s.s. dans les biofilms sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type.

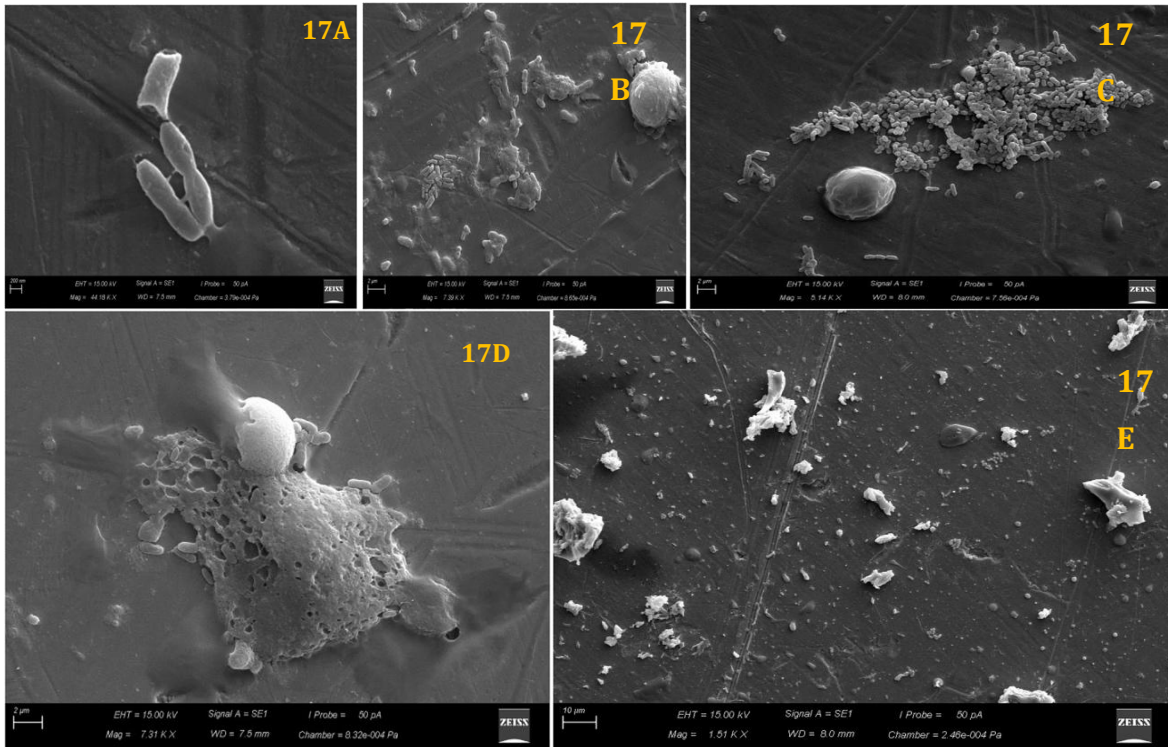


Figure 17 : observation microscopique de l'évolution biofilm de *bacillus cereus* en acier inoxydable AISI 304.

- A** : Adhérence des cellules végétatives de *Bacillus cereus* s.s. sur une surface en acier inoxydable AISI 304.
- B** : Production de matrice extracellulaire supposée par les cellules végétatives de *Bacillus cereus* s.s. sur une surface en acier inoxydable AISI 304.
- C** : Début du processus de formation du biofilm par les cellules végétatives de *Bacillus cereus* s.s. sur une surface en acier inoxydable AISI 304 avec prolifération cellulaire et formation d'une structure tridimensionnelle.
- D** : Biofilm déjà structuré par des cellules végétatives de *Bacillus cereus* s.s. sur une surface en acier inoxydable AISI 304.
- E** : Résidus de lait et d'autres composants (organiques et inorganiques) sur une surface en acier inoxydable AISI 304, obtenus à partir de lait étamé.).

3.3. Discussion

Les sites de faible humidité peuvent être trouvés dans les usines de transformation des aliments à haute et à faible activité de l'eau (a_w). Sur cette base, une méthode statique (**Oja et al., 2014; Charaf UK, et al, 1999**) qui n'expose pas les coupons directement à un milieu liquide, a été choisie pour effectuer la formation du biofilm.

Pour optimiser un programme d'hygiène, plusieurs facteurs doivent être pris en compte, notamment le temps d'exposition au traitement et le type de matériau de surface. Il a observé que le temps d'exposition a eu une influence significative ($p < 0,05$) sur l'efficacité de la plupart des traitements de désinfection sur le biofilm de *B. cereus* sur SS, à l'exception de la solution d'éthanol. Sur PP, le temps d'exposition a influencé ($p < 0,05$) la performance de trois des sept traitements (UV-C, ozone, chlore pH 11). Néanmoins, il n'y avait pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les deux matériaux de surface lorsqu'ils étaient évalués au même temps d'exposition et traitement. La faible action antimicrobienne de l'éthanol (70 % v/v) sur le SS et le PP observée dans cette étude corrobore les conclusions de (**Kim et al., 2019**), qui ont obtenu une réduction < 1 log UFC/cm². La présence de substances polymères extracellulaires courantes dans les biofilms pourrait avoir limité l'action de l'éthanol (**Rutala, et al, 2008**).

Les réductions les plus élevées observées étaient de 1,08 log UFC/cm² après 5 min sur SS et de 0,62 log UFC/cm² après 15 min sur PP. Il n'y avait pas de données sur l'action de ce type de produit contre le biofilm de *B. cereus*. Néanmoins, il a été rapporté que le biofilm de *B. subtilis* est fortement répulsif aux liquides, résistant même à l'éthanol à 80% (**Epstein et al., 2011**). Un comportement similaire du biofilm de *B. cereus* pourrait expliquer la faible efficacité des désinfectants à base d'alcool.

Les résultats de l'études cohéré par (**Silva et al., 2018**) ont montré que l'efficacité de la chaleur sèche (90°C) était légèrement plus élevée sur SS que sur PP, mais sans différence statistique ($p > 0,05$). Parmi toutes les méthodes sèches testées, la lumière UV-C a présenté les meilleures performances sur SS. Sur les deux surfaces, des réductions d'environ. 2 log UFC/cm² ont été observés après 30 min.

En 2001, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé l'utilisation de l'ozone comme agent antimicrobien pour le traitement des aliments, qui peut être utilisé en phases aqueuse et gazeuse (FDA, 2001). Initialement, l'ozone avait une plus grande action antimicrobienne sur le SS que sur le PP. Cependant, après 30 min, une réduction de 1,32 log UFC/cm² a été observée sur SS versus 2,16 log UFC/cm² sur PP. La meilleure performance vérifiée sur le PP après une période d'exposition plus longue pourrait être liée à la capacité du gaz à dégrader et endommager la surface du polymère, ce qui se traduit par une augmentation de la zone de réactivité.

Par rapport à l'hypochlorite de sodium (200 mg/l), toutes les méthodes de désinfection à sec avaient une faible efficacité contre le biofilm de *B. cereus* sur les deux matériaux de surface testés ($p < 0,05$), avec des réductions $< 1,5$ log UFC/cm² jusqu'à 15 min d'exposition. Ainsi, les résultats indiquent que dans les conditions expérimentales spécifiques évaluées dans cette étude, les méthodes de désinfection à sec nécessitent une longue période d'exposition pour atteindre des réductions élevées, ce qui ne convient pas toujours à une routine de fabrication alimentaire. Ainsi, d'autres études pour évaluer l'efficacité de la combinaison de différentes méthodes de désinfection à sec entre elles ou avec des méthodes de nettoyage à sec sont nécessaires.

Les recherches indiquent une plus grande capacité d'adhésion des spores par rapport aux cellules végétatives (**Faille et al., 2013; Jang et al., 2006; Branda et al., 2005**) Cependant, cela n'a pas été observé dans les résultats, où aucune différence significative n'a été détectée ($p > 0,05$) entre l'adhésion et la colonisation dans les catégories étudiées.

Malgré l'absence de différences, l'adhésion initiale des spores, favorisée par le film de conditionnement, où les spores germent et les cellules végétatives peuvent synthétiser les composants de la matrice, se multiplier et former un biofilm, est préoccupante en raison de sa résistance aux agents chimiques et aux traitements thermiques. Les spores sont résistantes à la désinfection et à d'autres méthodes d'inactivation, par rapport aux cellules végétatives (**Young et Setlow, 2003**). Des études antérieures ont montré que l'acide peracétique ne réduit pas les spores de *Bacillus spp.* À des niveaux indétectables, et il est considéré comme encore moins efficace.

Le processus de désinfection est divisé en nettoyage et désinfection, dont le but est d'éliminer les résidus organiques et minéraux adhérant aux surfaces, en plus d'éliminer les micro-organismes pathogènes et de réduire la charge microbienne à des niveaux considérés comme sûrs, respectivement. Même après la désinfection, il y avait une adhésion de micro-organismes sur la surface des coupons. D'autres études ont démontré que les bactéries peuvent survivre et produire des biofilms à l'intérieur des tuyaux même après une procédure CIP correctement appliquée.

En ce sens, les résultats de cette étude concordent avec l'étude de **(Ribeiro et al. 2017)** démontrant que le conditionnement de leurs fonctions est un facteur déterminant du degré d'adhésion des biofilms de *Bacillus cereus*.

Les biofilms associés aux industries de transformation laitière sont favorisés par la présence de films de conditionnement, générés principalement par le lait résiduel, ce qui permet l'accumulation de composés organiques et inorganiques du lait **(Ribeiro, 2015)**. De plus, les désinfectants sont moins efficaces lorsqu'il y a des résidus de matières organiques comme les graisses, les sucres et les protéines **(Wirtanen et Salo, 2004)**. Par conséquent, il est essentiel que les procédures d'hygiène soient menées à l'aide de détergents pour éliminer les résidus d'aliments organiques et inorganiques associés à la désinfection par l'utilisation d'agents physiques ou chimiques pour contrôler les micro-organismes.

L'acide peracétique est considéré comme efficace contre les spores **(Buhr et al., 2013, Mohan et al., 2009;)**. La recherche a montré que malgré leur résistance, l'acide peracétique peut inactiver les spores. Apparemment, ce mécanisme ne se produit pas par des dommages à l'ADN, mais probablement à la suite d'altérations des couches externes des spores, plus précisément de la couche intermédiaire, de sorte que lorsqu'elles germent, la membrane se rompt **(Leggett et al., 2016 ; Park et al., 2014 ; Buhr et al., 2013)**. Cependant, le mécanisme d'inactivation des spores par l'acide peracétique n'est pas entièrement connu.

Le traitement combiné du désinfectant et de la vapeur est une technologie alternative très prometteuse pour contrôler les cellules du biofilm des pathogènes non sporulés. Cependant, l'efficacité des spores est encore étudiée **(Ban et Kang, 2016)**. En plus de ces études, un certain nombre d'autres approches peuvent être utilisées pour

contrôler les biofilms dans l'industrie laitière, telles que la modification de la nature chimique de la surface pour empêcher la liaison cellulaire, le traitement des surfaces avec des agents antimicrobiens et l'optimisation de la conception des équipements, des processus et de nettoyage CIP. Restent particulièrement importants (**Gopal et al., 2015**).

Les résultats indiquent un manque de différences entre l'utilisation des désinfectants appliqués dans cette étude et l'utilisation de l'eau au cours de la dernière étape de la procédure CIP. Cela peut être une conséquence de l'effet vortex provoqué par l'agitation, qui est probablement efficace pour éliminer les micro-organismes à faible adhérence. L'étape d'adhésion bactérienne est considérée comme fondamentale ; sans elle, le processus n'évolue pas (**Klemm et al., 2010 ; Wirtanen et al., 1996 ;**). C'est aussi la plus vulnérable à l'action des désinfectants (**Ghigo, 2003 ; Webb et al., 2003**).

Bacillus cereus s.s. survit à la pasteurisation grâce à la sporulation, et après la germination, les cellules sont exemptes de compétition avec d'autres cellules végétatives (**Sharma et Anand, 2002**). Bien que les biofilms formés par plus d'une espèce bactérienne présentent plus d'avantages métaboliques dans les environnements naturels, les biofilms formés par une seule espèce de bactérie colonisent généralement plus efficacement les substrats et les surfaces des équipements dans les industries laitières (**Parkar et al., 2003**).

Les points ci-dessus ont été atteints avec la comparaison de deux articles axés sur l'assainissement et essayant de proposer les meilleures méthodes de lutte contre le biofilm de *B. cereus* et leurs effets sur les aliments. Les résultats soulevés par les 2 auteurs après avoir étudié et comparé les deux articles montrent comment *B.cereus* peut persister dans les produits alimentaires et une étude plus approfondie est nécessaire afin de pouvoir contrôler pleinement leurs effets.

Conclusion générales

La présence de *B. cereus* dans l'industrie alimentaire est un facteur très préoccupant, car il s'agit d'un micro-organisme pathogène et d'altération, et il peut être facilement dispersé dans l'environnement de fabrication.

Les articles analysés indiquent que l'action de différentes méthodes de désinfection à sec sur les biofilms de *bacillus cereus*. De plus, les performances des méthodes sèches ont été comparées à la solution d'hypochlorite de sodium, un désinfectant largement utilisé dans l'industrie alimentaire.

Pour optimiser un programme d'hygiène, plusieurs facteurs ont été pris en compte, notamment le temps d'exposition au traitement et le type de matériau de surface. Parmi toutes les méthodes sèches testées, la lumière UV-C a montré les meilleures performances sur l'acier inoxydable. Par rapport à l'hypochlorite de sodium (200 mg/l) et à l'acide peracétique, toutes les méthodes de désinfection à sec avaient une faible efficacité contre le biofilm de *B. cereus* sur les deux matériaux de surface testés ($p < 0,05$), avec des réductions $< 1,5 \log \text{ UFC/cm}^2$ jusqu'à 15 min d'exposition.

Ces résultats indiquent que dans les conditions expérimentales spécifiques évaluées dans cette étude, les méthodes de désinfection à sec nécessitent une longue période d'exposition pour atteindre des réductions élevées, ce qui ne convient toujours pas à une routine de fabrication alimentaire.

Alors que l'acide peracétique et l'hypochlorite de sodium n'étaient pas efficaces pour éliminer le *B. cereus*, un biofilm formé sur des coupons en acier inoxydable immergés dans du lait, sans aucune différence avec le même processus de désinfection effectué sans l'utilisation de désinfectants. Ces résultats sont d'une extrême importance pour les industries laitières pour adopter l'utilisation de désinfectants efficaces dans l'élimination du biofilm, car l'utilisation de fortes concentrations de désinfectants dans les environnements industriels est un défi, puisque cela peut favoriser le processus de corrosion.

Références bibliographiques

1. ABNT NBR 9425 (2005), 2005. Brazilian National Standards Organization. ABNT NBR 9425 (2005) Sodium hypochlorite - Determination of active chlorine - Volumetric method. ABNT, Rio de Janeiro.
2. Anand, S., Singh, D., Avadhanula, M., Marka, S., 2014. Development and Control of Bacterial Biofilms on Dairy Processing Membranes: Biofilms on dairy processing membranes.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 18–33. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12048>
3. Bossola, J. J., and Russell, L. D., 1998. Bossola, J. J., and Russell, L. D. (1998). *Electron Microscopy*, 2th Edn. Boston, MA: Jones and Bartlett.
4. Bottone, E.J., 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 23, 382–398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>
5. Brahmabhatt, T.N., Janes, B.K., Stibitz, E.S., Darnell, S.C., Sanz, P., Rasmussen, S.B., O'Brien, A.D., 2007. *Bacillus anthracis* exosporium protein BclA affects spore germination, interaction with extracellular matrix proteins, and hydrophobicity. *Infect Immun* 75, 5233–5239. <https://doi.org/10.1128/IAI.00660-07>
6. Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* 13, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
7. Bremer, P., Seale, B., Flint, S., Palmer, J., 2009. Biofilms in dairy processing, in: *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Elsevier, pp. 396–431. <https://doi.org/10.1533/9781845697167.4.396>
8. Bressuire-Isoard, 2015. Bressuire-Isoard, C. (2015). Mécanisme d'assemblage des enveloppes de la spore en fonction de la température de sporulation : rôle de la protéine morphogénétique CotE chez *Bacillus cereus*.
9. Ceri, H., Olson, M.E., Turner, R.J., 2010. Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother* 11, 1233–1237. <https://doi.org/10.1517/14656561003724747>
10. Chojecka, A., Tarka, P., Kierzkowska, A., Nitsch-Osuch, A., Kanecki, K., 2017. Neutralization efficiency of alcohol based products used for rapid hand disinfection. *Rocz Panstw Zakl Hig* 68, 389–394.
11. Coyette, J., Mergeay, M., 2013. *Microbiologie*, 4e éd. ed. De Boeck, Bruxelles [Paris].

12. Cutting, S.M., 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* 28, 214–220.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
13. da Silva Fernandes, M., Kabuki, D.Y., Kuaye, A.Y., 2015. Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization procedures. *International Journal of Food Microbiology* 200, 97–103.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.004>
14. Deal, A., Klein, D., Lopolito, P., Schwarz, J.S., 2016. Cleaning and Disinfection of *Bacillus cereus* Biofilm. *PDA J Pharm Sci Technol* 70, 208–217.
<https://doi.org/10.5731/pdajpst.2014.005165>
15. Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., Koehler, T.M., 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol Spectr* 7, 7.3.6.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>
16. Enosi Tuipulotu, D., Mathur, A., Ngo, C., Man, S.M., 2021. *Bacillus cereus*: Epidemiology, Virulence Factors, and Host-Pathogen Interactions. *Trends Microbiol* 29, 458–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.003>
17. Faille, C., Bénézech, T., Blel, W., Ronse, A., Ronse, G., Clarisse, M., Slomianny, C., 2013. Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. *Food Microbiology* 33, 149–157.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.010>
18. Fait, M.E., Bakas, L., Garrote, G.L., Morcelle, S.R., Saparrat, M.C.N., 2019. Cationic surfactants as antifungal agents. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 97–112.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9467-6>
19. Fiedler, G., Schneider, C., Igbinosa, E.O., Kabisch, J., Brinks, E., Becker, B., Stoll, D.A., Cho, G.-S., Huch, M., Franz, C.M.A.P., 2019. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. *BMC Microbiol* 19, 250. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1632-2>
20. Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
21. Fox, D., Mathur, A., Xue, Y., Liu, Y., Tan, W.H., Feng, S., Pandey, A., Ngo, C., Hayward, J.A., Atmosukarto, I.I., Price, J.D., Johnson, M.D., Jessberger, N., Robertson, A.A.B., Burgio, G., Tschärke, D.C., Fox, E.M., Leyton, D.L., Kaakoush, N.O., Märtilbauer, E., Leppla, S.H., Man, S.M., 2020. *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin activates

- the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun* 11, 760. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14534-3>
22. Fratamico, P.M., 2009. *Biofilms in the food and beverage industries*, Woodhead publishing in food science, technology and nutrition. CRC Press [u.a.], Boca Raton, Fla.
23. Harada, A.M.M., Nascimento, M.S., 2021. Effect of dry sanitizing methods on *Bacillus cereus* biofilm. *Braz J Microbiol* 52, 919–926. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00451-0>
24. Jeßberger, N., Dietrich, R., Bock, S., Didier, A., Märtlbauer, E., 2014. *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon* 77, 49–57.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.028>
25. Kailas, L., Terry, C., Abbott, N., Taylor, R., Mullin, N., Tzokov, S.B., Todd, S.J., Wallace, B.A., Hobbs, J.K., Moir, A., Bullough, P.A., 2011. Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16014–16019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109419108>
26. Kalai, A., Malek, F., Bousmaha-Marroki, L., 2018. Effect of *Thymus ciliatus* oil-based disinfectant solutions against bio-films formed by *Bacillus cereus* strains isolated from pasteurized-milk processing lines in Algeria. *SAJEB* 8, 01–12.
[https://doi.org/10.38150/sajeb.8\(1\).p01-12](https://doi.org/10.38150/sajeb.8(1).p01-12)
27. Kim, H., Moon, M.J., Kim, C.Y., Ryu, K., 2019. Efficacy of chemical sanitizers against *Bacillus cereus* on food contact surfaces with scratch and biofilm. *Food Sci Biotechnol* 28, 581–590. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0482-2>
28. Kumari, S., Sarkar, P.K., 2014. In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control* 36, 153–158.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.014>
29. Le Gentil, C., Sylla, Y., Faille, C., 2010. Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *Journal of Food Engineering* 96, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.040>
30. Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., Gohar, M., 2016. *Bacillus cereus* Biofilms—Same, Only Different. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01054>

31. Malek, 2013. le biofilm en industrie latitiere: caracterisation facteur de developpment et élimination. Cas du biofilm de *Bacilus cereus* dans quelques laitéries de la région de tlemcen.
32. Malek, F., 2019. Bactéries sporulées et biofilms : un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombiné pasteurisé. *Can J Microbiol* 65, 405–420. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0435>
33. Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., Herman, L., 2012. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11, 133–147. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x>
34. Nicholas, R., Dunton, P., Tatham, A., Fielding, L., 2013. The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 115, 555–564. <https://doi.org/10.1111/jam.12239>
35. Nikkhah, M., Edalat, F., Manoucheri, S., Khademhosseini, A., 2012. Engineering microscale topographies to control the cell–substrate interface. *Biomaterials* 33, 5230–5246. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.079>
36. Oja, T., Blomqvist, B., Buckingham-Meyer, K., Goeres, D., Vuorela, P., Fallarero, A., 2014. Revisiting an agar-based plate method: What the static biofilm method can offer for biofilm research. *Journal of Microbiological Methods* 107, 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.10.008>
37. Oliveira, M.M.M. de, Brugnera, D.F., Cardoso, M. das G., Alves, E., Piccoli, R.H., 2010. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control* 21, 549–553. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.08.003>
38. Park, S.-I., Daeschel, M.A., Zhao, Y., 2004. Functional Properties of Antimicrobial Lysozyme-Chitosan Composite Films. *Journal of Food Science* 69, M215–M221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09890.x>
39. Pei, R.-S., Zhou, F., Ji, B.-P., Xu, J., 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *J Food Sci* 74, M379–383. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x>

40. Premkrishnan, B.N.V., Heinle, C.E., Uchida, A., Purbojati, R.W., Kushwaha, K.K., Putra, A., Santhi, P.S., Khoo, B.W.Y., Wong, A., Vettath, V.K., Drautz-Moses, D.I., Junqueira, A.C.M., Schuster, S.C., 2021. The genomic characterisation and comparison of *Bacillus cereus* strains isolated from indoor air. *Gut Pathog* 13, 6.
<https://doi.org/10.1186/s13099-021-00399-4>
41. Renner, L.D., Weibel, D.B., 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull* 36, 347–355. <https://doi.org/10.1557/mrs.2011.65>
42. Richards, J.J., Melander, C., 2009. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem* 10, 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900317>
43. Rolny, I.S., Minnaard, J., Racedo, S.M., Pérez, P.F., 2014. Murine model of *Bacillus cereus* gastrointestinal infection. *J Med Microbiol* 63, 1741–1749.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.079939-0>
44. Rutala, et al, 2008. Rutala, WA, Weber DJ, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (2008) Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, Centers for Disease Control and Prevention.
45. Salustiano, V.C., Andrade, N.J., Ribeiro Junior, J.I., Fernandes, P.E., Lopes, J.P., Bernardes, P.C., Portugal, J.G., 2010. Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedures used in dairy plants. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62, 1478–1483. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000600026>
46. Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* 101, 514–525.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
47. Setlow, P., 1994. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 23, 49S-60S.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04357.x>
48. Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M.A., Christiansson, A., Salkinoja-Salonen, M., 2010. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol* 27, 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.004>
49. Sharma, M., Anand, S.K., 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control* 13, 469–477.
[https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00068-8)

50. Silva, H.O., Lima, J.A.S., Aguilar, C.E.G., Rossi, G.A.M., Mathias, L.A., Vidal, A.M.C., 2018. Efficiency of Different Disinfectants on *Bacillus cereus* Sensu Stricto Biofilms on Stainless-Steel Surfaces in Contact With Milk. *Front. Microbiol.* 9, 2934. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02934>
51. Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43, 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>
52. Singh, S., Singh, S.K., Chowdhury, I., Singh, R., 2017. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *TOMICROJ* 11, 53–62. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>
53. Skandamis, P.N., Nychas, G.-J.E., 2012. Quorum sensing in the context of food microbiology. *Appl Environ Microbiol* 78, 5473–5482. <https://doi.org/10.1128/AEM.00468-12>
54. Sommers, C.H., Sites, J.E., Musgrove, M., 2010. ULTRAVIOLET LIGHT (254 NM) INACTIVATION OF PATHOGENS ON FOODS AND STAINLESS STEEL SURFACES. *Journal of Food Safety* 30, 470–479. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2010.00220.x>
55. Stanga, M., 2010. Sanitation: cleaning and disinfection in the food industry. Wiley-VCH, Weinheim.
56. Stanley, P.M., 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. J. Microbiol.* 29, 1493–1499. <https://doi.org/10.1139/m83-230>
57. Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* 32, 579–606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
58. Stewart, G.C., 2015. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiol Mol Biol Rev* 79, 437–457. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-15>
59. Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., 1998. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology* 85, 19S-28S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05279.x>
60. Sutherland, I., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (Reading)* 147, 3–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>

61. Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199–1218.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
62. Thomas, P., 2012. Long-Term Survival of Bacillus Spores in Alcohol and Identification of 90% Ethanol as Relatively More Spore/Bactericidal. *Curr Microbiol* 64, 130–139.
<https://doi.org/10.1007/s00284-011-0040-0>
63. Todd, S.J., Moir, A.J.G., Johnson, M.J., Moir, A., 2003. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *J Bacteriol* 185, 3373–3378.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.11.3373-3378.2003>
64. Trautner, B.W., Darouiche, R.O., 2004. Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Arch Intern Med* 164, 842–850.
<https://doi.org/10.1001/archinte.164.8.842>
65. Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., Jacques, M., 2014. [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. *Can J Vet Res* 78, 110–116.
66. Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., Hirata, A., 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters* 223, 287–292. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00399-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00399-9)
67. Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface: Biofilm formation and the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x>
68. Van Loosdrecht, M.C.M., Norde, W., Zehnder, A.J.B., 1990. Physical Chemical Description of Bacterial Adhesion. *J Biomater Appl* 5, 91–106.
<https://doi.org/10.1177/088532829000500202>
69. Vlková, H., Babák, V., Seydlová, R., Pavlík, I., Schlegelová, J., 2008. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms – a review. *Czech J. Food Sci.* 26, 309–323.
<https://doi.org/10.17221/1128-CJFS>
70. Wirtanen, G., Salo, S. (Eds.), 2004. DairyNET: hygiene control in Nordic dairies, VTT publications. VTT, Espoo.

71. Young, S.B., Setlow, P., 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *J Appl Microbiol* 95, 54–67.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01960.x>
72. 32. European Standard EN ISO 7932 (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony-count technique at 30°C (ISO 7932:2004)
73. (Fernandes et al.) - Fernandes MS, Kabuki DY, Kuaye AY (2015) Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization
74. (BS EN 1040)- British Standard - BS EN 1040 (2005) Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics. Test method and requirements (phase 1). British Standards Institution
75. (*Rutala et al*) - Rutala, WA, Weber DJ, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (2008) Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, Centers for Disease Control and Prevention

Annexes



Effect of dry sanitizing methods on *Bacillus cereus* biofilm

Andréia Miho Morishita Harada¹ · Maristela Silva Nascimento¹

Received: 21 August 2020 / Accepted: 6 February 2021 / Published online: 23 February 2021
© Sociedade Brasileira de Microbiologia 2021

Abstract

Bacillus cereus is a relevant foodborne pathogen and biofilm producer which can contaminate and persist in the processing environment of both high and low water activity foods. Because of this, it is crucial to understand better the resistance of this pathogen biofilm to different sanitation methods. The aim of this study was to evaluate the efficacy of dry sanitizing treatments against *B. cereus* biofilm formed on stainless steel (SS) and polypropylene (PP). Biofilm formation was held through the static method at 25 °C. After 4 days of incubation, coupons were exposed for up to 30 min to UV-C light, dry heat, gaseous ozone, 70% ethanol, and a commercial sanitizer. Sodium hypochlorite (200 mg/l) was also tested in two different pH values (7 and 11) for comparison purposes. In general, the surface material did not influence ($p > 0.05$) the performance of the treatments. From 10 min of exposure, 70% ethanol and the commercial product caused the lowest reductions on both surfaces. In addition, dry heat exhibited a poor performance on PP, with reductions $< 1 \log \text{CFU/cm}^2$. UV-C light on SS and PP and ozone on PP achieved reductions around 2 log CFU/cm² after 30 min. The same level of reduction was obtained after 5 or 10 min using sodium hypochlorite (200 mg/l). Therefore, the results showed that dry sanitizing methods are not as effective as sodium hypochlorite against *B. cereus* biofilms. Further studies to evaluate the efficacy of the combination of dry methods are necessary.

Keywords *Bacillus cereus* · Biofilm · Dry sanitation · Food hygiene · Food contact surfaces

Introduction

In the food industry, an effective cleaning and sanitizing program is crucial to prevent soil accumulation as well as microbial adhesion on surfaces [1]. Low moisture foods (LMFs) are defined as foods that have water activity ≤ 0.85 [2]. Hygiene

steel, rubber, glass, gaskets, and conveyor belts [6–8]. Carbohydrates, proteins, and extracellular DNA are the major components of the *B. cereus* biofilm matrix; this structure provides adhesion and protection from adverse environmental conditions [9]. *B. cereus* biofilms usually have high cell density and spores which contributes to enhance their resistance



Efficiency of Different Disinfectants on *Bacillus cereus* Sensu Stricto Biofilms on Stainless-Steel Surfaces in Contact With Milk

Higor Oliveira Silva¹, Joyce Aparecida Santos Lima¹, Carlos Eduardo Gamero Aguilar¹, Gabriel Augusto Marques Rossi¹, Luis Antonio Mathias¹ and Ana Maria Contola Vidal^{2*}

¹ Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Reproduction, School of Agrarian and Veterinarian Sciences, São Paulo State University, São Paulo, Brazil, ² Department of Veterinary Medicine, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

The species of the *Bacillus cereus* group have the ability to adhere to and form biofilms on solid surfaces, including stainless steel, a material widely used in food industries. Biofilms allow for recontamination during food processing, and the "clean-in-place" (CIP) system is largely used by industries to control them. This study thus proposes to evaluate the efficacy of peracetic acid and sodium hypochlorite against biofilms induced on stainless-steel surfaces. The SAMN07414939 isolate (BioProject PRJNA390851), a recognized biofilm producer, was selected for biofilm induction on AISI 304 stainless steel. Biofilm induction was performed and classified into three categories: TCP (Tindalized, Contaminated, and Pasteurized milk), TCS (Tindalized milk Contaminated with Spores), and TCV (Tindalized milk Contaminated with Vegetative cells). Subsequently, the coupons were sanitized simulating a CIP procedure, on a pilot scale, using alkaline and acid solutions followed by disinfectants (peracetic acid and sodium hypochlorite). Microorganism adhesion on the surfaces reached 6.3×10^5 to 3.1×10^7 CFU/cm². Results did not show significant differences ($p > 0.05$) for surface adhesion between the three tested categories (TCP, TCS, and TCV) or ($p > 0.05$) between the two disinfectants (peracetic acid and sodium hypochlorite). Microbial populations adhered to the stainless-steel coupons are equally reduced after

OPEN ACCESS

Edited by:
Leam-Hin Lee,
Monash University Malaysia, Malaysia

Reviewed by:
Jing He,
Guangzhou Women and Children
Medical Centre, China
Veronica Laise,
University of Bucharest, Romania

***Correspondence:**
Ana Maria Contola Vidal
amcontola@usp.br

Specialty section:
This article was submitted to

Résume

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste à Gram positif qui survit aux traitements thermiques tel que la pasteurisation en raison de la sporulation. Non seulement les spores elles-mêmes peuvent survivre longtemps dans un environnement difficile, mais aussi son biofilm connu par sa forte résistance aux détergents, désinfectants et antibiotiques.

Dans les industries laitières, où les biofilms de *Bacillus cereus* prédominent, diverses méthodes ont été mises en place afin de les éradiquer, d'améliorer la qualité des produits finis et d'éviter les dommages économiques causés. Une procédure comme le nettoyage en place (CIP) a été établi et optimisée par la suite pour améliorer l'efficacité de la lutte contre ces bactéries en biofilm.

Cette recherche bibliographique vise à évaluer l'efficacité des procédés de nettoyage et de désinfection dans l'élimination du biofilm de *Bacillus cereus* dans les industries laitières. Deux d'articles scientifiques ont été étudié et qui portent sur la même thématique. Le premier article traite l'effet des méthodes sèches sur l'élimination du biofilm de *B.cereus* et le seconde porte sur l'efficacité de différents désinfectants sur les biofilms de *B.cereus*. Les résultats ont montré une meilleure efficacité de la lumière UV-C sur les biofilms de *B.cereus* formés sur les surfaces en acier inoxydable. Alors que l'acide peracétique et l'hypochlorite de sodium n'étaient pas efficaces pour éliminer les biofilms formés sur des coupons en acier inoxydable immergés dans du lait.

Mots clés : *B.cereus*, Biofilm, nettoyage en place, désinfection, acier inoxydable.

ملخص

Bacillus cereus هو أحد مسببات الأمراض الانتهازية إيجابية الجرام التي تنجو من العلاجات الحرارية مثل البسترة بسبب الأبواغ. ليس فقط الجراثيم نفسها يمكنها البقاء على قيد الحياة لفترة طويلة في بيئة قاسية ، ولكن أيضًا البيوفيلم المعروف بمقاومته القوية للمنظفات والمطهرات والمضادات الحيوية. في صناعات الألبان ، حيث تسود الأغشية الحيوية العسوية ، تم تنفيذ طرق مختلفة من أجل القضاء عليها وتحسين جودة المنتجات النهائية وتجنب الضرر الاقتصادي الناتج. تم إنشاء إجراء مثل التنظيف في المكان (CIP) ثم تم تحسينه لاحقًا لتحسين فعالية مكافحة هذه البكتيريا في الأغشية الحيوية. يهدف هذا البحث البيولوجي إلى تقييم فعالية عمليات التنظيف والتطهير في القضاء على *Bacillus cereus* biofilm في صناعات الألبان. تمت دراسة مقالين علميين متعلقان بنفس الموضوع. تناول المقال الأول تأثير الطرق الجافة على التخلص من بكتيريا *B.cereus* biofilm وتناول الثانية فعالية المطهرات المختلفة على الأغشية الحيوية B. أظهرت النتائج كفاءة أفضل لضوء UV-C على الأغشية الحيوية *B. cereus* المتكونة على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ. بينما لم يكن حمض البيروكسيتيك وهيبوكلوريت الصوديوم فعالين في إزالة الأغشية الحيوية المتكونة على كوبونات الفولاذ المقاوم للصدأ المغمورة في الحليب.

الكلمات المفتاحية: *B.cereus* ، Biofilm ، التنظيف في المكان ، التطهير ، الفولاذ المقاوم للصدأ.

ABSTRACT:

Bacillus cereus is an opportunistic gram-positive pathogen that survives heat treatments such as pasteurization due to sporulation. Not only the spores themselves can survive for a long time in a harsh environment, but also its biofilm has been known for its strong resistance to detergents, disinfectants and antibiotics.

In the dairy industries, where *Bacillus cereus* biofilms predominate, various methods have been implemented in order to eradicate them, improve the quality of the finished products and avoid the economic damage caused. A procedure such as cleaning in place (CIP) was established and subsequently optimized to improve the effectiveness of the fight against these bacteria in biofilm.

This bibliographic research aims at evaluating the effectiveness of cleaning and disinfection processes in the elimination of *Bacillus cereus* biofilm in dairy industries. Two scientific articles have been studied and which relate to the same theme. The first article deals with the effect of dry methods on the elimination of biofilm of *B.cereus* and the second deals with the effectiveness of different disinfectants on *B.cereus* biofilms.

The results showed better efficacy of UV-C light on *B.cereus* biofilms formed on stainless steel surfaces. While peracetic acid and sodium hypochlorite were not effective in removing biofilms formed on stainless steel coupons immersed in milk.

Keywords: *B.cereus*, Biofilm, cleaning in place, disinfection, stainless steel.