

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMSEN

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de

L'Univers

Département de Biologie

MÉMOIRE

Présenté par

Melle SAYAH Hayam

Melle LARABI Lynda

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER en Sciences Biologiques

Option : Microbiologie et contrôle de qualité

Thème

Activité antimicrobienne et antibiofilm des hydrolats d'huiles essentielles :  
Application à la désinfection d'une surface agro-alimentaire.

Soutenue le 13/06/2024, devant le jury composé de :

Président	Dr. BENYOUB Norednine	Université de Tlemcen
Encadrant	Dr. MALEK Fadila	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr. BENSALAH Fatima	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2023-2024

## *Remerciements*

Nos remerciements s'adressent tout d'abord à " **Allah** ", le tout puissant qui nous a tracé le chemin de notre vie et nous a accordé la volonté, la santé, le courage, la force et la patience nécessaire à la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier notre encadrant Dr. Malek Fadila, Maître de Conférences classe A au département de biologie, à l'Université Abou Bekr-Belkaid-Tlemcen, qui nous a fait l'honneur de diriger ce travail, sa compétence et ses conseils pertinents ont été pour nous un point de référence fort et de réconfort à chaque instant.

Nous tenons à remercier très vivement Dr. Benyoub Noredine Maître de Conférences classe A au département d'Agronomie de l'université de Tlemcen pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury. Nos chaleureux remerciements s'adressent également au Dr. Bensalah Fatima Maître de Conférences classe B au département de biologie de l'université de Tlemcen d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Nos sincères remerciements et gratitude s'adressent au Pr. Bekhechi Chahrazed, Professeur à l'Université Abou Bekr-Belkaid, Tlemcen pour nous avoir offert la possibilité de faire les extractions des huiles essentielles et les hydrolats au sein du laboratoire de recherche LAPRONA

Nous exprimons notre sincère gratitude au Dr. Saidi Mohamed, médecin généraliste à Oudjlida, Tlemcen, pour sa généreuse contribution à ce travail en nous fournissant gracieusement les hydrolats à usage médical.

Nous tenons à témoigner nos sincères remerciements et gratitude à tous les ingénieurs des laboratoires pédagogiques en particulier ceux des pôles de microbiologie et de génétique faculté SNV-STU qui nous ont facilité le travail pratique dans les différents laboratoires et nous ont aidées pour la réalisation de ce modeste travail spécialement M. Yazid El Amine et M. Loukil Amine

Enfin nous adressons nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



## *Dédicaces*

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail

**A mon très cher père : Belhadj**

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent.

**A ma très chère mère : Zouaouia**

Tu as été ma force tout au long de mon parcours. Ton amour, ton soutien et ta tendresse ont été des piliers indispensables à ma réussite. Je ne pourrais jamais te rendre tout ce que tu as fait pour moi, Je t'aime infiniment ma mère.

**A mes grands-mères : Rahala et Zahra.**

**A mes très chers frères : Boumediene ; Ahmed ; Hachemi ; Ahmed.**

Je t'aime Boumediene Vous êtes ma plus grande force.

**A ma petite princesse : Hanae**

**A mes sœurs : Meriem et Fatima,** qui sont toujours soutenues et étaient toujours à mes côtés.

**A ma deuxième mère : Safia**

À tous les membres de la famille **SAYAH** petits et grands, en particulier ma cousine **Siham**

**A Mr. Yazid Amine** l'ingénieur de laboratoire du pôle de microbiologie

**A mes copines : Hadjer ; Chaimae ; Saadia ; Fatima.** Merci pour votre amour.

Sans oublier ma binôme **Lynda** pour son soutien morale, sa patience et sa Compréhension tout au long de ce travail.

**Hayam**





## *Dédicaces*

### **À mon cher père, Amar**

Ce mémoire est le fruit de nombreux efforts et sacrifices, mais il n'aurait jamais vu le jour sans ton soutien inconditionnel et ta sagesse inestimable. Ton amour, ta patience et ta croyance en mes capacités m'ont toujours poussé à aller de l'avant. Pour tous les conseils, les encouragements et les moments partagés, je te dédie ce travail. Merci de m'avoir montré le chemin et de m'avoir appris que rien n'est impossible avec du courage et de la persévérance je t'aime **PAPA**.

### **A ma chère mère, Karima**

Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as toujours été le père et la mère, rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuit pour mon éducation et mon bien être, toute cette abnégation dont tu as fait preuve afin que je devienne ce que je suis, je t'en serai éternellement reconnaissante. Que Dieu, tout puissant, te préserve et t'accorde la bonne santé, longue vie et bonheur je t'aime **MAMA**.

A mon chère adorable et unique frère **Seif Eddine Abdessamie**.

A ma chère jumelle et unique sœur **Louiza**.

A ma chère adorable chat **khadodje**.

A ma chère binôme **Hayam**.

A toute ma grande famille **Larabi** (en particulier mon grand-père **Okacha**, Mes tantes **Fatiha** et **Fouzia**).

A tous mes amis (en particulier ma chère **Doaa** et **Wassila**)

A toute la promotion **master 2 Microbiologie et Contrôle de qualité 2024**.

*Lynda*



## Résumé

Notre étude vise à évaluer l'activité antimicrobienne et antibiofilm des huiles essentielles et des hydrolats extraits par hydrodistillation de trois plantes aromatiques (romarin, lavande, eucalyptus), en comparaison avec les huiles essentielles correspondant. Cette activité est testée sur des bactéries isolées de l'environnement et sur des souches de collections.

L'analyse microbiologique de l'environnement du laboratoire pédagogique a montré que la flore de contamination de l'air ambiant et des pailles est essentiellement composée de germes totaux et de Staphylocoques, isolés sur milieux PCA et Chapman respectivement ainsi que de champignons. Deux types de levure pigmentées et non pigmentées et plusieurs types de moisissures ont été isolées sur milieu PCA et PDA respectivement.

L'activité antimicrobienne des hydrolats a été testée par la méthode de l'aromatogramme sur des souches bactériennes de la collection du laboratoire de microbiologie, appartenant au genre *Enterobacter* et aux espèces *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*.

Les résultats de l'aromatogramme ont montré que les hydrolats n'ont pas présenté d'activité antimicrobienne sur la majorité des souches. Une seule souche d'*Enterobacter*, a montré une sensibilité aux hydrolats de romarin et de lavande avec 30 et 32 mm de diamètre d'inhibition respectivement. Testés en combinaison avec des produits chimiques (un désinfectant industriel et NaOH), les hydrolats n'ont pas amélioré l'activité antimicrobienne des formulations ainsi obtenues, donnant des effets antagonistes ou neutres. De même aucune activité antibiofilm n'a été attribuée aux hydrolats testés seuls. Toutefois, un effet antibiofilm a été enregistré avec l'hydrolat de la lavande combiné avec le désinfectant industriel. En revanche, seules les huiles essentielles ont montré une activité antimicrobienne importante, indiquant leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens naturels, contrairement aux hydrolats.

**Mots clé :** Hydrolat ; Huiles essentielles ; Plantes aromatiques ; Activité antimicrobienne ; Biofilm ; combinaison hydrolat-produit chimique.

## Abstract

Our study aims to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of essential oils and hydrosols extracted by hydrodistillation from three aromatic plants (rosemary, lavender, eucalyptus), in comparison with the corresponding essential oils. This activity is tested on bacteria isolated from the environment and on collection strains.

The microbiological analysis of the environment of the educational laboratory showed that the flora contaminating the ambient air and benches is essentially composed of total germs and Staphylococci, isolated on PCA and Chapman media respectively, as well as fungi. Two types of pigmented and non-pigmented yeast and several types of molds were isolated on PCA and PDA medium respectively..

The antimicrobial activity of the hydrosols was tested by the aromatogram method on bacterial strains from the microbiology laboratory collection, belonging to the genus *Enterobacter* and the species *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli*.

The aromatogram results showed that the hydrosols did not exhibit antimicrobial activity on the majority of strains. A single strain of *Enterobacter* showed sensitivity to rosemary and lavender hydrosols with 30 and 32 mm inhibition diameter respectively. Tested in combination with chemicals (an industrial disinfectant and NaOH), the hydrosols did not improve the antimicrobial activity of the formulations thus obtained, giving antagonistic or neutral effects. Likewise, no antibiofilm activity was attributed to the hydrosols tested alone. However, an antibiofilm effect was recorded with lavender hydrosol combined with industrial disinfectant. In contrast, only essential oils showed significant antimicrobial activity, indicating their potential as natural antimicrobial agents, unlike hydrosols.

**Keywords:** Hydrosol; Essential oils; Aromatic plants; Antimicrobial activity; Biofilm; hydrosol-chemical combination.

## المخلص:

دراستنا تهدف إلى تقييم النشاط المضاد للميكروبات و للبيوفيلم لتكوين الأغشية البكتيرية للزيوت العطرية والماء الزهري المستخلصة بواسطة التقطير البخار من ثلاث نباتات عطرية (الإكليل، الخزامى، الكاليتوس)، مقارنة بالزيوت العطرية المقابلة. يتم اختبار هذا النشاط على البكتيريا المعزولة من البيئة وعلى سلالات من المجموعات. أظهر التحليل الميكروبيولوجي لبيئة المختبر التعليمي أن تلوث الهواء المحيط والأرائك يتألف أساساً من الجراثيم الكلية والعنقوديات، المعزولة على وسط PCA و Chapman على التوالي، بالإضافة إلى الفطريات. تم عزل نوعين من الخمائر الملونة وغير الملونة وعدة أنواع من العفن على وسط PCA و PDA على التوالي. تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات للماء الزهري باستخدام طريقة التحليل العطري على سلالات بكتيرية من مجموعة مختبر علم الأحياء الدقيقة، تنتمي إلى جنس *Enterobacter* وأنواع *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli*. أظهرت نتائج التحليل العطري أن الماء الزهري لم يظهر أي نشاط مضاد للميكروبات على معظم السلالات. أظهرت سلالة واحدة من *Enterobacter* حساسية لماء الزهري الإكليل والخزامى بأقطار تثبيط بلغت 30 و 32 ملم على التوالي. عند اختبارها بالتزامن مع المنتجات الكيميائية (مطهر صناعي و NaOH) لم يحسن الماء الزهري من النشاط المضاد للميكروبات للتركيبات التي تم الحصول عليها، مما أدى إلى تأثيرات متعارضة أو محايدة. بالمثل، لم يتم تعيين أي نشاط مانع لتكوين الأغشية البكتيرية للماء الزهري الذي تم اختباره بمفرده. ومع ذلك، تم تسجيل تأثير مانع لتكوين الأغشية البكتيرية مع ماء الزهر الخزامى المجتمع مع المطهر الصناعي. وعلى النقيض، أظهرت فقط الزيوت العطرية نشاطاً مضاداً للميكروبات مهماً، مما يشير إلى إمكاناتها كعوامل مضادة للميكروبات الطبيعية، على عكس الماء الزهري.

**الكلمات المفتاحية:** الماء الزهري؛ زيوت أساسية؛ نباتات عطرية؛ نشاط مضاد للميكروبات؛ البيوفيلم؛ مزيج ماء مقطر - مواد كيميائية.

## Liste des abréviations :

**AO** : activités antioxydante

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**°C** : Degré Celsius

**CV** : Cristal violet

**DO** : densité optique

**EDS** : Eau distillée stérile.

**g** : Gramme

**h** : heure

**HE** : Huile essentielle

**HD**: Hydrolat

**EPS** : polysaccharides extracellulaires

**PDA** : Gélose déxtrosée à la pomme de terre

**T** : témoin

**TSA** : Gélose trypticase soja ou gélose tryptone soja

**TSE**:Tryptone sel eau

**UFC** : Unité formant colonie

**V/V**: volume/volume

**%** : Pourcentage

**µl** : microlitre

**ATB** : antibiotique

**TIAC** : les Toxi-Infections alimentaires communes.

**HACCP:** Hazard analysis critical control point

**CAQ:** composés d'ammonium quaternaire

**HR:** Hydrolat romarin

**HV :** Hydrolat lavande

**HC :** Hydrolat eucalyptus

**HR-I :** Hydrolat de romarin combiner avec désinfectant industriel

**HV-I :** Hydrolat de lavande combiner avec désinfectant industriel

**HC-I :** Hydrolat eucalyptus combiner avec désinfectant industriel

**HR-N :** Hydrolat de romarin combiner avec NaOH

**HV-N :** Hydrolat de romarin combiner avec NaOH

**HC-N :** Hydrolat de romarin combiner avec NaOH

## Liste des figures :

<b>Figure 1:</b> Aspect microscopique de la bactérie sporulée <i>B. cereus</i> .....	9
<b>Figure 2 :</b> Diversité morphologique de la flore de contamination bactérienne des aliments .....	9
<b>Figure 3 :</b> Diversité morphologique des champignons isolés de l'environnement laitier .....	10
<b>Figure 4:</b> Schéma représentant le cycle de vie du biofilm .....	12
<b>Figure 5 :</b> Représentation schématique illustrant la résistance aux antibiotiques associée aux biofilms.....	13
<b>Figure 6:</b> Représentation schématique du nettoyage en place ou système CIP.....	18
<b>Figure 7:</b> Images représentant quelques plantes aromatiques .....	24
<b>Figure 8 :</b> Représentation schématisée de l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation .....	25
<b>Figure 9:</b> Montage représentant un alambic traditionnel en cuivre .....	26
<b>Figure 10 :</b> Les classes chimiques majeures des huiles essentielles et des hydrolats de deux plantes aromatiques originaires de Chine .....	28
<b>Figure 11 :</b> Exemples d'hydrolats commercialisés en Algérie .....	29
<b>Figure 12:</b> Effet de l'huile de <i>Cistus munbyi</i> sur la structure d'un biofilm de 48 h de <i>P. aeruginosa</i> .....	32
<b>Figure 13 :</b> Photo représentant l'appareil d'hydrodistillation de type Clevenger, utilisé dans ce travail.....	35
<b>Figure 14 :</b> Hydrolats à usage médical conservés une année à la température ambiante.....	36
<b>Figure 15 :</b> Adhésion et formation de biofilm sur les lames de microscopie en verre .....	42
<b>Figure 16 :</b> Formation de biofilm sur les lames en verre .....	43
<b>Figure 17 :</b> Les zones d'inhibition de la croissance d' <i>E.coli</i> (E2), et <i>S. aureus</i> (Sa.50), sous l'action des combinaisons d'hydrolats avec le désinfectant industriel à 1%. .....	52
<b>Figure 18 :</b> activité antimicrobienne de désinfectant industriel sur <i>Entérobacter</i> (R14) <i>S. aureus</i> (sa.50) et <i>E. coli</i> (E2) .....	52
<b>Figure 19 :</b> Les zones d'inhibition de la croissance d' <i>E.coli</i> (E3), et <i>Entérobacter</i> (ERF), sous l'action des combinaisons d'hydrolats avec NaOH à 1%. .....	54
<b>Figure 20 :</b> activité antimicrobienne de NaOH sur <i>Entérobacter</i> (R15) ; <i>S. aureus</i> (sa.50) et <i>P.aeruginosa</i> . .....	54
<b>Figure 21 :</b> Caractérisation microscopique des biofilms formés par <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i> .....	57
<b>Figure 22 :</b> Dénombrement des bactéries du biofilm avant et après le traitement par le mélange hydrolat-désinfectant industriel. ....	58

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Efficacité comparée des désinfectants industriels.....	20
<b>Tableau 2</b> : Liste des composés des hydrolats extraits du fenouil par hydrodistillation et distillation à la vapeur .....	28
<b>Tableau 3</b> : Analyse microbiologique de l'air ambiant, des pailles et des hydrolats médicaux .....	37
<b>Tableau 4</b> : Dénombrement et morphologie cellulaire de la flore de contamination des pailles .....	46
<b>Tableau 5</b> : Dénombrement et morphologie cellulaire de la flore de contamination de l'air ambiant .....	48
<b>Tableau 6</b> : Résultats du contrôle microbiologique des hydrolats médicaux .....	49
<b>Tableau 7</b> : Résultats de l'activité antimicrobienne des produits naturels .....	50
<b>Tableau 8</b> : Activité antimicrobienne des combinaisons des hydrolats avec le désinfectant industriel à 1% .....	51
<b>Tableau 09</b> :Activité antimicrobienne des combinaisons des hydrolats avec NaOH à 1 %.....	53
<b>Tableau 10</b> : Activité antimicrobienne des hydrolats conservés à 4 °C .....	55
<b>Tableau 11</b> : Activité antimicrobienne des hydrolats médicaux conservés à température ambiante .....	55

# Table des matières

Résumé	
Abstract	
الملخص	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	<b>3</b>
<b>Chapitre 01 : L'hygiène des surfaces agroalimentaires</b> .....	<b>3</b>
1. Les problèmes de contamination dans les industries agroalimentaires.....	<b>4</b>
1.1. Généralité .....	4
1.2.1. La flore d'altération.....	4
<input type="checkbox"/> La flore aérobie mésophile totale .....	4
<input type="checkbox"/> Les entérobactéries .....	5
<input type="checkbox"/> Les coliformes.....	5
<input type="checkbox"/> Les levures et les moisissures .....	6
1.2.2. La flore pathogène .....	6
<input type="checkbox"/> Salmonella .....	6
<input type="checkbox"/> Escherichia coli.....	7
<input type="checkbox"/> Staphylococcus aureus.....	7
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus .....	8
2. Biocontamination des surfaces agroalimentaires : le biofilm.....	<b>10</b>
2.1. Problématique.....	10
2.1.1. Définition des biofilms .....	11
2.1. 2. Processus de formation du biofilm.....	11
2.1.3. Résistance des biofilms aux agents antimicrobiens .....	12
2.2. Moyens de lutte contre les biofilms .....	14
3. L'hygiène industrielle .....	<b>14</b>
3.1. Définition .....	14
3.2. Aspects réglementaires.....	15
3.3. Le nettoyage .....	15
3.3.1. Définition.....	15

3.3.2. Les produits détergents.....	16
3.3.3. Le nettoyage des circuits fermés : Le système CIP.....	17
- Définition.....	17
- Application du système CIP en industrie laitière.....	17
3.4. La désinfection .....	18
3.4.1. Définition.....	18
3.4.2. Les désinfectants industriels .....	18
<b>Chapitre 2 : Les huiles essentielles et les hydrolats .....</b>	<b>21</b>
1- les huiles essentielles.....	<b>22</b>
1-1-Définition et description.....	22
1-2-Répartition et localisation.....	22
1-2-1-Répartition .....	22
1-2-2-Localisation .....	23
1-3- Propriétés physiques.....	24
1-4-Technique d'extraction des huiles essentielles.....	24
1-4-1-Hydrodistillation .....	24
1-4-2-Entrainement à la vapeur d'eau.....	25
2- Les hydrolats.....	<b>26</b>
2-1- Définition.....	26
2-2-Composition chimique des hydrolats .....	27
2-3-Utilisation .....	27
2-4-Production et commercialisation en Algérie.....	29
3-Activités antimicrobienne des hydrolats et des huiles essentielles .....	<b>30</b>
3-1-Activité antifongique.....	30
3-2-Activité antibactérienne.....	30
3-3- Activité antivirale.....	31
3-4-Activité antibiofilm .....	31
3-4-1-Activité antibiofilm des huiles essentielles.....	31
3-4-2- Activité antibiofilm des hydrolats.....	32
3-4-3-Les formulations désinfectantes à base de produits naturels .....	32
<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>34</b>
1. Obtention des huiles essentielles et des hydrolats .....	<b>35</b>
1.1. Matériel végétal frais .....	35

1.2. Procédé d'extraction par hydrodistillation .....	35
1.3. Les hydrolats conditionnés et conservés .....	36
2. Analyse microbiologique et isolement des souches bactériennes .....	<b>37</b>
2.1. Isolement à partir de l'air ambiant .....	38
2.2. Isolement à partir des surfaces.....	38
2.2.1. Ensemencement en surface.....	38
3. Identification et caractérisation des isolats .....	<b>39</b>
3.1. Critères morphologiques .....	39
3.1.1. Examen macroscopique.....	39
3.1.2. Examen microscopique .....	39
4. Conservation des souches .....	<b>40</b>
5. Détermination de l'activité antimicrobienne des hydrolats et des huiles essentielles .....	<b>40</b>
5.1. Préparation des précultures .....	40
5.2. L'aromatogramme ou méthode de diffusion en milieu gélosé .....	41
6. Détermination de l'activité antibiofilm des hydrolats .....	<b>41</b>
6.1. Obtention de biofilms <i>in-vitro</i> .....	42
6.1.1. Préparation des cultures bactériennes.....	42
6.1.2. Préparation des lames en verre.....	42
6.1.3. Adhésion et formation de biofilms sur les lames en verre.....	43
6.2. Traitement des biofilms par les hydrolats.....	43
6.2.1. Caractérisation microscopique de l'effet antibiofilm des hydrolats.....	44
6.2.2. Dénombrement des cellules survivantes en biofilm.....	44
<b>Résultats et Discussion .....</b>	<b>45</b>
1-Résultat de l'analyse microbiologique de l'environnement de laboratoire.....	<b>46</b>
1-1-La flore de contamination de la surface des paillasses .....	46
1-2-La flore de contamination de l'air ambiant.....	47
2-Résultats du contrôle microbiologique des hydrolats médicaux .....	<b>49</b>
3-Résultat de l'aromatogramme des hydrolats et des huiles essentielles.....	<b>49</b>
3-1- Activité antimicrobienne des hydrolats et des huiles essentielles .....	49
3-2- Résultats de l'activité antimicrobienne des formulations désinfectantes à base d'hydrolats.....	51
3-2-1- Activité antimicrobienne des combinaisons des hydrolats avec un désinfectant industriel.....	51
3-2-2 Activité antimicrobienne des combinaisons des hydrolats avec NaOH.....	53
4-Effet de la conservation sur l'activité antimicrobienne des hydrolats .....	<b>54</b>

4-1- Activité antimicrobienne des hydrolats conservés à 4 °C.....	54
4-2- Activité antimicrobienne des hydrolats médicaux conservés à température ambiante.....	55
5-Résultats de l'activité antibiofilm des hydrolats .....	<b>56</b>
5-1- Caractérisation microscopique des biofilms non traités (témoins).....	56
5-2- Effet des combinaisons hydrolat-désinfectant sur les biofilms expérimentaux .....	56
5-2-2- Dénombrement des bactéries survivant au traitement.....	57
<b>Conclusion .....</b>	<b>59</b>
Références bibliographiques .....	<b>61</b>
Annexes	

---

# **Introduction**

---

### Introduction

La contamination microbiologique fait référence à la croissance de différents types de micro-organismes nocifs, notamment des virus, des bactéries, des moisissures et des levures. Ces organismes se développent principalement de deux manières : en formant des biofilms lorsqu'ils colonisent les surfaces, ou en se fixant sur des particules en suspension dans l'air, ce qu'on appelle la contamination aéroportée.

Les installations de transformation des aliments sont fortement influencées par la présence de micro-organismes sur leurs surfaces, ce qui peut avoir des répercussions significatives sur la santé publique et l'économie. En effet, la présence de micro-organismes non désirés sur les surfaces des produits agroalimentaires entraîne des altérations de leurs caractéristiques sensorielles telles que l'apparence, l'odeur et le goût, ainsi que la diminution de leur durée de conservation. En plus, certains agents pathogènes, tels que *listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli*, sont nocifs pour la santé humaine. Outre les risques pour la santé, la biocontamination peut avoir un impact financier considérable, dans le secteur agroalimentaire. En effet, par mesure de précaution, les produits susceptibles d'être contaminés sont rappelés et éliminés, ce qui entraîne des pertes importantes pour l'entreprise. **(Anonyme, 2021)**

Ainsi, les contaminations des surfaces agroalimentaires affectent la qualité des aliments distribués et entraînent des risques économiques et sanitaires. La persistance de ces contaminations est principalement due à la présence des biofilms, qui se forment lorsque des micro-organismes s'associent de manière permanente à une surface, et s'enveloppent dans une matrice de substances polymères extracellulaires (EPS). Celle-ci assure la protection des cellules en biofilms et présente un obstacle majeur pour les opérations de nettoyage/désinfection. La résistance aux agents antimicrobiens est une caractéristique bien connue des biofilms dans le domaine agroalimentaire ou médical. Par conséquent, pour prévenir la formation de biofilms et éliminer les micro-organismes attachés de manière réversible et irréversible, il est nécessaire de rechercher de nouvelles substances actives. Les plantes médicinales, en particulier celles utilisées dans les pratiques traditionnelles, représentent une source potentielle de ces composés **(in BERRAHAL, 2020)**. En effet, la valorisation des plantes aromatiques et de leurs produits dérivés, tels que les huiles essentielles et les hydrolats, est une piste prometteuse dans la lutte contre les germes de contamination et les biofilms. Les hydrolats qui peuvent présenter des propriétés biologiques comparables à celles huiles essentielles sont un exemple de ces nouvelles stratégies, offrant à la fois

une efficacité élevée et une sécurité renforcée (**Hadjadj et Nouri, 2022**).

Notre étude s'inscrit dans ce cadre et a pour objectif d'appliquer les hydrolats à la désinfection de surfaces agroalimentaires. L'approche méthodologique adoptée pour déterminer l'activité antimicrobienne et antibiofilm des hydrolats analysés, comprend les étapes suivantes :

- Extraire les huiles essentielles par hydrodistillation et récupération de leurs hydrolats.
- Isoler des bactéries à partir de l'air ambiant et des surfaces du laboratoire d'analyses microbiologiques.
- Etudier les caractéristiques phénotypiques des souches bactériennes isolées.
- Examiner l'activité antimicrobienne et anti biofilm des hydrolats d'huiles essentielles de diverses plantes aromatiques contre les cellules bactériennes à l'état libre et en biofilms, et comparer leur efficacité à celle d'un désinfectant industriel, par la technique de l'aromatogramme.
- Utiliser les hydrolats pour désinfecter des surfaces contaminées par le biofilm.

---

# **Synthèse bibliographique**

**Chapitre 01 : L'hygiène des surfaces agroalimentaires**

---

## 1. Les problèmes de contamination dans les industries agroalimentaires

### 1.1. Généralité

Les microorganismes des aliments peuvent avoir différentes origines : ils peuvent préexister dans la matière avant toute manipulation et /ou transformation, être apportés accidentellement lors des manipulations ultérieures de l'aliment, et / ou être ajoutés volontairement. La règle des 5M énumère cinq sources potentielles de contamination (**Joffin ,2010**) :

- Matière première ;
- Matériel ;
- Main-d'œuvre ;
- Milieu ;
- Méthode.

### 1.2. Les principales flores de contamination

#### 1.2.1. La flore d'altération

##### La flore aérobique mésophile totale

La flore mésophile aérobique totale désigne l'ensemble des micro-organismes capables de se reproduire dans des conditions aériennes et à des températures modérées, plus précisément ceux dont la température de croissance optimale est comprise entre 25 et 40°C. ils peuvent être des micro-organismes pathogènes ou d'altération (**Gassama, 2002**). En effet, la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant une Colonie) présentes dans un produit (**Rezak, 2023**).

La Flore Mésophile Aérobie Totale est déterminée suivant la méthode de dénombrement en Unité Formant Colonie (UFC) à 30 °C pendant 72 h ± 2 h sur la gélose PCA (**Aissi et al., 2013**).

Ce dénombrement permet de dénombrer trois grands types de flore :

- La flore thermophile : température optimale de croissance à 45 °C ;
- La flore mésophile : température optimale de croissance entre 20 °C et 40 °C ;
- La flore psychrophile : température optimale de croissance à 20 °C (**Rezak, 2023**).

## Les entérobactéries

La famille des *Enterobacteriaceae* est la plus grande des familles, elle contient des bâtonnets droits Gram -négatifs à flagelles péritriches ou non mobiles, et facultativement anaérobies, dont des besoins nutritionnels sont simples (**Prescott et al., 2004**).

En effet, l'ensemble des entérobactéries est intéressant au niveau industriel comme test de qualité hygiénique : les entérobactéries peuvent être considérées comme germe indicateurs de mauvaises conditions de manipulation et de fabrication (**Guiraud et Rosec., 2004**). Le dénombrement s'effectue donc par la mise en évidence de la dégradation du glucose, en utilisant un milieu contenant du glucose ainsi qu'un indicateur de pH, milieu rendu sélectif par des inhibiteurs des bactéries Gram + (**Joffin, 2010**).

## Les coliformes

En microbiologie alimentaire, le terme "coliformes" désigne les Entérobactéries capables de fermenter le lactose avec production de gaz à 30°C, comprenant les genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* et *Serratia*. À l'exception de quelques biotypes d'*E. coli*. Les bactéries coliformes se présentent sous forme de bâtonnets Gram négatifs, ne présentant pas d'activité oxydasique, et peuvent se développer en présence d'oxygène ou en son absence selon leur convenance. Les coliformes thermotolérants sont ceux qui survivent à une température élevée de 44°C, parmi lesquels on trouve notamment *Escherichia coli*, communément appelé colibacille (**anonyme, 2020**).

Les coliformes présentent généralement un faible risque pour la santé et sont rarement entéro-pathogènes. Cependant, en cas de présence en nombre très élevé, ils peuvent causer des intoxications alimentaires. Ils sont souvent considérés comme des indicateurs de contamination fécale, bien que cela soit un critère discutable ; ils reflètent plutôt la qualité hygiénique fécale. Cette flore est plus spécifique de la contamination fécale que les coliformes totaux (**Katinan et al., 2012**).

## Les levures et les moisissures

Les levures et les moisissures ont une structure cellulaire eucaryote : les levures se présentent généralement, à un stade de leur cycle biologique, sous forme de cellules individuelles, sphériques ou ovoïdes, d'une taille de quelques micromètres de diamètre. Les moisissures adoptent une forme filamentaire, où l'ensemble des filaments (hyphes) formant le mycélium devient visible à l'œil nu, conférant ainsi aux produits moisissés leur aspect feutré caractéristique.

Ces organismes se développent exclusivement en présence de carbone organique. Leur plage de température de croissance s'étend de 2 °C à 40 °C, avec une température optimale située entre 20 °C et 30 °C. Ils sont sensibles à la chaleur, étant détruits à des températures supérieures à 50 °C. Ils tolèrent bien les environnements acides et peuvent se développer sur des produits riches en sucre et à faible teneur en eau, tels que les confitures et les fruits séchés. Ces caractéristiques physiologiques en font des contaminants courants dans les fruits (Marielle, 2020).

### 1.2.2. La flore pathogène

Les sources de contamination par des bactéries pathogènes varient selon la nature du produit ainsi que ses procédés de production et de transformation (CHermitti, 2017). Parmi ces germes, il est possible de citer à titre non-exhaustif :

#### *Salmonella*

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des bacilles Gram négatif, non sporulants, habituellement mobiles grâce à des flagelles péritriches, à l'exception de certains sérovars aviaires tels que *S. Gallinarum* et *S. Pullorum*. Leur taille varie généralement de 2,0 à 5,0 µm de longueur sur 0,7 à 1,5 µm de largeur. Les salmonelles sont des bactéries mésophiles et peu exigeantes sur le plan nutritionnel, capables de croître sur des milieux ordinaires contenant des extraits de viande. Elles sont aéro-anaérobies facultatives. Après une incubation de 18 à 24 heures à 37 °C sur un milieu ordinaire avec un pH compris entre 6,5 et 7,5, les colonies obtenues mesurent généralement entre 2 et 4 mm de diamètre, à l'exception de certains sérovars qui produisent toujours des colonies naines, tels que *S. Abortusovis* et *S. Abortus* (Jakdalli et CHettouh.,2018). En effet *Salmonella*

est le premier agent pathogène confirmé dans les foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) (Anonyme, 2021).

### *Escherichia coli*

*E.coli* est un bacille à Gram négatif appartenant à la famille des *enterobacteriaceae*. Il se développe sur gélose ordinaire, produit habituellement de l'indole, fermente le lactose, mais ne produit pas d'acétoïne (Fauchère et Avril, 2002). La plupart des souches d'*E.coli* se multiplient rapidement (18 à 24 heures) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, elles sont rondes, plates et à bords réguliers (Joly et Beynaud, 2002). *E.coli* est bien connu pour pouvoir croître à 44°C et exprimer normalement ses activités métaboliques à cette température ; par contre il ne pousse que très lentement ou pas du tout à 4- 6°C (Grimont, 1987).

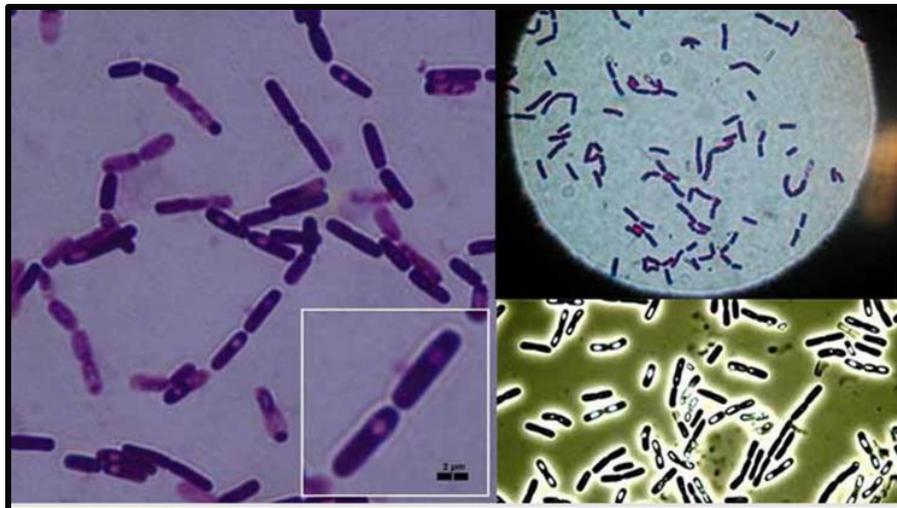
### *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* est une bactérie ubiquitaire, très répandue dans la nature (air, eau, sol...etc), une bactérie commensale de la peau et des muqueuses de l'Homme et de l'animal (Heczko et al., 1981 ; Peacock et al., 2001). Sur la base d'analyse des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S, *S. aureus* appartient au phylum des Firmicutes, à la Classe des Bacilli, à l'ordre des Bacillales et à la famille des *Staphylococcaceae* (Garrity et al., 2005), avec une teneur en G+C variant de 30 à 39 % selon les espèces (Landgraf et Destro, 2013). *S. aureus* se distingue des autres espèces de staphylocoques sur la base des résultats des tests : de fermentation du mannitol, de désoxyribonucléase...etc (Lowy, 1998 ; Le Loir et al., 2003). *S. aureus* est une bactérie à Gram positif, en forme de coque de 0,5 à 1,5 µm de diamètre, il généralement est isolé ou groupé en diplocoques, le plus souvent en amas (en grappe de raisin) (Yves et Michel, 2009 ; Landgraf et Destro, 2013). Les *S. aureus* sont anaérobies facultatifs, certaines espèces sont aérobies strictes, leur croissance est plus rapide et plus abondante en conditions aérobies qu'en conditions anaérobies (Sutra et al., 1998) asporulés (Le Loir et al., 2003 ; Landgraf et Destro, 2013), chimioorganotrophes et non mobiles (Landgraf et Destro, 2013). *S. aureus* est halotolérant et peut se multiplier en présence de concentrations élevées de chlorure de sodium (Sutra et al., 1998). Les températures optimales de croissance de cette bactérie se situent entre 35 et 40 °C et leur pH

optimal est de 6-7 (Landgraf et Destro, 2013). Cette bactérie a la capacité d'être largement disséminée dans l'environnement, ce qui peut entraîner la contamination des aliments. Par conséquent, tous les types d'aliments peuvent potentiellement contribuer au développement d'une infection alimentaire d'origine bactérienne. Cependant, certains aliments requièrent une attention particulière, notamment le lait cru ou fermenté, les œufs et les produits dérivés des œufs, la viande fraîche ou hachée, les abats et la volaille (Khallaf et al., 2014).

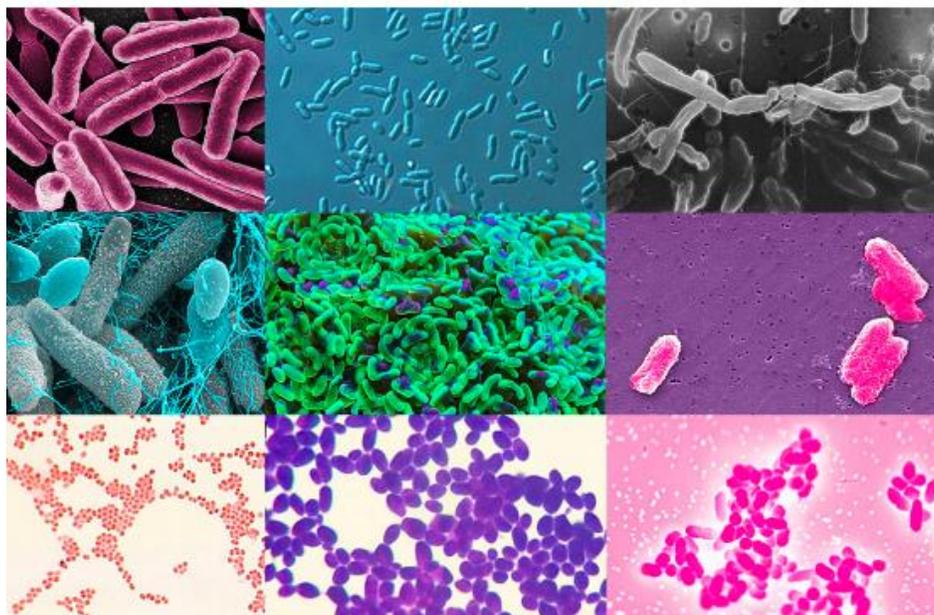
### *Bacillus cereus*

Le genre *Bacillus* est diversifié, englobant des bacilles aéro-anaérobies facultatifs à Gram positif, capables de former des spores et mobiles. Toutes les espèces de ce genre sont capables de se reproduire dans des environnements aérés à des températures modérées, avec des températures optimales de croissance généralement comprises entre 20 et 40°C. Ces bactéries peuvent avoir des propriétés pathogènes ou être impliquées dans des processus d'altération des aliments. L'espèce *B. cereus* peut causer deux types d'empoisonnement alimentaire : le syndrome émétique et le syndrome diarrhéique (Dris et Krouchi.,2019). C'est un contaminant fréquent dans les industries agroalimentaires. Il est présent à divers niveaux de la chaîne alimentaire, de l'environnement jusqu'au tube digestif du consommateur (Guérin,2016). Cette ubiquité est due à la propriété de sporulation de cette bactérie et à la capacité des spores à l'adhésion aux surfaces inertes et à la formation de biofilm (Figure 1).

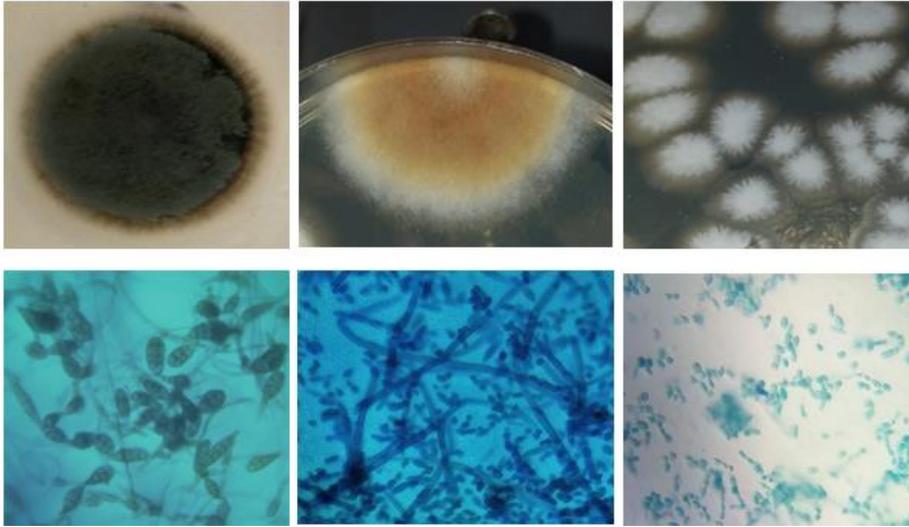


**Figure 1:** Aspect microscopique de la bactérie sporulée *B. cereus* (Sagar, 2022).

Les figures 2 et 3 illustrent, elles aussi la diversité morphologique des flores de contamination bactérienne et fongique des aliments.



**Figure 2 :** Diversité morphologique de la flore de contamination bactérienne des aliments (Source : Google, images)



**Figure 3** : Diversité morphologique des champignons isolés de l'environnement laitier (**Adapté de Benallal et Benazzouz, 2023 ; Saidani et Saidouni, 2023**).

## **2. Biocontamination des surfaces agroalimentaires : le biofilm**

### **2.1. Problématique**

Les biofilms sont omniprésents dans divers secteurs, notamment les laiteries, les brasseries, les meuneries, les sucreries, les malteries, et les salaisons, et se retrouvent sur une variété de surfaces inertes telles que l'acier inoxydable, le verre, le caoutchouc et le polypropylène. Ils se forment à tous les stades de la chaîne de production. Ces biofilms constituent une source de contamination à haut risque, car les bactéries peuvent se détacher pendant la fabrication, contaminant ainsi les aliments au contact de ces surfaces et altérant leur qualité, ce qui les rend potentiellement porteurs de microorganismes pathogènes.

Par exemple, dans l'industrie laitière, la contamination des produits laitiers durant leur fabrication est souvent attribuable à la formation de biofilms indésirables sur les surfaces des équipements de fabrication. Parfois, les problèmes de détérioration sont dus à des niveaux élevés de microorganismes libérés sous forme de biofilms dans le produit final ou aux enzymes produites par les biofilms à un stade particulier du processus de fabrication (**Boumedjirek et Boukraa.,2020**). Les biofilms sont, en effet, une source de contamination des aliments transformés par des germes indésirables et sont largement impliqués dans la dégradation de la qualité

organoleptique et sanitaire des produits finis et la diminution de leur durée de conservation (**Malek ,2019**).

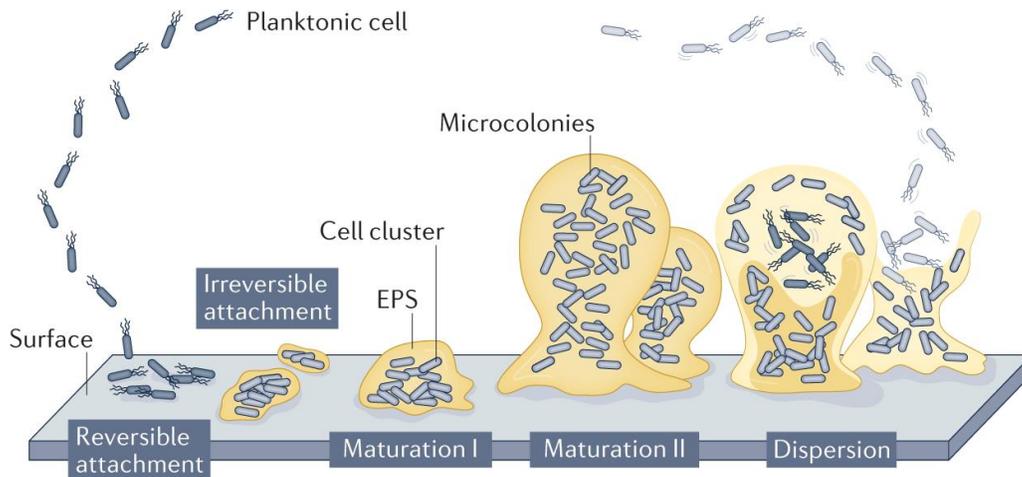
### **2.1.1. Définition des biofilms**

Un biofilm se définit comme une agrégation de micro-organismes dans laquelle les cellules se lient entre elles et souvent à une surface, étant incorporées et protégées à l'intérieur d'une matrice extracellulaire composée de substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par ces mêmes micro-organismes (**Speranza et al., 2020**). La formation d'un biofilm représente une transformation radicale du mode de vie des microorganismes qui le constituent, passant d'un mode de vie planctonique et individuel à un mode de vie communautaire et sessile. Les bactéries semblent amorcer la formation d'un biofilm en réponse à des pressions environnementales telles que le manque d'oxygène et de nutriments, ou en présence de certains traitements. Elles peuvent se développer sur une grande variété de surfaces (**Chibi, 2015**).

### **2.1. 2. Processus de formation du biofilm**

Comme le montre la figure 4, le processus de formation de biofilm se déroule en plusieurs étapes :

- Adhésion réversible
- Adhésion irréversible
- Multiplications et formation des microcolonies
- Maturation du biofilm
- Dispersion du biofilm

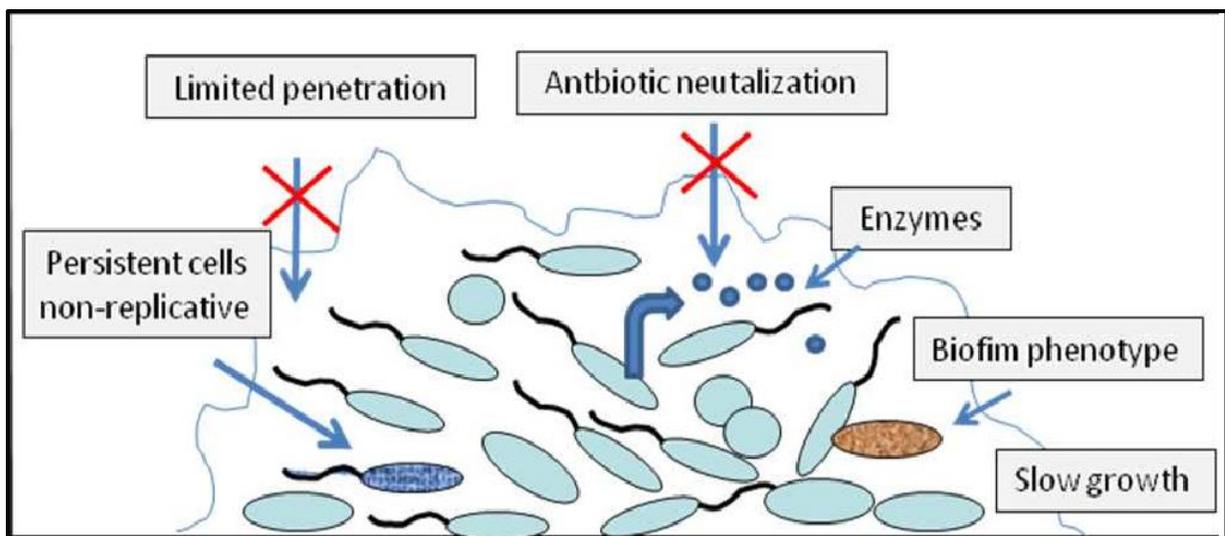


**Figure 4:** Schéma représentant le cycle de vie du biofilm (Sauer et *al.*, 2022)

### 2.1.3. Résistance des biofilms aux agents antimicrobiens

Une caractéristique cruciale des biofilms est leur capacité renforcée à survivre à l'exposition à divers composés antimicrobiens, tels que les désinfectants, les métaux toxiques et les antibiotiques, grâce à plusieurs mécanismes (Flemming et *al.*, 2016). En effet, les bactéries présentes dans les biofilms possèdent des mécanismes intrinsèques de protection contre des conditions environnementales hostiles, notamment l'action des agents antimicrobiens (Marchand et *al.*, 2012). Par conséquent, les micro-organismes en biofilm présentent une moindre sensibilité aux agents antimicrobiens et aux désinfectants, nécessitant des concentrations de 10 à 1000 fois supérieures à celles requises pour les micro-organismes libres (Xu, 2000 ; Tremblay et *al.*, 2014). Cette résistance accrue, résulte de multiples facteurs, est liée aux conditions de vie dans un biofilm, telles que l'accès aux nutriments, l'hétérogénéité de l'environnement et la disponibilité en oxygène, qui altèrent les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques (Figure 5). En effet, plusieurs éléments peuvent expliquer la tolérance accrue des biofilms aux agents antimicrobiens :

- La matrice polymérique agit comme une barrière qui réduit ou entrave la diffusion des agents antimicrobiens, soit en les ralentissant physiquement, soit en réagissant chimiquement avec eux (**Walters et al., 2003**).
- Le métabolisme des bactéries au sein d'un biofilm joue également un rôle crucial. En raison de la faible concentration de certains nutriments et du gradient d'oxygène, certaines cellules du biofilm peuvent présenter une activité métabolique réduite, voire être dans un état dormant, ce qui diminue leur sensibilité aux antimicrobiens. Ces cellules dormantes, également appelées cellules persistantes, sont largement considérées comme étant responsables d'une grande partie de la résistance observée dans les biofilms (**Lewis, 2008**).
- La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise le transfert horizontal de gènes et l'accroissement de la résistance aux antimicrobiens (**Ghigo, 2001**), ainsi que l'activation de gènes spécifiques qui sont inhibés dans l'état planctonique (**Donlan et Costerton 2002**).



**Figure 5 :** Représentation schématique illustrant la résistance aux antibiotiques associée aux biofilms.

(Source : <https://www.semanticscholar.org/paper/Biofilms%3A-A-Survival-and-Resistance-Mechanism-of-Estela-Alejandro/df74ae6c396cd27a08652afb90ef55b32d94b44> )

## 2.2. Moyens de lutte contre les biofilms

La robustesse intrinsèque des biofilms, caractérisée par leur capacité à supporter des stress physiques et chimiques, à persister et à résister aux antibiotiques, en fait des structures difficiles à éliminer. Pour cela, diverses stratégies de lutte ont été développées au fil des années. Elles se regroupent en deux grandes catégories : les stratégies préventives, qui visent à prévenir la formation de biofilms sur les surfaces, et les stratégies curatives, qui agissent pour perturber les biofilms déjà établis (**Baudin, 2017**).

Une des stratégies les plus efficaces pour combattre les biofilms est le nettoyage mécanique. En raison des fortes pressions de cisaillement appliquées, ce processus les détruit en séparant les microorganismes de leur support (**Herbache, 2022**).

## 3. L'hygiène industrielle

### 3.1. Définition

Les bonnes pratiques d'hygiène englobent un ensemble d'actions visant à assurer la sécurité et la salubrité des aliments. Ces pratiques comprennent des opérations dont les effets sur le produit final peuvent être difficiles à quantifier. Les bonnes pratiques d'hygiène sont typiquement classées en sept catégories :

- l'hygiène du personnel,
- le transport et le stockage hygiéniques,
- le nettoyage et la désinfection,
- l'hygiène des installations,
- la lutte contre les nuisibles ;
- la gestion des déchets

Le nettoyage et la désinfection sont parmi les opérations les plus importantes en industrie agroalimentaire (IAA). Elles ont pour but d'éliminer les souillures et détruire les microorganismes présents dans les appareils, les surfaces et dans les emballages) (**Tabeti, s.d**).

### 3.2. Aspects réglementaires

Afin de garantir cette sécurité auprès des consommateurs, des normes d'hygiène ont été mises en place, dans les industries agroalimentaires. Ces normes concernant l'hygiène sont la plupart du temps élaborées par des organismes nationaux ou internationaux, comme l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO), le paquet hygiène et Le HACCP ISO 22000 (**In Malek, 2021**).

- Le "**paquet hygiène**" est un ensemble de règlements européens, applicables depuis le 1er janvier 2006 dans tous les États membres, régissant l'hygiène dans toute la chaîne agroalimentaire. Cette législation couvre la production primaire, animale et végétale, l'industrie agroalimentaire, le transport et la distribution, jusqu'au consommateur final.
- Le **HACCP ISO 22000**, une norme de nettoyage industriel, et l'ISO 9001 :2008 sont des standards essentiels dans l'industrie agroalimentaire. Ces normes assurent la sécurité sanitaire et l'hygiène des produits alimentaires, depuis la production jusqu'à la consommation finale. Ainsi le nettoyage et la désinfection sont des prérequis (ISO 22000), nécessaires à la sécurité des denrées alimentaires. En outre, Depuis 2005, la norme ISO 22000, impose à toute la filière agroalimentaire d'utiliser la méthode HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) pour assurer l'hygiène des aliments (**In Malek, 2021**).

### 3.3. Le nettoyage

#### 3.3.1. Définition

Selon la norme AFNOR 50-109, le nettoyage est défini comme l'activité visant à éliminer toute forme de saleté visible ou invisible présente sur une surface donnée. Son objectif est de supprimer complètement les traces de saleté ou de contaminants afin de minimiser le risque de contamination croisée. Cette opération est considérée comme une phase intégrale de la production, étant à la fois le premier maillon de la chaîne de production pour garantir un environnement propre avant la fabrication, et le dernier maillon puisqu'il est effectué à la fin de l'utilisation pour maintenir la propreté de l'équipement (**Baaziz et Boulakzaz., 2018**).

Une large gamme de produits chimiques ou détergents est utilisée aux fins du nettoyage ou détergence.

### 3.3.2. Les produits détergents

- **Les surfactants (agents de surface)** sont des composés chimiques qui réduisent la tension superficielle des liquides dans lesquels ils sont dissous. Ils agissent en augmentant les propriétés d'étalement et de mouillage du liquide. Les surfactants sont classés en fonction de la structure chimique de leurs groupes hydrophiles, qui peuvent être anioniques, cationiques, non-anioniques ou amphotères. Par exemple, les surfactants anioniques, tels que les savons, peuvent avoir des propriétés bactéricides, tandis que les surfactants cationiques agissent comme inhibiteurs de corrosion en milieu acide **(In Msemo, 2022)**.
- **Les détergents minéraux :** Tels que les acides forts et les alcalis forts, sont efficaces pour dissoudre les minéraux tels que le calcium, le magnésium, et les sucres. Par exemple, l'acide phosphorique et l'acide nitrique sont largement utilisés à cet effet. Ces détergents ont des propriétés bactéricides, notamment l'acide sulfurique passivé, qui est efficace même contre les spores. Les alcalis forts, comme la soude caustique, agissent également comme détergents et ont des effets sporicides et virucides. Les détergents contiennent généralement une base forte comme la soude caustique, un tensioactif pour solubiliser les graisses, et un complexant du calcium pour une meilleure efficacité, bien qu'ils soient corrosifs, surtout sur les surfaces en acier inoxydable **(In Msemo ,2022)**
- **Les détergents enzymatiques :** contiennent une ou plusieurs enzymes, qui sont souvent utilisés pour traiter les biofilms dans l'industrie alimentaire. En raison de la nature hétérogène de la matrice d'exopolysaccharides, différents types d'enzymes peuvent être nécessaires pour sa décomposition efficace. Ces mélanges enzymatiques peuvent inclure des protéases pour la dégradation des protéines, des lipases pour la dégradation des lipides, ou des amylases pour la dégradation de l'amidon **(Diaby, 2018)**.

### 3.3.3. Le nettoyage des circuits fermés : Le système CIP

#### - Définition

Le CIP est l'acronyme anglais de (cleaning-in-place) ou NEP (nettoyage-en-place), est un procédé automatisé intégré aux installations industrielles pour maintenir un environnement propre et stérile. Il implique la circulation de diverses solutions désinfectantes à travers les équipements de production sans nécessiter leur démontage, afin d'effectuer un nettoyage quotidien des cuves, tuyauteries, chaînes de production, vannes, etc. Le processus se termine toujours par un rinçage (Mouloudj et Hamadi, 2012).

#### - Application du système CIP en industrie laitière

Dans l'industrie laitière, l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection dépend de nombreux facteurs : la nature et l'âge de l'encrassement, la composition et la concentration des produits de nettoyage, la durée et la température du nettoyage, le degré de turbulence de la solution, et les caractéristiques de la surface à nettoyer. Comme le montre la figure 6, le processus standard du système CIP inclut les étapes suivantes :

1. Rinçage initial à l'eau à température ambiante pendant 5 à 20 minutes pour éliminer les résidus de matières premières.
2. Nettoyage avec une solution alcaline (NaOH à 1.0-1.5%) à 75-80°C pendant 6 à 45 minutes pour enlever les contaminants organiques.
3. Rinçage à l'eau chaude.
4. Nettoyage avec une solution acide (0.5-1%) à 60-90°C pendant 5 à 45 minutes pour éliminer les sédiments inorganiques, à effectuer une fois par semaine selon la dureté de l'eau et le degré de contamination.
5. Rinçage final à l'eau à température ambiante pendant 5 à 20 minutes (Didouh, 2015).

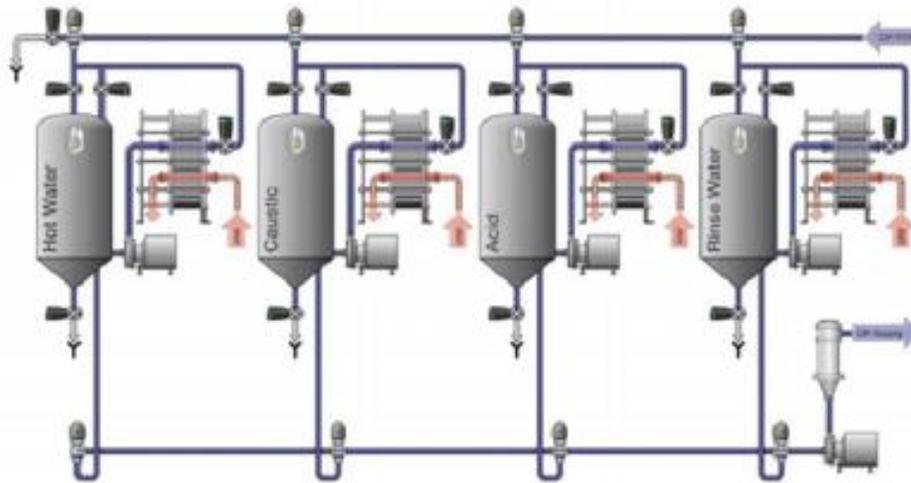


Figure 6: Représentation schématique du nettoyage en place ou système CIP

(Source : <https://www.linkedin.com/pulse/alfa-laval-solutions-cip-ruslan-hasanov>)

## 3.4. La désinfection

### 3.4.1. Définition

La désinfection, selon la norme AFNOR NF T 72 IRI 198, est une opération au résultat momentanée qui vise à éliminer ou à neutraliser temporairement les micro-organismes et/ou les virus indésirables présents dans des environnements inertes contaminés, conformément aux objectifs définis (Sow, 2003). Une large gamme de produits désinfectant est utilisée dans les industries agroalimentaires.

### 3.4.2. Les désinfectants industriels

Dans le domaine des industries agroalimentaires, les principaux agents désinfectants incluent :

- **l'acide peracétique** : un composé résultant de la combinaison d'acide acétique et de peroxyde d'hydrogène, reconnu pour sa haute efficacité dans l'élimination des agents pathogènes.

- **Les composés halogénés**, tels que le chlore et ses dérivés, ainsi que l'iode et ses dérivés, sont largement utilisés comme désinfectants en raison de leur efficacité. À des concentrations relativement faibles en chlore actif, de l'ordre de quelques milligrammes par litre, ces composés présentent une activité désinfectante significative. De même, le mélange d'iode avec un agent tensio-actif, connu sous le nom d'iodophore, démontre une forte activité bactéricide même à des concentrations réduites.
- **Les aldéhydes**, tels que le formaldéhyde à 30% en solution (formol), sont appliqués sous forme gazeuse. Leur activité antibactérienne s'étend sur une gamme étendue de valeurs de pH.
- **Les composés d'ammonium quaternaire (CAQ)** démontrent à la fois des propriétés détergentes et microbicides. Leur efficacité est réduite en présence de souillures protéiques, ce qui souligne l'importance de les appliquer sur des surfaces préalablement nettoyées avec soin. À faible concentration, les CAQ inhibent la croissance bactérienne, tandis qu'à des concentrations plus élevées, ils induisent la mort des bactéries.
- D'autres agents de désinfection peuvent être employés, notamment l'ozone, l'eau oxygénée, les alcools, les cétones, ainsi que les acides et bases fortes (**Bendahman et Bougueroudjs 2021**).

**Tableau 1** : Efficacité comparée des désinfectants industriels  
(Bendahman et Bougueroudjs 2021)

Désinfectant Propriétés Bactéries	Acide acétique + Eau Oxygénée	Eau Oxygénée	C.A.Q	Chlore	Iode	Formol
Gram +	+	+	+	+	+	+
Gram –	+	+	(+)	(-)	+	+
Spores						
Levures	+	(-)	-	(+)	(+)	(+)
moisissures	+	(-)	+	(+)	+	+
Virus	+	(+)	(+)	+	+	(+)
Bactériophages	+	(-)	-	+	+	+
Action à base Température	+	(-)	(+)	+	+	(-)
pH d'utilisation						
Influence	7	7	11	13	5	10
Mat.org	(-)	(-)	(-)	-	(-)	(+)
Corrosion	+	+	+	(+)	(+)	(+)
Mousse	+	+	-	+	(-)	+
Résidus	+	+	(-)	+	(+)	(-)
Toxiques	+	+	(-)	+	(+)	(+)
Rinçabilité						

---

---

## **Chapitre 2 : Les huiles essentielles et les hydrolats**

---

---

## 1- les huiles essentielles

### 1-1-Définition et description

Les huiles essentielles sont des liquides aromatiques hautement concentrés, présentant une complexité de mélanges volatils composés de multiples dizaines de substances. Les plantes aromatiques sont les plantes qui les sécrètent en quantité suffisante pour permettre leur extraction par distillation. Ces essences sont présentes dans diverses parties de la plante (écorce, racine, feuille, fleur, fruit) et se trouvent dans toutes les zones climatiques du monde. Des facteurs environnementaux tels que la température, l'exposition à la lumière et la durée du jour peuvent influencer de manière significative la qualité et la quantité des huiles essentielles produites. **(Laiche et Mecheri., 2023).**

La Pharmacopée Européenne VI<sup>e</sup> édition, décrit les huiles essentielles comme «un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par extraction à la vapeur, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » **(Faustine et Clémence, 2017) .**

### 1-2-Répartition et localisation

Les huiles essentielles sont présentes au sein de diverses familles botaniques et sont réparties dans toutes les structures vivantes de la plante. Elles sont stockées dans des cellules spécialisées du cytoplasme **(Bammou et al., 2022).**

#### 1-2-1-Répartition

Au sein du règne végétal, les huiles essentielles sont principalement présentes chez les plantes supérieures. Les genres capables de produire les constituants qui les composent sont répartis dans environ cinquante familles, dont de nombreuses appartiennent aux Lamiaceae (lavande, thym, menthe...), aux Lauraceae (cannelle, camphrier...), aux Myrtaceae (eucalyptus, niaouli...), aux

Pinaceae (pin, cèdre, cyprès, genévrier...), aux Rutaceae (citron, orange...) ou aux Apiaceae (cumin, fenouil, anis vert...) (**Kamal,2019**).

### 1-2-2-Localisation

La biosynthèse et l'accumulation des huiles essentielles chez les végétaux sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, localisées en des points spécifiques des tissus, souvent situées à la surface ou à proximité de celle-ci.

Les HE sont stockés dans tous les organes végétaux :

- Les fleurs (lavande...).
- Feuilles (eucalyptus, laurier...).
- Fruits (anis, orange...).
- Graines (muscades...).
- Écorce (cannelle...).
- Rhizomes (gingembre, curcuma...).
- Racines (vétiver...).
- bois (camphrier...) (**Hemiani et Ben djerroume.,2021**).

La figure 7 montre les images représentant quelques plantes aromatiques très utilisées en pharmacopée et dans les pratiques culinaires.



**Figure 7:** Images représentant quelques plantes aromatiques (Source : application Pinterest)

### 1-3- Propriétés physiques

À température ambiante, les huiles essentielles sont des liquides volatils., Elles sont solubles dans les solvants organiques courants et sont liposolubles. Elles peuvent être entraînées par la vapeur d'eau et sont très peu solubles dans l'eau. Cependant, leur solubilité est suffisante pour imprégner l'eau d'une odeur caractéristique, ce qui conduit à la formation de ce qu'on appelle l'"eau distillée florale" ou hydrolat (Aissous et Morsli., 2016).

### 1-4-Technique d'extraction des huiles essentielles

#### 1-4-1-Hydrodistillation

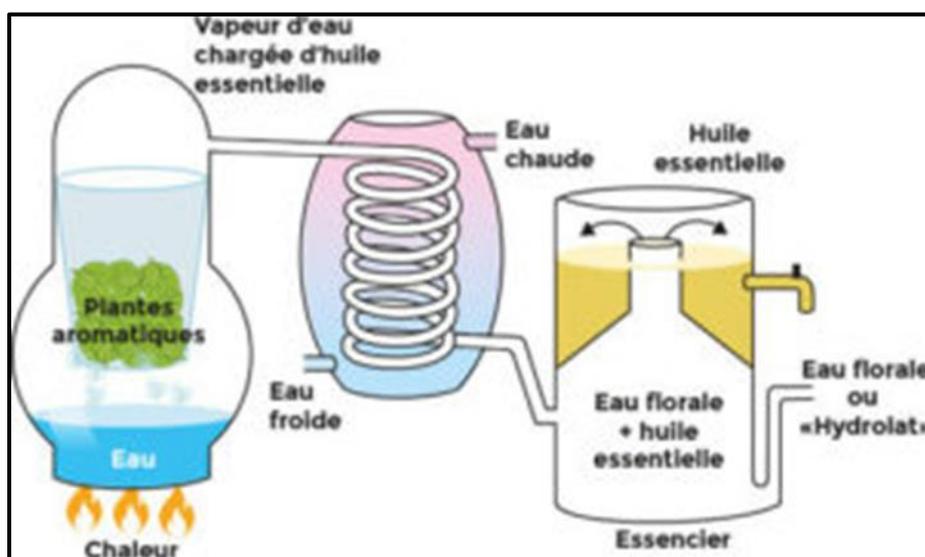
L'hydrodistillation est une méthode d'extraction ancienne, où la matière végétale est immergée dans de l'eau et portée à ébullition à pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, les cellules végétales se rompent, libérant les molécules odorantes. Ces molécules forment un mélange avec l'eau, distillant à 100°C. Ce mélange est entraîné par la vapeur d'eau vers un système de refroidissement. À la fin du processus, un mélange d'huile et d'eau est obtenu, ces deux substances ayant des densités différentes et pouvant être séparées par décantation (Figure 8). Cette technique

est très utilisée au niveau individuel et artisanal, au moyen d'alambics en inox ou en cuivre (Figure 9).

Cependant, l'hydrodistillation présente des inconvénients, notamment le contact direct entre l'eau et la matière végétale, entraînant des phénomènes d'hydrolyse. Par conséquent, l'huile essentielle récupérée diffère souvent de l'essence originelle. De plus, la durée nécessaire à l'hydrodistillation est généralement longue (Belbessai.,2016).

### 1-4-2-Entrainement à la vapeur d'eau

Cette méthode est reconnue comme l'une des approches officielles pour extraire les huiles essentielles (HE). Dans ce procédé d'extraction, le matériel végétal est exposé à un courant de vapeur sans pré-macération. Les vapeurs, chargées en composés volatils, sont ensuite condensées et séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE) dans un essencier. Cette méthode présente l'avantage de prévenir les phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation qui pourraient altérer la qualité de l'huile, car il n'y a pas de contact direct entre l'eau et le matériel végétal, ni entre l'eau et les molécules aromatiques (Boukhatem et al., 2019).



**Figure 8** : Représentation schématisée de l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

(Source : <https://www.nectarome.fr/zoom-sur-4-notions-daromatherapie/> )



**Figure 9:** Montage représentant un alambic traditionnel en cuivre

(Source: <https://lherbierdelsa.fr/definition-hydrolat-eau-florale/> )

## 2- Les hydrolats

### 2-1- Définition

Les hydrolats sont des sous-produits issus du processus de distillation à la vapeur ou d'hydrodistillation des plantes aromatiques employées dans la production d'huiles essentielles (HE). Après la distillation, les huiles essentielles sont séparées de l'eau en raison de leur différence de densité, formant deux phases distinctes : la phase supérieure constituée d'huile essentielle et la phase inférieure, appelée encore hydrolat ou eau florale, est constituée d'eau, caractérisée par une odeur spécifique inhérente au matériau végétal utilisé. La phase d'huiles essentielles renferme la majorité des composés volatils, tandis que la phase hydrosol contient de l'eau condensée et une faible concentration d'huiles essentielles dissoutes (généralement inférieure à 1 g/L), conférant ainsi leurs propriétés organoleptiques (**Hadjadj et Nouri., 2022**). Les hydrolats représentent, ainsi les produits obtenus conjointement à la distillation des huiles essentielles.

Il convient de souligner que chaque goutte d'hydrolat renferme l'intégralité des informations de la plante, et que comparativement à une infusion de la même plante, l'hydrolat est plus abondant en principes actifs volatils. L'hydrolat présente un parfum et un goût variés mais moins intenses que ceux des huiles essentielles (**Salem et Benchelih.,2019**).

## 2-2-Composition chimique des hydrolats

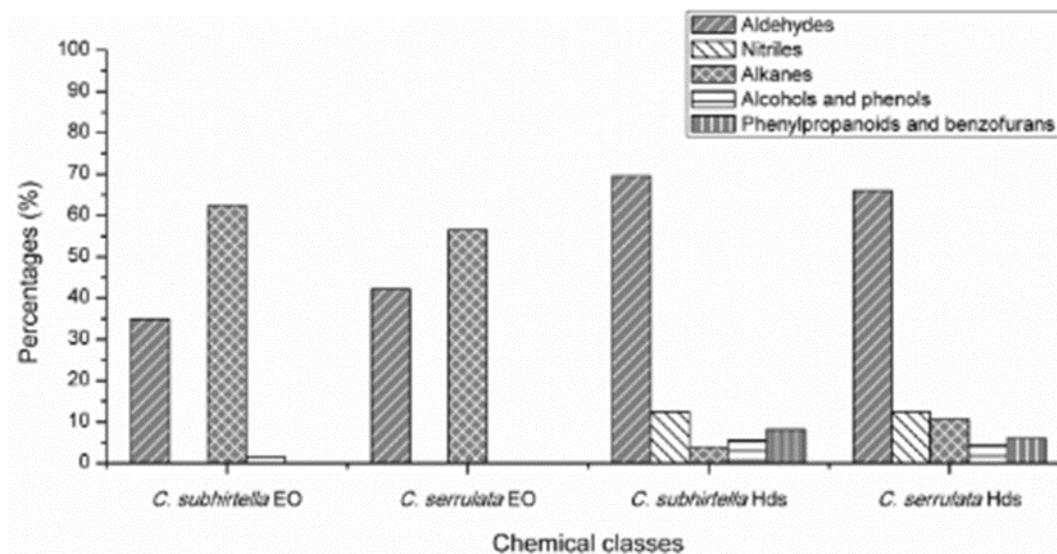
Telle que montrée par la figure 10, la composition chimique des huiles essentielles et de leurs hydrolats diffèrent quantitativement et qualitativement. Certains composés présents dans les hydrolats sont totalement absents dans l'huile essentielle correspondante et vice-versa. La composition des hydrolats est également influencée par le procédé de distillation (Tableau 2). Toutefois, d'un point de vue moléculaire, les principaux composés de l'hydrolat sont généralement les mêmes que ceux présents dans la fraction oxygénée correspondante de l'huile essentielle, lesquels contribuent à l'arôme de cette solution aqueuse (Lei et al., 2014).

## 2-3-Utilisation

Les hydrolats sont produits de manière aisée et économique, et semblent présenter moins de risques pour la santé humaine que les huiles essentielles (Hadjadj et Nouri, 2022). Cependant, l'utilisation thérapeutique des eaux florales produites lors de la distillation des plantes, appelée également hydrolathérapie, est moins connue que l'aromathérapie. Pourtant, ces eaux, dotées de vertus thérapeutiques remarquables issues des plantes et de la capacité purifiante de l'eau, méritent une attention égale (Benchachoua et Simoud, 2021). En effet, au niveau scientifique et industriel, il n'existe pas de définition légale, de normes établies par l'industrie ou la communauté scientifique internationale, ni de spécifications émises par des organismes internationaux tels que l'ISO ou l'AFNOR (Ould et Cjadj, 2021).

Les hydrolats sont exploités dans l'industrie alimentaire et cosmétique, comme l'eau de rose et l'eau de fleur d'oranger, qui sont employées non seulement dans le soin cutané, mais aussi dans la préparation de produits alimentaires et de boissons. Les hydrolats aromatiques, moins concentrés en molécules aromatiques que les huiles essentielles, sont plus doux et exigent moins de précautions d'utilisation. Ils trouvent des applications dans le domaine agroalimentaire

Contrairement aux huiles essentielles, les hydrolats présentent une composition biochimique différente, et leurs propriétés thérapeutiques peuvent donc différer. Ils peuvent être utilisés facilement par voie orale, en spray sur les muqueuses, ou par application cutanée (sur le visage, le corps ou les cheveux). En cosmétique, ils peuvent être utilisés comme lotion nettoyante ou tonifiante (Djehida et El Farroudji, 2019).



**Figure 10:** Les classes chimiques majeures des huiles essentielles et des hydrolats de deux plantes aromatiques originaires de Chine (Lei et al., 2014). EO : essential oil , Hds : hydrolats

**Tableau 2:** Liste des composés des hydrolats extraits du fenouil par hydrodistillation et distillation à la vapeur (Adapté de Silha et al., 2020)

Compound	% of Total Peak Area	
	H <sub>SD_SPE</sub>	H <sub>HD_SPE</sub>
Capronic acid	0.2	n.i.
1,8-Cineol	2.8	3.8
Phenylacetaldehyde	0.1	n.i.
Fenchone	22.5	26.5
Linalool	0.3	0.2
Camphor	0.7	0.9
Estragole	37.4	33.0
Carveol	2.6	2.3
Carvone	2.2	2.3
<i>p</i> -Anisaldehyde	5.2	5.5
Eugenol	2.5	5.6
Eugenyl acetate	0.8	1.0
<i>p</i> -Methoxy Cinnamaldehyde	7.1	4.0

HSD : Hydrolat obtenu par distillation à la vapeur, HHD : Hydrolat obtenu par hydrodistillation

## 2-4-Production et commercialisation en Algérie

Les hydrolats sont largement utilisés à des fins thérapeutiques, cosmétiques et culinaires, ce qui contribue à leur popularité croissante sur le marché algérien. Les consommateurs recherchent de plus en plus des produits naturels et respectueux de l'environnement, ce qui stimule la demande pour les hydrolats produits localement. De plus, la diversité des plantes cultivées en Algérie permet une variété d'hydrolats disponibles sur le marché, répondant ainsi aux besoins et aux préférences des consommateurs. La figure 11 donne quelques exemples des hydrolats qui sont commercialisés en Algérie.



Hydrolats d'eucalyptus



Hydrolats de romarin

Hydrolats de lavande

Figure 11 : Exemples d'hydrolats commercialisés en Algérie

(Source : <https://www.store.aromabiOil.com/shop/romarin-hydrolat-eau-florale/>

<https://genilux.dz/product/hydrolat-romarin-a-cineole-125ml/>

<https://www.facebook.com/bahja.madinalgerie/photos/a.1782277332070005/2591242144506849/?type=3> )

### 3-Activités antimicrobienne des hydrolats et des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont réputées pour leurs propriétés antiseptiques et antimicrobiennes, ainsi que pour d'autres activités biologiques. Par contre, les recherches portant sur la bio-activité des hydrolats sont relativement limitées en comparaison avec celles centrées sur les huiles essentielles (HE), comme soulignée dans la littérature scientifique. Bien que les hydrolats partagent une similitude chimique directe avec leurs HE correspondantes, elles demeurent moins étudiées dans ce domaine (Yann, 2015).

Néanmoins, certains travaux montrent que les hydrolats présentent des activités biologiques significatives, notamment contre les bactéries et les champignons pathogènes, ainsi qu'une activité antioxydante. Ces propriétés découlent de la présence de composants spécifiques avec des groupes fonctionnels distinctifs (Hadjadj et Nouri., 2022).

#### 3-1-Activité antifongique

L'évaluation de l'efficacité des hydrolats provenant de différentes sources, contre les champignons phytopathogènes fait l'objet de certains travaux. Une étude a montré l'inhibition totale de certains champignons, notamment *Aspergillus niger* et *Penicillium expansum* par les hydrolats de deux plantes aromatiques (Poli, 2018). Des hydrolats d'autres plantes aromatiques se sont révélées efficaces contre la levure *Candida*, provoquant une perte de perméabilité membranaire et une altération de ses fonctions mitochondriales (Marino et al., 2020).

#### 3-2-Activité antibactérienne

Les hydrodistillats (HD) démontrent une activité antibactérienne attribuable à la présence de certaines molécules telles que le géraniol, le linalool et l'alcool (Bouhenni et Bensliman, 2021). Les hydrolats de plusieurs espèces végétales telles que *Pimpinella anisum* (anis vert), *Cuminum cyminum* (cumin), *Satureja hortensis*, *Thym braspicata* et *Origanum vulgare* ont montré une activité antibactérienne significative contre les bactéries pathogènes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris* (Belabbes, 2018).

### 3-3- Activité antivirale

Les virus sont particulièrement sensibles aux composés aromatiques (**Bouchaale et al., 2015**). Ce qui explique l'utilisation des huiles essentielles dans le traitement de certaines maladies infectieuses d'origine virale telles que la grippe.

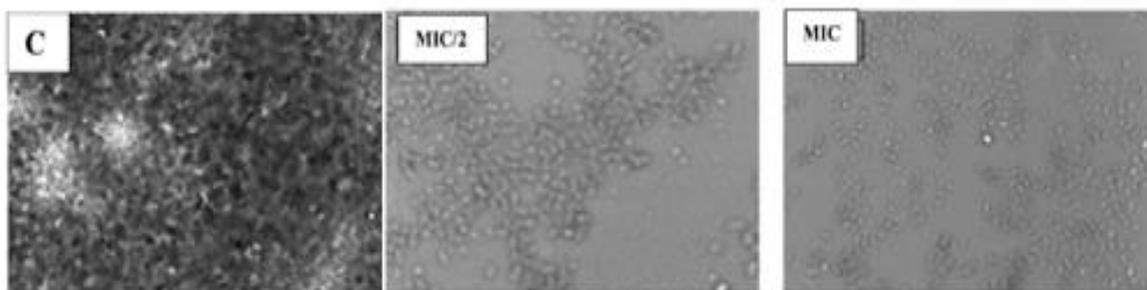
Concernant les hydrolats, une activité antivirale a été constatée chez divers hydrolats issus de la distillation des plantes aromatiques récoltées dans la région de Tlemcen, à savoir, le thym, la lavande, et l'eucalyptus. Ces hydrolats, utilisés en spray se sont révélés efficaces dans la protection contre la transmission de l'infection COVID 19, lorsqu'ils étaient pulvérisés sur les mains et les visages du médecin et des patients traités (**Dr. Saidi, Communication personnelle**).

### 3-4-Activité antibiofilm

#### 3-4-1-Activité antibiofilm des huiles essentielles

Les produits naturels font partie des nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms, sachant la résistance notable de ces derniers aux agents antimicrobiens conventionnels tels que les antiseptiques, les désinfectants et les antibiotiques (**Malek, 2019**). Parmi les produits naturels issus des plantes, les effets antibiofilms sont attribués aux huiles essentielles plutôt qu'aux extraits végétaux ou aux hydrolats. En effet, de nombreux travaux ont montré l'efficacité des huiles essentielles dans l'inhibition de la formation de biofilms ainsi que dans leur éradication (**Niu et Gilbert, 2004 ; Benaissa et al., 2024**).

Contrairement à la plupart des agents antimicrobiens, les huiles essentielles ont la capacité d'agir directement sur les biofilms déjà formés, en solubilisant leur matrice extracellulaire et en diffusant à travers celle-ci (**Boucif et Boudia.,2022**). A titre d'exemple, la figure 12 montre les perturbations morphologiques causées par une huile essentielle à l'architecture d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 12:** Effet de l'huile de *Cystus munbyi* sur la structure d'un biofilm de 48 h de *P. aeruginosa* (Adapté de Benaissa et al., 2024).

C : biofilm témoin, les deux autres images montrent des biofilms traités avec l'huile essentielle aux concentrations égales aux valeurs de la CMI/2 et de la CMI respectivement

### 3-4-2- Activité antibiofilm des hydrolats

Contrairement aux huiles essentielles, l'activité antibiofilm des hydrolats est peu documentée et même controversée. En effet, une réduction significative de la formation de biofilms a été observée avec l'hydrolat du clou de girofle, non concentré alors que le même hydrolat concentré augmente leur formation (Silha et al., 2020).

### 3-4-3- Les formulations désinfectantes à base de produits naturels

Des recherches sont nécessaires pour trouver de nouvelles molécules antibiofilm ou pour améliorer l'efficacité de celles qui existent. En effet, la combinaison des produits naturels avec des ingrédients chimiques, améliore l'efficacité antimicrobienne des formulations désinfectantes ainsi obtenues (Valeriano et al., 2012, Chai et al., 2016). A titre d'exemple, la combinaison de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* avec NaOH, l'acide nitrique ou l'acide acétique a amélioré l'élimination du biofilm de *B. cereus* (Kalai et al., 2018).

Ces formulations respectent les exigences de l'industrie agroalimentaire en termes de sécurité et d'efficacité, tout en utilisant des produits naturels et biodégradables. Quelques exemples des formulations qui existent sur le marché sont cités.

- ❖ Désinfectant à l'alcool et huiles essentielles
- ❖ Nettoyant désinfectant à base d'huiles essentielles
- ❖ Solution désinfectante à base de thymol
- ❖ Désinfectant à base de vinaigre blanc et d'huiles essentielles
- ❖ Désinfectant à base de citron, bicarbonate de soude et huile essentielle d'eucalyptus

---

---

# **Matériel et Méthodes**

---

---

Notre travail expérimental a été réalisé dans les laboratoires pédagogiques en particulier ceux des pôles de Génétique et de Microbiologie de la Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen. L'objectif de ce travail expérimental est de déterminer les effets antimicrobiens et anti biofilm des hydrolats et des huiles essentielles extrait de certaines plantes aromatiques ainsi que leur efficacité dans le processus de nettoyage des surfaces agroalimentaires.

### 1. Obtention des huiles essentielles et des hydrolats

#### 1.1. Matériel végétal frais

Dans cette étude, nous avons utilisé les huiles essentielles et les hydrolats extraits à partir des feuilles des plantes suivantes : Romarin, lavande, eucalyptus qui ont été récoltées à la région de Sebdou et Ghazaouet, wilaya de Tlemcen. L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation au niveau de Laboratoire des produits naturels LAPRONA, de l'université de Tlemcen, sous la direction du Pr. Bekhechi.

#### 1.2. Procédé d'extraction par hydrodistillation

Les feuilles des plantes sont cueillies, séchées à l'ombre et hachées en petits morceaux. Les huiles essentielles (HE) et les hydrolats (HD) des feuilles séchées ont été extraits à l'aide d'un hydro distillateur de type Clevenger (Figure 13)



**Figure 13** : Photo représentant l'appareil d'hydrodistillation de type Clevenger, utilisé dans ce travail

Dans cette opération, une masse de 300 g de matière végétale est placée dans un ballon en verre avec de l'eau distillée. Le mélange est chauffé jusqu'à ébullition pendant 3 heures. Les huiles essentielles (HE) sont alors entraînées par la vapeur d'eau dans une colonne de refroidissement où elles se condensent. Le distillat, contenant à la fois les huiles essentielles (HE) et les hydrolats (HD), est récupéré dans une ampoule à décanter, où la séparation se fait par différence de densité.

Après que le liquide ait reposé (décantation), les huiles essentielles sont récupérées et conservées dans des flacons en verre opaques, hermétiquement fermés, à une température de 4°C dans un réfrigérateur, selon le protocole décrit par Bouhenni et Benslimane (2021).

### 1.3. Les hydrolats conditionnés et conservés

En plus des hydrolats fraîchement extraits au laboratoire, nous avons également déterminé l'activité antimicrobienne des hydrolats extraits, de manière artisanale, à partir de la lavande et du thym, par Dr. Saidi (médecin généraliste). Ces hydrolats conditionnés en des flacons de 100 ml (figure 14) et conservés à température ambiante pendant plus d'une année, ont fait l'objet de divers usages thérapeutiques. Ces hydrolats à usage médical nous ont été fournis gracieusement par Dr. Saidi.



**Figure 14** : Hydrolats à usage médical conservés une année à la température ambiante

## 2. Analyse microbiologique et isolement des souches bactériennes

Dans le but d'isoler des souches bactériennes environnementales, destinées à l'étude de l'activité antimicrobienne et antibiofilm des hydrolats, nous avons procédé à l'analyse microbiologique de l'air ambiant et de la surface des paillasses du laboratoire pédagogique. L'analyse microbiologique a porté sur la recherche de la flore aérobie mésophile totale, ou germes totaux (GT) et les levures et moisissures dans le cas de l'air ambiant. L'analyse microbiologique a été élargie à la recherche des entérobactéries et des staphylocoques dans le cas des paillasses. Les hydrolats médicaux ont également fait l'objet d'un contrôle de leur qualité microbiologique après un stockage d'une année à la température ambiante (tableau 03).

**Tableau 3** : Analyse microbiologique de l'air ambiant, des paillasses et des hydrolats médicaux

	<b>Germes totaux</b>	<b>Entérobactéries</b>	<b>Staphylocoques</b>	<b>Levures et moisissures</b>
<b>Air ambiant</b>	x			x
<b>Surface des paillasses</b>	x	x	x	x
<b>Hydrolats médicaux</b>	x	x	x	x
<b>Milieux de cultures</b>	PCA	MacConkey	Chapman	PDA
<b>Température d'incubation</b>	30°C	37°C	37°C	25°C

## 2.1. Isolement à partir de l'air ambiant

Dans diverses zones du laboratoire de microbiologie, des boîtes de pétri contenant du milieu PDA et PCA sont laissées ouvertes à l'air pendant 30 minutes. Les microorganismes se déposent sur la boîte par gravité pendant cette période. Celles-ci sont incubées à 30°C pendant 24 à 72 heures afin de permettre aux microorganismes de se développer. Il est crucial d'utiliser des boîtes de pétri contenant une quantité adéquate de gélose pour éviter le dessèchement et le durcissement. Ensuite, nous identifions les colonies microbiennes qui se forment à la surface du milieu.

## 2.2. Isolement à partir des surfaces

Nous prélevons des échantillons de la surface des paillasses dans notre laboratoire de pédagogie. Pour cela, une solution de 5 ml d'eau physiologique peptonnée (TSE) a été préparée pour chaque tube, contenant un agent neutralisant le Tween 80 à 0,3 %. Après avoir humidifié l'écouvillon dans cette solution, nous raclons aseptiquement une zone délimitée à l'aide d'un guide stérile de 4 cm<sup>2</sup>, assurant ainsi un prélèvement de superficie uniforme. Les écouvillons sont ensuite remis dans les tubes de manière aseptique, puis soumis à une agitation au vortex, selon le protocole décrit in **BENHAMOU (2020)**.

### 2.2.1. Ensemencement en surface

L'ensemencement se fait en surface des milieux coulés dans les boîtes de Pétri. À l'aide d'une micropipette de 100 µl, nous déposons 0,1 ml de la solution dans les boîtes de Pétri préparées contenant le milieu gélosé. Nous étalons uniformément cet inoculum sur la gélose à l'aide de pipettes pasteur en forme de râteau.

### 3. Identification et caractérisation des isolats

#### 3.1. Critères morphologiques

L'étude des caractères morphologiques repose sur des observations macroscopiques et microscopiques (x100) pour différencier l'aspect des colonies sur boîtes de Pétri, le type de Gram, la forme cellulaire ainsi que la disposition et la mobilité des cellules bactériennes (isolées ou regroupées).

##### 3.1.1. Examen macroscopique

L'aspect des colonies est observé à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire. Les caractéristiques morphologiques des colonies développées sur les milieux gélosés sont notées.

- ✚ La taille : colonies petites (< 1 mm), moyennes (1,5 à 3 mm), grosses (> 3 mm)
- ✚ La forme : Bombée, plate, ombiliquée, surélevée
- ✚ Le contour : à bords circulaire, irrégulières et parfois envahissantes, déchiquetées et parfois envahissantes
- ✚ Elévation de la colonie : convexe, légèrement convexe, plate
- ✚ L'opacité : opaque, translucide, transparente.
- ✚ Pigmentation

Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses le plus souvent pigmentées.

##### 3.1.2. Examen microscopique

###### • Coloration de Gram

La méthode de coloration de Gram, mise au point par Hans Christian Joachim Gram en 1884, consiste à traiter un échantillon bactérien de la manière suivante :

- D'abord, le cristal violet est appliqué pendant une minute, suivi par deux traitements avec une solution de Lugol pendant 30 secondes chacun.
- Ensuite, les lames sont décolorées avec de l'éthanol à 95°C pendant 5 à 10 secondes, puis rincées à l'eau distillée.

- Enfin, la fuchsine est appliquée pendant une minute. Les bactéries sont observées à l'immersion avec un objectif 100x.

✚ Les bactéries "Gram négatives" apparaissent roses, tandis que les "Gram positives" sont violettes.

### • Coloration au bleu coton

Pour observer les moisissures au microscope, il faut préparer un montage en plaçant une lame et une lamelle, en commençant par déposer une solution de montage appelée "bleu coton". Nous avons utilisé le protocole décrit in **(Benallal et Benazzouz,2023)** et qui consiste à prélever le mycélium avec du ruban adhésif transparent dans une boîte de Pétri, puis de le coller sur la lame. Les observations sont ensuite effectuées au microscope optique à un grossissement de  $\times 40$ .

## 4. Conservation des souches

La préparation de tubes de gélose inclinée peut être réalisée en utilisant des tubes en verre stériles. Dans chaque tube, 7 mL de gélose fondue sont introduits. Une fois la gélose solidifiée, une colonie de chaque souche estensemencée sur la surface inclinée en utilisant une technique de stries, puis les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures pour favoriser la croissance bactérienne. Après l'incubation, les tubes peuvent être conservés au réfrigérateur à 4°C.

## 5. Détermination de l'activité antimicrobienne des hydrolats et des huiles essentielles

### 5.1. Préparation des précultures

Les précultures sont préparées dans 5ml de bouillon cœur-cerveau (BHIB) et incubées à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 18 à 24 h. Après incubation, la densité optique des cultures est déterminée à 580 nm dans un colorimètre, puis elle est ajustée (D.O) comprise entre 0,6 - 0,8.

## 5.2. L'aromatogramme ou méthode de diffusion en milieu gélosé

### ➤ Principe

C'est une technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'HE et de l'HD. Cette méthode a le même principe que l'antibiogramme (permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'HE et l'HD sur la souche étudiée), sauf que les disques des antibiotiques sont remplacés par papier Whatman n°1, imprégnés d'HE et d'HD d'une concentration donnée, et l'activité de notre HE et HD sera évaluée par la mesure du diamètre d'inhibition autour des disques tel que décrit dans la littérature (**Bouhenni et Benslimane., 2021**).

### ➤ Ensemencement

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé. Il consiste à tremper un écouvillon de coton stérile dans la suspension puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, à trois reprises sur la totalité de la surface gélosée (gélose Muller Hinton) de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum.

### ➤ Dépôt des disques

Des disques de papiers Whatman de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés sont déposés à la surface de la gélose Muller-Hinton après avoir été chargé de 10µl d'huile essentielle et d'autres par l'hydrolat. D'autres disques, sont utilisés comme témoins (l'eau distillé stérile ; désinfectant ; NaOH). Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré.

## 6. Détermination de l'activité antibiofilm des hydrolats

Les hydrolats ayant montré une action inhibitrice à l'égard des souches bactériennes testées ont été utilisés pour la désinfection d'une surface contaminée par le biofilm. Pour cela des biofilms expérimentaux ont été préparés *in-vitro* sur une surface en verre et soumis à l'action des hydrolats. L'activité anti biofilm des hydrolats est déterminée par deux techniques :

- Coloration des biofilms traités au cristal violet et observation au microscope en comparaison avec des biofilms témoins obtenus dans les mêmes conditions.
- Dénombrement des bactéries survivantes au traitement par les hydrolats et calcul de la réduction logarithmique.

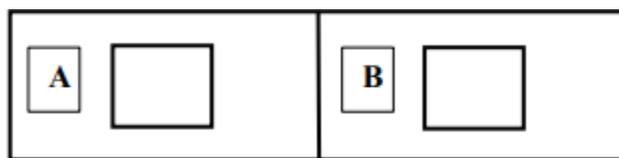
## 6.1. Obtention de biofilms *in-vitro*

### 6.1.1. Préparation des cultures bactériennes

Des colonies bactériennes sont prélevées à partir des cultures conservées à l'aide d'une anse de platine. Ces colonies sont ensuite introduites dans des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) et incubées pendant 24 heures à 37 °C afin de les enrichir. Après incubation les DO sont mesurées et ajustées à une valeur entre 0,6 -0,8 .

### 6.1.2. Préparation des lames en verre

Selon la méthode de Maris (1992), des biofilms sont cultivés sur des lames en verre destinées à la microscopie. Ensuite, ils sont colorés avec du cristal violet en suivant le protocole établi par Malek (2023). Pour ce faire, les lames sont divisées en deux parties égales et chacune est marquée au centre par un carré de 2 cm de côté, puis stérilisée, selon le protocole décrit in (Benallal et Benazzouz, 2023).



**Figure 15** : Adhésion et formation de biofilm sur les lames de microscopie en verre

**A** : Biofilm témoin

**B** : Biofilm traité

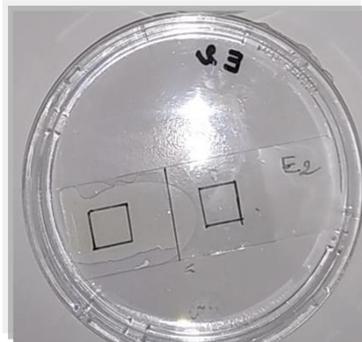
### 6.1.3. Adhésion et formation de biofilms sur les lames en verre

#### ✚ Adhésion

Les lames sont placées dans des boîtes de Pétri stériles. En utilisant une micropipette, 100  $\mu$ L de la suspension de culture bactérienne préalablement préparée sont prélevés. Cet inoculum est ensuite déposé au centre d'un carré tracé sur la lame, puis incubé dans une étuve saturée en humidité pendant 2 heures, favorisant l'adhérence des cellules à la surface de la lame en verre.

#### ✚ Formation de biofilm

Après l'incubation, les lames sont rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules faiblement attachées. En utilisant la micropipette, 100  $\mu$ L du milieu TSB sont ajoutés, pour permettre la multiplication des cellules et la formation de biofilm. L'ensemble est ensuite incubé à 37°C pendant 24 heures dans une atmosphère saturée en humidité. (Figure 16)



**Figure 16** : Formation de biofilm sur les lames en verre

### 6.2. Traitement des biofilms par les hydrolats

Les biofilms de 24 h formés sur les lames en verres sont rincés à l'eau distillée stérile trois fois pour éliminer les cellules non adhérentes, suivies d'une période de séchage de 10 à 15 minutes. Ensuite, le désinfectant est ajouté sur le biofilm traité (carré à droit), laisser agir 30 à 40 min. A l'issue de ce temps verser le produit. Suivi d'un autre rinçage à l'eau distillée et d'une nouvelle période de séchage.

A ce stade, les biofilms sont traités différemment selon la technique de révélation de l'activité antibiofilm des hydrolats

### 6.2.1. Caractérisation microscopique de l'effet antibiofilm des hydrolats

Pour la microscopie, le cristal violet est ajouté au biofilm, laissé agir puis rincer à l'eau distillée stérile. Enfin, les lames sont examinées au microscope optique à un grossissement de  $\times 100$  en utilisant l'huile à immersion.

### 6.2.2. Dénombrement des cellules survivantes en biofilm

Utiliser deux écouvillons stériles et humidifiés pour prélever les échantillons de formation de biofilms qui se trouve dans chaque carreau sur la lame. Transférer les écouvillons dans des tubes à hémolyse contenant de l'eau physiologique puis agiter au vortex pour la dispersion des échantillons. Ensuite, Préparer des dilutions décimales des échantillons et ensemercer la surface du milieu TSA ou PCA avec les dilutions préparées, puis incubé pendant 24 heures. Procéder ensuite au dénombrement des boîtes en utilisant les colonies formées pour calculer les valeurs de  $N_0$  et  $N$  (Malek, 2019)

$$\text{Log}(N_0/N) = \log N_0 - \log N$$

$N_0$  : nombre des microorganismes témoin en UFC/ ml

$$N_0 = (n / d \times v)$$

$N$  : nombre des microorganismes survivant de biofilm traité en UFC/ml

$$N = (n / d \times v)$$

$n$ : nombre des colonies dénombrées.

$v$ : Volume prélevé.

$d$  : Dilution .

---

## **Résultats et Discussion**

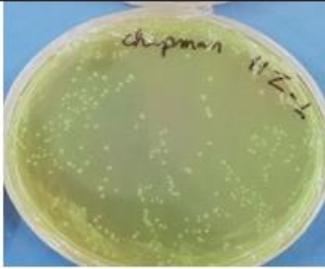
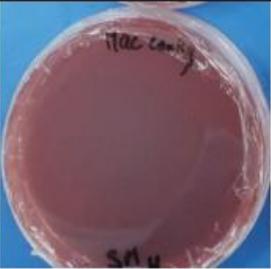
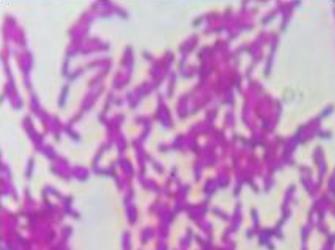
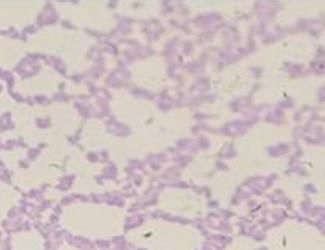
---

## 1-Résultat de l'analyse microbiologique de l'environnement de laboratoire

### 1-1-La flore de contamination de la surface des paillasses

Les résultats obtenus après l'analyse microbiologique des surfaces des paillasses du laboratoire sont montrés dans le **tableau 04**.

**Tableau 4** : Dénombrement et morphologie cellulaire de la flore de contamination des paillasses

Milieux de cultures	PCA	Chapman	MacConkey
Le nombre de colonie	Indénombrable	165	00
Aspect des colonies sur milieu gélosé			
Morphologie cellulaire			

Sur le milieu **PCA**, un nombre important de colonies a été observé, indiquant une présence significative de bactéries hétérotrophes totales, qui peuvent inclure diverses espèces bactériennes, à la surface testée. Les germes totaux sont des indicateurs de l'hygiène globale et leur nombre est soumis à des normes. Ce sont essentiellement des germes d'altération mais peuvent héberger des pathogènes (**Gassama, 2002 ; Rezak, 2023**).

Sur le milieu **Chapman**, qui est sélectif pour les staphylocoques, **165** colonies ont été dénombrées. Cela indique une contamination notable par ces bactéries, ce qui est préoccupant car certaines espèces, comme *S. aureus*, peuvent être pathogènes et résister à certains agents de nettoyage couramment utilisés (**Landgraf et Destro, 2013 ; Boumedjirek et Boukraa, 2020**). En revanche,

sur le milieu **MacConkey**, **aucune** colonie n'a été observée. Le milieu MacConkey est sélectif pour les bactéries Gram-négatives, en particulier les entérobactéries. L'absence de colonies sur ce milieu suggère que les surfaces testées ne sont pas contaminées par ces types de bactéries, ou que les niveaux de contamination sont en dessous du seuil de détection.

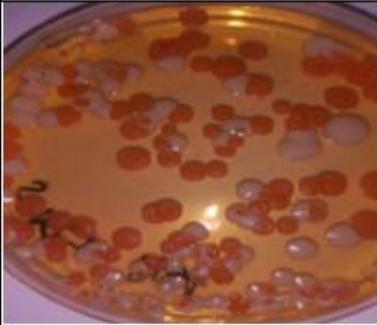
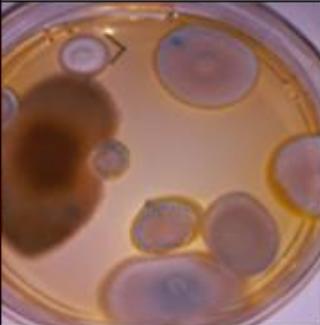
La contamination de la surface des paillasses par les germes totaux et les Staphylocoques indique une insuffisance dans les mesures d'hygiène appliquées et suggère que les mesures de désinfection et de nettoyage doivent être revues et potentiellement renforcées. Comme souligné dans la littérature, pour éliminer le maximum de produits organiques, de poussières et de salissures, il est nécessaire de nettoyer les surfaces (propreté visuelle ou macroscopique), afin de les désinfecter de manière efficace.

### 1-2-La flore de contamination de l'air ambiant

Les taux de contamination de l'air ambiant (**tableau 05**) montrent un nombre de 127 colonies pour les levures. En ce qui concerne les champignons filamenteux, le nombre de colonies obtenues sur le milieu PDA après 48 heures d'incubation varie de 7 à 10 colonies par boîte. Ce résultat pourrait s'expliquer par un temps d'incubation insuffisant pour la croissance optimale des champignons filamenteux, alors que les levures ont été détectées sur milieu PCA après 48 heures d'incubation. L'identification des champignons repose sur les caractères morphologiques. Deux types de colonies, pigmentées et non pigmentées dominent la surface des boîtes de pétri. D'après l'encyclopédie universelle, les colonies blanches crémeuses et brillantes et les colonies rouge-saumon sont caractéristiques des genres *Candida* et *Rhodotorula*, respectivement. La pigmentation est due à la présence de caroténoïdes chez cette dernière levure.

Le nombre de champignons filamenteux isolé à partir de l'air ambiant est plus faible que celui des levures. Toutefois, la diversité morphologique montrée par les moisissures est plus importante que celle des levures observées sur milieu PCA. La prolifération courante des moisissures survient lorsque l'humidité est excessive, un exemple typique étant celui du *Penicillium* (**Emmons et al., 1977**). Alors que les concentrations de bactéries présentes dans l'air demeurent faibles comparativement à celles des moisissures (**Bauer et al., 2002**). Ces résultats indiquent que l'air ambiant constitue une source de contamination par les levures et les champignons filamenteux.

**Tableau 5** : Dénombrement et morphologie cellulaire de la flore de contamination de l'air ambiant

Milieux de cultures	PCA	PDA	
Le nombre de colonie	127	10	07
Aspect Macroscopique			
Aspect microscopique			
Le nom de champignon	<p>Colonie Blanches : <i>Candida</i> *</p> <p>Colonie rouge saumon : <i>Rhodotorula</i>*</p>	<i>Alternaria</i> **	<i>Penicillium</i> ***

\*Orientation à partir de <https://www.universalis.fr/encyclopedie/levures/2-principaux-types-et-classification/> (Encyclopedia universalis).

\*\*Orientation à partir de **Blancard (2014)**

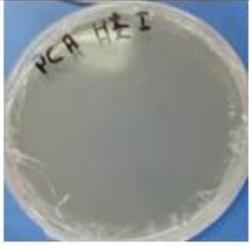
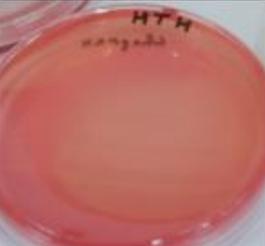
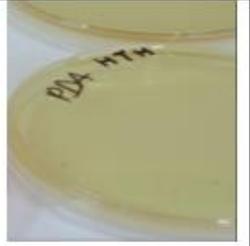
\*\*\*Orientation à partir de <https://fr.dreamstime.com/moisissure-p%C3%A9nicillium-microscope-vue-d-genre-champignon-micromicroscopie-en-laboratoire-imagerie-image203044424>

## 2-Résultats du contrôle microbiologique des hydrolats médicaux

Comme le montre le tableau 06, à l’issue du contrôle microbiologique des hydrolats médicaux, aucune croissance microbienne n’a été observée sur les différents milieux de culture. Ce qui indique que les hydrolats ne présentent aucune contamination microbienne malgré la longue période de conservation à la température ambiante.

Par conséquent, les hydrolats médicaux analysés présentent une bonne qualité microbiologique et sont conformes aux normes de sécurité microbiologique, puisqu’aucun pathogène n'a été détecté.

**Tableau 6** : Résultats du contrôle microbiologique des hydrolats médicaux

Milieux de cultures	PCA	MacConkey	Chapman	PDA
Le nombre de colonie	00	00	00	00
Aspect des colonies sur milieu gélosé				

## 3-Résultat de l’aromatogramme des hydrolats et des huiles essentielles

### 3-1- Activité antimicrobienne des hydrolats et des huiles essentielles

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (HE) et de l'hydrolat sont présentés dans le **tableau 7**. Ces résultats montrent que les produits naturels testés n'exercent aucune activité antimicrobienne sur la majorité des souches bactériennes analysées. Les huiles essentielles de romarin et de lavande ainsi que leurs hydrolats sont actifs uniquement sur deux souches et une souche d'*Enterobacter* respectivement. Néanmoins, il est intéressant de remarquer que les diamètres d’inhibition dans le cas des hydrolats sont égaux (30 vs 30 mm) voire même supérieurs (32 vs 16 mm) à ceux des huiles essentielles correspondantes. Quant à l’eucalyptus aucune activité

antimicrobienne n'est enregistrée aussi bien pour son huile essentielle que pour son hydrolat. Ce qui implique que les hydrolats peuvent être complètement dépourvus d'activité antimicrobienne. Ils peuvent aussi exercer la même activité antimicrobienne que les huiles essentielles dont ils sont issus ou même être plus actifs. D'après Di Vito et al. (2021), les substances volatiles contenues dans les hydrolats sont plus efficaces que leurs huiles essentielles pour inhiber la croissance microbienne car elles sont actives à des concentrations plus faibles. Marino et al. (2020), ont également montré que l'hydrolat de *Coridothymus capitatus* a donné une bonne activité antimicrobienne contre les bactéries et les levures analysées.

**Tableau 7 :** Résultats de l'activité antimicrobienne des produits naturels

Produits naturels	Huiles essentielles (HE) (Diamètres des zones d'inhibition en mm)			Hydrolats (H) (Diamètres des zones d'inhibition en mm)		
	Romarin (HER)	Eucalyptus (HEC)	Lavande (HEV)	Romarin (HR)	Eucalyptus (HC)	Lavande (HV)
Plantes						
Souches						
<i>Entérobacter</i> (R15)	34	00	15	00	00	00
<i>Entérobacter</i> (R14)	30	00	16	30	00	32
<i>S. aureus</i> (sa.50)	00	00	00	00	00	00
<i>P. aeruginosa</i> (Pa1)	00	00	00	00	00	00
<i>E. coli</i> (E2)	00	00	00	00	00	00
<i>E. coli</i> (E3)	00	00	00	00	00	00
<i>Entérobacter</i> (ERF)	00	00	00	00	00	00

On peut conclure que l'absence d'activité antimicrobienne des hydrolats testés dans notre étude, peut s'expliquer par l'absence de molécules bioactives dans l'huile essentielle correspondante ou par sa faible concentration dans l'hydrolat lorsqu'elle existe. De même, la variabilité des résultats

peut être attribuable à l'influence de divers facteurs, notamment les types de microorganismes testés, les hydrolats et les huiles essentielles employées (Pattanaik et al.,1996).

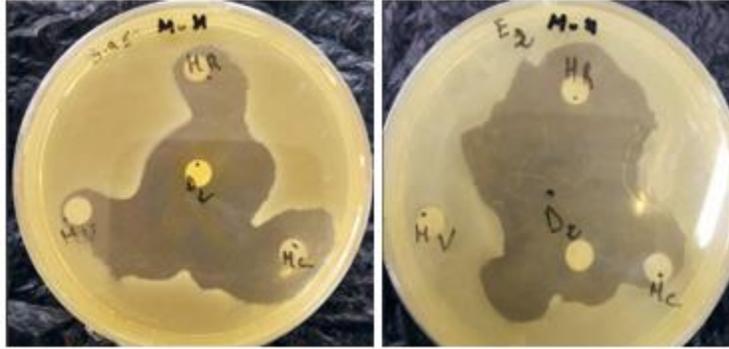
### 3-2- Résultats de l'activité antimicrobienne des formulations désinfectantes à base d'hydrolats

#### 3-2-1- Activité antimicrobienne des combinaisons des hydrolats avec un désinfectant industriel

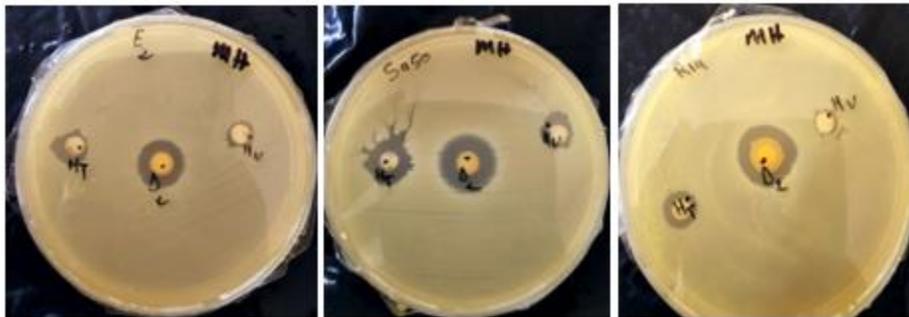
Les résultats de l'activité antibactérienne des combinaisons des hydrolats avec le désinfectant industriel sont présentés dans le **tableau 08** et **Figure 17** et **18**.

**Tableau 8** : Activité antimicrobienne des combinaisons des hydrolats avec le désinfectant industriel à 1%

Souches	Les combinaisons d'hydrolats avec le désinfectant industriel (DI) (Diamètre d'inhibition en mm)			DI
	(HR-DI)	(HC-DI)	(HV-DI)	
<i>Entérobacter</i> (R15)	00	<b>20</b>	<b>14</b>	<b>45</b>
<i>Entérobacter</i> (R14)	00	<b>20</b>	<b>14</b>	<b>40</b>
<i>S. aureus</i> (sa.50)	<b>28</b>	<b>40</b>	00	<b>52</b>
<i>P. aeruginosa</i> (Pa1)	<b>22</b>	00	00	<b>39</b>
<i>E. coli</i> (E2)	<b>42</b>	00	00	<b>62</b>
<i>E. coli</i> (E3)	<b>32</b>	00	00	<b>52</b>
<i>Entérobacter</i> (ERF)	00	00	00	<b>44</b>



**Figure 17** : Les zones d'inhibition de la croissance d'*E.coli* (E2), et *S. aureus* (Sa.50), sous l'action des combinaisons d'hydrolats avec le désinfectant industriel à 1%.



**Figure 18** : Activité antimicrobienne du désinfectant industriel sur *Entérobacter* (R14) *S. aureus* (sa.50) et *E. coli* (E2)

Comme le montre le tableau 08, le désinfectant industriel non dilué exerce une forte action inhibitrice sur toutes les souches testées. Les diamètres d'inhibition varient de 39 à 62 mm. Par contre lorsqu'il est dilué dans les différents hydrolats son activité diminue considérablement, de plus que la moitié dans le cas de la lavande (45 vs 14 mm) voire elle s'annule à l'égard de la majorité de souches testées. Les souches sensibles telles que *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli* montrent des zones d'inhibition dont les diamètres varient de 22 à 42 mm et qui sont nettement inférieurs à ceux du désinfectant testé seul.

Il semblerait que la réduction de l'activité antimicrobienne du désinfectant mélangé à l'hydrolat est non seulement due à l'effet de la dilution mais également à un effet antagoniste potentiel de l'hydrolat. En revanche, des effets synergiques sont obtenus avec les combinaisons des huiles essentielles avec divers agents antimicrobiens chimiques, tels que rapporté dans la littérature

scientifique (Valeriano et al., 2012 ; Chai et al., 2016 ; Kalai et al., 2018). On peut conclure que la combinaison dans certains cas améliore l'activité mais dans notre cas il y a un effet antagoniste, l'hydrolat diminue l'efficacité de désinfectant.

### 3-2-2 Activité antimicrobienne des combinaisons des hydrolats avec NaOH

Dans le tableau 09 et la figure 19 et 20, les résultats d'étude des combinaisons d'hydrolats de lavande, romarin, et eucalyptus avec une solution de NaOH à 1% ont révélé des activités antibactériennes semblables à celle du produit chimique testé seul : (32 et 34 vs 38 mm) et (36 vs 38 mm) pour les hydrolats d'eucalyptus et de romarin respectivement. Ces résultats semblent indiquer un effet neutre puisque la dilution dans les hydrolats n'a pas affecté l'activité antimicrobienne de NaOH. Ce qui n'est pas le cas de la combinaison avec l'hydrolat de lavande, qui a complètement annulé l'effet de NaOH puisqu'aucune inhibition n'a été observée. Ces résultats suggèrent une faible activité antibactérienne des combinaisons de NaOH avec les hydrolats de romarin et de lavande, tandis que l'hydrolat d'eucalyptus n'a pas montré d'effet notable.

On peut conclure que la variabilité des résultats pourrait être attribuée aux différences de composition chimique des hydrolats et à leurs interactions avec NaOH qui ont donné des effets antagonistes ou neutres.

**Tableau 09:** Activité antimicrobienne des combinaisons des hydrolats avec NaOH à 1 %

Souches	Les combinaisons d'hydrolats avec NaOH (N) (Diamètre d'inhibition en mm)			NaOH
	(HR-N)	(HC-N)	(HV-N)	
<i>S. aureus</i> (sa.50)	00	00	00	00
<i>E. coli</i> (E2)	00	32	00	38
<i>E. coli</i> (E3)	00	00	00	30
<i>Entérobacter</i> (ERF)	36	34	00	38



**Figure 19** : Les zones d'inhibition de la croissance d'*E. coli* (E3), et *Enterobacter* (ERF), sous l'action des combinaisons d'hydrolats avec NaOH à 1%.



**Figure 20** : activité antimicrobienne de NaOH sur *Entérobacter* (R15) ; *S. aureus* (sa.50) et *P. aeruginosa*.

### 4-Effet de la conservation sur l'activité antimicrobienne des hydrolats

#### 4-1- Activité antimicrobienne des hydrolats conservés à 4 °C

Après 2 mois de conservation des hydrolats fraîchement extraits des différentes plantes, nous avons testé leur effet antimicrobien sur les souches les plus sensibles. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 10, 11 et 12. D'après les résultats expérimentaux des activités antimicrobiennes des produits bruts, on peut constater que les hydrolats conservés ont perdu leur activité antimicrobienne.

**Tableau 10** : Activité antimicrobienne des hydrolats conservés à 4 °C

Produits naturels	<b>Hydrolats (H)</b> (Diamètres des zones d'inhibition en mm)		
Plantes	Romarin	Eucalyptus	Lavande
Souches	(HR)	(HC)	(HV)
<i>Entérobacter</i> (R15)	00	00	00
<i>Entérobacter</i> (R14)	00	00	00

### 4-2- Activité antimicrobienne des hydrolats médicaux conservés à température ambiante

Les hydrolats médicaux extraits, à partir de la lavande et du thym, sont conditionnés en des flacons de 100 ml et conservés à température ambiante pendant plus d'une année. L'évaluation de l'activité antimicrobienne de ces hydrolats a été réalisée également par la technique d'aromatogramme. Les volumes des extraits déposés sur les disques furent de 10 µl. Le témoin négatif utilisé fut l'eau distillée stérile et le témoin positif est constitué par le désinfectant industriel et NaOH. Selon les résultats obtenus dans le **tableau 11**, les souches testées sont complètement résistantes aux hydrolats de la lavande et du thym qui ne montrent aucun effet antimicrobien.

**Tableau 11**: Activité antimicrobienne des hydrolats médicaux conservés à température ambiante

Produits naturels	<b>Hydrolats (H)</b> (Diamètres des zones d'inhibition en mm)	
Plantes	Thym	Lavande
Souches	(HT)	(HV)
<i>Entérobacter</i> (R14)	00	00
<i>S. aureus</i> (sa.50)	00	00
<i>P. aeruginosa</i> (Pa1)	00	00
<i>E. coli</i> (E2)	00	00
<i>E. coli</i> (E3)	00	00
<i>Entérobacter</i> (ERF)	00	00

### 5-Résultats de l'activité antibiofilm des hydrolats

#### 5-1- Caractérisation microscopique des biofilms non traités (témoins)

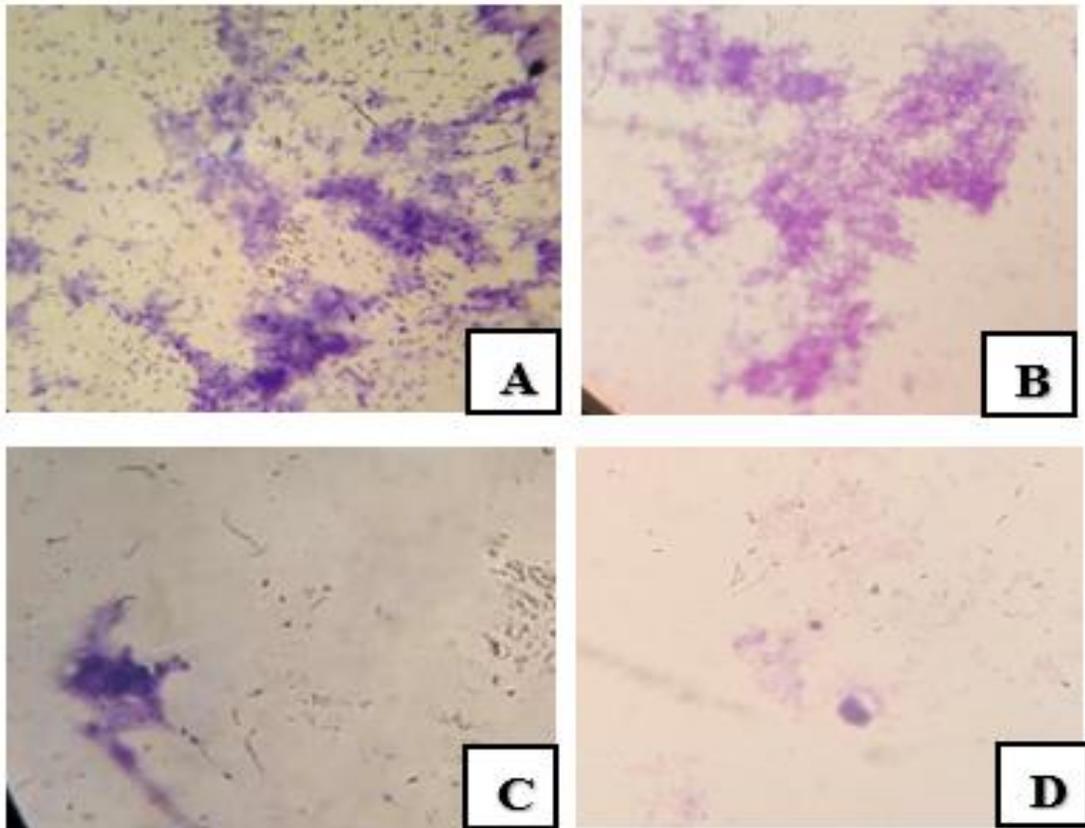
Après 24 d'incubation de croissance sur les lames en verre, les biofilms non traités ont été observés après la coloration au cristal violet. Les résultats expérimentaux sont illustrés dans la figure 21, qui montre des différences dans la morphologie des biofilms et leur stade de développement. Le biofilm de *E. coli* (Figure 21 -A) était en phase de dispersion active, indiquant le grand potentiel et la rapidité du processus de formation du biofilm chez cette souche. Il est possible de visualiser une cavité formée au centre du biofilm selon le processus de dispersion appelé dispersion par ensemencement ou central hallowing (Malek, 2016). La souche de *S. aureus* (Figure 21-B) a formé un biofilm qui est encore au début de son développement, ce qui traduit un processus d'adhésion et de croissance du biofilm plus lent que celui de *E. coli*. Ces données traduisent un grand potentiel de formation du biofilm chez les souches testées. La dispersion active a une grande signification en hygiène alimentaire, puisqu'elle est responsable de la recontamination du produit fini ou contamination croisée (Malek, 2019).

#### 5-2- Effet des combinaisons hydrolat-désinfectant sur les biofilms expérimentaux

##### 5.2.1. Caractérisation microscopique des biofilms traités

L'effet des combinaisons hydrolat-désinfectant sur la formation de biofilm a été évalué par le test au cristal violet sur les lames en verre. Les résultats de la caractérisation microscopique sont montrés dans la figure 21 (image C et D). Ces images illustrent respectivement la présence des débris cellulaires importants qui restent après l'élimination du biofilm. Ce qui indique que les formulations des combinaisons hydrolat-désinfectant ont permis une réduction importante des populations résiduelles adhérentes à la surface, entraînant l'élimination totale du biofilm. On peut dire que l'hydrolat combiné avec le désinfectant utilisé est très efficace contre la croissance planctonique (*E. coli* 42 mm diamètre d'inhibition et *S. aureus* : 28mm diamètre d'inhibition) et le biofilm de *E. coli* (image C) et *S. aureus* (image D).

La sensibilité de biofilm à la combinaison hydrolats-désinfectant est une bonne indication de son utilisation dans les programmes de contrôle et d'élimination de la biocontamination des surfaces.

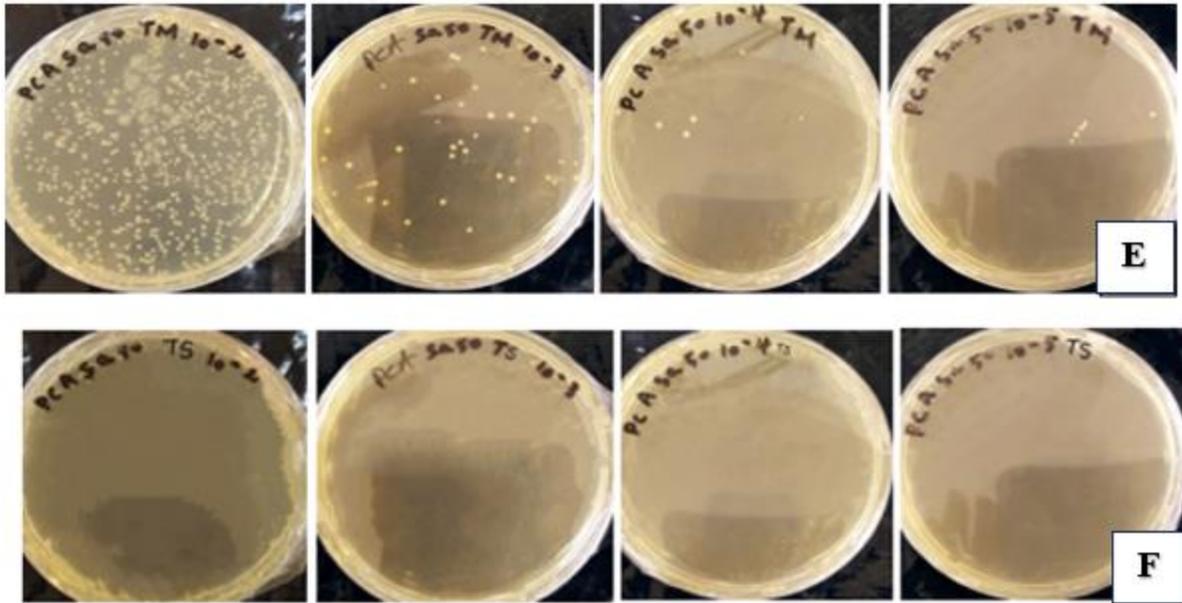


**Figure 21** : Caractérisation microscopique des biofilms formés par *S. aureus* et *E. coli*.

(A) et (B) : biofilms témoins, (C) et (D) : biofilms traités par le mélange hydrolat de lavande-désinfectant industriel.

### 5-2-2- Dénombrement des bactéries survivant au traitement

Après 24h d'incubation à 37°C, les colonies développées sont dénombrées. On détermine le nombre des germes avant le traitement témoin (Figure 22-E) et on détermine aussi le nombre des germes survivant du biofilm traité (Figure 22-F) , ensuite on calcule la réduction logarithmique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution. Comme le montre la figures 22, dans le cas de biofilm non traité on a trouvé  $4,8 \times 10^5$  UFC/ml, alors que dans le cas de biofilm traité par les hydrolats on trouve **0 UFC/ml** qui ne traduit aucun développement des colonies. Selon les résultats obtenus on peut conclure que le mélange hydrolat-désinfectant industriel a un effet létal total. Cet effet bactéricide est essentiellement dû à l'action du désinfectant industriel.



**Figure 22** : Dénombrement des bactéries du biofilm avant (E) et après (F) le traitement par le mélange hydrolat-désinfectant industriel.

**E** : Dénombrement des bactéries du biofilm avant le traitement

**F** : Dénombrement des bactéries du biofilm après le traitement

L'effet antibiofilm des hydrolats est très peu documenté. La seule référence que nous avons pu trouver sur ce sujet (**Silha et al., 2020**), a montré que parmi les nombreux hydrolats testés sur des espèces d'*Arcobacter*, seul l'hydrolat du clou de girofle a montré un effet antibiofilm. En effet ces auteurs ont trouvé qu'en présence des hydrolats non concentrés de cette plante, une formation de biofilm considérablement réduite a été observée. Cependant, avec l'hydrolat de clou de girofle concentré, il y a eu une augmentation de la formation de biofilms, de trois espèces d'*Arcobacter*. Par conséquent, cet effet antibiofilm controversé ne fait pas des hydrolats de bons candidats pour la désinfection des surfaces contaminées par les biofilms.

---

---

# Conclusion

---

---

Cette étude s'articule autour de deux axes principaux : l'isolement et l'identification des microorganismes présents dans l'environnement d'un laboratoire (air ambiant et surfaces) et l'évaluation de l'activité antimicrobienne et anti-biofilm des hydrolats d'huiles essentielles de plantes aromatiques (romarin, lavande, eucalyptus) contre les germes testés. La contamination de l'environnement du laboratoire d'analyse microbiologique par des microorganismes met en lumière la nécessité d'une hygiène rigoureuse des surfaces dans cet établissement.

L'isolement et l'identification des souches bactériennes ont révélé une contamination de l'environnement des laboratoires par des bactéries d'origine environnementale, telles que *Bacillus*, ainsi que par des bactéries d'origine humaine, notamment des *Staphylococcus*. L'analyse de l'air ambiant a également mis en évidence la présence de mycètes, soulignant ainsi l'importance de la contamination aéroportée. Les isolats fongiques identifiés comprenaient une grande diversité de champignons filamenteux, tels que les genres *Alternaria* et *Penicillium*, ainsi que des levures comme *Candida* et *Rhodotorula*.

Les résultats de l'aromatogramme ont montré que les hydrolats d'huiles essentielles testés n'ont présenté aucune activité antimicrobienne sur la majorité des souches bactérienne analysées, à l'exception d'une souche d'*Enterobacter* qui a été inhibée par les hydrolats de romarin et de la lavande. La combinaison des différents hydrolats avec des produits chimiques n'a pas amélioré l'effet des formulations ainsi obtenues. Au contraire elle a engendré un effet antagoniste avec un désinfectant industriel et un effet neutre avec NaOH.

Les résultats obtenus ont également montré l'absence d'activité antibiofilm des hydrolats et un fort potentiel de formation de biofilm chez la souche bactérienne testée. Ce qui peut diminuer l'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection et nécessite l'adoption de mesures d'hygiène antibiofilm.

Cette étude confirme l'efficacité antimicrobienne connue des huiles essentielles et souligne l'inefficacité des hydrolats analysés en tant qu'agent antimicrobiens. Toutefois, les hydrolats qui sont des sous-produits des procédés de distillation appliqués aux plantes aromatiques peuvent avoir d'autres activités biologiques et être valorisés. Pour cela, des investigations supplémentaires permettant d'explorer les différentes activités biologiques des hydrolats, notamment les activités antivirale, antioxydant, et antalgique, sont nécessaires.

---

---

## **Références bibliographiques**

---

---

1. **Aissi, A. K., Kouglbenou, S. D., Dougnon, V., Klotoe, J. R., Bankole, H., Deguenon, Y., ... & Loko, F. (2013).** Evaluation de la qualité sanitaire des poudres de feuilles de Moringa oleifera Lam. Commercialisées au profit des Personnes Vivant avec le VIH à Cotonou (Bénin). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(4), 1461-1473.
2. **Aissous, N. et Morsli, A. (2016).** Activité insecticide des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques et médicinales sur les pucerons verts : *Aphis pomi* (Mémoire de Master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed Sedik Ben Yahia JIJEL.
3. **Anonyme. (2021)** . Salmonelle : un risque toujours présent, des méthodes performantes et adaptées aux différents besoins
4. **Anonyme. (2020).** Microflore pathogènes et responsables d'altération des produits alimentaires.
5. **Baaziz, A.C. et Boulakzaz, A. (2018).** Validation d'un Procédé de nettoyage physico-chimique et microbiologique d'une cuve de mélange "forme liquide" (Mémoire de master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine.
6. **Bammou, H. Mellouki, I. Tlajit, Z. (2022).** Extraction et activité antioxydante des huiles essentielles de la plante *Ruta chalepensis* L (Mémoire de Master). Faculté des Sciences et de la Technologie, Université Ahmed Draïa-Adrar.
7. **Baudin, M. (2017).** Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms (Doctoral dissertation, Université Paris Saclay (COMUE)).
8. **Bauer H, Hitzenberger, R., Giebl, H., Kasper-Giebl A, Löflund, M., Puxbaum, H. et Zibuschka, F. (2002).** The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmospheric Research*, 64, 109-19.
9. **Belbessai, N. (2016).** Approche de modélisation de l'extraction des huiles essentielles basée sur les phénomènes de surface. Application des cinétiques du premier et second ordre (Mémoire de Master). Département du Génie Chimique Laboratoire de Valorisation des Energies Fossiles, Ecole Nationale Polytechnique.
10. **Benallal, K.F. et Benazzouz, N. (2023).** Evaluation de la qualité microbiologique des équipements après application du système de nettoyage et désinfection dans une laiterie de la wilaya de Tlemcen (Mémoire de master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubekr belkaid, Tlemcen.

## Références bibliographiques

---

11. **Benchachoua,R. et Simoud, A .(2021).**Etude théorique sur l'activité antibactérienne et antioxydant des extraits (Huile essentielle et hydrolat) de *Salvia officinalis* (Mémoire de master).Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine.
12. **Bendahman,M.et Bougueroudjs,S.( 2021).**Efficacité de produits de nettoyage et désinfection contre les bactéries dans une entreprise fromagerie Cas laiterie Sidi-Saada. (Wilaya de Relizane) (Mémoire de master).Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.
13. **Benhamou,D.(2020).**Evaluation du pouvoir antibactérien et antibiofilm des extraits de quelques plantes médicinales (Mémoire de master).Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubekr belkaid , Tlemcen.
14. **BERKE, M. B. (2017).** LES HUILES ESSENTIELLES REFERENCEES A L'AGENCE EUROPEENNE DU MEDICAMENT (Doctorat en pharmacie , Université de Bordeaux)
15. **Bouhenni,R. et Benslimane,C.(2021).**Evaluation d'activité antioxydante et antibactérienne des huiles essentielles et d'hydrolat de la Sauge «*Salvia officinalis L.* » (Mémoire de master).Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn khaldoun, Tiaret.
16. **Boukhatem, M. N., Ferhat, A., & Kameli, A. (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature. Une, 3(4), 1653-1659.
17. **Boumedjirek, A.et Boukraa, N. (2020).** Inhibition de l'adhésion de *Staphylococcus aureus* par le surnageant de cultures de bactéries lactiques dans l'industrie agroalimentaire (Mémoire de master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed elsedikk ben Yahia, Djijel.
18. Chai C, Lee S, Kim J, Oh SW (2016) Synergistic antimicrobial effect of organic acids in combination with carvacrol against *Shigella Sonnei*. Journal of Food Safety DOI:101111/JFS.12251.
19. **Chermitti, k. (2017).** Identification biochimique, microbiologique du lait de vache destiné à la fabrication du fromage à Pâte molle (Mémoire de Master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubekr belkaid, Tlemcen.
20. **Chibi A. (2015).** Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen (Mémoire de master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubekr belkaid , Tlemcen .

21. **Diaby, K. (2018)**. Les biofilms en industrie agroalimentaire : optimisation de leur élimination (Mémoire de master). Faculté Ingénierie et Management de la Santé, Université de Lille.
22. **Didouh, N. (2015)**. Caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection (Thèse de doctorat). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubekr belkaid, Tlemcen.
23. **Di Vito, M., Smolka, A., Proto, M. R., Barbanti, L., Gelmini, F., Napoli, E., ... & Bugli, F. (2021)**. Is the antimicrobial activity of hydrolates lower than that of essential oils?. *Antibiotics*, 10(1), 88.
24. **Djehida, S. et El farroudji, N. (2019)**. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et de l'hydrolat de l'origan ; *Origanum glandulosum* (Mémoire de master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb, Blida.
25. **Donlan R.M. et Costerton J.W. (2002)**. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2): 167–193. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. PMID: 11932229
26. **DRIS, M. et KROUCHI, A. (2019)**. Effet du glucose et du NaCl sur la formation de biofilm par des souches isolées de la viande de poulet (Mémoire de master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubekr belkaid, Tlemcen.
27. **Emmons, W., Binford, CH., Utz JP, Kwon-Chung KJ.** *Medical Mycology*. Lea & Febiger, 3rd ed. Philadelphia 1977.
28. **Fauchère J-L., Avril J-L., (2002)**. *Bactériologie générale et médicale*. Ellipses Edition Marketing S.A. Paris. P: 239.
29. **Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016)**. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
30. **Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. (2005)**. The Revised Road Map to the Manual in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Ed. II. Springer (New York). 2: 159–220.
31. **GASSAMA, D. (2002)**. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale dans les filets de sole. Etude comparative des méthodes d'analyse et des résultats des deux laboratoires. Mém d'étude approfondit en production animale, Dakar, 46p. repérer

32. **Ghigo, J.M. (2001).** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412(6845):442–445. <https://doi.org/10.1038/35086581>
33. **Grimont P.A.D., (1987).** Taxonomie des escherichia. *Médecine et Maladies Infectieuses*. Numéro Spécial, 6-10
34. **Guerin, A. (2016).** Comportement de la bactérie pathogène *Bacillus cereus* dans des aliments prêts à l'emploi-Impact des conditions physico-chimiques (Doctoral dissertation, Montpellier SupAgro).
35. **Guiraud, J. P., & Rosec, J. P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire (Vol. 300). Afnor. Pages 225-228-199
36. **Hadjadj, R. et Nouri, A. (2022).** Etude théorique de l'activité biologique et application des hydrolats des plantes aromatiques (Mémoire de master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine.
37. **Heczko PB, Hoffler U, Kasprovicz A, Pulverer G. 1981.** Studies of the flora of the nasal vestibule in relation to nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* . 14: 233-241.
38. **Hemiani , B. et Ben Djermoume, F. (2021).** Caractérisation chimique des huiles essentielles de quelques plantes de la famille des Lamiacées: une revue bibliographique (Mémoire de master ). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie , Université Ziane Achour Djelfa.
39. **Herbache, KH.N. (2020).** Evaluation de l'activité antibiofilm des extraits de graines de *Linum usitatissimum* (Mémoire de Master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubekr belkaid, Tlemcen.
40. **Jadida, E. (2019).** Caractérisation des huiles essentielles de deux plantes médicinales et aromatiques du Maroc (*Laurus nobilis* et *Thymus satureioides*): Essai de valorisation dans la conservation antimicrobienne d'une préparation pharmaceutique (Doctoral dissertation, Université Chouaib Doukkali).
41. **Jakdalli, M., Chattouh, S. (2018).** Isolement, identification et étude de l'antibiogramme de *Salmonella* spp et autres entérobactéries chez la volaille dans la région de Djelfa (Mémoire de Master). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubekr belkaid, Tlemcen.
42. **Joffin, C., Joffin, J. N., Figarella, J., & Leyral, G. (2010).** Microbiologie alimentaire. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.
43. **Joly B., Reynaud A., (2002).** Entérobactéries: systématique et méthodes de diagnostic. Edition TEC et DOC. Lavoisier. Chapitre 2. P: 28-31.

44. **Kalai, A., Malek, F., & Bousmaha-Marroki, L. (2018).** Effect of *Thymus ciliatus* oil-based disinfectant solutions against biofilms formed by *Bacillus cereus* strains isolated from pasteurized-milk processing lines in Algeria. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 7(6).
45. **Katinan, C. R., Sadat, A. W., Chatigre, K. O., Bohoussou, K. M., & Assidjo, N. E. (2012).** Évaluation de la qualité chimique et microbiologique des laits caillés artisanaux produits et consommés dans la ville de Yamoussoukro, Côte d'Ivoire. *J. Appl. Biosci*, 55(7), 4020-4027. rep'rer à <https://www.m.elewa.org/JABS/2012/55/8.pdf>
46. **Khallaf, M., Benbakhta, B., Nasri, I., Sarhane, B., Senouci, S., & Ennaji, M. M. (2014).** Prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat marketed in Rabat, Morocco. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 7(4), 1665-1670.
47. **Laiche, Ch.E. et Mecheri, M. (2023).** Extraction des huiles essentielles et hydrolats (Mémoire de Master). Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université des Frères mëntouri 1, Constantine.
48. **Landgraf M, Destro MT. 2013.** Intoxication alimentaire staphylococcique. Dans *Infections et Intoxications d'Origine Alimentaire*, Presse académique, pp. 389-400
49. **Le Loir Y, Baron F, Gautier M. 2003.** *S. aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research*. 2: 63-76.
50. **Lei, G., Wang, L., Liu, X., & Zhang, A. (2014).** Chemical composition of essential oils and hydrosols from fresh flowers of *Cerasus subhirtella* and *Cerasus serrulata* from East China. *Natural Product Research*, 28(21), 1923-1925.
51. **Lewis K. (2008).** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current topics in microbiology and immunology*, 322 : 107–131. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_6).
52. **Lowy FD. 1998.** Infections à *Staphylococcus aureus*. *Journal de médecine de la NouvelleAngleterre*. 339 : 520-532.
53. **Malek, F. (2021).** Cour biofilm microbien et hygiène des matériaux à l'usage des étudiants du master1 microbiologie et contrôle de la qualité. Repérer à <https://elearn.univ-tlemcen.dz/course/index.php?categoriid=692>
54. **Malek, F. (2016).** Evaluation of a non-submerged cultivation assay combined to ESEM imaging for analysis of biofilms formed by dairy-associated sporeforming bacteria. *African journal of Microbiology research*. 10 : 1263-1273.

55. **Malek, F. (2019).** Bactéries sporulées et biofilms : Un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombinaison pasteurisé. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(6):405-420. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0435>.
56. **Malek, F. (2023).** Microorganism Carrier-Surface Method as an Efficient Model for Microscopic Characterization of Biofilm Structure and Dispersion in Dairy Associated Spore-Forming Bacteria. *Journal of Food Engineering and Technology*, 12(1), 21-28.
57. **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(2), 133-147.
58. **Marielle, B. (2020).** Référencement de l'ensemble des experts et professionnels de la maîtrise de la contamination.
59. **Marino, A., Nostro, A., Mandras, N., Roana, J., Ginestra, G., Miceli, N., ... & Tullio, V. (2020).** Evaluation of antimicrobial activity of the hydrolate of *Coridothymus capitatus* (L.) Reichenb. fil.(Lamiaceae) alone and in combination with antimicrobial agents. *BMC complementary medicine and therapies*, 20, 1-11.
60. **Mouloudj,H. et Hamadi,S. (2012).**Étude et réalisation d'une armoire d'un système CIP (Mémoire de master).Faculté de Génie Electrique et d'informatique ,Université Mouloud Mammeri ,Tizi Ouzou .
61. **Msemo ,J.J.(2022).** L'effet du nettoyage et désinfection sur les biofilms de *Bacillus cereus* dans l'industrie laitière (Mémoire de master).Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubekr belkaid , Tlemcen .
62. **Ould Mohamed,R.et Chadli,S.(2021).** Extraction et Activité biologique des huiles essentielles d'Artemisia herba Alba Asso et Artemisia campestris dans la Région de Tiaret (Mémoire de master).Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn khaldoun, Tiaret.
63. **Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., & Kole, C. (1996).** Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*, 86(349), 237-246.
64. **Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD. 2001.** What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*?. *Trends in Microbiology*. 9 : 605-10
65. **Poli,J.P.(2018).**Recherche des mécanismes d'action des molécules à activité biologique issues des produits naturels ( Thèse de doctorat). Université de Corse-Pascal Paol.
66. **Prescott,M.L.,Harley.P.J.,Klein.A.D.(2004).**Livre Microbiologie deuxième édition française.

67. **Rezak, H. Y.(2023)**. La microbiologie des aliments. Repérer à <https://facmed.univ-constantine3.dz/wp-content/uploads/2023/04/Microbiologie-des-aliments.pdf>
68. **Salem,I. et Benchelih,K.(2019)**.La conservation des pommes par les huiles essentielles et les hydrolats des plantes aromatiques ( *Anacylus valentinus* , *Chrysanthemum Coronarium* et *Carthamus caeruleus* ) et évaluation biotoxécologique(Mémoire de master).Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Aboubekr belkaid , Tlemcen .
69. **Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022)**. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620.
70. **Sow,N.K . (2003)**.Efficacité du nettoyage et de la désinfection du matériel et des surfaces de production dans l'industrie de traitement de poissons: cas de Sénégal peche (Mémoire de master). Faculté des sciences et techniques , Université Cheikh Anta Diop de Dakar .
71. **Speranza, B., Corbo, M R., Campaniello, D., Altieri, C., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. (2020)**. Biofilm formation by potentially probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Microbiology* 87 (2020) 103393
72. **Sutra L, Federighi M, Jouve JL. 1998**. Manuel de bactériologie alimentaire. Ed. Polytechnica (Paris), 308 p.
73. **Tabti.(s.d)**. hygiène en industries agro-alimentaires. Repéré à <https://www.univ-chlef.dz/fsnv/wp-content/uploads/hygiene-Tabti.pdf>.
74. **Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014)**. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.
75. **Valeriano C, et al. (2012)**. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control* 25: 673-677.
76. **Walters,M.C., Roe F., Bugnicourt,A., Franklin M.J., et Stewart, P. S. (2003)**. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance.of.*Pseudomonas.aeruginosa*.bio films.to.ciprofloxacin.and.tobramycin. *Antimicrobial.agents.and.chemotherapy*,47(1):317–323. <https://doi.org/10.1128/aac.47.1.317-323.200>

## Références bibliographiques

---

77. **Xu, K. D., McFeters, G. A., & Stewart, P. S. (2000).** Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*, 146(3), 547-549.
78. **Yann, O.M.H.(2015).**la complexité des simples - caractérisations chimique et biologique de combinaisons hydrolats-huiles essentielles et huiles essentielles-huiles essentielles pour l'objectivation d'effets conservateurs de produits phytothérapeutiques ( Thèse de doctorat).Université Toulouse.
79. **Yves LL, Michel GANTIER. 2009.** Staphylococcus aureus. Lavoisier. 1 : 65-192

---

---

# Annexe

---

---

# Annexes

## ❖ Tryptone-sel-eau (TSE)

Eau distillée 1000 ml

Nacl 8.5g

Tryptone 1g

## ❖ Solution NaOH 1N

NaOH 4g

Eau Distillé 100ml

## ❖ Milieux de cultures

### Potato dextrose agar (PDA)

Poudre déshydraté 39g

Eau distillée 1000 ml

### Chapman

Poudre déshydraté 111g

Eau distillée 1000 ml

### MacConkey

Poudre déshydraté 50g

Eau distillée 1000 ml

 **Gélose nutritive**

Poudre déshydraté 28g

Eau distillée 1000 ml

 **Plate Count Agar (PCA)**

Poudre déshydraté 23 g

Eau distillée 1000 ml

❖ **Eau physiologique**

Nacl 9g

Eau distillée 1000 ml

## Résumé

Notre étude vise à évaluer l'activité antimicrobienne et antibiofilm des huiles essentielles et des hydrolats extraits par hydrodistillation de trois plantes aromatiques (romarin, lavande, eucalyptus), en comparaison avec les huiles essentielles correspondant. Cette activité est testée sur des bactéries isolées de l'environnement et sur des souches de collections.

L'analyse microbiologique de l'environnement du laboratoire pédagogique a montré que la flore de contamination de l'air ambiant et des paillasse est essentiellement composée de germes totaux et de Staphylocoques, isolés sur milieux PCA et Chapman respectivement ainsi que de champignons. Deux types de levure pigmentées et non pigmentées et plusieurs types de moisissures ont été isolés sur milieu PCA et PDA respectivement.

L'activité antimicrobienne des hydrolats a été testée par la méthode de l'aromatogramme sur des souches bactériennes de la collection du laboratoire de microbiologie, appartenant au genre *Enterobacter* et aux espèces *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*.

Les résultats de l'aromatogramme ont montré que les hydrolats n'ont pas présenté d'activité antimicrobienne sur la majorité des souches. Une seule souche d'*Enterobacter*, a montré une sensibilité aux hydrolats de romarin et de lavande avec 30 et 32 mm de diamètre d'inhibition respectivement. Testés en combinaison avec des produits chimiques (un désinfectant industriel et NaOH), les hydrolats n'ont pas amélioré l'activité antimicrobienne des formulations ainsi obtenues, donnant des effets antagonistes ou neutres. De même aucune activité antibiofilm n'a été attribuée aux hydrolats testés seuls. Toutefois, un effet antibiofilm a été enregistré avec l'hydrolat de la lavande combiné avec le désinfectant industriel. En revanche, seules les huiles essentielles ont montré une activité antimicrobienne importante, indiquant leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens naturels, contrairement aux hydrolats.

**Mots clé :** Hydrolat ; Huiles essentielles ; Plantes aromatiques ; Activité antimicrobienne ; Biofilm ; combinaison hydrolat-produit chimique.

## Abstract

Our study aims to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of essential oils and hydrosols extracted by hydrodistillation from three aromatic plants (rosemary, lavender, eucalyptus), in comparison with the corresponding essential oils. This activity is tested on bacteria isolated from the environment and on collection strains.

The microbiological analysis of the environment of the educational laboratory showed that the flora contaminating the ambient air and benches is essentially composed of total germs and Staphylococci, isolated on PCA and Chapman media respectively, as well as fungi. Two types of pigmented and non-pigmented yeast and several types of molds were isolated on PCA and PDA medium respectively..

The antimicrobial activity of the hydrosols was tested by the aromatogram method on bacterial strains from the microbiology laboratory collection, belonging to the genus *Enterobacter* and the species *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli*.

The aromatogram results showed that the hydrosols did not exhibit antimicrobial activity on the majority of strains. A single strain of *Enterobacter* showed sensitivity to rosemary and lavender hydrosols with 30 and 32 mm inhibition diameter respectively. Tested in combination with chemicals (an industrial disinfectant and NaOH), the hydrosols did not improve the antimicrobial activity of the formulations thus obtained, giving antagonistic or neutral effects. Likewise, no antibiofilm activity was attributed to the hydrosols tested alone. However, an antibiofilm effect was recorded with lavender hydrosol combined with industrial disinfectant. In contrast, only essential oils showed significant antimicrobial activity, indicating their potential as natural antimicrobial agents, unlike hydrosols.

**Keywords:** Hydrosol; Essential oils; Aromatic plants; Antimicrobial activity; Biofilm; hydrosol-chemical combination.

## المخلص:

دراستنا تهدف إلى تقييم النشاط المضاد للميكروبات و للبيوفيلم لتكوين الأغشية البكتيرية للزيوت العطرية والماء الزهري المستخلصة بواسطة التقطير البخار من ثلاث نباتات عطرية (الإكليل، الخزامى، الكاليتوس)، مقارنة بالزيوت العطرية المقابلة. يتم اختبار هذا النشاط على البكتيريا المعزولة من البيئة وعلى سلالات من المجموعات. أظهر التحليل الميكروبيولوجي لبيئة المختبر التعليمي أن تلوث الهواء المحيط والأرائك يتألف أساساً من الجراثيم الكلية والعنقوديات، المعزولة على وسط PCA و Chapman على التوالي، بالإضافة إلى الفطريات. تم عزل نوعين من الخمائر الملونة وغير الملونة وعدة أنواع من العفن على وسط PCA و PDA على التوالي. تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات للماء الزهري باستخدام طريقة التحليل العطري على سلالات بكتيرية من مجموعة مختبر علم الأحياء الدقيقة، تنتمي إلى جنس *Enterobacter* وأنواع *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli*. أظهرت نتائج التحليل العطري أن الماء الزهري لم يظهر أي نشاط مضاد للميكروبات على معظم السلالات. أظهرت سلالة واحدة من *Enterobacter* حساسية لماء الزهري الإكليل والخزامى بأقطار تثبيط بلغت 30 و 32 ملم على التوالي. عند اختبارها بالتزامن مع المنتجات الكيميائية (مطهر صناعي و NaOH) لم يحسن الماء الزهري من النشاط المضاد للميكروبات للتراكيب التي تم الحصول عليها، مما أدى إلى تأثيرات متعادلة أو محايدة. بالمثل، لم يتم تعيين أي نشاط مانع لتكوين الأغشية البكتيرية للماء الزهري الذي تم اختياره بمفرده. ومع ذلك، تم تسجيل تأثير مانع لتكوين الأغشية البكتيرية مع ماء الزهر الخزامى المجتمع مع المطهر الصناعي. وعلى النقيض، أظهرت فقط الزيوت العطرية نشاطاً مضاداً للميكروبات مهماً، مما يشير إلى إمكاناتها كعوامل مضادة للميكروبات الطبيعية، على عكس الماء الزهري.

**الكلمات المفتاحية:** الماء الزهري؛ زيوت أساسية؛ نباتات عطرية؛ نشاط مضاد للميكروبات؛ البيوفيلم؛ مزيج ماء مقطر - مواد كيميائية.