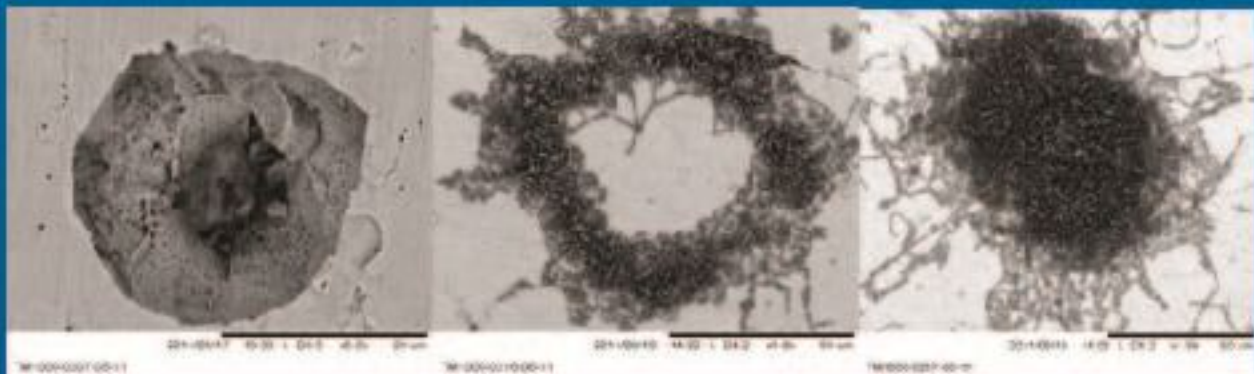


*Thèse en vue de l'obtention
du diplôme de doctorat en Biologie
Option Microbiologie*

Thème

**Le biofilm en industrie laitière : caractérisation,
facteurs de développement et élimination.
Cas du biofilm de *Bacillus cereus* dans quelques
laiteries de la région de Tlemcen.**



Présentée par Malek Fadila

JURY :

Président :	Pr. Abdelouahid D. E.	Univ. Tlemcen
Promoteur :	Pr. Kihal M.	Univ. Sénia (Oran)
Co-promoteur :	Pr. Moussa Boudjema B.	Univ. Tlemcen
Examineurs :	Pr. Djeribi R.	Univ. Annaba
	Pr. Hani K.	Univ. Sousse (Tunisie)
	Pr. Henni D. E.	Univ. Sénia (Oran)
	Dr : Hassaine Hafida	Univ. Tlemcen

*L'hygiène avant la microbiologie n'est hygiénique que dans ses intentions.
C'est la science des apparences qui repose entre des mains d'aveugles : est
sain ce qui est beau, bon et ne sent pas mauvais.*

*Pierre Darmon, l'homme et les microbes,
Fayard 1999.*

A la mémoire de mes parents

A ma famille

A mes enfants adorés Imane et Youcef Amine

Aux étudiants de mon pays

REMERCIEMENTS

Dans le cadre de cette thèse, réalisée pour une grande part au département de biologie, Université de Tlemcen, j'ai eu le plaisir de travailler et de rencontrer un certain nombre de personnes à qui je voudrais exprimer ma reconnaissance et présenter mes sincères remerciements.

Je remercie tout d'abord mes deux directeurs de thèse, Mr Kihal Mabrouk, professeur en microbiologie et directeur du laboratoire de microbiologie appliquée, université Sénia, Oran et Mr Moussa Boudjemaa Boumédiène professeur en microbiologie et directeur du laboratoire de microbiologie appliquée (LAMAABE), université de Tlemcen.

Mr. Kihal m'a honorée de sa confiance en acceptant la direction de cette thèse, et a fait preuve à mon égard d'une indulgence et d'une patience souvent mises à rude épreuve par un rythme de travail largement sinusoïdal. Je lui reconnais cette grande qualité d'avoir toujours respecté et facilité mes initiatives. Qu'il trouve dans cette thèse le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je suis très reconnaissante à Mr. Moussa Boudjemaa, pour la proposition de ce sujet, sur les biofilms, dont il a le mérite d'être avant-gardiste au niveau régional. Je le remercie pour le temps qu'il a consacré à ce travail malgré ses nombreuses occupations, son aide variée et sa lecture attentive du manuscrit ainsi que pour ses encouragements à présenter les résultats de ce travail dans des congrès et à les publier dans des revues internationales. Je le remercie également de ce long parcours sur un terrain de confiance, d'estime et de bonne entente, et j'espère que l'avenir nous offrira de nouvelles opportunités de collaborations scientifiques fructueuses.

Mes remerciements les plus sincères vont à Mr Abdelouahid Djamel Eddine professeur en microbiologie à l'université de Tlemcen, de me faire l'honneur de présider le jury de soutenance, tâche qu'il a acceptée, promptement et avec son enthousiasme et sa gentillesse habituels, malgré ses nombreuses occupations. Je le remercie chaleureusement pour ses encouragements et son exhortation mainte fois renouvelée, quant à la soutenance de ma thèse.

Je remercie vivement Mr Djeribi Ryad, professeur en microbiologie à l'université d'Annaba, laboratoire des biofilms et biocontamination des matériaux (LBBM), Mr Hani Khaled, professeur en biochimie appliquée à l'université de Sousse (Tunisie) et Mr Henni Diamel Eddine professeur en phytopathologie à l'université Sénia, Oran, d'avoir accepté d'évaluer ce travail, de l'enrichir de leurs hautes compétences scientifiques et de me faire l'honneur de leur gracieuse présence dans ce jury de soutenance. J'adresse également mes sincères remerciements à Mme Hassaine Hafida, Maître de conférences à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail, et de ses encouragements, tout au long de la réalisation de cette thèse. J'apprécie son courage et son engouement pour les biofilms ainsi que les efforts qu'elle fournit pour créer une ambiance de travail agréable et conviviale au sein du LAMAABE.

J'exprime ma sincère gratitude à Mr Malek Youcef, anesthésiste, GAMS Paris, France, dont la contribution à ce travail revêt de nombreuses formes aussi bien matérielles que personnelles. Je le remercie de m'avoir facilité le travail de recherche en de nombreuses occasions, et de m'avoir toujours encouragée à aller de l'avant, à participer aux séminaires internationaux et à publier aussi. Son aide inestimable m'a permis de dépasser les limites du présent handicapant. J'espère qu'il trouvera dans cette thèse la satisfaction de celui qui a suivi de près, conseillé et veillé au bon déroulement de ce travail. Qu'il y trouve aussi le témoignage de ma profonde considération.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Mme Aouar-Metri Amaria, professeur en biométrie et génétique des populations pour son aide inestimable dans la réalisation de ce travail particulièrement dans le traitement statistique des données. Sa compétence dans le domaine de la biométrie m'a permis de comprendre des résultats ambigus et de me faciliter leur interprétation. Je la remercie également pour les discussions éclairées sur la diversité génétique. Je n'oublierai jamais les longues heures de travail passées dans l'intimité de son foyer chaleureux et hospitalier, à des heures souvent inopportunes. Sa présence dans les moments difficiles, ses encouragements et son amitié sincère et indéfectible ont été pour moi un tel réconfort que ne je peux rien lui dire d'autre qu'un grand merci.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mr Christophe Nguyen directeur de l'unité 408 à l'INRA d'Avignon de m'avoir gentiment accueillie au sein de son unité de recherche, de m'avoir facilité le séjour et de m'avoir permis de réaliser des manipulations dans le laboratoire de biologie moléculaire. Je suis également reconnaissante à Mme Marie-Hélène Guinebretière de m'avoir guidée dans l'analyse moléculaire et de m'avoir aidée dans l'identification phylogénétique. C'est grâce à sa haute compétence dans le domaine de la biologie moléculaire que j'ai pu mener à bien cette partie de l'expérimentation. Je la remercie aussi pour les photographies au microscope à contraste de phase. Je n'oublierai jamais sa générosité et son dévouement à la science, largement imprégnée d'une simplicité qui ne peut émaner que d'un grand esprit.

Je voudrais également remercier Mr Tabti doyen de la faculté des sciences, université de Tlemcen, de m'avoir facilité l'accès au laboratoire de microscopie électronique à balayage et de m'avoir permis de réaliser mes observations dans les meilleures conditions. Je suis particulièrement reconnaissante à Mr Sari responsable du MEB de m'avoir encouragée à observer mes échantillons de biofilms. J'adresse également mes sincères remerciements à l'opératrice, Melle Belabbaci Chérifa, qui a fait preuve de beaucoup de patience et de sérieux en m'accompagnant dans ces observations.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel, responsable, enseignant, technicien et employés d'administration des différents départements de la faculté SNV-STU et en particulier le département de biologie pour les nombreuses aides fournies durant les longues années de préparation de la thèse. Je suis particulièrement reconnaissante à Mr le doyen et à son staff pour les facilités offertes en particulier dans les stages et les congés scientifiques ainsi qu'à mes collègues enseignants pour la sollicitude qu'ils m'ont toujours témoignée.

J'adresse mes vifs remerciements aux responsables et au personnel technique des différentes laiteries qui nous ont facilité la collecte des échantillons, particulièrement ceux du

complexe Giplait dont nous avons été les hôtes pendant plusieurs années. Je suis particulièrement reconnaissante à Mme Belarbi Nacéra et Mr Nabi Hakim pour leur aide gentiment offerte chaque fois qu'ils ont été sollicités notamment les informations techniques, riches de leurs expériences et compétences respectives.

C'est grâce au soutien des membres de ma famille, en particulier mes frères et mes sœurs, à leur présence constante, à leur aide sans limites, et leur dévouement que j'ai pu mener à terme ce travail. Qu'ils trouvent dans cette thèse l'expression de mes sincères remerciements et le témoignage de ma profonde gratitude.

A mes amies, celles qui ont toujours été là pour moi, en particulier, Maghnia, Souad, Kheira, Nabila... je dis un grand merci.

Lors de mes longues années d'encadrement des mémoires de fin de cycle, j'ai eu l'occasion de connaître de nombreuses personnes qui ne sont pas citées ici. Que chacune de ces personnes en particulier certains étudiants qui ont travaillé avec moi, dans la bonne foi et le respect de la science, trouvent ici le témoignage de ma gratitude.

Enfin, si ce travail est une réussite c'est bien grâce à la volonté de Dieu, le tout puissant, sinon, je ne m'en prends qu'à moi même. Dans tous les cas :

Louange à Dieu, le seigneur des mondes

ملخص

يسبب تطور البيوفيلم على سطوح الأجهزة في معامل صناعة و تجهيز الأغذية، تلوث للمنتجات المصنعة، مما يؤدي الى الحد من مدة صلاحيتها، وتشكيل المخاطر الصحية للمستهلكين. وكمثال على ذلك هو النوعية غير المستقرة للحليب المبستر المنتج محليا.

أظهر تقييم للأحياء الدقيقة على سطوح المعدات في بعض مصانع الألبان التي تقع في منطقة تلمسان مستويات تلوث عالية حتى بعد إجراء عمليات التنظيف والتطهير. تعتبر العصيات التبوغية، ولاسيما أعضاء المجموعة *B.cereus* هي الغالبة في الأشرطة الحيوية. تختص هذه الأخيرة بضعف في تنوعها الوراثي (ثلاثة ملامح وراثية، M13-PCR) وانتماها إلى المجموعات الوراثية الثالثة والرابعة المسببة للأمراض. مصدر التلوث الرئيسي للمعدات هو مسحوق الحليب على النحو الذي حدده النمط الجيني و هو مصدر انتشار و تواجد النمط الجيني (A) عبر أربع سنوات في مصنع الحليب .وكشفت تجارب تقييم امكانيات السلالات علي نمط التصاق خاص، يتميز بمعدلات عالية في متوسط الالتصاق على الفولاذ المقاوم للصدأ في حالة التعرية او التغطية بالمواد الغذائية . و لقد لوحظ ان الاغشية الغذائية المتكونة من سكر اللبن (اللاكتوز) و الكازيين لها تأثير كبير على الالتصاق على الفولاذ المقاوم للصدأ من قبل السلالات المدروسة. و تأكدت هذه النتائج وفقا لخصائص سطح الابواغ خاصة العلاقة ما بين الهيدروفوبية و الالتصاق على الفولاذ المقاوم للصدأ بوجود ارتباط ايجابي كبير بين الهيدروفوبية و التصاق الابواغ على غشاء الكازيين و وجود ارتباط سلبي كبير بين هذه الخاصة و التصاق الابواغ على غشاء اللاكتوز. و على النقيض من التنوع الوراثي المنخفض المسجل تعتبر الخصائص السطحية للسلالات متفاوتة كما اثبتت تجارب الالتصاق بالمذيبات العضوية و التي اظهرت ان السلالات تنقسم الي سلالات نافرة للماء (مسعورة) لا تتميز بأي خاصية معطية للإلكترون او قابلة للإلكترون أو محبة للماء و هي ذات الطابع المانح للإلكترون و القابلة للإلكترون. هذه الخصائص الحمضية/القلوية الخاصة للابواغ زيادة على الميزة المحبة للماء تدل على تكيف هذه السلالات للبنية البيئية و نمط الحياة على شكل بوفيلم.

ويلاحظ أيضا بعض التنوع في الهياكل وعمليات تكوين البيوفيلم في مراحل الانفصال/التشتت اثر المشاهدة للشكل المورفولوجي في المجهر الإلكتروني ذي المسح الضوئي. وأظهرت تجارب نمو البوفيلم في ظروف مختلفة أن كمية اللقاح وسن البيوفيلم من العوامل الهامة التي أثرت على عدد الخلايا الملتصقة ، علي عكس النتائج المحصلة في الاوساط الغذائية. و يعتبر هذان العاملان ذوا تأثير كبير على مقاومة البيوفيلم لمنتجات التنظيف والتطهير. و لقد اظهرت عملية التنظيف الحمضي/القلوي تأثير على حساسية البيوفيلم تجاه فاعلية مواد التطهير مما يؤكد اهمية التنظيف قبل التطهير في عملية القضاء على البيوفيلم

و بالرغم من الطابع المتغير و متعدد العوامل الذي يختص به البيوفيلم الا ان هذه النتائج سمحت بتحديد المعايير التي تعتبر مهمة لعملية تشكيل البيوفيلم و لحذفه في مصانع الألبان . وهذا قد يساعد على تطوير استراتيجيات فعالة لمكافحة البيوفيلم ، وتحسين النوعية الميكروبية ومدة صلاحية الحليب المبستر.

RESUME

En industrie agroalimentaire, le développement des biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments peut-être à l'origine de la contamination des produits transformés. Ce qui conduit à la réduction de leur durée de vie et à des risques potentiels pour la santé du consommateur. La qualité précaire du lait pasteurisé produit à l'échelle nationale illustre bien cette situation.

L'évaluation de la microflore du biofilm formé à la surface des équipements laitiers dans quelques laiteries de la région de Tlemcen, a montré des taux de contamination relativement élevés même après l'application des procédures de nettoyage et désinfection. Les bacilles sporogènes notamment les membres du groupe *Bacillus cereus* constituent la flore dominante du biofilm. Ces derniers sont caractérisés par une faible diversité génétique (trois profils M13-PCR) et font partie des groupes phylogénétiques III et IV qui sont potentiellement pathogènes. La principale source de contamination des équipements telle qu'identifiée par la M13-PCR, est la poudre de lait. Celle-ci serait responsable de la dissémination du génotype A de *B.cereus* et de sa persistance dans la laiterie analysée pendant 4 années.

Les expériences de détermination du potentiel d'adhésion des souches de *B. cereus* ont montré que ces souches adhèrent à l'acier inoxydable selon un modèle caractérisé par des taux d'adhésion élevés sur l'inox propre et conditionné par différents nutriments. Les effets les plus significatifs sont obtenus en présence de caséine et de lactose. Ces résultats sont confirmés par les propriétés de surfaces des spores, et leur relation à l'adhésion à l'acier inoxydable, la corrélation entre l'hydrophobicité et l'adhésion au film de caséine étant positive alors qu'elle est négative dans le cas du film de lactose.

En contraste avec la faible diversité génétique enregistrée, est la variabilité des propriétés de surface des souches de *B. cereus*. Selon leurs affinités respectives aux solvants organiques utilisés, celles-ci se répartissent en souches hydrophobes moyennes n'ayant exprimé aucun caractère donneur d'électron ou accepteur d'électron, et souches hydrophiles avec un caractère donneur d'électron et accepteur d'électron. Ces propriétés acide-base particulières des spores de *B.cereus* associées au caractère hydrophile dominant traduisent une adaptation de ces isolats laitiers à la niche écologique et au mode de vie sessile.

Une certaine diversité est également notée dans les structures des biofilms formés par les différentes souches et leurs modes de détachement/dispersion, tels que montrés par les morphotypes observés en microscopie électronique à balayage. Le développement de biofilms de *B. cereus* dans les différentes conditions de culture a montré que, contrairement à la composition des milieux de culture, la taille de l'inoculum et l'âge du biofilm sont des facteurs qui influent sur le nombre de cellules adhérees. Ces deux paramètres sont également significatifs dans la tolérance des biofilms de *B. cereus* exposés à différents désinfectants. Une sensibilisation des biofilms à l'action de ces produits est obtenue par un nettoyage acido-alcalin simulant le CIP industriel, et soulignant l'importance du nettoyage en amont de la désinfection, dans l'élimination du biofilm

Malgré le caractère versatile et multifactoriel des biofilms, ces résultats ont permis d'identifier les paramètres importants pour la formation du biofilm par *B. cereus* et son élimination dans les entreprises de production du lait pasteurisé. Ce qui permettra de développer des stratégies efficaces de lutte contre ces biofilms, en vue de l'amélioration de la qualité microbiologique du lait pasteurisé et de sa durée de vie.

ABSTRACT

In the food-processing industry, the development of biofilms on equipment surfaces may be the cause of the contamination of processed products, which results in the reduction of their shelf-life and potential health risks for consumers. As an illustration, is the precarious quality of pasteurized milk nationally produced.

The assessment of the microflora of biofilms formed on the surfaces of dairy equipment in some dairies located in Tlemcen, showed high contamination levels even after cleaning and disinfection procedures. Sporogenic bacilli, notably *B. cereus* group members, characterized by a low genetic diversity (three M13-PCR profiles), are predominant in biofilms and belong to the pathogenic phylogenetic groups III and IV. The main contamination source of equipments is milk powder as identified by M13-PCR genotyping. Milk powder is responsible of dissemination of *B. cereus* genotype A and its persistence in the dairy plant across four years.

Experiments to determine the potential of *B. cereus* strains to form biofilms, revealed a particular adhesion pattern, characterized by high adhesion rates in stainless steel clean or covered with various nutrients. However, spore adhered strongly to the casein and lactose conditioning films, which seem to be significant parameters for the adhesion to stainless steel. In accordance with these results, are the spore surface properties notably hydrophobicity and its relationship to adhesion to stainless steel. Significant correlations between this property and adhesion to the casein and lactose conditioning films were found to be respectively positive and negative. Therefore, in contrast with the low genetic diversity recorded, some variability was found in the surface properties of strains. Based on their respective affinities to organic solvents, strains are either middle hydrophobic without expressing any electron donor or electron acceptor character, or hydrophilic exhibiting an electron donor and electron acceptor character. These particular acid/base properties of spore, associated to the important hydrophilic character found among them, argue for an adaptation of these dairy isolates to the ecological niche and a biofilm lifestyle.

Some diversity is also noted in biofilm structures and processes of detachment/ dispersion as revealed by scanning electron microscopy micrographs. Growth of biofilms in different conditions showed that, in contrast with the composition of media, the size of inoculums and the age of biofilms are important factors that influenced adhered cells numbers. These two parameters were also significant for the tolerance of *B. cereus* biofilms submitted to different sanitizers. Biofilms became more sensitive to these products following exposition to an acid/base cleaning, mimicking industrial CIP, and highlighting the importance of cleaning before disinfection in biofilm removal.

Despite the multifactorial and versatile nature of biofilms, these results allowed the identification of parameters that are important for biofilm formation by *B. cereus* in pasteurized milk processing plants. This may help to develop effective strategies against biofilms and to improve the microbial quality of pasteurized milk and its shelf life.

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du processus de formation du biofilm, mettant en évidence les structures en tours en champignons.....	6
Figure 2 : Un film de conditionnement de nature protéique formé sur un neuro-stimulateur	6
Figure 3 : (A) : Image de microcolonie d'un biofilm de 9 h formé par une souche de <i>P. aeruginosa</i> porteuse de la protéine verte fluorescente (GFP).....	11
Figure 4 : Hétérogénéité physiologique à l'intérieur du biofilm.....	12
Figure 5 : (A) Structure en rayon de miel d'un biofilm de 6 h formé par <i>Listeria monocytogenes</i> et observé en microscopie à fluorescence grand champ (WFM)	14
Figure 6 : Dispersion d'un biofilm observée en CLSM avec coloration Live/Dead®	15
Figure 7 : Migration du biofilm.....	17
Figure 8 : Cellule à flux et dispositif de Robbins modifié.	20
Figure 9 : Des cultures bactériennes obtenues sur gélose au sang à partir de disques découpés dans des cathéters contaminés et incubés.....	21
Figure 10 : Micrographes de biofilm obtenus au MEB	22
Figure 11 : Micrographes de biofilms au MEB environnemental.....	22
Figure 12 : Des micrographes au MEB montrant des images de biofilms formés sur des prothèses de titanium à différentes résolutions.	22
Figure 13 : Comparaison d'images de biofilms par CLSM et MEB.....	24
Figure 14 : Séquences des événements dans la formation des biofilm sur les surfaces en contact avec les aliments.....	26
Figure 15 : Equipement laitiers	27
Figure 16 : Micrographe en MEB de surfaces en inox avec différents finis de surface	30
Figure 17 : Adhésion de différents microorganismes sur des surfaces en acier inoxydable.....	30
Figure 18 : Influence des caractéristiques de surface et de l'orientation des bactéries sur le nombre de cellules retenues	31
Figure 19 : Des essais de rétention de bâtonnet sur des surfaces en oxide de titanium avec des caractéristiques topographiques.....	32
Figure 20 : Micrographes électroniques d' <i>E. coli</i> retenu sur une surface en inox.....	33
Figure 21 : Micrographe de biofilm de 18 h formé par <i>Anoxybacillus flavithermus</i> sur une surface en inox	35
Figure 22 : La structure de l'arbre phylogénétique du group <i>B. cereus</i> telle que présentée dans la base de données Hyper CAT	40
Figure 23 : Colonies de <i>B. cereus</i> isolés dans la laiterie A après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MYP.....	41
Figure 24 : (A) Micrographe électronique (MET) montrant l'exosporium (structure en forme de sac) et les appendices des spores de <i>B. cereus</i>	44
Figure 25 : Sites de sporulation sur les surfaces des colonies de <i>B. subtilis</i>	45
Figure 26 : Micrographe d'un biofilm de 6 jours formé par <i>B. cereus</i> sur une surface en inox.	46

Figure 27 : Micrographes électroniques montrant le fouling d'une membrane après nanofiltration.....	51
Figure 28 : Micrographes électroniques montrant des spores de <i>B. cereus</i> sur des membranes de filtration après une séquence de fouling-nettoyage.....	51
Figure 29 : Comparaison des valeurs moyennes de la flore aérobique mésophile du biofilm des conduites de lait.....	61
Figure 30 : Distribution des isolats du biofilm dans les cinq laiteries.....	62
Figure 31 : Evolution des sporogènes aérobies dans le lait durant la production et le stockage.	66
Figure 32 : Evolution de <i>B. cereus</i> dans du lait durant la production et le stockage	66
Figure 33 : Photos en microscopie à contraste de phase de cultures de la souche BC3	81
Figure 34 : Photos en microscopie à contraste de phase de cultures de la souche BC4	81
Figure 35 : Photos en microscopie à contraste de phase de cultures de la souche BC14	82
Figure 36 : Photos en microscopie à contraste de phase de cultures de la souche BC15	82
Figure 37 : Photos en microscopie à contraste de phase de cultures de la souche BC19.	83
Figure 38 : Photos en microscopie électronique à balayage des souches BC19, BC15 et BC14.	83
Figure 39 : Les profils M13-PCR des souches de <i>B. cereus</i>	84
Figure 40 : Adhésion à l'acier inoxydable par technique d'inoculation.....	94
Figure 41 : Adhésion des spores et des cellules des souches BC1 (A), et BC2 (B) à l'acier inoxydable en fonction du temps d'incubation.	97
Figure 42 : Adhésion des spores et des cellules des souches BC3 (C), et BC4 (D) à l'acier inoxydable en fonction du temps d'incubation.	98
Figure 43 : Adhésion des spores et des cellules des souches BC5 (E), et BC6 (F) à l'acier inoxydable en fonction du temps d'incubation.	98
Figure 44 : Adhésion des spores (A) et des cellules végétatives (B) de six souches de <i>B. cereus</i> à l'inox propres (P) et souillé (S) au lait écrémé.	99
Figure 45 : Adhésion des spores des souches BC1 (A) et BC4 (B) à l'inox conditionné avec le lait et les constituants du lait	100
Figure 46 : Adhésion des spores des souches BC3 (C) et BC5 (D) à l'inox conditionné avec le lait et les constituants du lait	101
Figure 47 : Adhésion des spores des souches BC2 (E) et BC6 (F) à l'inox conditionné avec le lait et les constituants du lait	101
Figure 48 : Hydrophobicité des spores de 23 souches laitières de <i>B. cereus</i>	103
Figure 49 : Corrélations entre l'hydrophobicité et l'adhésion à l'inox, propre (a) et conditionné avec le lait (b), la caséine (c) et le lactose (d).	105
Figure 50 : Adhésion et formation de biofilm par immersion dans des milieux liquides.....	115
Figure 51 : Formation de biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits.	116
Figure 52 : Formation de biofilms sur l'acier inoxydable après 24 h de culture à 30°C dans le milieu LB. Les barres gris foncées représentent les groupes statistiquement différents.	119
Figure 53 : Formation de biofilms dans des microplaques de titration en polystyrène après 24 h de culture à 30°C dans le milieu LB.	120

Figure 54 : Evolution de la population du biofilm des souches BC1 (A), BC 2 (B) et BC3 (C) en fonction du temps d'incubation dans le milieu LB	121
Figure 55 : Evolution de la population du biofilm de la souche BC1 en fonction de la taille de l'inoculum et du temps d'incubation	122
Figure 56 : Micrographes électroniques montrant la microstructure de l'acier inoxydable neuf (a) ou après l'usage (b, c, et d).....	123
Figure 57: Micrographes électroniques montrant l'acier inoxydable recouvert de lait, les tâches noires correspondent à des fragments de biofilms.....	123
Figure 58 : Micrographes électroniques des biofilms de 20 h formés par la souche BC4 dans le bouillon nutritif	124
Figure 59 : Micrographes électroniques de biofilms de 20 h formés par la souche BC17 dans le bouillon nutritif	125
Figure 60 : Micrographes électroniques des biofilms de 24 h formés par la souche (BC3) (a et b) dans le bouillon nutritif.	126
Figure 61 : Micrographe électronique d'un biofilm de 20 h formés par la souche BC14 dans le bouillon nutritif	127
Figure 62 : Micrographes électroniques de biofilms de 20 h formés par la souche BC14 dans le recombinaé dilué au 1/100 (a,b, et c).	128
Figure 63 : Micrographes électroniques de biofilms de 7 jours formés par la souche BC6 dans le bouillon nutritif (a) et le recombinaé (b), et la souche BC2 (c) dans le lait recombinaé.....	129
Figure 64 : Micrographe électronique d'un biofilm de 20 h formé par la souche S41 dans le bouillon nutritif.	130
Figure 65 : Effets de différents désinfectants sur des biofilms de 24 h formés par <i>B. cereus</i> sur l'acier inoxydable à des concentrations variables en inoculum	131
Figure 66 : Effets de différents désinfectants sur des biofilms de différents âges (1 et 6 jours) formés par <i>B. cereus</i> sur l'acier inoxydable	132
Figure 67 : Effet de différents désinfectants sur des biofilms de 24 h formés par <i>B. cereus</i> sur l'acier inoxydable et soumis à un stress CIP-like	132

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les sept groupes phylogénétiques	39
Tableau 2 : Nombre de bactérie du biofilm des lignes de production du lait pasteurisé avant et après l'application du système de nettoyage et désinfection (CIP) dans la laiterie A.....	59
Tableau 3 : Nombre de bactérie du biofilm des lignes de production du lait pasteurisé avant et après l'application du système de nettoyage et désinfection (CIP) dans la laiterie B.....	59
Tableau 4 : Nombre de bactérie du biofilm des lignes de production du lait pasteurisé avant et après l'application du système de nettoyage et désinfection (CIP) dans la laiterie C.....	59
Tableau 5 : Nombre de bactérie du biofilm des lignes de production du lait pasteurisé avant et après l'application du système de nettoyage et désinfection (CIP) dans la laiterie D.....	60
Tableau 6 : Nombre de bactérie du biofilm des lignes de production du lait pasteurisé avant et après l'application du système de nettoyage et désinfection (CIP) dans la laiterie E	60
Tableau 7 : Identification des groupes microbiens majeurs des lignes de production du lait pasteurisé.....	62
Tableau 8 : Distribution des isolats selon la température de croissance.....	63
Tableau 9 : Valeurs moyennes du nombre de <i>Bacillus</i> spp. dans le lait cru et pasteurisé	64
Tableau 10 : Valeurs moyennes du nombre de <i>B. cereus</i> dans le lait cru et pasteurisé.....	65
Tableau 11 : Caractéristiques des souches de <i>B. cereus</i> utilisées dans cette étude.....	75
Tableau 12 : Distribution de 50 souches de <i>B. cereus</i> d'après les caractères phénotypiques	80
Tableau 13 : Typage moléculaire (M13-PCR) et affiliation phylogénétique de 20 souches de <i>B. cereus</i> isolées des différentes sources dans la ligne de production du lait pasteurisé.	86
Tableau 14 : Propriétés acide-base de 13 souches de <i>B. cereus</i>	104
Tableau 15 : les désinfectants et les conditions d'utilisation.....	117

LISTE DES ABREVIATIONS

CAM : Mesure de l'angle de contact (contact angle measure)

CIP: cleaning-in-place

CLSM: confocal laser scanning microscopy (Microscopie confocale à balayage laser).

EPS : extracellular polymeric substances

ESEM : environmental scanning electron microscopy

MATH : microbial adhesion to hydrocarbon

MATS : Adhésion microbienne aux solvants (microbial adhesion to solvents)

MEB : microscopie électronique à balayage.

MEBE : microscopie électronique à balayage environnemental

MVs : membrane vesicles (vésicules membranaire).

NEP: nettoyage en place

S.S: *sensu stricto*

SEM : scanning electron microscopy

TEM : transmission electron microscopy

WFM : wide field microbiology

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION AUX BIOFILMS	3
Les définitions	3
L'historique.....	4
Le processus	5
Etape 1 : Le conditionnement de la surface.	6
Etape 2 : Transport des bactéries ver le support	7
Etape 3 : l'Adhésion.....	8
Etape 4 - 5: La croissance et la maturation du biofilm.....	10
Etape 6 : La dispersion/ détachement du biofilm.....	14
Techniques d'études du biofilm	17
Détermination des propriétés de surface.....	17
Les techniques de culture.....	18
Les microplaques de titration	18
La cellule à flux	19
Les techniques microscopiques.....	21
Le microscope électronique électronique à balayage (MEB).....	21
La microscopie confocale à balayage laser (CLSM).....	23
CHAPITRE 2 : LES BIOFILMS DES INDUSTRIES ALIMENTAIRES.....	25
Contexte général	25
Le modèle du biofilm industriel.....	26
Le biofilm en industrie laitière.....	27
Les facteurs influençant l'attachement aux surfaces industrielles	28
L'hydrophobicité et la topographie du support.....	28
Les propriétés physico-chimiques de surface des bactéries.....	33
La microflore du biofilm en industrie laitière	34
Caractéristiques des biofilms des bacilles thermophiles	35
Le groupe <i>B. cereus</i> : considérations taxonomiques, caractéristiques générales.....	36
Les sept groupes phylogénétiques majeurs	38
Principaux caractères phénotypiques du groupe <i>B. cereus</i>	40
<i>B. cereus en industrie laitière</i>	41
Identification et typage moléculaire de <i>B. cereus</i>	42
Caractéristiques d'adhésion et de formation de biofilm chez <i>B. cereus</i>	43
Elimination de <i>B.cereus</i> de l'environnement laitier	46

Stratégies de lutttes contre le biofilm en industrie alimentaire	47
Efficacité du cleaning-in place (CIP) contre les biofilms.....	48
Biofilm et biofouling	50
Problématique du lait pasteurisé.	52
CHAPITRE 3: MICROFLORE DES LIGNES DE PRODUCTION DU LAIT PASTEURISE	54
1. Matériel et méthodes :.....	54
1.1 Présentation des laiteries	54
1.2 Dénombrement de la microflore du biofilm.....	54
1.2.1 Prélèvement	54
1.2.2 Traitement des échantillons	55
1.2.3 Conservation des souches :	55
1.3 Caractérisation de la flore de contamination du lait et des équipements laitiers.	56
1.3.1 Identification des groupes bactériens majeurs.....	56
1.3.2 Principaux caractères biochimiques et physiologiques	56
1.3.2.1 Mise en évidence des activités enzymatiques	56
1.3.2.2 Analyse de la croissance à différentes températures	57
1.4 Recherche de la flore dominante du biofilm dans le lait cru et pasteurisé.....	57
1.4.1 Echantillonnage	57
1.4.2 Analyse de la flore sporulée du lait liquide et en poudre	58
2. Résultats.....	58
2.1. Evaluation quantitative de la contamination bactérienne des lignes de production du lait pasteurisé.....	58
2.2. Identification de la flore de contamination des lignes de production du lait pasteurisé	61
2.1.2 Les principaux groupes microbiens du biofilm des conduites de lait	61
2.2.3. Principaux caractères physiologiques de la microflore du biofilm	62
2.3. Présence de <i>Bacillus</i> spp. et de <i>B. cereus</i> dans le lait cru et pasteurisé	63
2.3.1. <i>Bacillus</i> spp.	63
2.3.2 <i>B. cereus</i>	64
3. Discussion.....	67
CHAPITRE 4: IDENTIFICATION ET DIVERSITE GENETIQUE DES SOUCHES DE <i>B. cereus</i>.....	75
1. Matériel et Méthodes	75
1.1. Description des souches	75
1.2. Identification phénotypique	75
1.2. 1. Détermination du profil biochimique des souches	75
1.2.2 Recherche du cristal parasporal.	76

1.2.2.1. Observation au microscope optique	76
1.2.2.2. Observation au microscope à contraste de phase.....	77
1.2.2.3. Observation au microscope électronique à balayage	77
1.3. Caractérisation génotypique	77
1.3.1. Extraction d'ADN	77
1.3.2. Typage moléculaire par la technique M13-PCR.....	78
1.3.3. Identification phylogénétique.	78
1.3.3.1. Amplification partielle du gène pan C	79
1.3.3.2. Purification de la séquence pan C.....	79
2. Résultats.....	79
2.1. Caractérisation phénotypique	79
2.1.1. Détermination du profil biochimique	79
2.1.2. Caractéristiques morphologiques des colonies sur gélose Luria	80
2.1.3. Caractéristiques microscopiques des cultures de <i>B. cereus</i>	80
2.2. Caractérisation génotypique	84
2.2.1 Groupement des isolats selon le profil M13-PCR.....	84
2.2.2 Identification aux groupes phylogénétique	85
3. Discussion.....	85
CHAPITRE 5 : ADHESION DE <i>B.cereus</i> A L'ACIER INOXYDABLE.....	92
1. Matériel et méthodes.....	92
1.1 Adhésion des spores et des cellules végétatives de <i>B. cereus</i> à l'inox.....	92
1.1.1 Préparation des suspensions sporales :.....	92
1.1.2. Préparation des cellules végétatives	93
1.1.3. Préparation des surfaces en acier inoxydable	93
1.1.4. Inoculation des lames pour l'adhésion	94
1.1.5. Récupération et numération des cellules adhérees	94
1.2. Détermination de la cinétique d'adhésion chez <i>B. cereus</i>	95
1.3. Formation du film de conditionnement sur les lames en inox	95
1.3.1. Préparation des lames « préconditionnées » ou souillées	95
1.3.2. Adhésion sur lames conditionnées	95
1.4. Caractérisation des propriétés de surface des spores.	95
1. 5. Analyse statistique	96
2. Résultats.....	97
2.1. Cinétique d'adhésion de <i>B.cereus</i> à l'acier inoxydable.....	97
2.2. Adhésion des spores de <i>B.cereus</i> à l'inox propre et souillé.....	99

2.3. Adhésion des spores de <i>B. cereus</i> au film de conditionnement	100
2.4. Les propriétés de surface des spores	102
2.5. Relation entre l'hydrophobicité et l'adhésion	104
3. Discussion.....	105
CHAPITRE 6 : CARACTERISATION DU BIOFILM DE <i>B. cereus</i>	114
1. Matériel et méthodes.....	114
1. 1. Formation de biofilms	114
1.1.1. Développement des biofilm sur les lames en inox.	114
1.1.2. Développement de biofilms dans des microplaques en polystyrène.	115
1.1.3. Caractérisation microscopique des biofilms.....	116
1.2. Traitements d'élimination du biofilm.....	116
1.2.1. Désinfection de biofilms formés sur l'acier inoxydable	116
1.2.2. Effet du nettoyage sur la désinfection des biofilms.....	117
1.2.3. Effet du nettoyage sur la ré-adhésion des biofilms	117
2. Résultats.....	118
2.1. Le potentiel de formation du biofilm chez <i>B.cereus</i>	118
2.2. Evolution de la population du biofilm en fonction de l'âge et la taille de l'inoculum	120
2.3. La morphologie et la structure du biofilm	122
2.4. Tolérance des biofilms de <i>B. cereus</i> aux biocides.....	130
3. Discussion.....	133
CONCLUSION.....	145
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	148
PUBLICATIONS	173
ANNEXES.....	176

INTRODUCTION GENERALE

Les biofilms sont le résultat du développement des microorganismes sur une surface vivante ou inerte. Ce mode de vie sessile est très avantageux pour les microorganismes qui y trouvent refuge pour vivre et survivre, les biofilms pouvant croître dans des conditions nutritionnelles qui ne permettent pas la croissance des cellules planctoniques. Les biofilms microbiens peuvent être bénéfiques ou causer des nuisances dans les environnements où ils se développent. Ils peuvent être impliqués dans les processus infectieux ou induire des effets néfastes en terme de qualité, d'hygiène et de santé publique. Au sein des biofilms, les microorganismes acquièrent de nouvelles caractéristiques phénotypiques notamment une résistance importante aux agents antimicrobiens.

Le contrôle du biofilm est un enjeu majeur dans le secteur industriel. Les biofilms des industries alimentaires sont reconnus être la source de lourds problèmes économiques et sanitaires. Ils sont responsables de la diminution des rendements et de l'augmentation des coûts de production, dues aux altérations des produits transformés et aux détériorations des appareils et des matériaux. D'une part, les biofilms sont une source de contamination des aliments transformés par des germes indésirables et sont largement incriminés dans la dégradation de la qualité organoleptique et sanitaire des produits finis et la diminution de leur durée de vie. D'autre part, l'encrassement des échangeurs thermiques tels que les pasteurisateurs et les problèmes de corrosion diminuent l'efficacité de ces appareils avec des répercussions, notamment sur la qualité des produits traités. Dans les entreprises de transformation des aliments la lutte contre les biofilms s'inscrit dans les démarches visant l'amélioration de la qualité microbiologique des produits finis.

En industrie laitière, la contamination disséminée à partir des surfaces industrielles est largement reconnue. L'environnement des laiteries est propice au développement des biofilms. La nature des espèces qui composent ces écosystèmes microbiens est largement influencée par les conditions des processus technologiques. La flore thermorésistante telle que les bacilles sporulés est sélectionnée par les traitements thermiques, très utilisés comme une technologie de conservation du lait. Les bactéries du groupe *Bacillus cereus* sont un groupe de contaminants important dans le milieu laitier et sont impliqués dans les problèmes d'altération du lait pasteurisé ainsi que de la limitation de sa durée de vie. Certains membres de ce groupe sont pathogènes pour l'homme et les animaux, *B. cereus sensu stricto* produit plusieurs toxines et est responsable de toxi-infections alimentaires.

Cette étude a pour but d'identifier le microbiote du biofilm inféodé aux équipements laitiers et d'évaluer sa contribution à la contamination du lait pasteurisé. Elle consiste en l'isolement et la caractérisation de la microflore qui contamine les surfaces internes des conduites de lait dans des laiteries de la région de Tlemcen. Un intérêt particulier est accordé aux membres du groupe *B. cereus* et à leur capacité à s'organiser en biofilm. Cette thèse présente l'ensemble des résultats obtenus. Elle est structurée en six chapitres. Les deux premiers sont une synthèse bibliographique comportant une introduction aux biofilms et une description des biofilms des industries alimentaires, en particulier l'industrie laitière. Les 4 autres chapitres comportent le travail expérimental, les résultats obtenus et la discussion.

Dans une approche visant la compréhension globale de la présence du biofilm sur les équipements laitiers, d'élucider les conditions propices à son développement, de cerner les problèmes de la contamination transférée au lait pasteurisé et d'identifier les points intéressants pour l'amélioration de sa qualité microbiologique, nous avons adopté la démarche expérimentale suivante :

- Evaluation et identification phénotypique de la flore de contamination des équipements avant et après l'application du système de nettoyage/désinfection.
- Identification génotypique de la flore dominante du biofilm et identification des sources de contamination via un typage moléculaire des souches.
- Evaluation de l'adhésion bactérienne sur différents supports d'adhésion : acier inoxydable, verre et polystyrène et dans des conditions simulant la propreté et le manque d'hygiène en industrie laitière.
- Caractérisation de l'adhésion bactérienne par la détermination des propriétés de surface des bactéries
- Formation et caractérisation de biofilms expérimentaux obtenus par différentes techniques de culture. Cette caractérisation porte essentiellement sur l'influence de certains paramètres sur le développement des biofilms, sur leur morphologie et leur structure telles que révélées au microscope électronique à balayage, ainsi que la réponse des biofilms à l'action d'agents de nettoyage et de désinfection.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION AUX BIOFILMS

Avec les biofilms microbiens une nouvelle ère, celle de la microbiologie pluridisciplinaire a commencé. Le terme « biofilmologie » est déjà proposé (Karunakaran et al., 2011), l'étude des biofilms s'étant érigée en une discipline à part entière. Le biofilm s'est d'abord imposé comme un nouveau concept dans l'hygiène des surfaces et dans les processus infectieux. Il s'avère également comme un procédé et un outil faisant un pont entre la microbiologie et les sciences des atomes et des molécules ou nanosciences et nano technologie (Bhardwaj et al., 2009 ; Brigmon et al., 2012 ; Reddy et al., 2012).

➤ Les définitions

La vie microbienne associée aux surfaces a reçu de nombreuses définitions construites autour des trois éléments clés du biofilm, qui sont le microorganisme, la surface et la matrice organique (Marshall et al., 1971 ; Costerton et al., 1978 ; 1987 ; 1995). Celles-ci ont évolué en fonction de la perception et de la compréhension du phénomène et se sont affinées au fur et à mesure des découvertes réalisées sur le sujet. Les premières définitions étaient basées sur l'observation des bactéries attachées au sein de la matrice organique qui est tantôt décrite comme étant des fibres polymériques extracellulaires très fines tantôt comme étant le glycocalyx de nature polysaccharidique et intervenant dans l'adhésion. Dans une définition simple, proposée par Carpentier et Cerf (1993), le biofilm est une communauté de microbes incorporés dans une matrice de polymères organiques et adhérant à une surface. L'organisation des communautés microbiennes du biofilm en consortium fonctionnel et la nature de la surface, sont précisées (Costerton et al., 1995), les bactéries pouvant adhérer aux surfaces inertes ou vivantes, et interfaces ainsi qu'aux unes les autres. Donlan (2002) souligne le caractère solide de cet attachement des microorganismes aux surfaces : non enlevé par un rinçage doux.

Toutefois et bien qu'il n'existe pas de consensus absolu sur la définition d'un biofilm, Donlan et Costerton (2002) considèrent que toute nouvelle définition doit apporter des éléments d'information sur des aspects bien définis du biofilm, autres que les caractéristiques facilement observables telles que la croissance sur une surface et la production de matrice. Les autres attributs physiologiques des microorganismes en biofilm, notamment les taux de croissance altérés et l'expression de gènes non exprimés par les organismes planctoniques, en d'autres termes le phénotype biofilm, doivent être pris en considération. Sur cette base, Donlan et Costerton (2002) ont proposé une définition plus complète : « un biofilm est une

communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules qui sont irréversiblement attachées, à un substratum, ou une interface ou les unes aux autres, emprisonnées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires autoproduites et exhibant un phénotype altéré par rapport au taux de croissance et à la transcription des gènes ». Enfin le terme société du biofilm a également été utilisé (McDougald et al., 2012), faisant allusion à l'organisation des communautés microbiennes du biofilm ainsi qu'aux systèmes de communication intercellulaire et de régulation des fonctions au sein de cet ensemble complexe et dynamique.

Toutefois certains des concepts à la base des biofilms sont encore en plein évolution, notamment le système de communication intercellulaire ou quorum-sensing. Des études récentes ont montré que ce système de communication n'est pas uniquement liée à la densité cellulaire mais aussi à la localisation spatiale des cellules (Timp et al., 2009), ainsi qu'aux conditions hydrodynamiques qui règnent dans les systèmes fermés (Janakiraman et al., 2009). En outre d'autres travaux (Mashburn-Warren et al., 2008 ; Nakamura et al., 2008 ; Schooling et al., 2009 ; Remis et al., 2010), ont montré le rôle joué par les vésicules membranaires dans la communication cellulaire. Ces vésicules membranaires (MVs), libérées par les cellules durant leur croissance normale facilitent le transport entre les cellules de molécules telles que l'ADN, des protéines et des molécules de signalisation.

➤ **L'historique**

L'historique des biofilms est marqué par leur passage du milieu industriel au domaine médical. La découverte des biofilms a été faite dans le milieu marin au début du 20ème siècle, lors de travaux sur les problèmes de détérioration des coques de navires (Angst, 1923, Henrici, 1933 in Bagge et al., 2001). Il a été ainsi démontré que les salissures qui affectaient les bateaux n'étaient pas seulement chimiques mais avaient également une origine microbienne, et que les bactéries dans l'eau ne flottaient pas librement mais vivaient sur des surfaces submergées dans l'eau. L'existence de l'état sessile avec l'état planctonique a été reconnue suite à la découverte faite par Zobell en 1943 (Donlan, 2002) montrant que le nombre de bactéries colonisant les parois d'une bouteille remplie d'eau de mer était supérieur à celui des bactéries dans l'eau. Toutefois, les outils d'investigation disponibles à l'époque notamment les techniques de microscopie traditionnelle ne permettaient pas d'observer les biofilms.

Le concept du biofilm a été proposé puis généralisé à d'autres environnements par William Costerton dans les années 1980 indiquant que la majorité des microorganismes

adhèrent à des surfaces biotiques ou abiotiques par des mécanismes déterminés qui leur offrent des avantages dans cette niche écologique particulière (Costerton et al., 1978). Cette période a été également marquée par la découverte des biofilms sur les dispositifs médicaux. En effet, et grâce au microscope électronique, la capacité d'un biofilm à se développer sur un implant médical a été démontrée pour la 1^{ère} fois chez un patient doté d'un stimulateur cardiaque (pacemaker) ayant développé une infection à *Staphylococcus aureus* (Marrie et al., 1982). Dès lors et à ce jour, de nombreux travaux ont montré que les surfaces des dispositifs médicaux sont favorables à la colonisation microbienne et au développement de biofilm (Hazan et al., 2006 ; Bruellhoff et al., 2010 ; Treter et Macédo 2011 ; Djeribi et al., 2012). L'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) à partir des années 1990 a permis d'observer des biofilms intacts, révélant leur structure et architecture tridimensionnelle (Heydorn et al., 2000 ; Tomas et al., 2010). Depuis, la recherche sur les biofilms, notamment dans le domaine clinique a connu un essor considérable (Costerton et al., 2005 ; Dunlop et al., 2005 ; Donlan, 2011 ; Francollini et Donelli, 2010 ; Vertes et al., 2012). Plus de 5000 publications sur le sujet sont recensées entre 2000 et 2010 (Karunakaran *et al.*, 2011). Les techniques de microscopie de haute résolution, (microscopie électronique à balayage, microscopie confocale à balayage laser, la microscopie de force atomique) utilisées souvent en combinaison (Dige et al., 2007; Schaudinn et al., 2009 ; Neu et al., 2010), ont permis de réaliser de grands progrès dans la connaissance et la compréhension du phénomène.

➤ Le processus

La formation de biofilms est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes plus ou moins bien caractérisées (figure 1). Différents modèles ont été proposés pour décrire ce phénomène. Les premiers modèles simplifiés aux systèmes aquatiques, comprennent le modèle à deux étapes (Marshall et al., 1971), le modèle à trois étapes (Busscher et Weerkamp, 1987) et le modèle à cinq étapes proposés par Characklis et Cooksey, (1983) et Lawrence et al., (1987). Le modèle à six étapes est universellement adopté pour décrire la formation de biofilm d'une manière générale (Gottenbos et al., 1999 ; Tolker-Nielson et Molin., 2000, Sauer et al., 2002). Ces modèles ne constituent pas des modèles mathématiques et le nombre d'étapes n'a qu'une valeur explicative. En effet, quel que soit le nombre d'étapes dans les représentations schématiques du processus de formation du biofilm telle que celle de la figure 1, les étapes critiques du biofilm sont l'adhérence, la prolifération et la dispersion ou détachement.

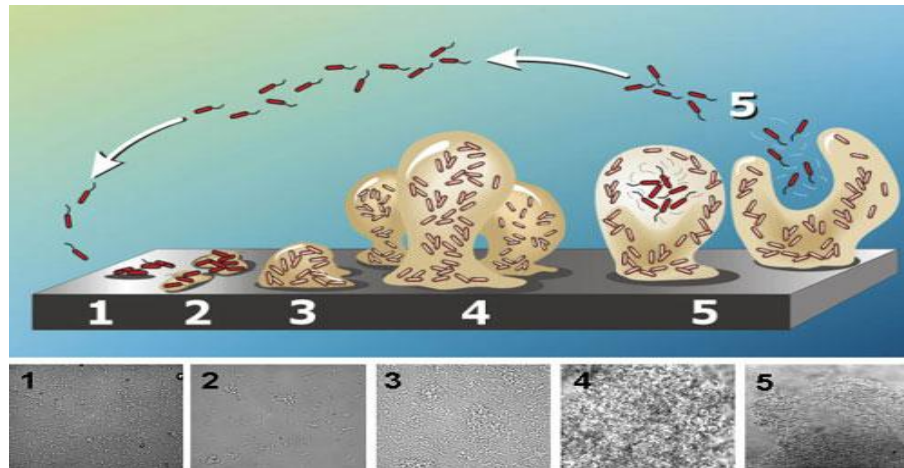


Figure 1 : Représentation schématique du processus de formation du biofilm, mettant en évidence les structures en tours en champignons (source : ww.2.binghamton.edu/biology/faculty/davies/research.htm)

✚ Etape 1 : Le conditionnement de la surface.

Le conditionnement de la surface des matériaux d'adhésion ou formation du film de conditionnement est considéré comme la première étape du processus de formation du biofilm. La surface de tout support exposé à un milieu aqueux sera inévitablement et presque immédiatement conditionnée ou recouverte de polymères provenant de ce milieu (Donlan, 2002) (figure 2). L'adsorption de ces molécules provoque des modifications des propriétés physico-chimiques de surface du support et affecte l'adhésion bactérienne (Gottenbos et al., 1999 ; Bakker et al., 2004 ; Lorites et al., 2011) qui sera ainsi favorisée ou inhibée. Cette dernière propriété est utilisée comme approche dans la lutte préventive contre l'adhésion microbienne et la formation de biofilms, par modification des surfaces (Bazaka et al., 2012; Yoshinari et al., 2010). Inversement le film de conditionnement peut altérer la surface des équipements de façon à promouvoir leur affinité pour les microorganismes. Le film de conditionnement le mieux connu est celui qui se forme au contact de l'eau de mer (Compère et al., 2001 ; Bakker et al., 2003 ; 2004 ; Jain et Bhosle, 2009).

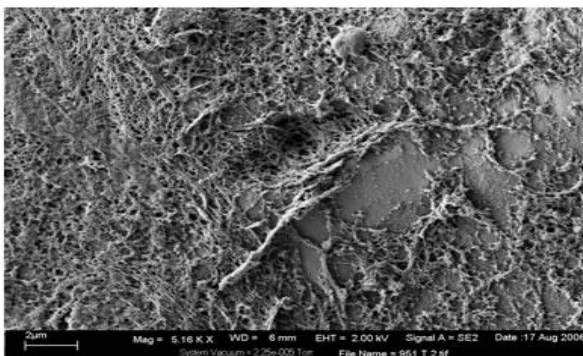


Figure 2 : Un film de conditionnement de nature protéique formé sur un neuro-stimulateur (Center for Biofilm Engineering, Montana State University)

✚ Etape 2 : Transport des bactéries ver le support

Les interactions entre les bactéries et le support nécessitent un rapprochement d'environ 50 nm tel qu'exprimé dans les théories de l'adhésion (Hori et Matsumoto, 2010 ; Katsikigiani et Missirlis, 2004). La proximité du support est perçue par les bactéries via des signaux environnementaux (Lowery et al., 2008 ; Lopez et al., 2010 ; Karatan et Watnick, 2009). Pour cela les bactéries doivent être transportées à proximité du support par un mécanisme actif ou passif. Le transport passif est dominé par des phénomènes non spécifiques tels que le flux, les mouvements brownien ainsi que la viscosité du milieu. Le transport actif consiste dans le déplacement des cellules en réponse à l'attraction exercée par la couche visqueuse riche en nutriment (chimiotactisme). Ce phénomène implique les organites de déplacement tels que les flagelles mais également des récepteurs spécifiques et sensibles aux variations de concentrations des nutriments présents.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont montré que la mobilité bactérienne joue un rôle central dans la colonisation bactérienne des surfaces et la formation de biofilm (Shrout et Chopp, 2006 ; Houry et al., 2011 ; O'May et Tufenkji, 2011). Le flagelle était déjà supposé permettre de franchir la barrière électrostatique répulsive (Morisaki et al., 1999 ; O'Toole et Kolter, 1998). Ceci est actuellement, non seulement confirmé (Van Houdt et Michiels, 2010), mais le rôle du flagelle et de la mobilité dans les stades précoces de la formation de biofilm et les interactions cellule-surface est amplement reconnu (Lemon et al., 2007 ; Meritt et al., 2007 ; Van Houdt et Michiels, 2010). D'après Houry et al., 2011, la mobilité est nécessaire aux bactéries pour atteindre les sites convenables pour la formation de biofilms. Toutefois, ce rôle est parfois contesté (Klausen et al., 2003 ; O'Neils et Marquis, 2006) la synthèse du flagelle étant réprimée après l'adhésion initiale chez de nombreuses bactéries (Todhanakasem et Young, 2008). Par contre chez *Pseudomonas aeruginosa*, la mobilité contribue également au développement du biofilm sur le plan de sa structure et architecture tridimensionnelle, en intervenant dans le phénomène d'agrégation des cellules adhérees et la formation de microcolonies (O'Toole et Kolter, 1998 ; Picioreanu et al., 2007 ; Patriquin et al., 2008). Ces travaux ont montré que les biofilms formés par des mutants déficients dans les gènes de synthèse du flagelle forment des biofilms plats constitués d'une monocouche de cellule. En fait chez cette bactéries trois types de mouvement sont décrits : les types swimming, twitching et swarming (Shrout et chopp, 2006 ; Caiazza et al., 2007 ; Tremplay et Deziel, 2010). La mobilité par nage (swimming motility) est modulée par le flagelle dans les milieux liquides alors que le déplacement en groupe ou radeau (swarming

mobility) est observé sur des surfaces visqueuses ou des milieux de culture à faible concentration d'agar, et est considérée comme un facteur intervenant dans la résistance des biofilms aux agents antimicrobiens (Lai et al., 2009). La mobilité par glissement (twitching motility) est un déplacement associé aux surfaces, observé chez les cellules adhérentes après la disparition du flagelle, et attribué aux pilis de type IV. Ce type de déplacement a également été mis en évidence chez d'autres espèces bactériennes (Bahar et al., 2009 ; Li et al., 2007 ; Burrows, 2012). En résumé, la mobilité peut affecter l'adhésion et la formation de biofilm via différents mécanisme en fonction du type de bactéries.

✚ Etape 3 : l'Adhésion

L'adhésion des microorganismes à une surface inerte ou vivante est un processus complexe qui n'est pas encore complètement élucidé et dévient souvent des modèles théoriques qui la décrivent (Hori et Matsumoto, 2010). Il est cependant admis que l'adhésion bactérienne aux surfaces est caractérisée par une phase physico-chimique initiale non spécifique, suivie par une phase moléculaire et cellulaire spécifique appelées couramment adhésion réversible et adhésion irréversible. Actuellement trois approches théoriques sont utilisées pour décrire les interactions qui sont impliquées dans l'adhésion microbienne aux surfaces : la théorie DLVO, l'approche thermodynamique et la théorie DLVO étendue (XDLVO) (Mora et Casinelli, 1997; An et Friedman 1998; Hermansson, 1999; Poortinga et al., 2002 ; Strevett et Chen., 2003; Katsikigiani et Missirlis, 2004; Chen et al., 2011; Hori et Matsumoto, 2010). Les paragraphes suivants sont une synthèse de ces différentes revues ainsi que d'autres références traitant de l'adhésion bactérienne aux surfaces.

La phase réversible, est dominée par des interactions de longues distances, considérées comme de faible intensité. Il s'agit des forces d'attractions de Van der Waals et des interactions électrostatiques répulsives qui apparaissent lorsque la distance qui sépare les bactéries du support atteint 50 nm. Selon la théorie DLVO, ces forces s'exercent jusqu'à un rapprochement de la surface inférieur ou égal à 15 nm : c'est la région du minimum secondaire.

La phase irréversible est caractérisée par des interactions de courte distance telles que les interactions hydrophobes, acides-base de Lewis, et la formation de dipôle. Ces interactions sont plus fortes et apparaissent lorsque la distance devient inférieure à 3 nm : c'est la région du minimum primaire. Très simplement dit, les bactéries qui se rapprochent étroitement de la

surface lui deviennent attachés (Karaten and Watnick, 2009). Pour cela, la bactérie doit d'abord franchir la barrière DLVO répulsive. Toutefois, dans cette seconde phase d'adhésion, des réactions spécifiquement moléculaires entre les structures de la surface des bactéries et la surface du substrat deviennent prédominantes. L'adhésion de la bactérie à la surface est renforcée par le biais de liaisons sélectives des structures polymériques des surfaces bactériennes, telles que les capsules, les fimbriae, les pili et les EPS qui agissent en tant que colle (Katsikigiani et Missirlis, 2004). Le rôle des protéines telles que les adhésines fimbriales d'*E. coli* (Krogfelt, 1991), la BAP (biofilm-associated protein) d'*Acinetobacter baumannii*, Brossard et Compagnari (2012), les glycoprotéines de l'exosporium de *B. cereus* (Lequette et al., 2011) ainsi que d'autres protéines bactériennes (Pieters, 2011 ; Van Ulsen, 2011) dans l'adhésion aussi bien aux surfaces inertes que vivantes est souligné. Le rôle des EPS est primordial, ces derniers peuvent contribuer à la formation d'un film de conditionnement recouvrant entièrement la surface (Azeredo et al., 1999). Ces interactions, ainsi que les forces d'hydratation ou hydrophobicité (Strevett et Chen., 2003), les facteurs environnementaux tels que la rugosité du support ou la force ionique du milieu (Galopin et al., 2010 ; Hermansson, 1999) et les forces de cisaillement (Boks et al., 2008 ; Galopin et al., 2010) ne sont pas pris en considération par la théorie DLVO qui est jugée ainsi insuffisante pour expliquer tous les événements gouvernant l'adhésion bactérienne.

La théorie thermodynamique est la deuxième approche physico-chimique qui a été utilisée pour décrire l'attachement bactérien aux surfaces. Elle est basée sur l'estimation des interactions interfaciales et prend en considération aussi bien les interactions physico-chimiques attractives et répulsives que les interactions acide-base (électron donneur/électron accepteur) et les exprime en énergie libre de surface (ELS) des surfaces interactives. Ce qui permet le calcul de l'énergie d'adhésion selon l'équation : $\Delta G^{\text{adh}} = \gamma_{\text{sm}} - \gamma_{\text{sl}} - \gamma_{\text{ml}}$, qui sont les énergies libres respectives des interfaces solides –microorganismes, solide-liquide et microorganisme-liquide. L'adhésion est favorisée si l'énergie libre par unité de surface est négative ce qui signifie que l'attachement bactérien est accompagné d'une diminution de l'énergie libre du système.

La troisième théorie est la théorie DLVO étendue ou XDLVO proposée par van Oss, (1994). Elle prend en considération les forces d'hydratation ou l'hydrophilicité et l'hydrophobicité microbienne. Elle est appliquée pour les forces polaires incluant les interactions acide-base et les interactions hydrophobes, non prises en compte dans la théorie DLVO (Strevett et Chen., 2003).

Ces trois théories ne permettent pas, cependant, de caractériser l'adhésion d'une manière absolue, chacune d'elle étant applicable dans un contexte donné tel que souligné dans la littérature. En outre, certains travaux (Ahimou et al., 2001 ; Bellon-Fontaine et al., 1990) ont montré que, par exemple, pour l'approche thermodynamique, les résultats peuvent varier selon les techniques de mesure utilisées ou les souches bactériennes (Hamadi et al., 2008). L'absence de technique permettant de caractériser la phase biologique de l'adhésion est également évoquée (Beloïn et al., 2008). Les résultats de techniques dérivants des différentes théories sont souvent comparés dans l'appréhension de l'adhésion bactérienne aux surfaces. Ainsi, l'estimation de l'adhésion de deux souches bactériennes au verre (*Pseudomonas stutzeri* PS et *Staphylococcus epidermidis*) par les approches DLVO et XDLVO a montré que les prédictions de l'adhésion bactérienne et sa réversibilité sont plus fiables avec la théorie XDLVO (Bayouhd et al., 2009). Le même résultat est rapporté par Chia et al., (2011) pour l'adhésion de *Salmonella* à différents substrats. Par contre, Jacobs et al., (2007) décrivent les limites de cette théorie pour l'adhésion bactérienne dans les milieux poreux. L'approche thermodynamique a été utilisée avec succès pour caractériser l'adhésion à des surfaces en verre de *Pseudomonas fluorescens* (Erbil, 2011) ainsi que d'autres bactéries (Li et Logan 2004). Salutiano et al., (2010) ont trouvé que l'adhésion à l'acier inoxydable, d'une souche de *B. cereus* survivant à une procédure de nettoyage acido-alcalin n'était pas favorable sur le plan thermodynamique (mesure de l'angle de contact). Résultat qui fut confirmé par les essais d'adhésion sur l'inox (mesure du nombre d'ufc/cm²). Vilinska et Rao (2011) trouvent une bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et les calculs obtenus selon la théorie XDLVO et la théorie thermodynamique. Le même résultat est obtenu par Chen et al, (2011) sur des données de la littérature soumises à une analyse statistique approfondie.

Etape 4 - 5: La croissance et la maturation du biofilm

La croissance du biofilm correspond à la multiplication cellulaire, la production de l'EPS ainsi que du matériel extracellulaire varié. La prolifération des cellules aboutit à la formation de microcolonies qui sont décrites comme des foyers tridimensionnels hautement récalcitrants (Conibear et al., 2009). La figure 3 est une illustration de cet aspect caractéristique des microcolonies du biofilm. L'importance de ces structures est primordiale dans la constitution de cet édifice microbien.

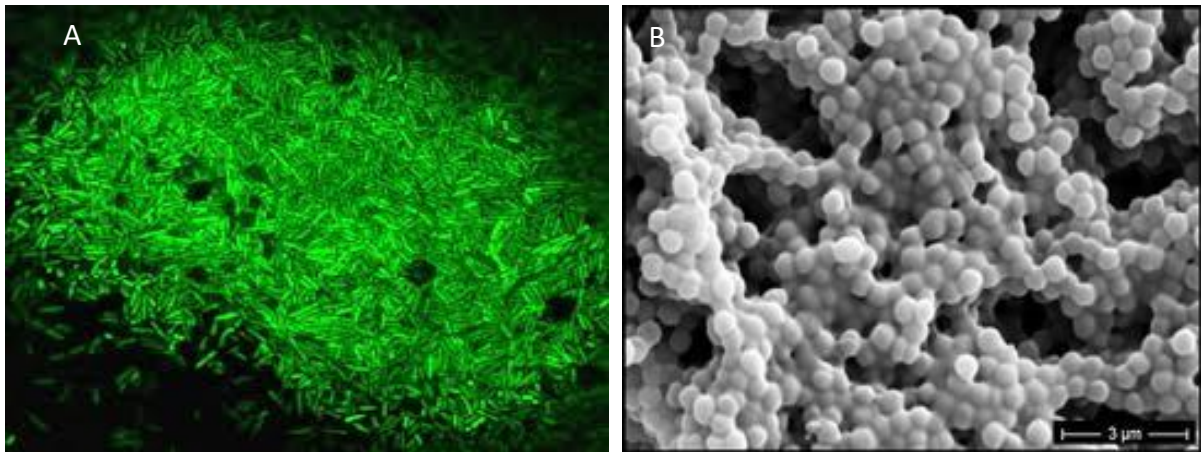


Figure 3 : (A) : Image de microcolonie d'un biofilm de 9 h formé par une souche de *P. aeruginosa* porteuse de la protéine verte fluorescente (GFP) et observé en microscopie confocale à balayage laser (<http://ausubellab.mgh.harvard.edu/picturehtml/pic20.html>).

(B) : Micrographe d'un biofilm en colonies de *Staphylococcus aureus* obtenu en microscopie électronique à balayage (www.coe.montana.edu/biofilmbook)

En effet l'unité de base du biofilm est la microcolonie (Donlan, 2002), qui est aussi l'une des caractéristiques les plus remarquables du phénotype biofilm. La morphologie des colonies dans les biofilms diffère de celles des colonies des cultures libres. Ceci a été démontré pour les colonies de *Pseudomonas* (Mann et Wozniak, 2012). Des colonies petites et rugueuses productrices d'un type particulier de polysaccharides, des colonies à la surface ridée productrices de cellulose et des colonies muqueuses productrices d'alginate constituent des sous-populations du biofilm formé par cette espèce. De même l'arrangement spatial des microcolonies contribue à l'architecture du biofilm et a de profondes implications pour son fonctionnement (Davey et O'Toole, 2000). La proximité des cellules au sein de la microcolonie ou entre les microcolonies fournit un environnement idéal pour la création de gradients nutritionnels, les échanges génétiques et le quorum-sensing (Donlan, 2002). L'hétérogénéité physiologique des cellules qui en résulte est impliquée aussi bien dans le phénomène de dispersion (Donlan et Costerton, 2002) que celui de résistance aux agents antimicrobiens (Stewart et Franklin, 2008). Cette hétérogénéité physiologique et métabolique est l'illustration de l'existence de gradients nutritionnels et physicochimiques (pH, O₂, potentiel redox) aussi bien au sein du biofilm qu'à l'échelle de la microcolonie (figure 4). En effet chaque microcolonie est une communauté indépendante avec son propre environnement vital. Ces colonies sont aussi considérées comme un élément important de la résistance des biofilms aux agents antimicrobiens (Sriramulu et al., 2005 ; Mah et al., 2012), qui n'est pas

celle d'une cellule isolée mais d'un ensemble multicellulaire (Häussler, 2010 ; Remis et al., 2010 ; Flemming et Wingender, 2001).

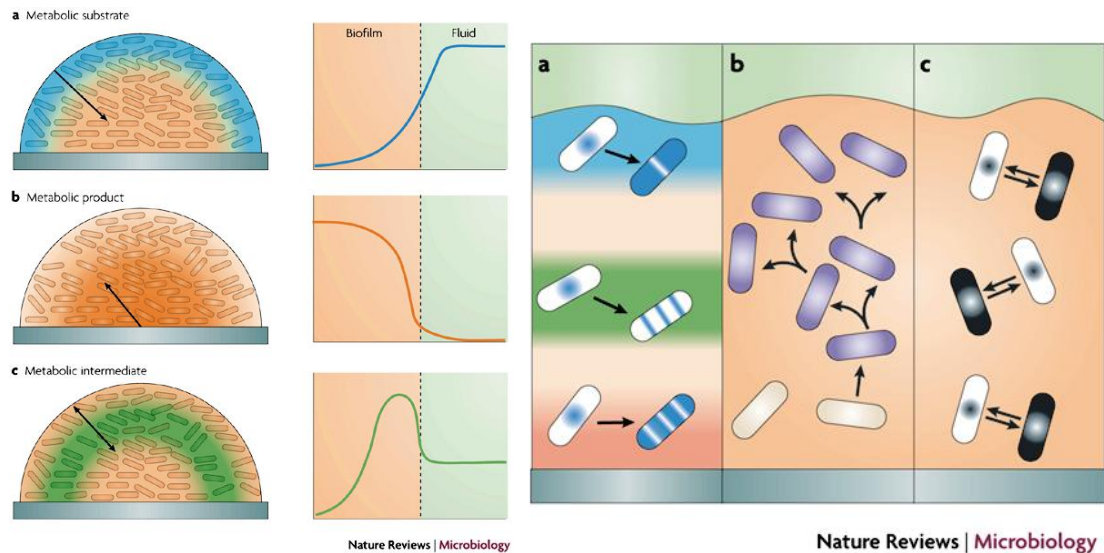


Figure 4 : Hétérogénéité physiologique à l'intérieur du biofilm. (Stewart et Franklin, 2008)

A gauche : trois modèles d'hétérogénéité chimique survenant en biofilm suite aux interactions de type réaction-diffusion d'un substrat métabolique (bleu : a), d'un produit du métabolisme (orange : b) et d'un intermédiaire métabolique (vert : c). La concentration d'un substrat consommé dans le biofilm diminue en fonction de la profondeur et la distance à partir de la source (a). Inversement un produit du métabolisme est plus concentré à l'intérieur du biofilm (b). Un intermédiaire métabolique qui est aussi bien consommé que produit au sein du biofilm peut montrer des profils de concentrations avec des maxima locaux (c).

A droite : Les trois mécanismes hypothétiques de la diversification phénotypique dans le biofilm. (a) adaptation physiologique : les cellules ont une réponse adaptative aux conditions environnementales locales par activation ou désactivation de certains gènes. Les réponses dépendent du microenvironnement chimique local et permettent donc une série d'adaptations localisées distinctes. (b) La variation génotypique et la sélection naturelle : Une mutation ou un réarrangement chromosomique conduisent à des variants qui se multiplient selon leur aptitude à le faire dans le biofilm. (c) Activation stochastique du gène : Les cellules basculent entre des états physiologiques discrets par le déclenchement de gènes qui se fait de manière aléatoire dans la nature.

Le deuxième constituant essentiel du biofilm est la matrice organique formé de substances polymériques extracellulaires ou EPS (extracellular polymeric substances). Celle-ci représente

85 à 90% du volume du biofilm (Donlan, 2002, Sutherland et al., 2001). Ces substances polymériques extracellulaires étaient initialement assimilées à des exopolysaccharides, et l'abréviation EPS est utilisée indifféremment pour désigner les deux éléments. Actuellement, il est bien reconnu que les EPS de la matrice, produits par les microorganismes du biofilm sont un mélange complexe de biopolymères comprenant des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques et des lipides (Ma et al., 2009 ; Vu et al., 2009 ; Flemming et wingender, 2010). Du matériel accessoire variable qualitativement et quantitativement est également produit et permet des adaptations aux conditions environnementales (Mann et Wozniac, 2012). Toutefois, les polysaccharides sont les composants majoritaires de la plupart des biofilms, l'alginate chez *P. aeruginosa* et l'acide colanique chez *E.coli* (Sutherland, 2001). Des exceptions sont observées dans la composition de certaines matrices de biofilms où des protéines peuvent prédominer (Branda et al., 2006 ; Christner et al., 2010 ; Molobela et al., 2010). Les vésicules membranaires (MVs) produites par les bactéries Gram- sont également considérées comme des composants importants de la matrice extracellulaire (Schooling et Beveridge, 2006) et sont supposées jouer un rôle dans le transfert de l'ADN (Schooling et al., 2009) et le quorum-sensing (Mashburn et Whiteley 2005). Néanmoins, la composition des EPS varie également en fonction des organismes présents et des conditions environnementales et elle n'est pas bien connue chez de nombreux microorganismes producteurs de biofilm. C'est le cas de la matrice organique de *B. cereus* (Vilain et al., 2009).

Les fonctions clés des EPS comprennent d'abord l'intervention dans l'attachement initial des cellules aux différents substrats (Morisaki et al., 1999 ; Singh et al., 2013) et leur protection contre les stress environnementaux et la déshydratation (Vu et al., 2009). Morisaki et al., (1999) ont montré que la barrière énergétique devient considérablement faible quand les surfaces bactériennes sont riches en polymères. Par ailleurs les EPS forment un réseau tridimensionnel cohésif qui interconnecte et immobilise de manière transitoire les cellules (Flemming et wingender, 2010) et influencent la structure tridimensionnelle et l'architecture du biofilm (Kreft et wimpenny, 2001 ; Sutherland, 2001 ; Czaczyk et Myszka, 2007). En outre, la matrice du biofilm agit comme un système digestif externe maintenant les enzymes extracellulaires à proximité des cellules, leur permettant de métaboliser des biopolymères dissouts, colloïdaux ou solides (Flemming et Wingender, 2010). En effet, le caractère biodégradable des EPS de la matrice du biofilm a été mis en évidence par Zhang et Bishop, (2003), qui ont montré que ces composés pouvaient être dégradés par leurs propres producteurs ainsi que par d'autres organismes. Ce qui constitue une source de nutriments que

les bactéries peuvent utiliser, par digestion enzymatique en cas de famine ou de privation nutritionnelle. La matrice extracellulaire est également impliquée dans la résistance aux agents antimicrobiens (Kim, 2001) et dans la communication intercellulaire via le quorum-sensing (Karatan et Watnick, 2009 ; de Kievit, 2009). Des travaux récents ont souligné l'importance de l'ADN extracellulaire (ADNe) dans le quorum-sensing (Spoering et Gilmore, 2006), ainsi que son rôle dans la structure du biofilm, et sa contribution à la construction et la solidification de la matrice organique, par réaction avec les exopolysaccharides (Vilain et al., 2009), ainsi qu'avec les vésicules membranaires (MVs) (Schooling et al., 2009) et les cations (Mulcahy et al., 2009). Selon ces chercheurs, la chélation des cations par l'ADN est supposée induire également une résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*.

Les structures des biofilms sont variables entre les structures étalés monocouches et les structure tridimensionnelles surélevés. Une structure bidimensionnelle en rayon de miel (Figure 5 A) est démontré chez *L. monocytogenes* pour des biofilms peu développés (Marsh et al., 2003). Le modèle structural le mieux étudié est celui de la structure en champignon de *P. aeruginosa* (Donlan et Costerton, 2002) (figure 5 B). Dans ce modèle, des conglomérats cellulaires agrégés dans une matrice d'EPS sont montés en structure en forme de tours et de champignon (mushrooms). Ils sont traversés par un système de canaux et des pores permettant la circulation d'eau de gaz et de nutriments ainsi que des molécules de signalisation et du matériel extracellulaire divers.

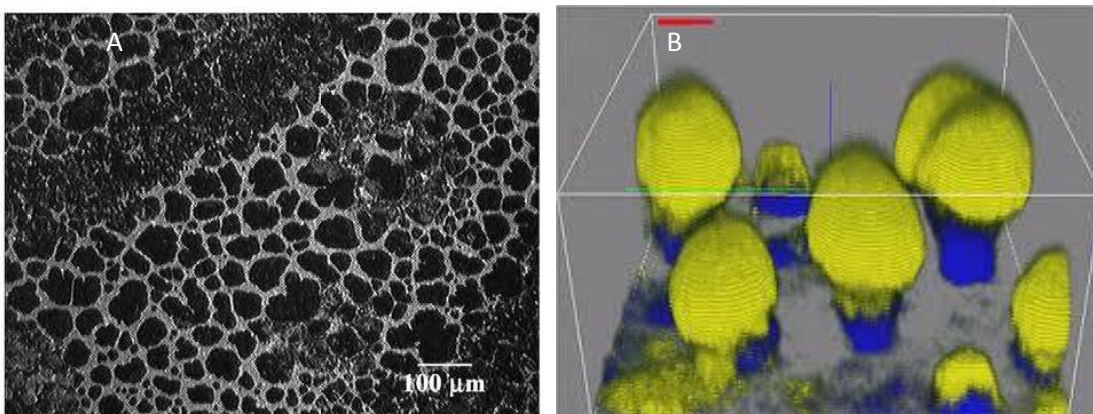


Figure 5 : (A) Structure en rayon de miel d'un biofilm de 6 h formé par *Listeria monocytogenes* et observé en microscopie à fluorescence grand champ (WFM) (Marsh et al., 2003) et (B) structure en champignon du biofilm de *P. aeruginosa*. (Source : <http://www.birmingham.ac.uk/schools/biosciences/staff/profile.aspx>)

✚ Etape 6 : La dispersion/ détachement du biofilm

La phase de dispersion est considérée comme l'étape finale qui complète le cycle du biofilm. Elle est également appelée phase planctonique, puisque des cellules différenciées

quittent le biofilms et retournent à l'état libre perdant ainsi le phénotype biofilm, mais pouvant coloniser d'autres surfaces (Donlan, 2002 ; McDougald et al., 2012). La synthèse de travaux récents (McDougald et al., 2012), souligne que la formation de ces cellules et leur dispersion éventuelle sont initiées par des mécanismes variés et remarquablement sophistiqués. Une variété de mécanismes de dispersion/dissolution est mise en place selon les espèces. Ces mécanismes comprendraient d'une part, la dégradation de la matrice extracellulaire par digestion enzymatique (Lequette et al., 2010 ; Nijland et al., 2010), et différenciation cellulaire telle que l'activation des fonctions de motricité de type swimming d'autre part (Sauer et al., 2002 ; Stoodley et al., 2002 ; Ma et al., 2009 ; McDougald et al., 2012). La figure 6 montre un processus de dispersion rencontré chez *P. aeruginosa*, par formation dans les biofilms matures de cavités centrales qui se remplissent de bactéries mobiles. La dispersion survient suite à la rupture de ces cavités et la libération de ces cellules mobiles. D'après Ma et al., (2009) le phénomène de formation de cavité est le résultat de l'accumulation de polysaccharides à la périphérie des microcolonies, durant la formation du biofilm. Ceci a pour effet de créer une cavité vide au centre de la microcolonie. Au stade de dispersion, des cellules mobiles ainsi que des cellules mortes et de l'ADN extracellulaires s'accumulent dans ces cavités.

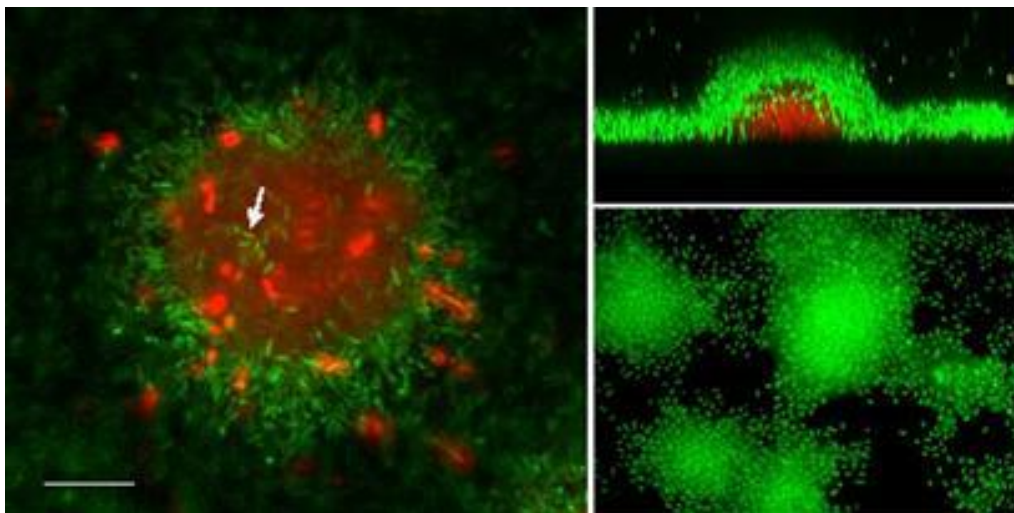


Figure 6: Dispersion d'un biofilm observée en CLSM avec coloration Live/Dead®
(<http://www.sbs.soton.ac.uk/staff/jsw/images/biofilm.jpg>)

Les cellules au centre des microcolonies subissent une différenciation complexe. Des sous-populations de cellules meurent et subissent une lyse cellulaire (les cellules colorées en rouge). D'autres cellules à l'intérieur des microcolonies survivent à la mort (les cellules vertes pointées par la flèche), et sont souvent observées en train de quitter le centre de la microcolonie et de se disperser (Ma et al., 2009).

En effet, la dispersion des biofilms n'est pas seulement une dispersion passive résultant de paramètres hydrodynamiques tels que les forces de cisaillement (Stoodley et al, 2001) mais peut-être un phénomène hautement régulé comprenant plusieurs circuits sensoriels (Karatan and Watnick, 2009). Les gènes du quorum-sensing y jouent un rôle prépondérant. La dispersion permet au biofilm de se propager et de coloniser de nouvelles surfaces. Ainsi, en certains points, le biofilm atteint une masse critique, les couches les plus externes commencent à générer des cellules planctoniques qui peuvent s'échapper du biofilm et coloniser d'autres surfaces (Donlan et Costerton, 2002). Selon Stoodley et al., (2002), les cellules quittent les microcolonies, quand celles-ci atteignent un diamètre minimal critique de 100 μm . Avec l'accroissement de la taille du biofilm, les cellules résidant dans les couches profondes n'ont plus accès aux nutriments et peuvent souffrir de l'accumulation des résidus toxiques. Leur microenvironnement devenant défavorable, les bactéries doivent y répondre en retournant à leur mode de vie planctonique (Karatan and Watnick, 2009). De nombreux travaux ont montré que le statut nutritionnel du milieu environnant est impliqué dans la régulation du phénomène de dispersion, la diminution des nutriments (Gjermansen et al., (2005), aussi bien que leur augmentation (Sauer et al., 2002) peut conduire à une dispersion du biofilm. Ces différentes études ont montré que la dispersion du biofilm n'est pas liée à l'action des forces physiques telles que celles rencontrées dans le phénomène de détachement (Stoodley et al., 2001 ; Donlan et Costerton, 2002 ; Choi et Morgenroth, 2003). Celui-ci est principalement soumis à l'action mécanique du flux et des forces de cisaillement qui provoquent le détachement de fragments plus ou moins importants de biofilms. Les cellules emprisonnées dans ces fragments de matrice extracellulaires conservent par contre le phénotype biofilm, notamment toutes les caractéristiques de résistance aux agents antimicrobiens de la communauté parentale (Donlan et Costerton, 2002). Ceci a une signification capitale dans les procédés d'enlèvement et d'élimination du biofilm. La figure 7 résume l'ensemble des mécanismes de dispersion qui sont connus



Figure 7 : Migration du biofilm source : (<http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/>).

❖ Techniques d'études du biofilm

L'approche pluridisciplinaire des biofilms se reflète bien dans les méthodologies adoptées, pour leur description et la compréhension des phénomènes qui leur sont associés. Un grand nombre de techniques applicables à l'étude des biofilms est, en effet, cité dans la littérature. La microscopie de haute résolution et la biologie moléculaire sont très importantes. La caractérisation des propriétés de surface ainsi que des interactions impliquées dans les phénomènes d'adhésion, la caractérisation de la matrice extracellulaire, la détermination de sa composition sont des exemples des aspects sur lesquels portent les études.

❖ Détermination des propriétés de surface

De nombreuses méthodes pour la détermination des propriétés de surface des cellules microbiennes sont décrites. Les plus couramment utilisées portent sur la détermination de la charge de surface et de l'hydrophobicité (Kreckler et al., 1989 ; Mozes et al., 1988). La charge électrique est mesurée par la mobilité électrophorétique, qui permet de déterminer le potentiel Zéta par mesure du déplacement d'une particule chargée (bactérie ou support) à travers un liquide lorsqu'elle est soumise à un champ électrique. La méthode de mesure de l'angle de contact est largement utilisée pour l'estimation des propriétés de surface des cellules et des substrata (Reid et al., 1992 ; Bellon-Fontaine et al., 1996 ; Li et Logan, 2004 ; Galopin et al., 2009 ; Hamadi 2008 ; 2012). Les techniques utilisées pour la détermination de l'hydrophobicité comprennent également, la mesure l'angle de contact (CAM) (Bellon-Fontaine et al., 1996 ; Chen et al., 2011 ; Sharma et Rao, 2002), l'adhésion bactérienne à un

solvant apolaire (Rosenberg, 1981), la HIC ou hydrophobic interaction chromatography ainsi que de nombreuses autres techniques (Kreckler et al., 1989 ; Mozes et al., 1988). La mesure de l'angle de contact, basée sur la mesure de l'angle formé entre le rayon de courbure d'une goutte d'un liquide et une surface (cellule ou support), permet de déterminer l'hydrophobicité cellulaire et celle des surfaces solides. Par contre les deux dernières méthodes ne sont appliquées que pour la mesure de l'hydrophobicité des cellules microbiennes.

L'adhésion bactérienne au solvant apolaire (BATH : bacterial adhesion to hydrocarbon) mise au point par Rosenberg (1981) est basée sur la mesure de l'affinité des cellules bactériennes à un hydrocarbure apolaire tel que le décane ou l'hexadecane. Cette technique a connu un grand succès et a bénéficié d'un large usage pour la caractérisation des propriétés des surfaces bactérienne car elle ne requiert aucun matériel spécial et est facile à mettre en œuvre. Elle a été modifiée par Bellon-Fontaine et al., (1996) avec la mise au point de la méthode MATS (microbial adhesion to solvents). L'adhésion microbienne aux solvants prend en considération les interactions acide-base de Lewis. Ainsi, en plus du liquide apolaire deux solvants polaires, l'un se comportant comme un donneur d'électron, tel que l'éther d'éthyle, et l'autre comme un accepteur d'électron (le chloroforme) sont utilisés.

❖ **Les techniques de culture.**

L'obtention d'un biofilm expérimental nécessite de réaliser des cultures sur des microorganismes qui ont été fixés au préalable à un support inerte. Le choix du matériau du support dépend du modèle de biofilm à étudier. Des lames ou coupons de dimensions variées, sont utilisées et placées dans des dispositifs dans lesquels sont assurées la nutrition du biofilm et son incubation. Le traitement de ces lames dépend de l'objectif de l'étude. Les méthodes de quantification des cellules microbiennes en biofilm peuvent exiger le détachement du biofilm qui peut se faire, par ultra sonication ou par écouvillonnage, suivi par un dénombrement sur plaque ou une évaluation par une méthode indirecte telle que l'ATPmétrie.

▪ **Les microplaques de titration**

La technique des microplaques de titration au cristal violet, mise au point par O'Toole et Kolter, (1998) est une technique très utilisée, pour la formation de biofilms (Niu et Gilbert, 2004 ; Pierce et al., 2008). C'est une technique colorimétrique basée sur le principe que le cristal violet se lie de manière proportionnelle à la biomasse du biofilm (Niu et Gilbert, 2004). En effet cette technique de coloration permet de visualiser les cellules qui s'attachent à la surface et se colorent en pourpre avec le cristal violet, alors que les surfaces abiotiques ne sont

pas colorées (Pratt et Kolter, 1998). Cette technique connaît de nombreuses applications. Elle a été utilisée dans les études sur le screening des mutants déficients dans la formation de biofilm (Pratt et Kolter, 1998), l'étude du pouvoir antimicrobien tels que les désinfectants (Pitts et al., 2003) la détermination de l'activité inhibitrice des huiles essentielle (Chorianopoulos et al., 2008 ; Lebert et al., 2007) et l'activité antifongique (Pierce et al., 2008). De nombreuses variantes à la technique des microplaques de titration existent, des modifications sont opérées pour augmenter sa fiabilité. La validation des résultats peut-être obtenue par d'autres techniques telles que les techniques microscopiques.

▪ **La cellule à flux**

Les biofilm peuvent être cultivés in-vitro dans les cellules à flux (flow cell). Celles-ci sont des systèmes ouverts qui permettent l'approvisionnement en continu en nutriments d'une manière similaire à l'environnement réel qu'il soit médical, naturel ou industriel (Gilbert et Keasling, 2004 ; Sternberg et Tolker-Nielsen, 2006 ; Pamp et al., 2009 ; Zhang et al., 2011).

De nombreux modèle de cellules à flux existent (figure 8). Certains sont disponibles dans le commerce, d'autres sont construits par les chercheurs eux même. La cellule à flux est construite simplement à partir de pièces de tubes capillaires en verre montés sur une base en plastique (figure 8 A et B) ou en métal (figure 8 C et D) (Stoodley et al., 2001). Les dispositifs les plus utilisés sont les dispositifs de Robbins modifiés (Hall-Stoodley et al., 1999 ; Kharzmi et al., 1999 ; Honraet et Nelis, 2006, Ruiz et al., 2008). Les coupons ou bouchons à travers lesquels passe la suspension bactérienne, dont les cellules adhèrent et forment le biofilm sont détachables.

Après un certain temps d'incubation, ils sont retirés et les cellules détachées par ultrasonication puis dénombrées sur plaque. Ils peuvent aussi être utilisés pour des analyses chimiques et biologiques, notamment l'observation microscopique de la structure des biofilms. La cellule flux a permis d'observer les biofilms en temps réel par CLSM.

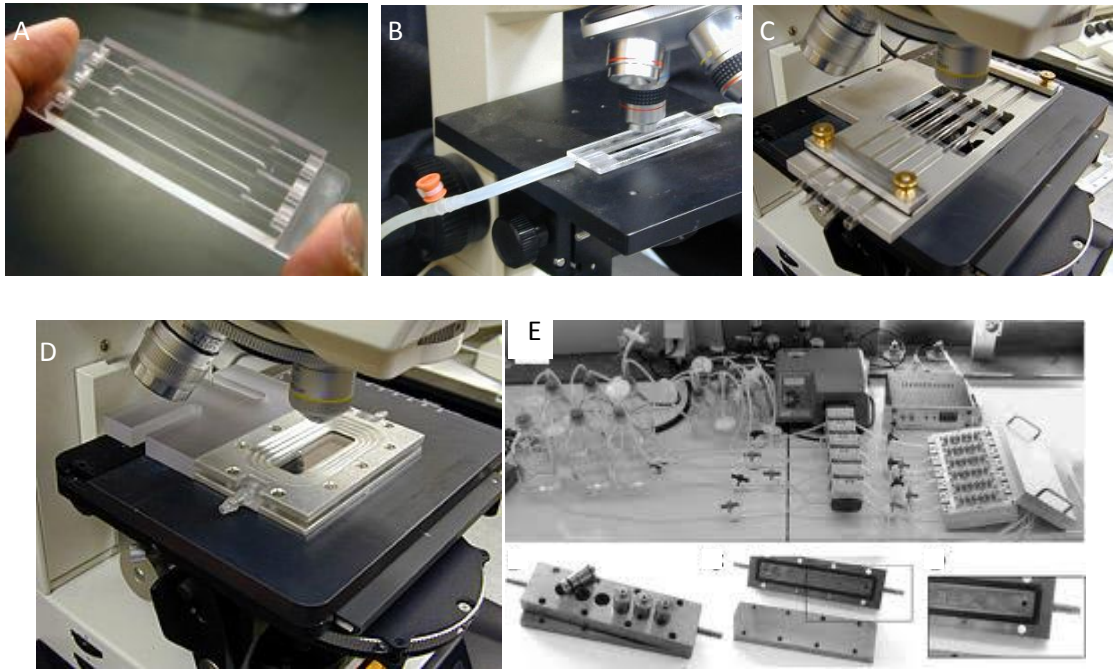


Figure 8 : Cellule à flux et dispositif de Robbins modifié. (A): base en plastique d'une cellule à flux (www.csm.Bio.dtu.dk). (B) cellule à flux capillaire simple montée sur support de microscope (Stoodley et al., 2001). (C) cellule à flux capillaire en métal montée sur microscope et (D) cellule à flux en forme d'assiette plate pouvant recevoir des coupons de différents matériaux (plastique, céramiques et métaux) pour l'étude du développement de biofilms sur des surfaces autres que le verre ([www.Center for genomicsciences.org/research/biofilm_flow.html](http://www.Centerfor.genomicsciences.org/research/biofilm_flow.html)). (E) : Dispositif de Robbins modifié (Ruiz et al., 2008).

Le développement de méthodes simples de mesure et de caractérisation des biofilms est nécessaire pour l'identification en routine du risque biofilm. Les techniques de culture classique sont encore utilisées (Djeribi et al., 2012 ; Ray et al., 2012). La technique utilisée par (Djeribi et al., (2012), est simple et pratique et permet l'évaluation du biofilm formé à l'intérieur de dispositifs médicaux tels que les cathéters. Elle consiste à disposer des pièces de cathéters contaminées sur une gélose au sang et isoler ensuite les bactéries qui s'y développent (figure 9). La technique semi-quantitative proposée par (Ray et al., 2012), est basée sur la formation par les bactéries du biofilm de colonies rugueuses sur milieux gélosés. Ces colonies sont comparées à celles formées par une souche de *Vibrio fischerii*, utilisée comme référence.

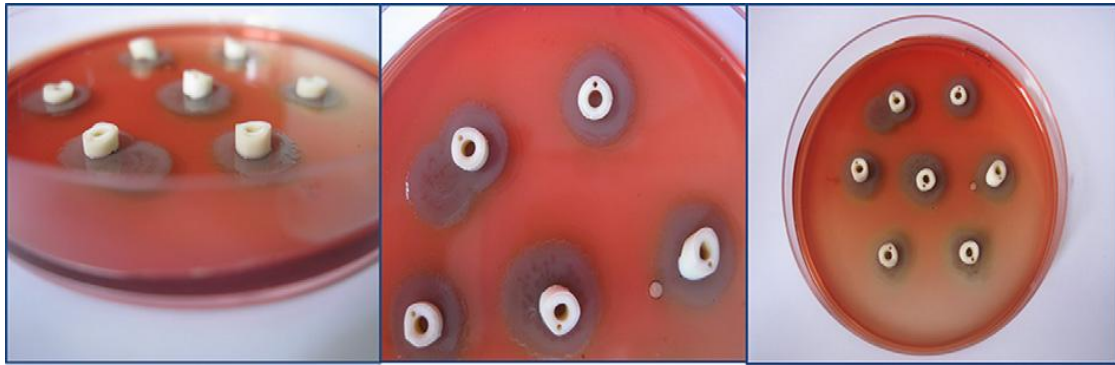


Figure 9 : Des cultures bactériennes obtenues sur gélose au sang à partir de disques découpés dans des cathéters contaminés et incubés (Djeribi et al., 2012).

❖ Les techniques microscopiques

▪ Le microscope électronique électronique à balayage (MEB)

L'utilisation du MEB pour l'étude des biofilms a permis de fournir les premières images de la surface des biofilms, révélant des structures en trois dimensions. Avant l'avènement de la CLSM, la MEB était considérée comme la technique standard d'or pour l'étude morphologique des biofilms (Trinidad et al., 2010). Toutefois la déshydratation des spécimens requise à cause du grand vide dans les microscopes électroniques, engendre des altérations dans la structure de la matrice organique et des images déformées du biofilm sont obtenues (Priester et al., 2007 ; Trinidad et al., 2010 ; Dohnalkova et al., 2011) (figure 10). En outre, la préparation du matériel biologique pour la MEB requiert des manipulations extensives comprenant une fixation, une déshydratation des échantillons suivie par un séchage, au point critique (Little et al, 1991, Cortizo et de Mele, 2003 ; Priester et al., 2007).

Les échantillons non-conducteurs tels que les biofilms nécessitent leur recouvrement avec un métal, or et/ou platine sont couramment utilisés. Des protocoles variés sont cités dans la littérature avec des variantes visant à améliorer la visualisation des structures cellulaires par utilisation de colorants tels que le rouge de ruthénium (Priester et al., 2007) et atténuer les déformations dues à la déshydratation de la matrice organique par des méthodes cryogéniques (Alhede et al., 2012 ; Dohnalkova et al., 2011). Le microscope électronique à balayage environnemental est proposé comme un outil d'investigation des biofilms respectant l'intégrité de leur structure et autres caractéristiques morphologiques (Little et al., 1991 ; Wallstrom et Karlsson, 2004 ; Ramírez-Camacho et al., 2008 ; Trinidad et al., 2010). En effet le MEB environnemental (ESEM) permet d'observer tout spécimen biologique sans déshydratation et sans utilisation de métaux conducteurs et le glycocalyx hautement hydraté du biofilm peut être observé dans son état naturel (Trinidad et al., 2010) (figure 11, et 12).

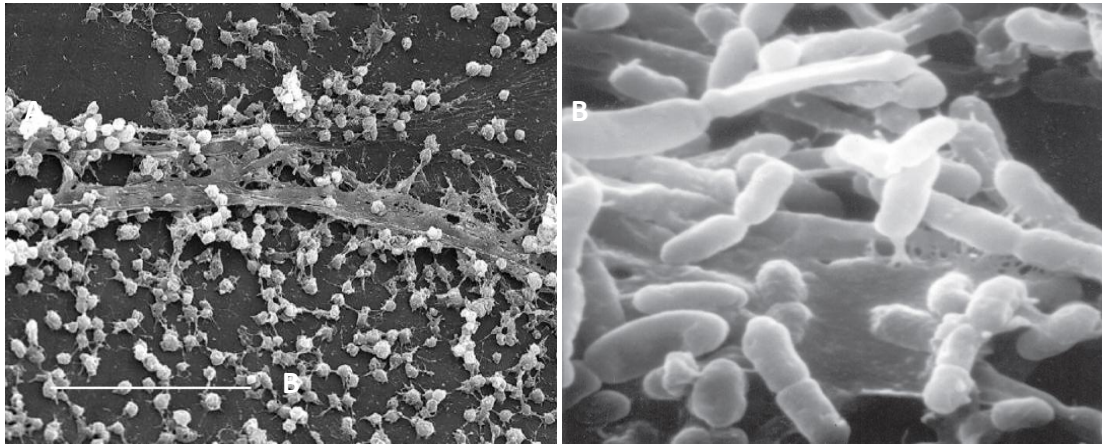


Figure 10 : Micrographes de biofilm obtenus au MEB (A) : (in Donlan et Costerton, 2002) et (B) : (Flemming, 2008), montrant l'effondrement de la matrice organique provoqué par la déshydratation de l'échantillon.

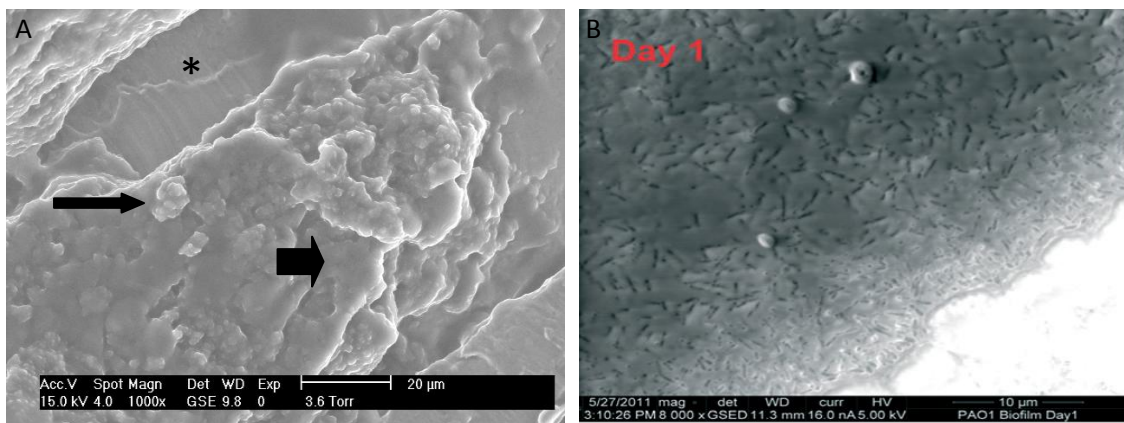


Figure 11 : Micrographes de biofilms au MEB environnemental. (A) : La structure tridimensionnelle permet de voir quelques cellules proéminentes (longue flèche) et le glycocalyx lisse (flèche courte), la présence d'irrégularité est notée sur la surface non recouverte du dispositif (*) (Trinidad et al., 2010). (B) : (Alhede et al., 2012).

Le MEBE permet également des vues d'ensemble à faible résolution et les zones les plus intéressantes peuvent être ré-observés à plus forte amplitude (figure 12).

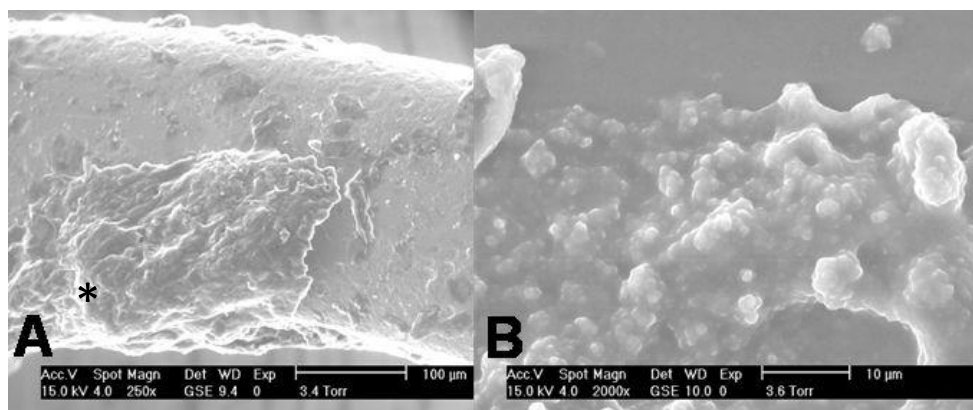


Figure 12 : Des micrographes au MEBE montrant des images de biofilms formés sur des prothèses de titane à différentes résolutions. (A) : une observation préliminaire de l'échantillon à (250 x) montrant une vue panoramique du dispositif ainsi que les zones de sa surface colonisées (*). (B) : montre la structure en détail avec les cellules bactériennes emprisonnées dans du matériel aqueux identifié au glycocalyx (2000 x) (Trinidad et al., 2010).

❖ La microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

La microscopie à épifluorescence et la CLSM sont toutes les deux basées sur l'usage de colorants fluorescents qui excités par la lumière, émettent une fluorescence qui est détectée. L'épaisseur de l'échantillon limite l'emploi de l'épifluorescence dans l'étude des biofilms. Dans la microscopie confocale à balayage laser, ou confocal laser scanning microscopy (CLSM), l'utilisation de la lumière laser permet une résolution voisine de celle de la microscopie électronique sans altération de la structure des spécimens et des observations à différentes profondeurs du biofilm. Elle ne requiert pas de réactifs sauf des solutions aqueuses de colorants fluorescents.

La première observation de biofilm vivant pleinement hydraté a été réalisée par microscopie confocale à balayage laser (Costerton et al, 1995). L'application de la CLSM à l'étude de biofilms formés dans les chambres à flux par des bactéries génétiquement colorées à la protéine fluorescente verte (GFP) (Pamp et al, 2009), a permis l'observation de l'intérieur des biofilms, à des profondeurs contrôlées, fournissant des informations sur leur processus de développement, les différenciations cellulaires, l'organisation spatiale ainsi que d'autres fonctions du biofilm. Les observations microscopiques couplées à la CLSM ont rendu possible la quantification de la biomasse produite dans les biofilms, du développement de différentes structures ainsi que celle des interactions entre les différents types de bactéries dans les biofilms multi-espèce (Jørgensen et al 2003). Cette quantification est souvent associée à des techniques moléculaires telles que la FISH : fluorescent in situ hybridation (Diaz et al., 2006 ; Diges et al., 2009 ; Nistico et al., 2009 ; Jung et al., 2010), qui permet la détection des bactéries sans perturber leur environnement naturel. La combinaison CLSM/FISH est reconnue être une meilleure approche pour la description et compréhension des événements qui surviennent à l'intérieur des biofilm. L'utilisation de microélectrodes, dont la taille est inférieure à 10 nm permet de fournir des données chimiques à l'intérieur des biofilms (O'Toole et al., 2000). La CLSM, et la FISH peuvent être combinées à d'autres techniques microscopiques telles que la microscopie électronique à balayage (MEB) (Schaudinn et al., 2009 ; Alhede et al., 2012) (Figure 13).

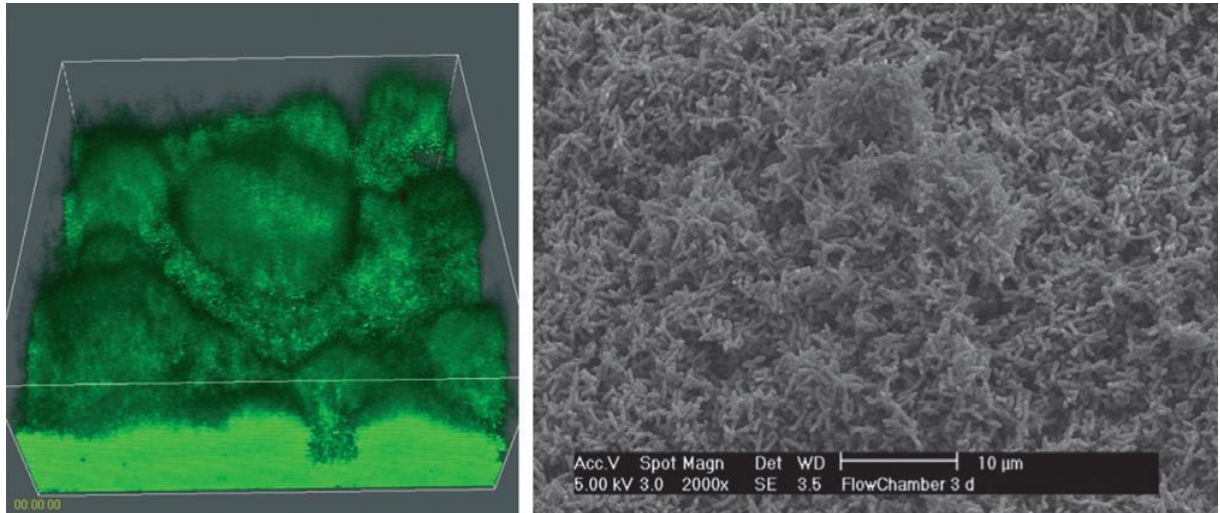


Figure 13 : Comparaison d'images de biofilms par CLSM et MEB (Alhede et al., 2012)

CHAPITRE 2 : LES BIOFILMS DES INDUSTRIES ALIMENTAIRES

➤ Contexte général

L'étude des biofilms dans le milieu des industries alimentaires relève, pour une grande part, du domaine de la sécurité sanitaire des aliments. Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs des produits laitiers sont remises en cause par le problème des biofilms (Srey et al., 2013). Ces derniers causent à l'industrie alimentaire des pertes annuelles de plusieurs millions de dollars (Brook et Flint 2008). Leur formation sur les surfaces en contact avec les aliments est quasi inévitable et est favorisée par les conditions qui prévalent dans les établissements de transformation des aliments. Les biofilms des industries alimentaires sont à l'origine de problèmes qui affectent la qualité hygiénique et sanitaire des produits transformés ainsi que celle des matériaux. En effet, les biofilms sont incriminés dans 40% des toxi- infections alimentaires en France (Lequette et al., 2010 b), et sont considérés comme un risque pour la santé même s'ils ne contiennent que des bactéries inoffensives parce qu'ils constituent un refuge pour les pathogènes (Vlkova et al., 2008). Les bactéries du biofilm se détachent, et peuvent se retrouver dans le produit fini et affecter ainsi sa qualité hygiénique et sanitaire (Bagge-Ravn et al., 2003; Kusumaningrum et al., 2003; Brook and Flint, 2008 ; Pérez-Rodriguez et al., 2008). Le développement de biofilm peut aussi induire la corrosion des surfaces métalliques alimentaires et réduire l'efficacité des appareils par diminution de transfert de chaleur dans les échangeurs thermiques (Austin et Bergeron, 1995 ; Chmielewski et Frank, 2003 ; Simões et al., 2010).

Les nombreuses revues anciennes et nouvelles sur le sujet (Hood et Zottola, 1995 ; Carpentier et al, 1998 ; Kumar et Anand, 1998 ; Meyer 2003 ; Shi et al., 2009 ; Simoes et al., 2010 ; Van houdt et Michieli, 2010 ; Marchand et al., 2012 ; Srey et al., 2013) traitent des biofilms avec pour objectif principal la maîtrise des contaminations microbiennes induites, et par conséquent la mise en œuvre des moyens pour les éliminer. Le problème de la résistance des biofilms aux procédures de nettoyage/ désinfection est souligné (Carpentier et Cerf, 1993 ; Langsrud et al., 2003 ; Burfoot et al., 2009 ; Scheffler, 2009), leur élimination requiert des traitements sévères avec de puissants oxydants (Meyer, 2003 ; Murthy et Venkatesan, 2008 ; Scheffler, 2009). Un autre élément de complexité du problème est la découverte de l'existence de liens génétiques entre la résistance aux désinfectants et aux antibiotiques (Langsrud et al., 2003 ; Arunjo et al., 2011; Morinte et al., 2013). De nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms sont ainsi nécessaires. L'approche préventive est prometteuse, de

nombreux travaux explorent cette voie, cherchant à mettre au point les moyens et procédés pour empêcher la formation de biofilms (Hazan et al., 2006 ; Silvestry-Rodriguez et al., 2008 ; Bruellhoff et al., 2010). Toutefois, la recherche dans ce domaine est encore au stade de l'expérimentation dans la majorité des cas.

➤ **Le modèle du biofilm industriel**

Les biofilm dans l'industrie alimentaire constituent des modèles particuliers qui ne correspondent pas complètement aux modèles de biofilms établis sur la base des observations faites dans les écosystèmes naturels (Chmielewski et Frank, 2003). Ceux-ci sont reconnus se former en réponse aux stress environnementaux qui sévissent généralement dans les milieux naturels, notamment le déficit nutritionnel (Costerton, et al., 1999). Les principes à la base de ces biofilms ne peuvent donc pas être appliqués aux systèmes des industries alimentaires caractérisées par la richesse en nutriments. D'autant plus que l'impact des conditions des processus technologiques de transformation des aliments sur le développement des biofilms doit également être pris en considération (Chmielewski et Frank, 2003). Dans certains modèles développés pour les systèmes de transformation des aliments (Shi et Zhu, 2009), l'étape constituée par les traitements de nettoyage/désinfection est incluse dans le cycle de formation du biofilm (voir figure 14).

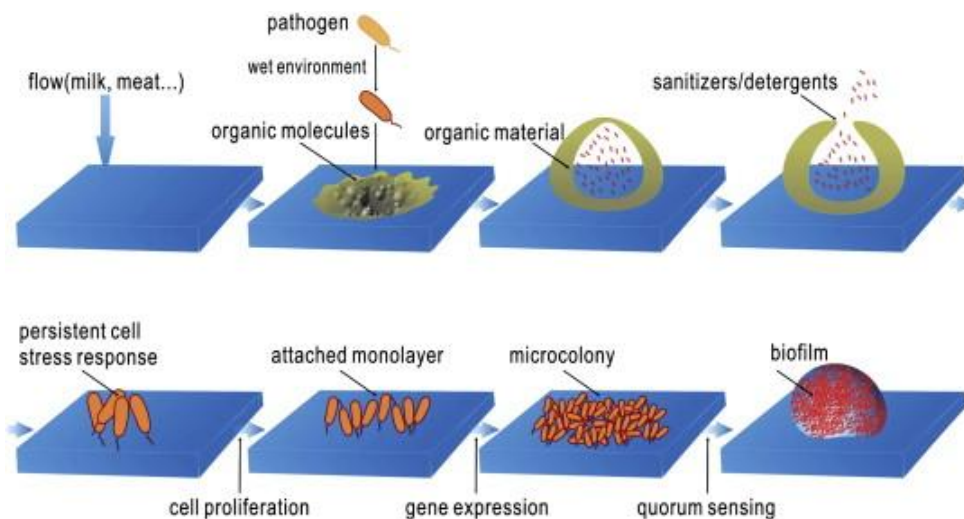


Figure 14 : Séquences des événements dans la formation des biofilm sur les surfaces en contact avec les aliments. (Shi et Zhu, 2009).

Les molécules organiques se déposent en premier sur la surface de l'équipement formant le film de conditionnement. En second lieu, des microorganismes biologiquement actifs sont attirés par les molécules organiques. Troisièmement, des cellules microbiennes persistantes restent après le nettoyage/désinfection et initient une croissance. En dernier, le biofilm se forme avec l'expression des gènes cellulaires et le quorum-sensing. En outre, des

biofilms comme ceux qui se forment dans les conduites de lait peuvent se propager à un taux qui leur est propre par division cellulaire, mais ils peuvent aussi périodiquement libérer des cellules pionnières capables de coloniser les sections en aval du système de pipe (Marchand et al., 2012). Comme décrit pour le système clinique (Donlan et Consterton, 2002), dans les milieux riches en nutriments, le biofilm se forme préférentiellement dans les conditions de forte turbulence (Van Houdt et Michielis, 2010). Dans ces systèmes, il est généralement admis que les propriétés dynamiques du milieu à savoir la vitesse d'écoulement du fluide est un facteur important dans l'approche des bactéries d'une surface (Katsikigiani et Missirlis, 2004). Les flux turbulents favorisent l'adhésion en propulsant les bactéries libres sur les surfaces (Donlan et Consterton, 2002). De ce fait, les principes issus de l'étude des biofilms dans les systèmes naturels ne peuvent être appliqués aux environnements industriels.

➤ **Le biofilm en industrie laitière.**

Un important réservoir de contaminations microbiennes qui a reçu relativement peu d'attention en industrie laitière est le biofilm microbien (Marchand et al., 2012). La formation de biofilms peut avoir lieu dans les différents sites de la chaîne de transformation du lait (Parkar et al., 2004). Les équipements laitiers, principalement les tanks de stockage du lait et le système de canalisation ainsi que les appareils de traitement tels que les pasteurisateurs et des évaporateurs (figure 15), sont reconnus pour être une source de contamination du lait traité par des germes d'altérations ainsi que des pathogènes (Austin et Bergeron, 1995; Kusumaningrum et al., 2003; Brooks et Flint, 2008 ; Salutiano et al., 2010 ; Marchand et al., 2012). Le développement de biofilms sur les équipements laitiers est très rapide (8-12 h), avec des nombres de bactéries souvent supérieurs à 10^6 bactérie/cm² (Bremer et al., 2009). Le risque de transfert de ces bactéries au lait qui circule dans les lactoducs est grand, ce qui implique la contamination microbienne des produits laitiers transformés et la diminution de leur sécurité et durée de vie.



Figure 15 : Equipement laitiers. (A) : tanks de stockage du lait, (B) : système de canalisation (lactoducs), (C) : un échangeur thermique à plaque (source : internet image google)

En raison de leur résistance au traitement thermique et aux agents antimicrobiens, les biofilms de l'environnement laitier sont difficiles à éliminer même avec des procédures de nettoyage et de désinfection acceptables (Bore et Langsrud, 2005 ; Bremer et al., 2006 ; Brooks et Flint, 2008). En outre il a été montré (Le Gentil et al., 2010), que la ré-adhésion des bactéries à la surface des équipements du système de canalisation du lait survient même durant le nettoyage en place (CIP : cleaning-in-place). Dans ce domaine là, l'émergence de la résistance des biofilms aux traitements antimicrobiens conventionnels est également soulignée (Chmielewski et Frank, 2003, Murthy et Venkatesan, 2008 ; Vlkova et al., 2008 Shi et Zhu, 2009 ; Simoes et al., 2010).

➤ **Les facteurs influençant l'attachement aux surfaces industrielles**

Parmi les facteurs qui influencent l'attachement microbien aux surfaces inertes, les propriétés de surface des cellules et des supports inertes sont largement citées dans la littérature (Bagge-Ravn et al., 2001 ; Oliveira et al., 2001 ; Hilbert et al. , 2003 ; Van Houdt et Michielis, 2010).

▪ **L'hydrophobicité et la topographie du support**

Les matériaux les plus couramment utilisés en industrie laitière sont les aciers inoxydables AISI 304 et 316 L (Bagge-Ravn et al., 2001 ; Bremer et al., 2009), parce qu'ils répondent exactement aux exigences des matériaux en contact avec les aliments (Marchand et al., 2012). Ce sont des matériaux qui sont neutres sur les plans chimique, bactériologique et organoleptique, ils sont faciles à nettoyer et résistants à la corrosion (Bremer et al., 2009). Les polymères et les caoutchoucs sont également utilisés (Austin et Bergeron, 1995, Faille et Carpentier, 2009). Le choix du matériau est d'une grande importance, les propriétés de surface telles que la rugosité, la capacité de nettoyage et de désinfection, et l'humidité exprimée en hydrophobicité, déterminent le statut hygiénique du matériau et son influence sur l'adhésion bactérienne (Van Houdt et Michielis, 2010).

Parmi les caractéristiques de surface du support, l'hydrophobicité et les propriétés topographiques ou rugosité sont au centre d'une large controverse. La relation de ces deux paramètres à l'adhésion aux différents matériaux des surfaces industrielles varie largement entre les travaux (Bos et al., 2000 ; Hilbert et al., 2003 ; Cerca et al., 2005 ; Durr, 2007). L'hydrophobicité est reconnue comme un paramètre significatif de l'adhésion des bactéries aux surfaces inertes. De nombreux travaux l'ont montré. Cerca et al., (2005) ont trouvé que l'adhésion de souches de *S. epidemidis* était plus forte aux surfaces hydrophobes qu'aux

surfaces hydrophiles. L'augmentation de l'hydrophobicité du téflon et de l'acier inoxydable a induit l'augmentation l'adhésion des spores de *B. cereus* (Shakerifard et al., 2009). Dans d'autres études, l'adhésion de différentes bactéries à la surface de différents matériaux hydrophobes et hydrophiles (polystyrène, verre) n'était pas influencée par le type de matériel (Bernardes et al., 2010 ; Simoes et al., 2007). Il est cependant admis que les cellules dont la surface est hydrophobe adhèrent préférentiellement aux surfaces hydrophobes qu'aux surfaces hydrophiles et inversement (Shi et zhu, 2009). Toutefois, ceci ne semble pas être une règle générale sachant que la formation de biofilms hydrophiles sur des substrats hydrophobes a été rapportée (Oliveira et al., 2007 ; Wallstrom et Karlsson, 2004). D'après Oliveira et al., (2007) d'autres facteurs tels que la production de polysaccharides doivent être pris en considération. En effet, il a été montré (Myszka et al., 2007) que chez des souches de *Proteus vulgaris* caractérisées par un caractère hydrophobe faible, la production de polysaccharides de faible poids moléculaire a permis de promouvoir l'adhésion de cette bactérie à l'acier inoxydable. Il a été également montré que des substances chimiques tels que les surfactants pouvait augmenter l'hydrophobicité de l'inox et promouvoir l'adhésion bactérienne (Shakerifard et al., 2009). De même, l'usage répété et les traitements d'abrasion transforment le caractère hydrophile de l'inox en hydrophobe (Boulangue-Petermann et al., 1993 ; Kokare et al., 2009).

La rugosité du support est elle aussi largement controversée quant à sa relation à l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm. Cette propriété est décrite par des paramètres mathématiques dont les plus utilisés sont la rugosité arithmétique (R_a) et la rugosité quadratique moyenne (RMS ou R_q). En effet, la surface de l'acier inoxydable n'est pas uniforme mais présente des dissymétries révélées dans l'ultrastructure de ce matériau et exprimées sous le terme de rugosité (figures 16 et 17). Celle-ci peut influencer le mode d'aggrégation des cellules et la formation de microcolonie et par conséquent la morphologie et la structure du biofilm (Johnson, 2008) (Figure 17)

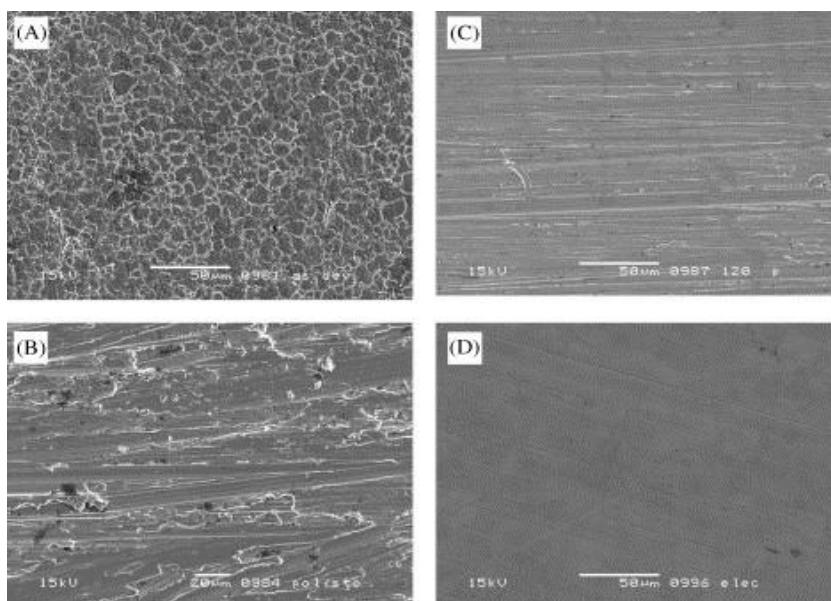


Figure 16 : Micrographe en MEB de surfaces en inox avec différents finis de surface. A: sans traitement de polissage, B: polissage 80 grit, C: polissage 120 grit, D: électropolissage. (Hilbert et al., 2003).

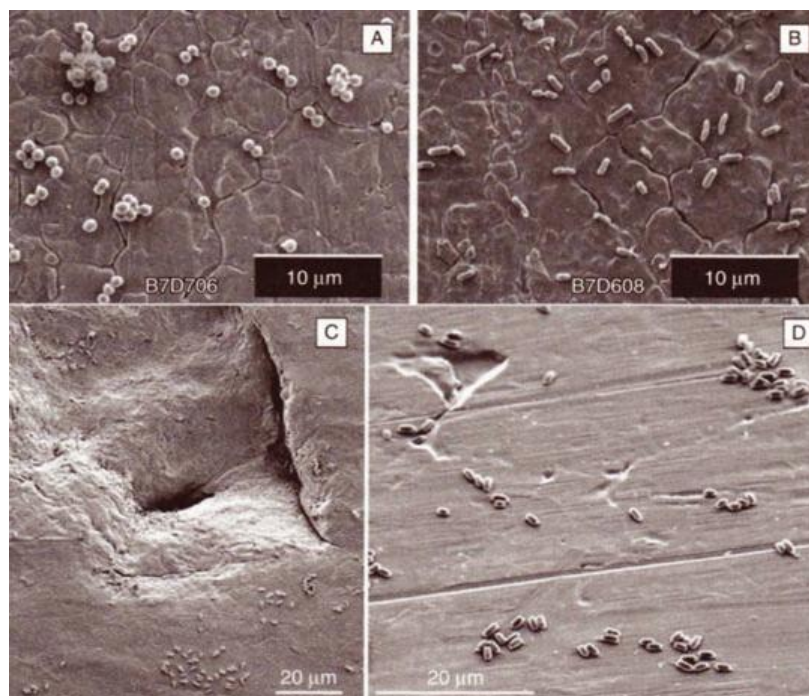


Figure 17 : Adhésion de différents microorganismes sur des surfaces en acier inoxydable. (A-B) : adhésion par de *Staphylococcus caprea* et *Pseudomonas fluorescens* à l'inox avec un fini de surface 2B, (C-D) : adhésion des spores de *B. cereus* sur des supports avec des topographies irrégulières (scratches, flaw.. voir article). Adapté de Faille et Carpentier (2009) par Marchand et al., (2012). Les cellules peuvent adhérer de manière isolées ou par groupe.

La rugosité est déterminée par la MEB et la microscopie de force atomique (AFM) (Arnold et Bailey, 2000 ; Tang et al., 2009) ainsi que par mesure au rugosimètre. Une surface avec une valeur Ra égale à $0.8 \mu\text{m}$ est considérée comme une surface hygiénique en industrie alimentaire (Bagge-Ravn et al). Cette propriété est également influencée par l'usage, et peut servir, selon Chaturongkasumrit et al., (2011), d'indicateur de la durée de vie des équipements dans les établissements de transformation des aliments. En effet, les valeurs de rugosité (Ra) de convoyeurs neufs et de convoyeurs utilisés pendant 5 ans étaient égales à 0.05 et $1.44 \mu\text{m}$ respectivement (Chaturongkasumrit et al., 2011). Les surfaces lisses sont généralement considérées comme défavorables à l'adhésion bactérienne contrairement aux surfaces rugueuses (Arnold et Bailey, 2000). D'après Donlan, (2002), celles-ci sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'irrégularités. En outre, il a été montré que l'adhésion bactérienne est influencée par l'orientation des cellules (Medilanski et al., 2002 ; Mercier et al., 2011), leur taille (Flint et al., 2000) et l'écart entre les sillons (Whitehead et Verran, 2006). D'une part, l'orientation des cellules dans des directions autres que parallèles aux sillons de la surface du matériau réduit l'adhésion. La réorientation des spores de *B. cereus* a été montré expérimentalement sous l'effet de la force du flux (Mercier-Bonin et al., 2011). D'autre part, le maximum d'adhésion est obtenu quand la valeur moyenne de Ra est proche de la longueur moyenne des bactéries (figures 18 et 19).

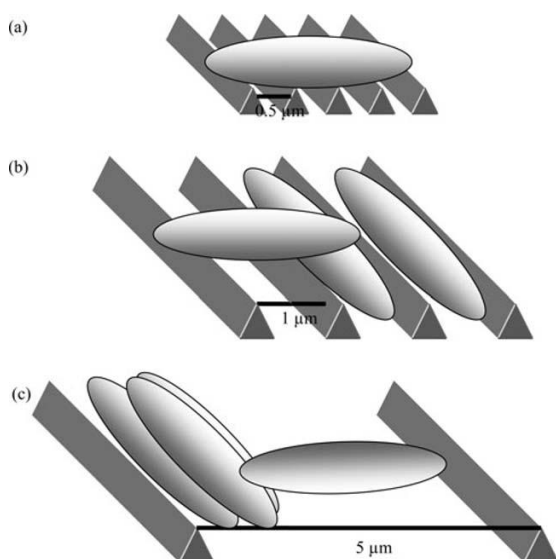


Figure 18 : Influence des caractéristiques de surface et de l'orientation des bactéries sur le nombre de cellules retenues. (a) quand l'écart entre les sillons est faible (inférieur à la taille des cellules), la surface de contact cellule- c substratum est faible, (b) quand cet écart est supérieur à la taille des cellules, la surface de contact est plus grande, (c) pour des écarts plus importants, la surface de contact cellule-substrat étant plus faible, les cellules peuvent être éliminées des structures de surface. (Whitehead et Verran, 2006)

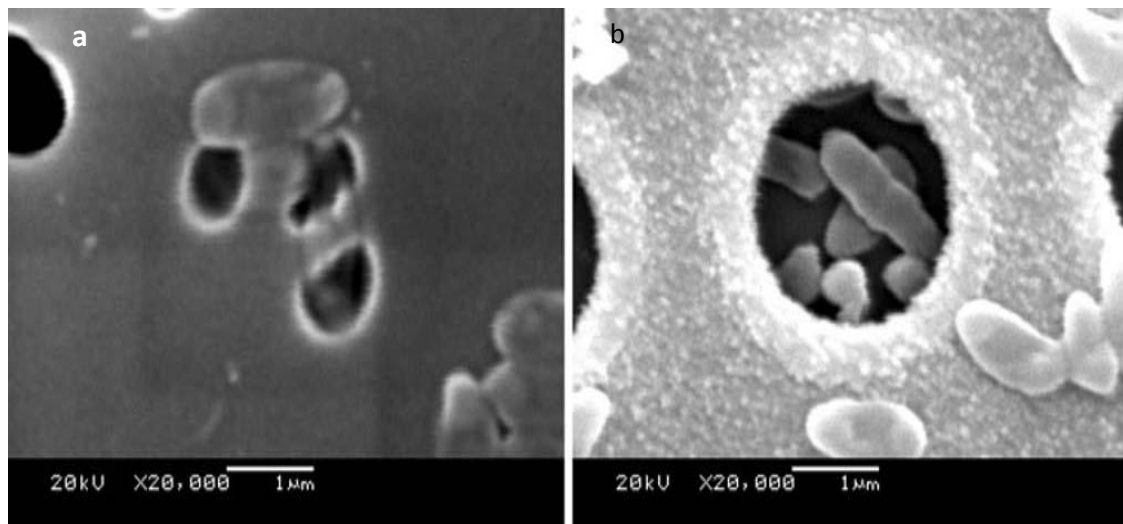


Figure 19 : Des essais de rétention de bâtonnet sur des surfaces en oxyde de titane avec des caractéristiques topographiques de (a) 0.5 μm et (b) 2 μm (Whitehead et Verran, 2006). Les cellules sont retenues dans les structures topographiques de même ordre de grandeur que les dimensions microbiennes

Cette relation entre la taille des cellules et leur orientation d'une part et les caractéristiques topographiques du support d'autre part, pourrait expliquer les différences dans les résultats des travaux. En effet l'absence de relation entre l'adhésion des bactéries et la rugosité est rapportée. Dans une étude (Riedewald, 2006) ont montré que des surfaces ayant subi un électro polissage poussé ont permis l'adhésion d'un nombre important de bactéries. Hilbert et al., (2003), ont également trouvé que la rugosité de l'acier inoxydable (R_a variant de 0.01 à 0.9 μm) n'influe ni sur l'adhésion ni sur la colonisation des surfaces ni sur l'élimination des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* mais qu'elle était un paramètre important dans la résistance à la corrosion (exercée par un agent de désinfection). Dans une autre étude, Prokopovitch et Perni (2009) ont montré que la rugosité de surface n'affecte pas l'adhésion de *S. aureus* et *E. coli* à différents substrats. La rugosité seule (Wallstrom et Karlsson, 2004 ;) ou associée à l'hydrophobicité (Durr, 2007) a été trouvée liée à la capacité de nettoyage des surfaces plutôt qu'à l'aptitude à l'adhésion des microorganismes. Les surfaces lisses sont plus facilement nettoyées que les surfaces rugueuses et montrent également une plus grande résistance à la corrosion (Hilbert et al., 2003 ; Wallstrom et Karlsson, 2004). Certains traitements permettent d'améliorer l'aptitude de l'inox au nettoyage. Ainsi, Verran et al., (2010) ont montré que des surfaces couvertes de titane ont augmenté la nettoyabilité de l'acier inoxydable et diminué l'adhésion bactérienne (figure 20).

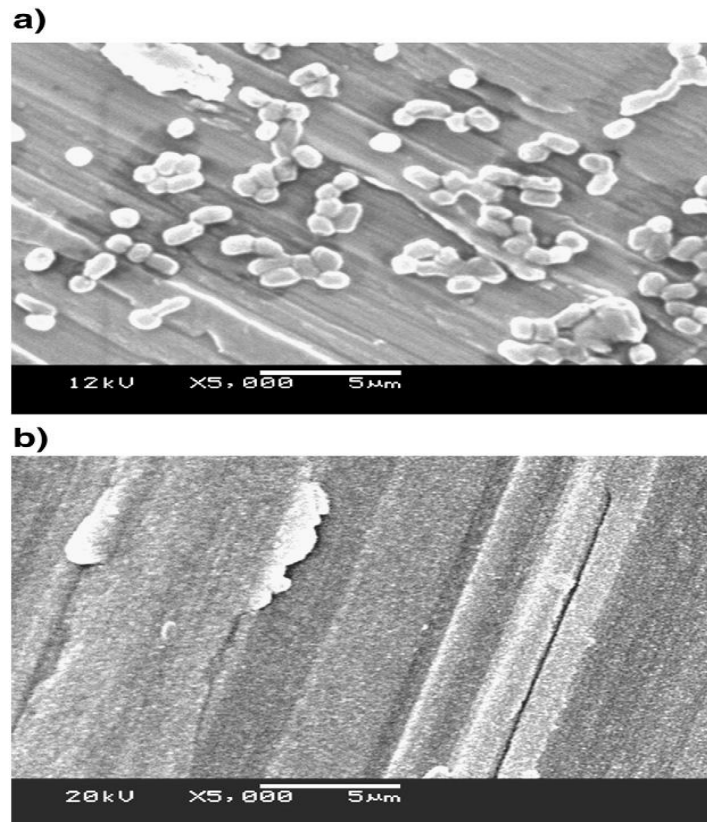


Figure 20 : Micrographes électroniques d'*E. coli* retenu sur une surface en inox (a) non recouvert et (b) recouvert de Titanium montrant que les nombres de cellules sont nettement plus faible sur l'inox conditionné de Titanium. (Verranet al., 2010).

Une relation entre la rugosité et l'adhésion a été trouvée sous l'influence de la température. Il a été montré Chaturongkasumrit et al., (2011), qu'à 30°C, *L. monocytogenes* forme des biofilms robustes indépendamment de la rugosité et qu'inversement à 15°C, l'aptitude à former le biofilm diminue pour les valeurs les plus faibles de rugosité. Ce qui montre que les divers aspects de la topographie influencent le statut hygiénique de l'acier inoxydable en association avec d'autres facteurs dont il faut tenir compte, comme exprimé dans différentes études (Hilbert et al., 2003 ; Durr, 2007 ; Tang et al., 2009). En fait, d'après Zhang et al., (2011), les systèmes expérimentaux actuels ne permettent pas d'appréhender l'ensemble des processus physiques chimiques et biologiques qui régulent le développement de biofilms ni le contrôle efficace de toutes les conditions environnementales.

- **Les propriétés physico-chimiques de surface des bactéries.**

L'hydrophobicité des cellules est impliquée dans les interactions qui gouvernent l'adhésion aux surfaces comme démontré dans les approches théoriques de ce phénomène. Toutefois la relation de cette propriété fondamentale est encore contestée, sa relation à l'adhésion dans certaines conditions expérimentales n'étant pas évidente. D'après Marshall et

Cruickshand, (1973) les cellules bactériennes s'orientent perpendiculairement aux interfaces dans les systèmes air/eau ou eau/solide grâce aux portions hydrophobes de toute cellule propulsée de la phase aqueuse au système. Les interactions hydrophobes permettent aux cellules bactériennes d'outrepasser les forces répulsives exercées par le substrat et de réaliser l'adhésion (Bendinger, 1993). Toutefois des résultats variables sont trouvés dans la littérature. L'hydrophobicité était le facteur majeur de l'adhésion de *P. aeruginosa* à l'inox 304 et 316 L pendant les 30 premières minutes (Vanhaecke et al., 1990). Toutefois, pour Flint et al., (1997), l'adhésion à l'inox n'était pas liée à l'hydrophobicité et la charge de surface des cellules de bacilles thermophiles mais plutôt à leur protéines de surfaces. De même, l'hydrophobicité cellulaire des souches de *S. epidermidis* n'avait aucune influence sur leur adhésion à des surfaces hydrophiles et hydrophobes (Cerca et al., 2005). Une absence de corrélation entre l'hydrophobicité et l'adhésion au PVC est notée pour des spores hydrophobes et hydrophiles de souches de *B. cereus* (Auger et al., 2009). Par ailleurs, d'après Peng et al., (2001), l'hydrophobicité de cellules végétatives de *B. cereus* variait selon le stade physiologique, augmentant durant la phase stationnaire. Cette propriété est également affectée par des facteurs environnementaux tels que les conditions de stress. Une augmentation de l'hydrophobicité des cellules de *Lactobacillus* soumises à un stress biliaire, a été observée dans les premières heures de formation du biofilm (Ambalam et al., 2012). D'une manière générale de nombreux travaux (Castellanos et al., 1997 ; Lindsay et al., 2002 ; Giotis et al., 2009 ; Hamadi et al., 2005), ont montré que cette propriété subit des modifications plus ou moins importantes en fonction des conditions environnementales telles que le pH

➤ La microflore du biofilm en industrie laitière

La flore constitutive du biofilm en industrie laitière peut-être variée et comprendre de nombreuses espèces aussi bien Gram+ que Gram-, telles que *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Pseudomonas* et certaines entérobactéries (Sharma et Anand, 2002). Néanmoins certains groupes de bactéries sont considérés comme inféodés au biofilm dans l'environnement des laiteries en raison de conditions sélectives et propices à la croissance de ces taxons. Il s'agit notamment de *Streptococcus thermophilus* (Flint et al, 1997), des bacilles thermophiles (Parkar et al., 2004 ; Rueckert et el., 2005 ; Seale et al., 2008 ; Burgess et al., 2010) et des membres du groupe *B.cereus* (Wijman et al., 2007 ; Shaheen et al., 2009 ;Salutiano et al., 2010). Dans cette synthèse, l'intérêt sera porté sur la flore sporogène aérobie représentée essentiellement par les bacilles thermophiles et les membres du groupe *B. cereus*.

➤ Caractéristiques des biofilms des bacilles thermophiles

Les bacilles thermophiles principalement *Anoxybacillus* et *Geobacillus* sont considérés comme les contaminants les plus importants de l'industrie laitière où ils sont introduits via la poudre de lait (Murphy et al., 1999, Ronimus et al., 2003 ; Seale et al., 2008, Yuan et al. 2012) et sont formés d'espèces qui se développent de façon optimale à 55 ° C degrés sur l'acier inoxydable (Parkar et al ; 2004).

Dans l'industrie laitière, les bacilles thermophiles sont essentiellement des indicateurs d'hygiène laitière et sont responsables d'altérations dues à leur propriété acidifiantes et leur potentiel enzymatique (Burgess et al., 2010). En effet, les thermophiles obligatoires tels que *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus spp.* ne sont pas pathogènes alors que quelques espèces des thermophiles facultatifs telles que *B. licheniformis* et *B. subtilis* peuvent produire des toxines (De jonghe et al., 2010). D'une manière générale, les bacilles thermophiles sont, capables de croître dans les sections où la température est comprise entre 40 et 65°C et sont caractérisés par des taux de croissance rapides (15 à 20 min), la formation de spores thermorésistantes et un potentiel élevé de formation des biofilms (, Flint et al., 1997 ; Parkar et al., 2001 ; Burgess et al., 2010). L'adhésion des spores des bacilles thermophiles à l'acier inoxydable a été augmentée 10 à 100 fois en présence de lait écrémé (Flint et al., 2001).

Les biofilms des bacilles thermophiles sont désignés sous le terme de biofilm du processus (process biofilms), parce qu'ils se forment dans des conditions qui ne leur permettent pas de former des microcolonies et des structures en multi-couches (Burgess et al., 2010 ; Flint et al., 2001) (figure 21). Ces conditions incluent les sections régulièrement nettoyées dans les laiteries, et les surfaces caractérisées par des forces de cisaillement élevées et dépourvues d'extrémité mortes, telles que les échangeurs thermiques à plaques. Inversement des biofilms consistants peuvent se former dans les conditions opposées.

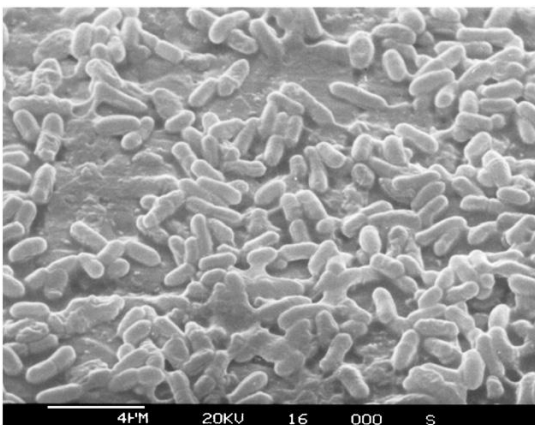


Figure 21 : Micrographe de biofilm de 18 h formé par *Anoxybacillus flavithermus* sur une surface en inox (Flint et al., 2001)

Le contrôle des bacilles thermophiles et de leurs biofilms en industrie laitière repose sur le raccourcissement des cycles de production (6 à 8 h), l'augmentation de la fréquence du nettoyage, l'utilisation des désinfectants, et la réduction de la surface dans les zones optimales de température (Burgess et al., 2010). Le régime de nettoyage proposé par (Parkar et al., 2004) permet l'élimination efficace des biofilms formés par ces bacilles. L'emploi de désinfectants dans certaines laiteries est souhaitable car elle permet d'inactiver toute population microbienne résiduelle sur la surface des équipements (Burgess et al., 2010).

➤ **Le groupe *B. cereus* : considérations taxonomiques, caractéristiques générales.**

Le genre *Bacillus* est un vaste groupe de bactéries aérobies et/ou aéroanaérobies facultatives appartenant à la famille des Bacillaceae, phylum des firmicutes, ayant en commun la faculté de produire des endospores (Fritze et al., 2004). Il est caractérisé par une grande diversité phénotypique et génomique qui lui a valu son intérêt historique en plus de son importance économique et médicale. Ce genre comprend, en effet des espèces qui ont une grande importance en activité humaine : *B. anthracis* bactérie très pathogène agent de l'anthrax, *B. thuringiensis*, parasite d'insecte largement utilisée dans la lutte biologique et *B. cereus sensu stricto* responsable de toxi-infections alimentaires (Didelot et al., 2009 ; Forsyth et al., 1998). Certaines souches avirulentes appartenant à cette espèce ainsi qu'à d'autres espèces du genre *Bacillus* sont même utilisées comme probiotiques en alimentation humaine (Sanchez et al., 2009). *B. subtilis* l'espèce-type du genre, qui en plus d'être un modèle classique pour la recherche scientifique est largement utilisée dans les fermentations traditionnelles et industrielles ainsi qu'en agriculture (Fritze, 2004 ; Maughan et Van der Auwera, 2011). L'extrême hétérogénéité des *Bacillus* est également à l'origine des remaniements profonds qui ont marqué la classification du genre depuis sa création à ce jour. Nombreux sont les chercheurs (Forsyth et al., 1998 ; Priest et al., 2004) qui proposèrent la subdivision du genre en six genres différents, mais celui-ci demeura intact jusqu'en 2004, date à laquelle il fut scindé en plusieurs familles et genres de bactéries formant des endospores (Fritze, 2004 ; Todar, 2008). Certains des premiers membres du genre *Bacillus* ont été placés dans de nouvelles familles. Il s'agit des Acyclobacillaceae (genre : *Acyclobacillus*), Paenibacillaceae (genre : *Paenibacillus*, *Brevibacillus*) et Planococcaceae (genre : *Sporosarcina*). De nouvelles espèces sont proposées mais aussi certaines des anciennes espèces du genre sont placées dans le nouveau genre *Geobacillus* (Nazina et al., 2001). Ainsi, *Bacillus stearothermophilus* et *Bacillus thermodenitrificans* sont devenues respectivement *Geobacillus stearothermophilus* et *Geobacillus thermodenitrificans*. Toutefois, malgré cette

réorganisation, et la description de nouveaux taxons (Jung et al., 2011 ; Coorvits et al., 2012), *Bacillus sensu stricto* demeure le genre le plus important de la famille des Bacillaceae avec plus de 60 espèces bien définies sur le plan taxonomique (Todar, 2008).

Le groupe *B. cereus* constitue l'exemple qui illustre le mieux l'ambiguïté dans les relations entre les différents taxons qui le constituent (Maughan et Van Der Auwera, 2011) et la nécessité de révisions taxonomiques aussi bien au sein du groupe *B. cereus* que du genre *Bacillus* (Schmidt et al., 2011). Traditionnellement formée par quatre espèces étroitement proches: *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* et *B. cereus sensu stricto* (Ash et al., 1991) auxquelles sont rajoutées deux autres espèces jugées proches elles aussi, *Bacillus pseudomycoides* (Nakamura, 1998) et *Bacillus weihenstephanensis* (Lechner et al., 1998), ainsi que la nouvelle espèce *B. cytotoxicus* (Fagerlund et al., 2007 ; Lapidus et al., 2008 ; Lappin-Scott et al., 2008), le groupe *B. cereus* est actuellement composée de ces sept espèces (Guinebrière et al., 2008 ; Schmidt et al., 2011 ; Tourasse et al., 2011). Toutefois, la systématique de ce groupe est encore sujette à une controverse. Alors que la taxonomie traditionnelle présente ces organismes comme des espèces distinctes, la phylogénie moléculaire nouvelle et le séquençage comparé des génomes sont en faveur de leur classification en une seule espèce (Guinebrière et al., 2008; Schmidt et al., 2011 Tourasse et al., 2011). Le concept de l'espèce unique a été déjà largement proposé notamment pour les trois espèces très proches génétiquement *Bacillus anthracis*, *Bacillus. Thuringiensis* et *Bacillus.cereus sensu stricto* (Hansen et al., 2001; Helgason et al., 2004 ; Priest et al., 2004 ; Tourasse et al., 2006 ; Vila-Boas et al., 2007). La proximité génétique de ces espèces est révélée par la similarité extrêmement élevée (plus de 99%) de leurs chromosomes (Ash et al., 1991 ; Rasco et al., 2005). Cette similarité génétique associée à leur pouvoir pathogène pour l'homme ou l'animal, renforce encore la tendance des chercheurs de les regrouper. En outre, chez les trois espèces, les facteurs de virulence et de spécificité d'hôtes sont portés par des facteurs extra-chromosomiques de sorte que lorsque ces plasmides sont perdus les souches rendues ainsi avirulentes ne sont plus distinctes les unes des autres (Frantz et al., 2004 ; Rasco et al., 2005 ; Tourasse et al., 2006). Toutefois, pour des considérations d'ordre médical, économique et social (Guinebrière et al., 2008 ; Priest et al., 2004) et bien que le statut d'espèce génomique soit remis en cause, aucun changement dans la taxonomie de ce groupe n' a été encore fait et tel que souligné par Maughan et Van der Auwera, (2011), ce statu quo sera maintenu encore longtemps.

Les concepts actuels définissent l'espèce *B. anthracis* comme possédant les plasmides pXO1 et pXO2 qui codent respectivement pour la toxine de l'anthrax et la capsule et *B. thuringiensis* comme possédant une variété de plasmides codant les différents types de la toxine gamma ou cristal parasporal (Didelot et al, 2009 ; Rasco et al., 2005). Quant à *B. cereus sensu stricto*, caractérisé par un profil plasmidique très variable, sa pathogénicité est due à la production de facteurs chromosomiques de virulence non spécifiques, tels que des phospholipase et des entérotoxines (Schmidt et al., 2011). Toutefois, les gènes responsables de la production du céruléide (toxine émétique) sont portés par un grand plasmide de virulence (Ehling-Schulz et al., 2006; Rasco et al., 2005). Les espèces *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* se distinguent des autres par l'aspect rhizoïde de leurs colonies et la composition globale en acides gras (Nakamura, 1998). *B. weihenstephanensis* est l'espèce psychrotrophe du groupe caractérisée par une croissance à des températures inférieures à 7°C mais pas à 43°C et est caractérisée par la présence des signatures de psychrophilie dans le gène *cspA* (Lechner et al., 1998). La nouvelle espèce *B. cytotoxicus* relativement rare, est placée dans le groupe phylogénétique VII, et caractérisée par sa toxicité élevée, et sa thermotolérance particulière (croissance à 50°C) (Guinebretière et al., 2012).

➤ Les sept groupes phylogénétiques majeurs

La division du groupe *B. cereus* en sept groupes phylogénétiques a été proposée récemment par Guinebretière et al., (2008) (tableau 1 et figure 22). Dans cette classification Guinebretière et al., ont montré que la structure génétique du groupe *B. cereus* regroupait au sein d'un même groupe phylogénétique, des souches appartenant à des espèces différentes mais partageant le même domaine de température (tableau1). Selon cette classification, chaque groupe correspond à un « thermotype » particulier qui montre clairement la différence entre les capacités à se développer à basses ou hautes températures. On peut relever dans cette classification l'importance des températures minimales et maximales de croissance en tant que caractère physiologique de classification du groupe *B. cereus*. En effet, la définition de groupes thermiques sur la base de la structure génétique et la perte du statut d'espèce génomique de certaines espèces du groupe constitue l'originalité de cette étude. La transition évolutive vers la psychrotolérance illustrée par l'abondance relative des signatures génétiques et qui se retrouve tout au long de la phylogénie, est l'un des résultats remarquables (Guinebretière et al., 2008). Ceci conforte l'argument selon lequel l'évolution globale de *B. cereus sensu lato* n'est pas anarchique mais fortement déterminée par des adaptations écologiques qui expliqueraient le développement de nouvelles lignées évolutives et la longue persistance du groupe face aux changements du climat (Carlin et al., (2009). La température

est, en effet, considérée comme le facteur environnemental le plus important auquel les microorganismes doivent répondre (Guinebretière et al., 2008). Enfin, cette étude a, en outre, permis de positionner dans cette nouvelle structure écotypique, les pathogènes alimentaires ainsi que les espèces phénotypiques courantes (Carlin et al., 2009 ; Guinebretière et al., 2010).

Tableau 1: Les sept groupes phylogénétiques (Guinebretière et al., 2008)

Groupes	espèces	Association à des T.I.A ^a	T°C de croissance	Résistance des spores ^a	% de souches porteuses ^b				
					Hbl	ctyK-2	cytK-1	nhe	ces
I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	Non	10-40	nd	41	0	0	100	0
					86	0			
II	<i>B.cereus</i> II, <i>B.thuringiensis</i> II	Oui	7-40	++	61	13	0	100	0
III	Souches émétiques <i>B.cereus</i> III <i>B. thuringiensis</i> III <i>B. anthracis</i>	Oui	15-45	+++	67	73	0	100	0
					12	31			31
					14	57			7
					14	39			0
IV	<i>B. cereus</i> IV <i>B. thuringiensis</i> IV	Oui	10-45	++	97	79	0	100	0
					97	97			
					86	79			
V	<i>B. cereus</i> V <i>B. thuringiensis</i> V	Oui	8-40	++	88	6	0	100	0
IV	<i>B. Weihenstephensis</i> <i>B. mycoïdes</i> <i>B. thuringiensis</i> VI	Non	5-37	+	83	0	0	100	0
					60	0			100
VII	<i>B. cytotoxicus</i>	Oui	20-50	+++	0	0	100	100	0

N.D : non déterminé, ^aclassement établi par Carlin et al., (2009), ^bles gènes de production de toxines selon Guinebretière et al., (2010). Ces groupes phylogénétiques peuvent être récupérés de la base de données MLST de Tourasse-helgason (<http://mlstoslo.uio.no/>).

Le groupe I est un groupe mésophile correspondant à l'espèce *B. pseudomycoïdes* dont les souches se distinguent de l'espèce *B. mycoïdes* par les signatures associées à la psychrotolérance sur le gène *scpA* (Guinebretière et al., 2008). Le groupe II comprend en majorité (75%) des souches psychrotrophes de *B. cereus sensu stricto* et de *B. thuringiensis*

ainsi que des souches mésophiles (25%) et peut contenir des souches cytotoxiques. Les groupes III, IV et V regroupent les souches de *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* et *B. anthracis* (groupe III) les plus mésophiles du groupe, la température minimale de croissance étant supérieure à 7°C. Les souches de ce groupe sont cytotoxiques certaines d'entre elles portent le gène de la toxine émétique (le gène *ces*). Seules les souches du groupe VI possèdent une signature de psychrophilie dans la séquence du gène *cspA*. *B. cereus sensu stricto* se retrouve dans quatre des sept groupes phylogénétiques : les groupes (II, III, V et VI) principalement avec *B. thuringiensis*, Le seul critère discriminatif entre les deux espèces est la présence ou l'absence du cristal parasporal. Le groupe sept est très éloigné des six autres et contient les souches les plus thermophiles, dont la température de croissance varie de 20 à 50°C.

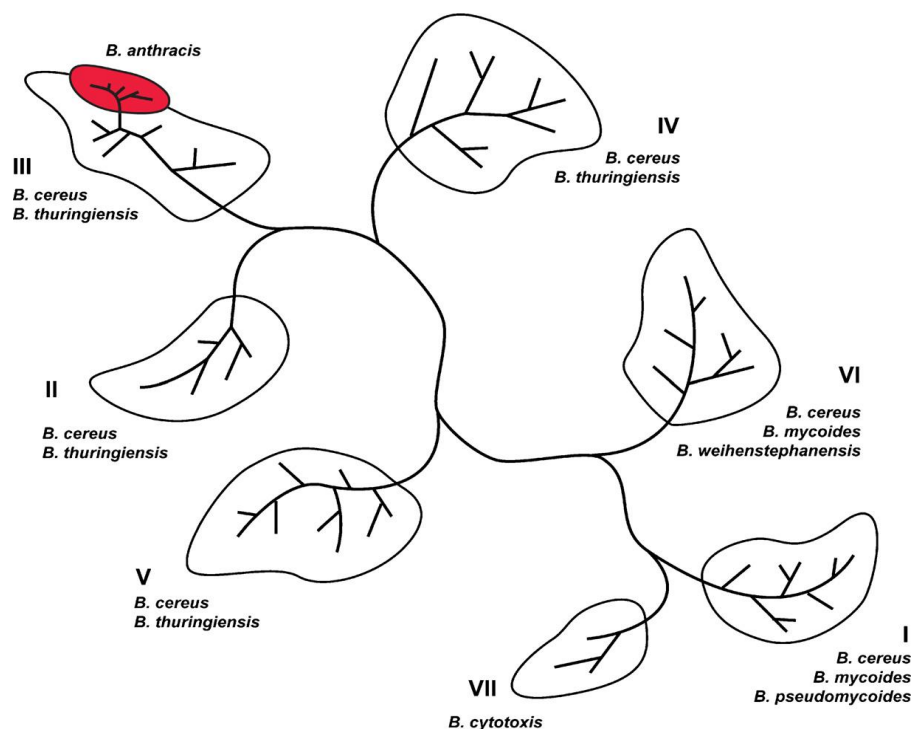


Figure 22 : La structure de l'arbre phylogénétique du group *B. cereus* telle que présentée dans la base de données Hyper CAT (Tourasse et al., 2010) <http://mlstoslo.uio.no>. *B. anthracis* forme une lignée à part étroitement proche des *B. cereus* du groupe III. Les bactéries du groupe *B. cereus* auraient émergé d'un ancêtre commun : *B. anthracis* (Lapidus et al., 2008), à la suite de réarrangements génétiques par le biais de recombinaison ainsi que de transferts génétiques horizontaux (Vials-Boas, et al, 2007 ; Tourasse et al., 2011). Les ramifications à l'intérieur des feuilles sont à titre esthétique seulement.

➤ Principaux caractères phénotypiques du groupe *B. cereus*.

Les bactéries du groupe *B. cereus* sont facilement distinctes des autres bactéries du genre *Bacillus* ainsi que du reste des bactéries sporogènes aérobies (AEFB) dont elles diffèrent par leur incapacité à fermenter le mannitol et leur production de lécithinase (Fritze, 2004, Logan et Berkley, 1984). Ces caractéristiques associées à d'autres critères phénotypiques tels la nature de l'hôte, la

morphologie des colonies, les propriétés métaboliques, la résistance à la pénicilline et la sensibilité au phage gamma permettent de différencier entre les espèces du groupe (Maughan et Van der Auwera, 2011). La mobilité, l'activité hémolytique, l'incapacité à fermenter le mannitol, et la production d'une lécithinase (Guinebretiere et Sanchis, 2003) sont à la base des méthodes standards de recherche de *B. cereus sensu stricto* dans les aliments (ISO, FDA, IDF). Le milieu MYP (mannitol- egg yolk- phenol red-polymyxin agar) ou le milieu de Mossel permet de mettre en évidence l'activité lécithinase par formation d'une zone de précipitation autour de la colonie et l'absence de fermentation du mannitol par le non virage du milieu (figure 23 A). L'activité hémolytique (figure 23 C) est mise en évidence sur gélose au sang de mouton par l'apparition d'une zone de lyse caractéristique. Sur milieu luria-Bertani (LB) solide les colonies de *B. cereus* peuvent présenter un aspect rugueux et confluent caractéristique tel que montré par la figure 23 B



Figure 23 : Colonies de *B. cereus* isolés dans la laiterie A après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MYP (A), gélose Luria-Bertani (B) et gélose au sang (C).

▪ *B. cereus* en industrie laitière

Les membres du groupe *B. cereus* sont des contaminants fréquents des industries alimentaires. La persistance des spores dans les aliments transformés ainsi que sur les équipements et les installations industriels est attribuée à leurs propriétés de résistance à la chaleur et aux désinfectants chimiques (Guinebretiere et Sanchis, 2003 ; Peng et al., 2002 ; Shaheen et al., 2010). La température de sporulation affecte la thermorésistance des spores. La survie dans l'eau chauffée à 90°C des spores produites à 37°C est supérieure à celles produites à 15-20°C (Gounina-Allouane et al., 2008). En outre les spores de *B. cereus sensu stricto* sont hautement hydrophobes, adhèrent facilement aux équipements et sont difficiles à éliminer (Faille et al., 2001 ; 2010 b ; Simmonds et al., 2003). Malgré des procédures de nettoyage très agressives appliquées dans des laiteries modernes Svensson et al., (2004) et Shaheen et al., (2009), ont montré que certains génotypes de *B. cereus* colonisent des tanks de stockage du lait et persistent pendant plusieurs années.

En effet, la présence de *B. cereus* dans l'industrie laitière est quasi inévitable. L'environnement laitier caractérisé par l'humidité et les traitements thermiques modérés tels

que la pasteurisation, offrent les conditions propices au développement des spores de *B. cereus*. En outre, les sources de contamination sont variées, de la ferme à l'usine de transformation du lait. A la ferme le sol, la litière (Te Giffel, 1997) et la souillure du pis (Moussa-Boudjemaa et al., 2004) sont les plus incriminés. A l'usine, les tanks de stockage du lait semblent être une source importante de contamination par *B. cereus* (Moussa-Boudjemaa et al., 2004 ; Svensson et al., 2004 ; Shaheen et al., 2010). Le lait subit d'autres contaminations dans la chaîne de production, qui sont responsables de la diminution de sa qualité et sa durée de vie. Les membres du groupe *B. cereus* principalement les souches psychrotrophes de *B. cereus s.s* sont connues pour limiter la durée de vie du lait pasteurisé (Svensson et al., 2004 ; Hanson et al., 2005; Barbano and Santos, 2006; Aires et al., 2009). La contamination du lait pasteurisé a été principalement tracée au lait cru (Lin et al., 1998 ; Huck et al., 2007; Banykó et Vyletelová, 2009) et / ou aux surfaces des équipements. Le rôle des équipements industriels en tant que réservoir de *B. cereus* est bien documenté (Te Giffel et al., 1997 ; Svensson et al., 1999; 2000; 2004; Schlegelova et al., 2010) notamment la contamination post-pasteurisation (Eneroth et al., 2001; Salustiano et al., 2009; Sharma and Anand, 2002). Le rôle du biofilm de *B. cereus* dans la dissémination des spores dans l'environnement des laiteries est souligné (Ryu et Beuchat, 2005 ; Wijman et al., 2007)

La présence des membres de *B. cereus* dans les aliments constitue un risque pour la santé du consommateur. En effet, ces bactéries peuvent causer une large variété de pathologies incluant des empoisonnements alimentaires, des infections systémiques et des formes hautement létales d'anthrax (Didelot et al., 2009). Les souches du groupe *B. cereus* peuvent être hautement, faiblement ou non pathogènes, selon le potentiel de production des toxines (Svensson et al., 2007 ; De Jonghe et al., 2010; Guinebretière et al., 2010). *B. cereus s.s* est responsable de deux types de toxi-infections alimentaires qualifiées de syndromes diarrhéique et émétique (Ghelardi et al., 2002 ; Arongo-Alegro, 2008 ; Kim et al., 2010). La toxine diarrhéique thermolabile est libérée dans l'intestin après ingestion d'aliments contaminés alors que la toxine émétique thermostable est préformée dans l'aliment. *B. thurigiensis* a également été associé à des épisodes d'empoisonnements alimentaires (Ankelokar et Labbé, 2010 ; Schraft et al., 1999).

➤ Identification et typage moléculaire de *B. cereus*

Les techniques de biologie moléculaires notamment les techniques de la PCR ou l'amplification aléatoire (RAPD) sont largement utilisées pour le typage moléculaire des isolats de *B. cereus* (Guinebretière et Nguyen-The, 2003; Ehling-Schulz et al., 2005;

Svensson et al., 2004; 2006; Thorensen et al., 2010). Ces méthodes de typage moléculaires sont reconnues pour être de bons outils pour tracer les voies de contaminations du lait pasteurisé par *B. cereus* et ont été utilisées avec succès à cette fin (Te-Giffel et al., 1997 ; Svensson et al., 1999; 2000 ; Eneroth et al., 2001). Par ailleurs, d'après Guinebretière et al., (2008), l'analyse du gène *panC* fournit une meilleure opportunité pour distinguer entre les populations écologiques étroitement liées que les séquences ribosomales et permet d'assigner rapidement les isolats bactériens aux différents groupes phylogénétiques. En outre, selon Guinebretière et al., (2010), l'aptitude des souches de *B. cereus* à causer des empoisonnements alimentaires est liée à leur affiliation aux groupes phylogénétique plutôt qu'aux espèces anciennement connues (tableau1). En industrie alimentaire, l'identification des souches à l'échelle du groupe phylogénétique s'avère donc plus pertinente qu'à l'échelle de l'espèce car elle permet une prédiction rapide de leur potentiel toxinogénique et une meilleure estimation du risque sanitaire des aliments.

➤ **Caractéristiques d'adhésion et de formation de biofilm chez *B. cereus***

Le pouvoir d'adhésion aux surfaces et la formation de biofilm de *B. cereus* sont attribués aussi bien aux propriétés physico-chimiques de surface des spores (Peng et al., 2001 ; Simmonds et al., 2003 ; Tauveron et al., 2006 ; Ankelokar et Labbé, 2010 ; Faille et al., 2010a ; Lequette et al., 2011), qu'à son potentiel génétique (Oosthuizen et al., 2002 ; Sauer, 2003 ; Husueh et al., 2006). D'après Oosthuizen et al., (2002) le protéome d'un biofilm de 2h de la souche *B. cereus* DL50 est caractérisé par l'expression de 15 protéines uniques. Un projet visant l'identification et l'analyse des gènes impliqués dans la formation de biofilms dans le groupe *B. cereus* est en cours de réalisation sous la direction du professeur Ole Andreas Økstad (www.mn.uio.no/farmasi/).

Les caractéristiques de surface de *B. cereus* impliquées dans l'adhésion aux surfaces inertes et la formation de biofilm sont en relation avec la morphologie des spores. En effet les nombreux travaux précédemment cités ont montré que la présence de l'exosporium, le nombre et la longueur des appendices associés au caractère hydrophobe de la surface des spores affecte leurs propriétés d'adhésion aux surfaces inertes. Toutefois, d'après Klavenes et al, (2002), l'importance des appendices des spores de *B. cereus* dans l'adhésion dépend des souches et des conditions hydrodynamiques. Selon ces auteurs, l'adhésion des spores est favorisée par des conditions de flux même en absence d'appendices. Au contraire, Mercier-Bonin et al., (2011) ont montré que l'adhésion des spores de *B. cereus* dans les conditions dynamiques était influencé par la présence et le nombre d'appendice. En microscopie

électronique à transmission, l'exosporium se présente en structure en forme de sac (bag-like) et les appendices en filaments (figure 24). La longueur des appendices varie de 0.45 à 3.8 µm (Ankélokar et Labbé, 2010). Alors que l'exosporium est présent chez tous les membres de *B. cereus* (Faille et al.2010 a ; Lequette et al, 2011), les appendices sont décrits chez *B. cereus s.s* et récemment mis en évidence chez *B. thuringiensis* mais pas chez *B. mycoides* (Ankélokar et Labbé, 2010) et les autres membres du groupe.

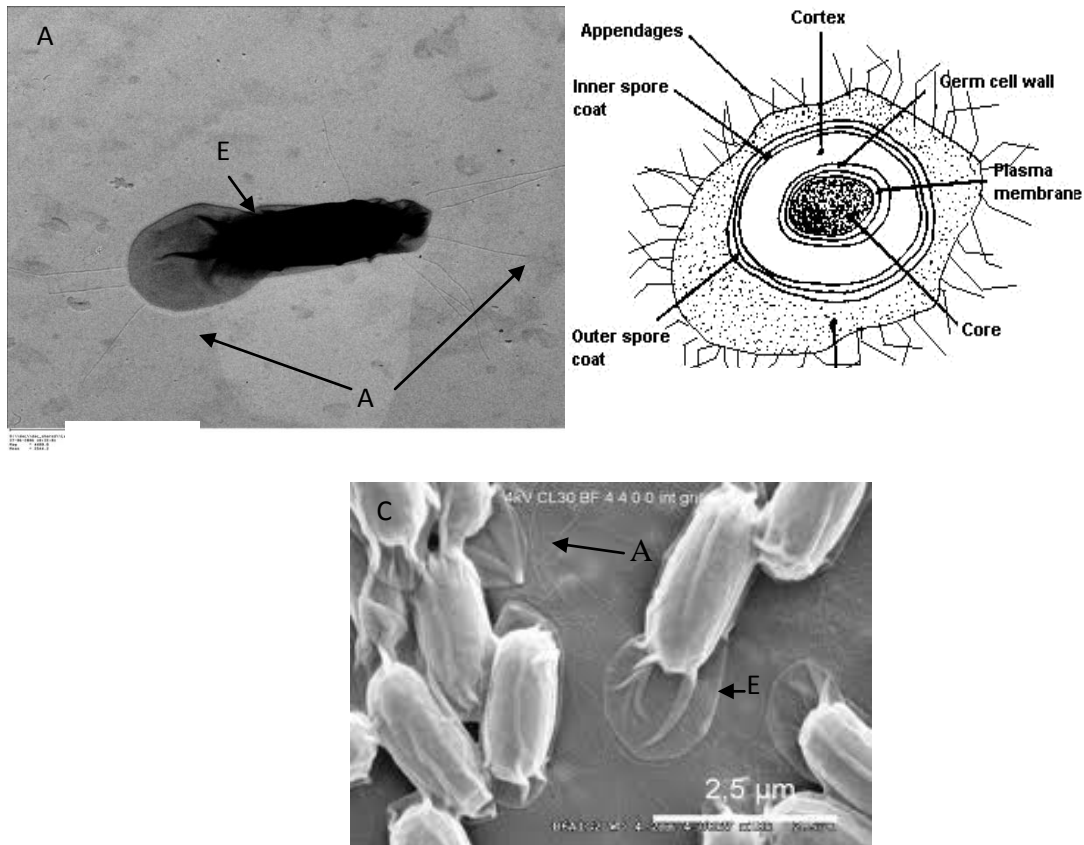


Figure 24 : (A) Micrographie électronique (MET) montrant l'exosporium (structure en forme de sac) et les appendices des spores de *B. cereus* (photo reproduite avec la permission de Mr Ronald G. Labbé*), (B) : une représentation schématique de la spore et (C) : Micrographie électronique (MEB) montrant des spores de *B. cereus* adhérentes, E : exosporium, A : appendice. (source :<http://amgar.blog.processalimentaire.com>).

*Sincères remerciements à Mr Ronald G. Labbé d'avoir gentiment envoyé par e-mail la photo de *B. cereus*.

Les propriétés d'adhésion des spores de *B. cereus s.s* à l'acier inoxydable ainsi qu'à d'autres matériaux utilisés en industrie laitière sont responsables de leur persistance sur les équipements laitiers et de la formation de biofilm. Les biofilms des bacilles sporogènes aérobies sont caractérisés par la différenciation de structures aériennes ou corps de

fructification (fruiting bodies) (figure 25) qui servent de site de prédilection pour la sporulation (Abée et al., 2011 ; Brenda et al., 2001). En industrie alimentaire, les biofilms fournissent par conséquent un environnement optimal pour la sporulation. En outre, les processus de développement tels que la mobilité, la formation de biofilm et la sporulation sont strictement interconnectés et partagent les mêmes régulateurs généraux (Abée et al., 2011).

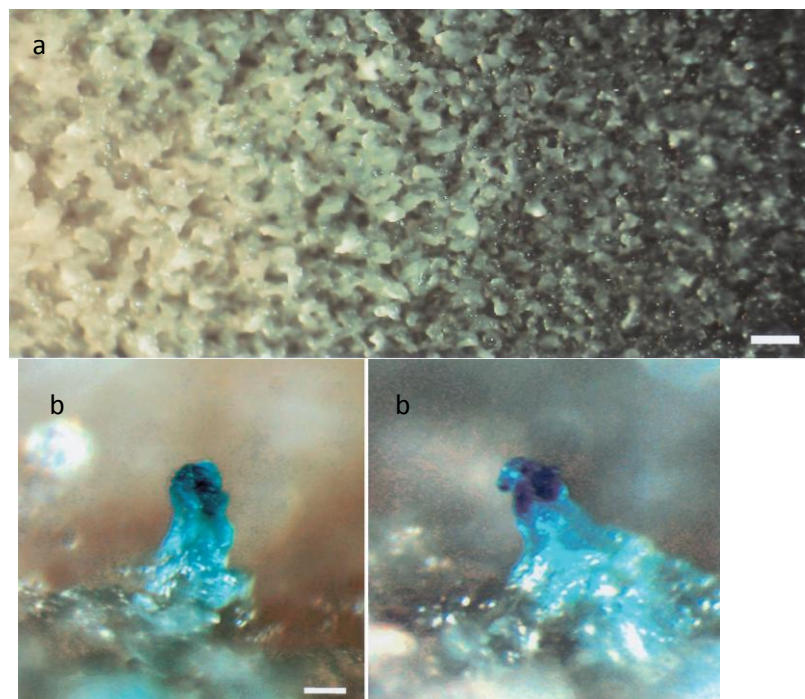


Figure 25 : Sites de sporulation sur les surfaces des colonies de *B. subtilis*. Un gros plan sur le bord de la colonie et les photos obtenues au microscope à dissection, au grossissement (a) : (16 x) et (b) : (x 130), montrant des structures physiques projetées à partir de la surface des colonies formant les fruiting bodies dans lesquels les cellules sporulent (Branda et al., 2001).

Le rôle de la mobilité et la présence du flagelle dans la formation du biofilm de *B. cereus* a également été rapporté (Houry et al., 2010). Cette propriété est mise à profit pour permettre à la bactérie d'atteindre des sites favorables à son développement telles que les interfaces (Wijman et al., 2007). Dans des biofilms mixtes formés avec une souche de *P. aeruginosa*, Simoes et al., (2008), ont montré qu'après avoir adhéré en premier à l'acier inoxydable, *B. cereus* colonise les couches externes du biofilm pour échapper à l'inhibition exercée par l'autre bactérie et avoir accès aux nutriments fournis par le milieu de culture frais. Ryu et Beuchat, (2005) ont également montré que l'exposition de biofilm de *B. cereus* à l'air et l'humidité a pour effet de promouvoir la formation de spores (> 97%). Résultats qui concordent avec ceux de Wijman et al, (2007), décrivant le biofilm de *B. cereus* formé à l'interface air/liquide comme un véritable réservoir de spores et soulignant son rôle dans leur dissémination dans l'environnement des laiteries. Dans les conditions expérimentales les

biofilms formés diffèrent aussi selon les conditions de culture. Le biofilm de *B. cereus* obtenu par Simoes et al., (2010) en culture continu est dominé par les microcolonies, l'EPS étant presque totalement absent (figure 26). Karanukaran et Biggs (2011) ont souligné le rôle des protéines de l'EPS dans la stabilité et la résistance du biofilm de *B. cereus*.

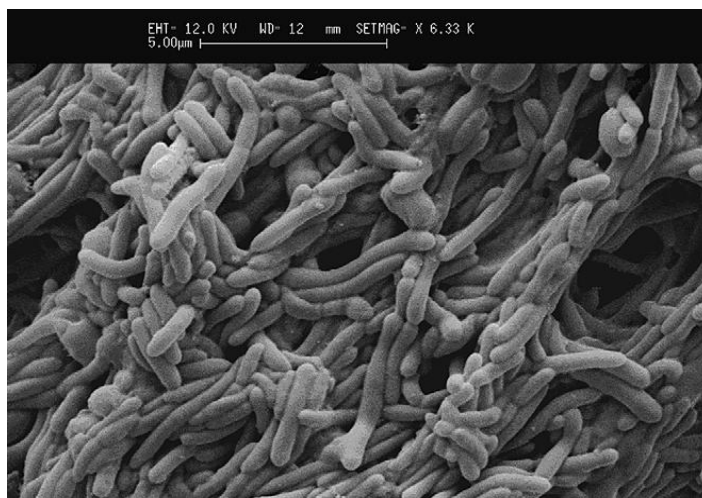


Figure 26 : micrographe d'un biofilm de 6 jours formé par *B. cereus* sur une surface en inox (Simoes et al., 2010).

➤ **Elimination de *B.cereus* de l'environnement laitier**

La persistance de *B. cereus* dans l'environnement des laiteries est favorisée par les conditions du processus technologique dominées par les traitements thermiques modérés et les stress acido-alcalin. De nombreux travaux ont rapporté l'adaptation de *B. cereus* à des stress acide ou alcalin (Lindsay et al., 2002 ; Thomassin et al., 2006 ; Chen et al., 2009 ; Mols et al., 2010,). Shaheen et al., 2009 ont attribué la persistance de certains génotypes récurrents de *B. cereus* à une alcali-résistance élevée. Faille et al., (2010b) et Shaheen et al., (2009) ont proposé des conditions de nettoyage alcalin expérimentées sur des souches de leur laboratoire. Faille et al., ont montré la résistance de *B. cereus* au nettoyage alcalin et ont indiqué qu'une exposition à NaOH à 2% pendant 20 min à 80°C était nécessaire pour l'inactivation des spores de *B. cereus*. Shaheen et al., ont montré que HNO₃, 0.9% à 65°C, permettait d'inactiver les spores de *B. cereus* soumises au nettoyage alcalin (NaOH, 1% à 75°C). De même, Langsrud et al., (2003), ont trouvé que l'exposition des spores de *B. cereus* à NaOH (1%) à plus de 40°C augmentait l'effet sporocide des désinfectants à base peroxyde d'hydrogène. D'après ces travaux, le nettoyage alcalin permettait l'utilisation des désinfectants à des températures et concentrations non-corrosives. Plus récemment, Faille et al., (2013) ont comparé un rinçage-in- place c'est-à-dire sans utilisation de produits chimiques (action mécanique) et un CIP comprenant NaOH (0.5%) à 60°C (action mécanique et chimique). Ils ont montré que seulement 53 à 89% des spores adhérentes ont été enlevées par action mécanique avec des forces de cisaillement élevées. Inversement, 80 à 99% des spores

adhérées ont été facilement enlevées en présence de NaOH à faible force de cisaillement. Il a été conclu dans cette étude que l'action chimique joue le rôle majeur pendant le CIP dont l'efficacité est largement gouvernée par la chimie de la surface des spores.

D'autre part, les stratégies de lutte contre *B. cereus* oscillent entre le déclenchement de la germination (Abée et al., 2011 ; Horstnra et al., 2007 ; Lovdal et al., 2011) et son inhibition (Abée et al., 2011). L'intérêt du déclenchement de la germination réside dans le fait que les spores germées perdent instantanément la résistance des spores dormantes et sont plus facilement détruites. L'empêchement de la germination doit permettre d'éviter que les décomptes bactériens atteignent les seuils à risque. Lovdal et al., (2011) montrent que le double traitement thermique est une stratégie pour l'élimination des spores de *B. cereus*. Le premier traitement est une activation suivie d'une germination ensuite l'inactivation se fait par le deuxième traitement thermique. Les spores de *B. cereus* supplémentées dans des matrices alimentaires ont été soumises à un premier traitement (activation) de 70°C suivi du traitement d'inactivation à 80-90°C. Les échantillons sont maintenus 1 h à 29-30°C entre les deux traitements pour permettre la germination. Cette stratégie a été décrite comme efficace pour l'inactivation des spores de *B. cereus* (mieux qu'un traitement de 90°C pendant 12 min) (L'addition de germinant L-ala, inosine, était nécessaire pour induire la germination).

➤ **Stratégies de lutttes contre le biofilm en industrie alimentaire**

Malgré les progrès réalisés dans la connaissance des biofilms, Les stratégies de lutte contre eux sont jusqu'à présent essentiellement basées sur l'action des agents antimicrobiens, antibiotiques ou biocides, et se heurtent encore au problème crucial de la résistance sessile. La résistance aux agents antimicrobiens est bien documentée (Mittelman, 1998 ; Meyer et al., 2003 ; Flemming and Ridgway, 2008 ; Kokare et al., 2009 ; Van Houdt et Michielis, 2010 ; Araujo et al., 2011 ; Mah et al., 2012) et l'un des objectifs majeurs des travaux sur les biofilm est d'élucider les mécanismes à la base de ce phénomène. Le caractère multifactoriel de cette résistance fait l'objet d'un large consensus. La résistance aux agents antimicrobiens est tout d'abord inhérente à l'expression dans les biofilms de gènes spécifiques réprimés à l'état planctonique (Donlan et Costerton, 2002) Le rôle de la matrice organique en tant que barrière diffusionnelle était reconnue dès le début (Sutherland, 2001), et jusqu'à présent (Mann et Wozniak, 2012), bien que minimisé dans certaines études (Stewart et Franklin, 2008). Des composants de l'EPS tels que l'ADNe ont été récemment impliqués dans le phénomène de résistance (Mulcahy et al., 2009). Le phénotype de croissance altéré et l'hétérogénéité physiologique ou l'existence de sous population composés de différents états métaboliques

oscillant entre les types actifs, intermédiaire et dormants constitue la thèse la mieux défendue actuellement (Højby et al, 2010 ; Stewart et Franklin, 2008). Celle-ci est en corrélation avec une sensibilité non- uniforme des bactéries qui lui sont associées (Fux et al., 2005). Les sous-populations des cellules persistantes (persistent cells) en sont l'exemple extrême et ont été impliquées dans les échecs thérapeutiques considérables et la résurrection du biofilm (Kim , 2001; Singh et al., 2009). En résumé, c'est tout le phénotype biofilm qui est impliqué, à savoir la formation de microcolonies et d'EPS, les taux de croissance altérés et l'hétérogénéité physiologique, le comportement multicellulaire des populations sessiles, le tout modulé par l'expression et la régulation de gènes spécifiques notamment ceux du quorum-sensing.

Un foisonnement de littérature sur la résistance des biofilms au nettoyage et à la désinfection classique a émergé dans les années 90 (Christensen et al., 1990 ; Ronner et Wong, 1993 ; Johansen et al., 1997 ; Taylor et al, 1999). Les conditions expérimentales, à savoir, la température, la concentration en agents chimiques, le temps de contact, le matériau du support inerte et le niveau d'encrassement sont des facteurs de variabilité. Les techniques de mesure connaissent aussi des variations entre les laboratoires, de sorte que les résultats étaient aussi différents que l'étaient les techniques d'investigation. Des scénarii obtenus la conclusion générale était la résistance des cellules sessiles par comparaison à leurs partenaires planctoniques. Les décennies qui ont suivi ont connu un autre foisonnement de littérature sur les méthodes alternatives d'élimination du biofilm formés sur les surfaces des équipements industriels ainsi que celles des dispositifs médicaux, (Hansan et al., 2003 ; Marion et al., 2006 ; Hendry et al., 2009 ; Vickery et al. 2009 ; Lequette et al., 2010 ; Donlan, 2011). Toutefois, dans le domaine industriel, les techniques traditionnelles du nettoyage et de la désinfection sont les pratiques quotidiennes de lutte contre les biofilms. Malgré les nombreux travaux, les stratégies innovatrices notamment les stratégies vertes, telles que l'utilisation des phages (Azeredo et Sutherland, 2008 ; Fu et al., 2010), la modification de surface avec du polyéthylène glycol (Zhang et al., 2001 ; Silvestry-Rodriguez et al., 2008 ; Okner et al., 2009) ou des revêtements antibactériens (Araujo et al., 2012 ; Elangovan et al., 2012 ; Falentin-Dauderé et al., 2012), et l'emploi des détergents enzymatiques (Johansen et al., 1997 ; Orgaz et al., 2006 ; Lequette et al., 2010) sont encore au stade de l'expérimentation au laboratoire.

➤ **Efficacité du cleaning-in place (CIP) contre les biofilms**

Dans la plupart des procédés industriels alimentaires, les surfaces en contact avec les aliments sont nettoyées et désinfectées quotidiennement. Pour les circuits fermés, un

nettoyage acido-alcalin, le système CIP (clean-in-place) ou NEP (nettoyage en place), est utilisé (Bremer et al., 2006). Les produits les plus couramment utilisées sont l'hydroxyde de sodium et l'acide nitrique. Toutefois, l'efficacité du CIP dans l'élimination du biofilm (Bremer et al., 2006) et des spores bactériennes est souvent contestée (Faille et al., 2010b ; Shaheen et al., 2009). En effet, après une procédure CIP, les microorganismes peuvent rester sur les surfaces visiblement propres (Austin et Bergeron, 1995). L'usage des désinfectants en complément du CIP est recommandé, il est considéré comme nécessaire pour tuer et éliminer les cellules microbiennes qui restent attachées aux surfaces (Burgess et al., 2010). La désinfection régulière avec de puissants oxydants est décrite comme une stratégie efficace de lutte contre les biofilms (Meyer, 2003).

Néanmoins, une procédure de nettoyage efficace est indispensable au préalable. Celle-ci doit casser et dissoudre la matrice d'EPS associée au biofilm, pour que les agents désinfectants puissent accéder aux cellules viables (Chmielewski et Frank, 2003). L'incorporation des enzymes dans les solutions de nettoyage utilisées dans le système CIP (Lequette et al., 2010 ; Leslie, 2011) ainsi que la combinaison de différents produits détergents alcalins (Peng et al., 2001 ; Lee et al., 2010 ; Antoniou et Frank, 2011) ont amélioré la performance du nettoyage dans l'élimination du biofilm. Leur contribution relative aux biofilms bactériens concerne le décrochement enzymatique et l'élimination par action alcaline des salissures compactes et incrustées dans des endroits confinés (pores, rugosité) et peu exposés aux forces de cisaillement. Le détergent enzymatique mis au point par Lequette et al., (2010), utilisé à 45°C, a montré une efficacité de nettoyage supérieure à un traitement à la soude 0,5 % à 45 °C pour tous les biofilms et similaire à un traitement à la soude 2 % à 60 °C pour les biofilms de *B. cereus*. Les polysaccharidases étaient plus actives contre les biofilms de *Pseudomonas fluorescens* alors que les protéases l'étaient contre les biofilms de *Bacillus*. La combinaison de ces activités enzymatiques à des tensioactifs à pH alcalin a permis d'améliorer le nettoyage des biofilms quelque soit l'espèce. De même, la préparation alcaline utilisée dans l'étude d' Antoniou et Frank (2011) a permis d'enlever plus que 99% de l'EPS du biofilm pendant 1 min à 4 et 25°C. Le nettoyage alcalin est en effet, obligatoire en industrie laitière, tandis que le nettoyage acide est pratiqué occasionnellement dans certaines laiteries pour éviter la formation de la pierre de lait « milkstone » en présence de fortes concentrations de résidus minéraux (Simoès et al, 2010). Toutefois, le nettoyage peut s'avérer indispensable contre les germes persistants sur les équipements et présentant une tolérance alcaline. D'après Shaheen et al., (2009), un traitement acide (NH₃ à 0.9%) a permis d'inactiver les spores de *B. cereus* alcali-résistantes. Les biofilms peuvent être

également décroché par action mécanique. Le rinçage à haute pression après l'application du désinfectant est préconisé (Burfoot et al., 2009).

➤ **Biofilm et biofouling**

De nombreux facteurs influent sur l'efficacité du CIP. La connaissance de la nature et des caractéristiques de la souillure à éliminer est primordiale. Il est courant de désigner certains biofilms formés sur des surfaces industrielles sous le terme de biofouling (Kim et al., 2006 ; Flemming, 2008 ; Botton et al., 2012). Celui-ci est défini comme le développement indésirable de couches microbiennes sur les surfaces (Flemming et Ridgway, 2008) en d'autres termes, les biofilms microbiens. Il survient dans une grande variété de processus industriels tels que les membranes de filtration du lait (Rice et al., 2009 ; Blanpain-Avet et al., 2011) (figure 27 et 28), constituant des nuisances qui coûtent quelquefois très cher (Flemming, 2008).

La définition du biofouling proposée par Flemming et Ridgway, (2008) est une définition opérationnelle, adaptée à partir de la technologie des échangeurs thermiques où le terme « fouling » est défini généralement comme le dépôt indésirable de matériels sur les surfaces, incluant : des dépôts inorganiques (le fouling mineral), des dépôts de substances organiques telles que les huiles, les protéines, les substances humiques (fouling organique), des dépôts de particules d'argile de silice et de substances humiques (le fouling particulaire) et l'adhésion des microorganismes aux surfaces et le développement de biofilms (le biofouling). D'après ces auteurs, le rôle des nutriments comme une source potentielle de biomasse est fréquemment négligé dans les mesures anti-fouling qui ciblent avant tout le microorganisme. Ces substances nutritives qui ne sont pas des souillures en soit vont soutenir indirectement l'encrassement et le biofilm, les biocides ne permettant pas de diminuer le taux de nutriments.

L'élimination des salissures constitue donc la base de toute action efficace de lutte contre le biofilm. En industrie laitière les conditions du mauvais nettoyage, l'accumulation des dépôts minéraux du lait et de l'eau du process ainsi que des solutions de nettoyage sont propices au développement du biofilm « bio-fouling ». Les caractéristiques de ces biofilms doivent être prises en considération dans l'élaboration des procédures efficaces du nettoyage

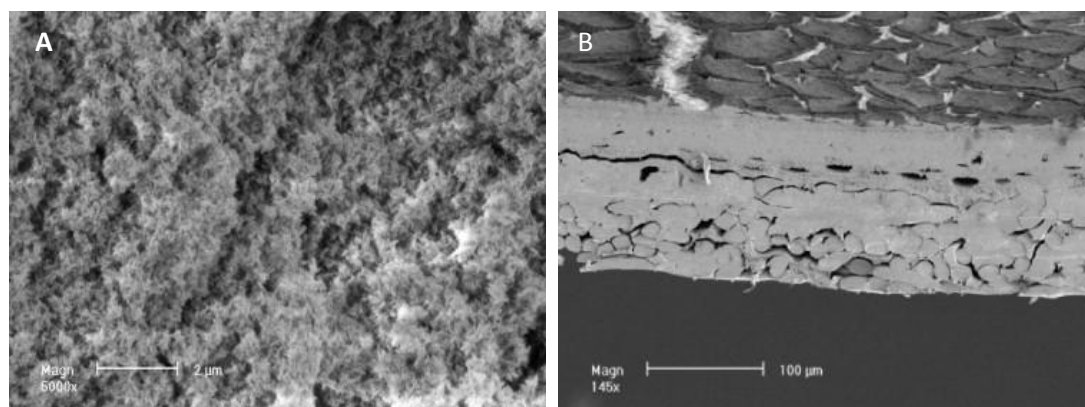


Figure 27 : Micrographes électroniques montrant : (A) le fouling d'une membrane après nanofiltration du filtrat obtenu par ultrafiltration du lait et (B) une coupe transversale d'une membrane de filtration semblable à (A) (Rice et al., 2009).

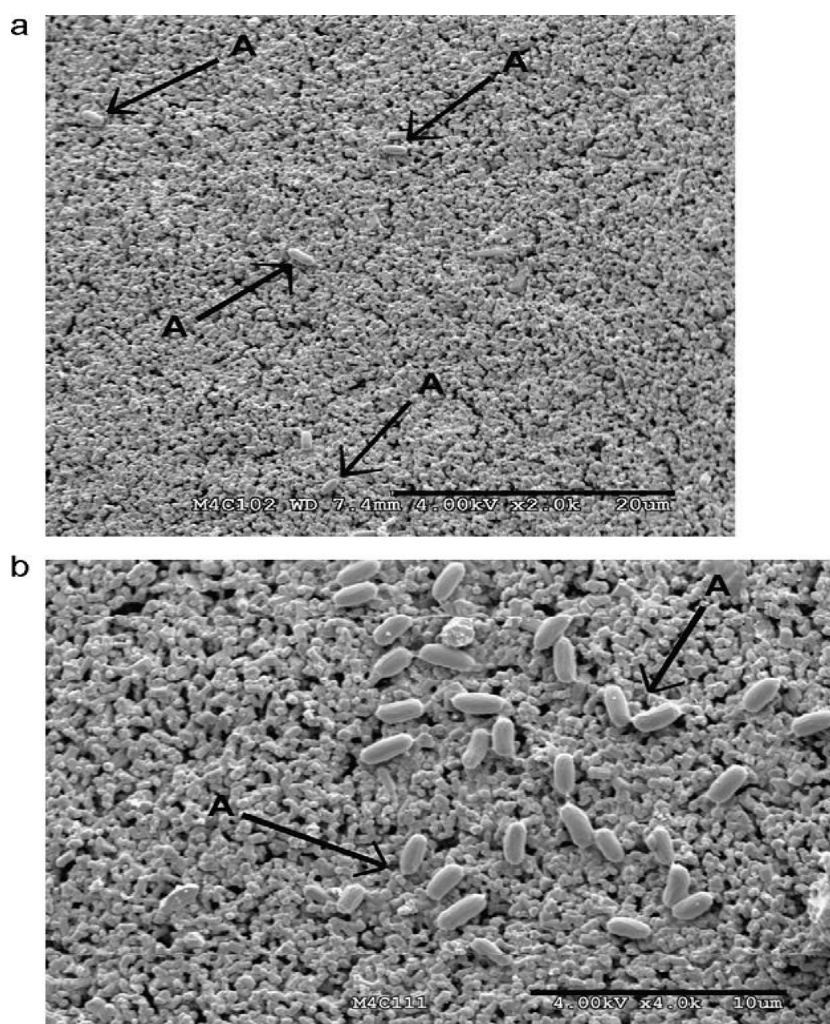


Figure 28 : Micrographes électroniques montrant des spores de *B. cereus* sur des membranes de filtration après une séquence de fouling-nettoyage. Les flèches montrent les cellules adhérentes, isolément (a) ou en amas séparés de larges zones sans cellules (b). (Blanpain-Avet et al., 2011).

et de la désinfection. Il a été montré (Rosmaninho et al., 2006), que la modification de surface en acier inoxydable avec différents métaux pourrait diminuer le dépôt des particules du lait et empêcher la formation du fouling.

La fréquence du nettoyage (Marchand et al., 2012), le design des équipements et la manière dont ils sont connecté au CIP (Bénézech et al., 2002) sont également des facteurs qui influencent l'efficacité du nettoyage. Le temps disponible pour la formation de biofilm dépend de la fréquence des régimes de nettoyage/désinfections (Simoes et al., 2010). Le nettoyage/désinfection pratiqué à des intervalles de temps courts est une approche efficace pour empêcher ou limiter la sporulation en biofilm (Lindsay et al., 2005). Le renforcement des opérations d'assainissement des surfaces industrielle est la règle d'or (Scheffler et al., 2009). Un large consensus existe concernant l'efficacité du lavage et de l'assainissement des surfaces, à contrôler le biofilm de même qu'une bonne gestion de ces opérations. En conclusion, actuellement, l'amélioration des procédés traditionnels reste la stratégie la plus utilisée pour lutter contre les biofilms sur le terrain de la réalité.

➤ **Problématique du lait pasteurisé.**

Un problème récurrent en industrie laitière est la qualité microbiologique du lait pasteurisé. La pasteurisation n'assure pas la destruction complète de la flore de contamination du lait et sélectionne les bactéries sporogènes (Aires et al., 2009 ; Hanson et al., 2005). En effet, malgré les progrès réalisés dans la technologie laitière, la contamination du lait spécialement par les bactéries productrices de spores demeure une barrière biologique spécifique qui limite la durée de vie et la qualité des laits traités thermiquement (Novak et al., 2005 ; Huck et al., 2007 ; Zhou et al., 2008 ; Ranieri et al., 2009). De nombreuses études sont menées à travers le monde pour résoudre ce problème, afin de prolonger la durée de vie du lait pasteurisé. Toutefois, les facteurs limitant varient d'un pays à un autre, en fonction des conditions de production du lait. Les source de contamination potentielles sont variables : le lait cru (Lin et al., 1998 ; Bartoszewicz et al., 2008 ; Ranieri et Bore, 2009), les surfaces des équipements (Sharma et Anand, 2002 ; Svensson et al., 2004 ; Salutiano et al., 2009) et les matériaux de conditionnement (Simon et Hanson, 2001 ; Zygoura et al., 2004 ; Petrus et al., 2010). Telle que rapportées dans certaines études (Hanson et al., 2005 ; Aires et al., 2009 ; Ranieri et al., 2009), les températures utilisées pour le traitement de pasteurisation affectent, elles aussi, la durée vie du lait pasteurisé. Celle-ci varie de quelques jours (2 à 3) à quelques semaines (3 à 4) selon les pays.

En effet, parmi ces facteurs limitant, le procédé de pasteurisation constitue une étape clé dans la sélection des germes sporulés. Les résultats de travaux précédents ont montré que la température affecte inversement les populations bactériennes du lait pasteurisé. Les décomptes bactériens les plus élevés sont trouvés dans les laits soumis aux plus hautes températures. Ceci est dû à l'activation des spores, qui vont germer, se multiplier et former des biofilms. Ces derniers constituent de nouveau, de véritables réservoirs de spores bactériennes (Wijman et al., 2007). Ainsi, les bactéries du genre *Bacillus* tels que les représentant du groupe *B. cereus* et les bacilles thermophiles tels que *Geobacillus* et *Anoxybacillus* sont les organismes caractéristiques des biofilms inféodés à l'environnement des laiteries.

CHAPITRE 3: MICROFLORE DES LIGNES DE PRODUCTION DU LAIT PASTEURISÉ

L'étude de la microflore des lignes de production du lait pasteurisé a été entreprise dans le but d'évaluer la contribution du biofilm dans la contamination du lait pasteurisé. Pour cela la flore de contamination des équipements laitiers a été analysée avant et après l'application du système de nettoyage (CIP). L'investigation a également porté sur la recherche des représentants de la flore dominante du biofilm dans le lait cru et traité.

1. Matériel et méthodes :

1.1 Présentation des laiteries

Cinq laiteries (A, B, C, D et E) situées dans la wilaya de Tlemcen ont été choisies pour cette étude. Hormis la laiterie A qui transforme également du lait de vache de production locale, les différentes laiteries sont spécialisées dans la production du lait recombinaé pasteurisé. Dans la laiterie A, les deux productions, lait de vache/lait recombinaé se font alternativement le jour même ou un jour sur deux. La laiterie utilise la même ligne pour la production des deux types de lait pasteurisé et les mêmes barèmes de traitement thermique. La figure illustre le diagramme de fabrication du lait recombinaé adopté dans la laiterie A. Cette laiterie a également été l'objet d'une deuxième investigation de la microflore du biofilm formé dans le système de canalisations du lait pasteurisé durant l'année 2010.

Les cinq laiteries étudiées utilisent un même système CIP à deux étapes, comprenant un pré-rinçage à l'eau froide, suivi d'un nettoyage alcalin (NaOH à 2%) 5 min à 75°C et un rinçage pour neutraliser le pH. La deuxième phase du CIP consiste en un nettoyage acide avec HNO₃ à 1% à 75°C pendant 5 min. Le processus se termine par un rinçage final à l'eau froide. Occasionnellement certaines de ces laiteries réalisent une désinfection à l'hypochlorite de sodium ou avec des produits à base d'acide peracétique et d'ammonium quaternaire.

1.2 Dénombrement de la microflore du biofilm

L'analyse de la microflore de contamination des équipements dans ces laiteries a consisté en le dénombrement et la caractérisation de la flore aérobie mésophile totale (germes totaux). Les techniques d'échantillonnage et de mise en culture de la microflore du biofilm sont inspirées des travaux de (Bagge-Ravn et al, 2003 ; Sharma et Anand, 2002 ; Svensson et al, 2004).

1.2.1 Prélèvement

Les prélèvements sont effectués par écouvillonnage conformément aux règles citées dans la littérature concernant l'échantillonnage des surfaces, (Ronner et Wong, 1993 ; Moore et Griffith, 2002). Les sites de prélèvement sont situés le long de la ligne de production du lait

pasteurisé (le système de canalisations), au niveau des lactoducs dans leur partie linéaire (les segments), et non linéaire (les coudes), dans différents points situés avant et après le pasteurisateur. Des prélèvements ont également été effectués à partir des tanks et bidons dans la laiterie A durant l'année 2006.

La surface choisie est délimitée aseptiquement grâce à un guide confectionné par nos propres soins (voir annexe). Les dimensions de la surface échantillonnée sont 2x2 cm. A l'aide d'un écouvillon humidifié à l'eau distillée stérile (EDS) additionnée de tween 80 à 3% (Moore et Griffith, 2002), le carré délimité est essuyé minutieusement pour assurer une meilleure récupération des germes adhérents aux surfaces des équipements. L'écouvillon contaminé est ensuite mis aseptiquement dans un tube contenant le liquide de dilution, tryptone-sel-eau (TSE), après avoir brisé l'écouvillon sur la partie qui est entrée en contact avec les mains du manipulateur. Il est très important de noter que pour chaque segment ou coude, l'écouvillonnage se fait après et avant CIP, en évitant d'écouvillonner la même surface. Les prélèvements sont transportés dans une glacière jusqu'au laboratoire et analysés le jour même. Plusieurs campagnes de prélèvement ont été effectuées durant deux années successives (2006 et 2007).

1.2.2 Traitement des échantillons

Les tubes de TSE contenant les écouvillons sont agités pendant une minute au vortex pour détacher les germes et constituer la dilution 10^{-1} , qui servira à la préparation des autres dilutions décimales. Les ensemencements se font en profondeur dans les géloses de dénombrement qui sont la gélose nutritive, le milieu TGEA (Tryptone Glucose Extrait de levure Agar) ou la gélose Luria-Bertani (LB agar). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 72 h. Les résultats sont exprimés en nombre d'ufc/cm² calculé selon la formule suivante :

$$\text{UFC/cm}^2 = \frac{N \cdot 10}{A}$$

N = nombre d'ufc/ml

A = surface délimitée (4cm²).

1.2.3 Conservation des souches :

Pour déterminer les micro-organismes prédominants dans chaque échantillon, des colonies avec une morphologie distincte représentant les différents types obtenus sur boîte de pétri, sont transférées dans des tubes de géloses nutritives inclinées et incubées pendant 24h à 37°C. Les souches sont ensuite conservées au réfrigérateur à une température de 4°C. Les

souches identifiées au groupe *B. cereus* sont conservées par congélation dans du bouillon nutritif additionné de glycérol à 30%.

1.3 Caractérisation de la flore de contamination du lait et des équipements laitiers.

Les souches isolées du biofilm formé sur les conduites de lait dans les cinq laiteries, ont fait l'objet d'une identification et une caractérisation préliminaires.

1.3.1 Identification des groupes bactériens majeurs

Les tests d'identification des souches isolées ont compris les examens microscopiques après la coloration de Gram, le type respiratoire, la recherche des enzymes catalase et oxydase. Chez les isolats sporulés, on a procédé à la mise en évidence de la spore, réalisée sur les cultures âgées après coloration simple au bleu de méthylène ou à la fushine et à l'identification au groupe *B. cereus* qui comprend les pathogènes alimentaires du genre. L'identification à ce groupe, selon la norme AFNOR (1996), comprend en plus des tests décrits pour la flore sporogène aérobie, l'absence de fermentation du mannitol et la production de lécithinase, mis en évidence par culture sur milieu Mossel complet, ainsi que la recherche des hémolysines sur gélose au sang.

1.3.2 Principaux caractères biochimiques et physiologiques

La caractérisation des souches isolées a porté sur l'étude des propriétés biochimiques et physiologiques des souches traduisant leur aptitude à la contamination de l'environnement laitier et à la formation de biofilm sur des matériaux industriels. Ceci comporte, selon Pirttijarvi et al., (2000) et Sharma et Anand (2002), la croissance à différentes températures et l'hydrolyse de certains constituants des aliments tels que l'amidon, les protéines du lait et les lipides.

1.3.2.1 Mise en évidence des activités enzymatiques

L'étude du pouvoir enzymatique des souches a été réalisée en utilisant l'une des techniques classiques de diffusion sur plaque. Les milieux utilisés sont la gélose nutritive additionnée d'amidon soluble ou de tween 80 pour la mise en évidence des activités amylolytique et lipolytique, ainsi que la gélose au lait (agar, 1,5% et lait écrémé à 10%), pour la recherche des protéases. L'inoculum est prélevé de colonies provenant de cultures jeunes etensemencé par touches ou stries transversales à la surface des milieux gélosés. La production d'enzymes est révélée par l'apparition de zones claires autour des colonies dans les géloses à l'amidon et au lait, et de zones de précipitation sur le milieu au tween 80. Dans le cas de la

gélose à l'amidon la lecture se fait après addition du lugol. Les techniques étant semi-quantitatives, il est possible d'avoir une indication sur l'importance du pouvoir enzymatique des souches testées par mesure des zones de dégradation entourant les colonies.

1.3.2.2 Analyse de la croissance à différentes températures

La croissance des souches à 37 et 55°C est réalisée sur bouillon nutritif, alors qu'à 7-10°C, la gélose au lait (agar 2% et lait écrémé 10%) est utilisée, selon la technique de Svensson et al., (2004), pour l'étude des souches psychrotrophes. L'ensemencement de ces milieux se fait dans les mêmes conditions que pour le test des activités enzymatiques. Le développement bactérien est apprécié par l'observation de l'apparition d'un trouble dans le bouillon nutritif et la formation de colonies sur la gélose au lait.

1.4 Recherche de la flore dominante du biofilm dans le lait cru et pasteurisé.

La laiterie A a été choisie comme terrain d'étude pour cette partie de l'expérimentation, d'abord à cause de sa taille, ensuite parce qu'elle est la seule laiterie qui traite le lait de vache produit localement par des fermes de la région de Tlemcen, en plus du lait recombinaison. En se basant sur les résultats préliminaires, cette recherche a porté sur la flore sporogène aérobie essentiellement le genre *Bacillus*, ainsi que sur les bactéries du groupe *Bacillus cereus*.

1.4.1 Echantillonnage

Des échantillons de lait pasteurisé ou non pasteurisé et de poudre de lait écrémé prélevés dans la laiterie A ont été analysés pour leur contenu en bacille sporulés et en *B. cereus*.

Le lait non pasteurisé consistait en le lait cru de vache ou le lait recombinaison non traité, ainsi que la poudre de lait écrémé qui est le composant majeur du lait recombinaison. Les deux types de lait séjournent un certains temps à basse température dans des tanks de stockage avant de passer dans la ligne de production pour subir les différents traitements thermiques (préchauffage, pasteurisation, refroidissement) et le conditionnement. Le lait de vache est un lait de grands mélanges, collectés de différentes fermes de la région. Le lait recombinaison est préparés à partir de la poudre de lait écrémée ou partiellement écrémée. La reconstitution du lait puis sa recombinaison se font dans un atelier ou salle de reconstitution, séparée de l'atelier de production. La poudre de lait écrémé, commercialisée en vrac dans des sacs de 25 kg, provient de différents pays européens et américains. Plusieurs campagnes de prélèvement ont effectuées durant les deux années (2006 et 2007).

Concernant le lait pasteurisé, recombinaison ou non, Il est prélevé dans les sachets de 1 litre, à la sortie de l'usine. Pour voir l'évolution de la flore sporogène aérobie durant le stockage, le lait pasteurisé est analysé, immédiatement, puis après incubation à 30°C pendant 24h et à 7-10°C pendant une semaine. Pour un même sachet de lait pasteurisé plusieurs lots sont donc constitués pour l'analyse immédiate et après incubation.

1.4.2 Analyse de la flore sporulée du lait liquide et en poudre

La recherche des bactéries sporulées impose un traitement thermique des échantillons qui permet de détruire les formes végétatives et de sélectionner les spores. En outre, l'isolement des membres du groupe *B. cereus* nécessite l'utilisation d'un milieu sélectif: le milieu Mossel complet (additionné de jaune d'œuf et de polymyxine B). Les différents laits contenus dans des tubes à essai à raison de 10 ml/tube sont soumis à un traitement thermique 10 min à 80°C, puis refroidis rapidement sous un jet d'eau froide. Des dilutions décimales sont préparées dans du TSE (tryptone-sel-eau) et ensemencées en profondeur sur milieu luria (*Bacillus spp.*) et en surface par étalement de 0.1 ml d'inoculum sur milieu Mossel complet (*B. cereus*). L'isolement et le dénombrement de *B. cereus* sont réalisés conformément à la norme AFNOR (1996). Les tests de confirmation sont décrits dans le paragraphe 1.3.1.

Les échantillons de poudre sont prélevés aseptiquement dans les ateliers ou salle de reconstitution au niveau du mélangeur et/ou des sacs. La poudre (1 g) est diluée dans du TSE et analysée selon le même protocole que les échantillons de lait.

2. Résultats

2.1. Evaluation quantitative de la contamination bactérienne des lignes de production du lait pasteurisé

Les résultats du dénombrement des bactéries adhérentes sur des portions du circuit de production du lait pasteurisé dans les différentes laiteries étudiées sont donnés par les tableaux. Les taux de contamination des surfaces des conduites en acier inoxydable avant l'application du système CIP sont très élevés et atteignent la valeur moyenne de $2,5.10^9$ ufc/cm² (laiterie C). Les laiteries B et E montrent des valeurs maximales qui sont proches de cette moyenne. La charge microbienne résiduelle est également importante. Les nombres moyens de bactéries présentes après le nettoyage des installations du lait varient de $2,2.10^4$ (Laiterie C) à $5,7.10^7$ ufc/cm² (laiterie E). Les réductions décimales sont très faibles de l'ordre de 0.04 (laiterie A) ou 0.23 (laiterie D). La réduction la plus forte, 2,398 est obtenue dans la laiterie C qui affiche, cependant, avec la laiterie E les moyennes bactériennes les plus importantes (1.107 et $5,7.10^7$ ufc/cm² respectivement) après l'application du CIP.

Tableau 2 : Nombre de bactérie du biofilm des lignes de production du lait pasteurisé avant et après l'application du système de nettoyage et désinfection (CIP) dans la laiterie A

Nombre d'ufc/cm2	Avant CIP	Après CIP	Réduction décimale
Minimal	$2,5 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^3$	0.967
Moyen	$3,5 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	0,039
maximal	$2,4 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^4$	0,058

Tableau 3 : Nombre de bactérie du biofilm des lignes de production du lait pasteurisé avant et après l'application du système de nettoyage et désinfection (CIP) dans la laiterie B

Nombre d'ufc/cm2	Avant CIP	Après CIP	Réduction décimale
Minimal	$3,5 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^4$	0,039
Moyen	$3,5 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^4$	2.202
maximal	$9,7 \cdot 10^8$	$6,7 \cdot 10^7$	1.161

Tableau 4 : Nombre de bactérie du biofilm des lignes de production du lait pasteurisé avant et après l'application du système de nettoyage et désinfection (CIP) dans la laiterie C

Nombre d'ufc/cm2	Avant CIP	Après CIP	Réduction décimale
Minimal	$1,5 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^4$	1.814
Moyen	$2,5 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^7$	2.398
maximal	$4,5 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^7$	2.612

Tableau 5 : Nombre de bactérie du biofilm des lignes de production du lait pasteurisé avant et après l'application du système de nettoyage et désinfection (CIP) dans la laiterie D

Nombre d'ufc/cm2	Avant CIP	Après CIP	Réduction décimale
Minimal	$3,4.10^5$	$2,2.10^5$	0.189
Moyen	$4,3.10^5$	$2,5.10^4$	0.236
maximal	$3,5.10^6$	$2,1.10^4$	1.222

Tableau 6 : Nombre de bactérie du biofilm des lignes de production du lait pasteurisé avant et après l'application du système de nettoyage et désinfection (CIP) dans la laiterie E

Nombre d'ufc/cm2	Avant CIP	Après CIP	Réduction décimale
Minimal	$1,5.10^6$	$2,5.10^4$	1.778
Moyen	$9,7.10^8$	$5,7.10^7$	1.231
maximal	$3,5.10^9$	$2,1.10^7$	1.113

La comparaison des laiteries en fonction du nombre moyen de bactérie isolées des équipements après l'application du système CIP ou flore résiduelle, montrent que les laiteries B et D caractérisées par les valeurs moyennes de contamination les plus faibles peuvent être classée dans un même groupe (G1), les laiteries C et E caractérisées par les moyennes les plus fortes seront placés dans le dernier groupe (G3), alors que la laiterie A, pourra être classée dans un groupe intermédiaire (G2) (figure 29).

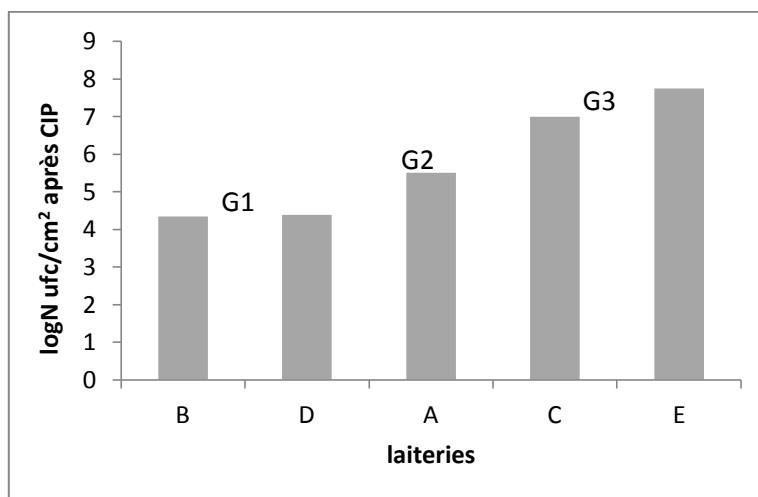


Figure 29 : Comparaison des valeurs moyennes de la flore aérobie mésophile du biofilm des conduites de lait.

2.2. Identification de la flore de contamination des lignes de production du lait pasteurisé

2.1.2 Les principaux groupes microbiens du biofilm des conduites de lait

La distribution de 186 souches isolées à partir des différentes sections des lactoducs, selon la morphologie et le type de Gram est montrée par le tableau 7 et la figure 30. Ces résultats révèlent la dominance des bactéries Gram-positives avec une émergence nette des bacilles aérobies sporogènes, isolés en nombres élevés avant et après l'application des systèmes de nettoyage, dans les cinq laiteries. Les niveaux de contamination par les *Bacillus spp.* représentent 51 à 72% de la flore aérobie mésophile, dont 10, 11, 17, 19 et 21% sont représentés par les membres du groupe *B. cereus* dans les cinq laiteries, C, B, E, A, et D, respectivement. Les autres bactéries Gram-positives comprennent des membres des genres *Staphylococcus* et *Micrococcus*. *Staphylococcus* qui est le deuxième genre après *Bacillus* est bien représenté dans les cinq laiteries A, B, C, D, et E, avec les pourcentages respectifs : 29, 30, 22, 20 et 19%. Contrairement à la flore Gram-positives dominante, la flore Gram-négative, identifiée aux genres *Pseudomonas* et *Enterobacter*, est présente dans deux laiteries seulement, C et E, à des taux relativement faibles, 15 et 5% respectivement. Les trois autres laiteries sont complètement dépourvues de bactéries Gram- au niveau de leurs conduites de lait. Quelques levures (3%) ont été trouvées dans les laiteries C et D, et des moisissures (7%) dans la laiterie D. En somme la microflore des biofilms formés dans les canalisations de laits dans l'ensemble des laiteries est essentiellement composée de bactéries Gram+, majoritairement sporulées.

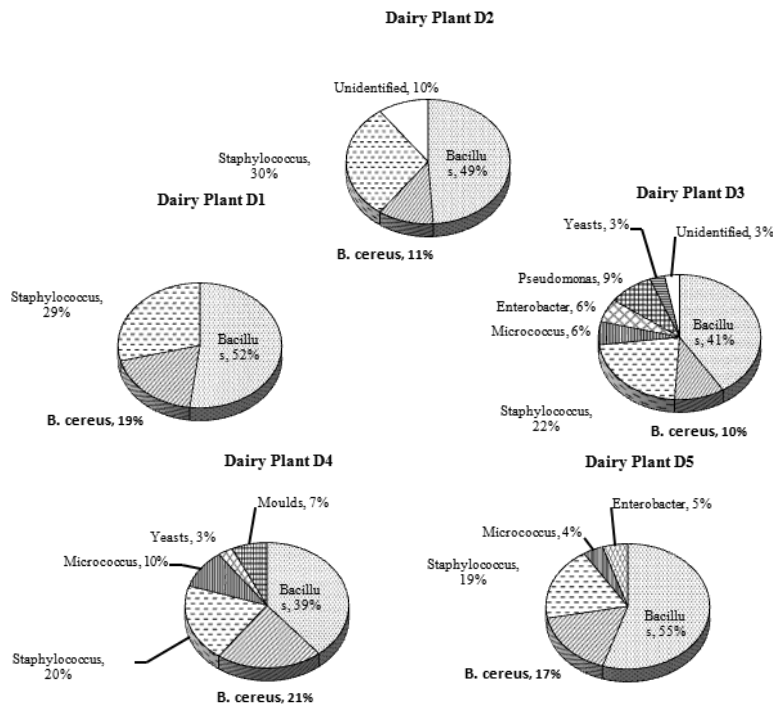


Figure 30 : Distribution des isolats du biofilm dans les cinq laiteries

Tableau 7 : Identification des groupes microbiens majeurs des lignes de production du lait pasteurisé

Groupes microbiens	Nombre de souches (%)				
	A	B	C	D	E
Bacilles Gram-positives	71	60	51	60	72
Bacilles Gram-négatifs	00	00	15	00	5
Cocci Gram-positifs	29	35	28	30	23
Levures	00	00	3	3	00
Moisissures	00	00	00	7	00

2.2.3. Principaux caractères physiologiques de la microflore du biofilm

Les activités enzymatiques, protéolytique, amylolytique et lipolytique sont présentes chez toutes les souches testées. L'importance de ces pouvoirs est variable et reflète les potentialités propres à chaque souche. Concernant la croissance des cultures en fonction de la température d'incubation, la flore est essentiellement mésophile voire thermotolérante, bien

que certaines des souches testées étaient capables de se développer à basses températures (7 et 6% dans les laiteries C et D respectivement). Toutefois les souches véritablement psychrotrophes c'est-à-dire capables de se développer à 7-10°C et à 30°C mais pas à 55°C, étaient rares (trouvées uniquement dans la laiterie C). La flore thermophile est importante dans les laiteries B (68%) et A (51 %). Dans la laiterie C la flore mésophile est majoritaire (93%) et les thermophiles sont totalement absents.

Tableau 8 : Distribution des isolats selon la température de croissance

Laiteries	Psychrotrophes (%)	Mésophiles (%)	Thermophiles (%)
A	00	49	51
B	00	32	68
C	7	93	00
D	6	62	32
E	00	79	21

2.3. Présence de *Bacillus* spp. et de *B. cereus* dans le lait cru et pasteurisé

2.3.1. *Bacillus* spp.

La présence des bacilles sporogènes aérobies est bien représentée dans les différents types de lait (tableau 9). La charge initiale du lait cru est plus importante dans le lait recombinaé ($4,3 \cdot 10^5$ ufc/ ml) que dans le lait de vache ($1,7 \cdot 10^4$ ufc/ ml) et est voisine de celle de la poudre de lait ($7,1 \cdot 10^5$ ufc/ ml). Cette microflore connaît des évolutions durant le processus technologique. Mais étant donné que les échantillons traités thermiquement ne proviennent pas nécessairement des échantillons non traités, il est difficile, de ce fait, de mesurer l'impact du traitement sur l'évolution de la microflore initiale. Toutefois, on peut constater que d'une manière générale, les taux moyens de contamination des laits pasteurisés par les bacilles sporogènes aérobies connaissent une légère réduction après les traitements de pasteurisation. En unité logarithmique, cette réduction n'excède pas 0.33 et 1.33 pour le lait de vache et le lait recombinaé respectivement. Enfin la poudre de lait présente les valeurs moyennes et maximales les plus élevées en bacilles sporogènes aérobies.

Tableau 9 : Valeurs moyennes du nombre de *Bacillus* spp. dans le lait cru et pasteurisé

Nombre d'ufc/ml (g)	Minimal	Moyen	Maximal
Lait de vache cru	$6,3.10^3$	$1,7.10^4$	$2,8.10^5$
Lait recombinaé non traité	5.10^3	$4,3.10^5$	$1,6.10^7$
Lait de vache pasteurisé	$5,5.10^2$	$7,7.10^3$	$2,8.10^4$
Lait recombinaé pasteurisé	3.10^3	$2,1.10^4$	$8,3.10^5$
Lait vache pasteurisé 30°C	$2,4.10^5$	$1,2.10^6$	$2,5.10^7$
Lait recombinaé pasteurisé 30°C	$1,9.10^4$	$5,8.10^6$	$4,2.10^8$
Lait de vache pasteurisé 4°C	$2,3.10^4$	$2,1.10^5$	$1,5.10^7$
Lait recombinaé pasteurisé 4°C	5.10^3	$4,5.10^4$	$6,3.10^5$
Poudre de lait écrémé	$2,8.10^3$	$7,1.10^5$	$9,2.10^7$

2.3.2 *B. cereus*

Les bacilles Gram+, présentant une endospore, catalase +, mannitol négatifs, produisant des lécithinases sur milieu Mossel complet et des hémolysines sur gélose au sang, ont été identifiés au groupe *B. cereus* conformément à la norme AFNOR, (2006).

Dans les échantillons contaminés, les bactéries du groupe *B. cereus* sont présentes à des taux variables (tableau 10). Tels que montrés par les dénombrements sur le milieu Mossel complet, le maximum de contamination ($6,5.10^6$ ufc/ ml) est obtenu dans le lait de vache incubé à 30°C, et le minimum (25 ufc/ ml) est enregistré dans le lait recombinaé stocké à basse température. Les laits crus hébergent un nombre de *B. cereus* qui est loin d'être négligeable, mais qui est plus faible dans le lait de vache local ($8,2.10^2$ ufc/ml) que dans le lait recombinaé ($6,1.10^4$ ufc/ml). Une chute dans ces valeurs est enregistrée après le traitement de pasteurisation, de sorte que les taux moyens obtenus dans les laits pasteurisés, ne dépassent pas $1,7.10^2$ et $6,1.10^2$ ufc/ ml dans le lait de vache et le lait recombinaé respectivement. Ces taux sont nettement inférieures au seuil requis pour l'apparition, du risque de toxi-infection (10^5 ufc/ ml).

Il est intéressant de remarquer que dans le cas du lait recombinaé, l'incubation à 30°C n'engendre pas une augmentation du nombre de *B. cereus*, contrairement au lait de vache dont les niveaux de contaminations obtenus dans les laits pasteurisés incubés à 30°C, atteignent la valeur maximale de $6,5.10^6$ ufc/ ml. Pour ce type de lait, le stockage à basse température ne

semble pas, non plus, stabiliser cette microflore qui atteint en moyenne $2,1.10^4$ ufc/ ml après une semaine à 7-10°C.

Tableau 10 : Valeurs moyennes du nombre de *B. cereus* dans le lait cru et pasteurisé

Nombre d'ufc/ml (g)	Minimal	Moyen	Maximal
Lait de vache cru	$1,3.10^2$	$8,2.10^2$	$2,8.10^3$
Lait recombinaé non traité	5.10^2	$6,1.10^4$	$1,6.10^5$
Lait de vache pasteurisé	95	$1,7.10^2$	$2,8.10^4$
Lait recombinaé pasteurisé	$1,2.10^2$	$6,1.10^2$	$8,3.10^3$
Lait vache pasteurisé 30°C	$2,4.10^2$	$3,2.10^5$	$6,5.10^6$
Lait recombinaé pasteurisé 30°C	190	$4,6.10^2$	$7,2.10^4$
Lait de vache pasteurisé 4°C	$2,3.10^3$	$2,1.10^4$	$1,5.10^5$
Lait recombinaé pasteurisé 4°C	25	83	132
Poudre de lait écrémé	$7,2.10^2$	$2,9.10^4$	$9,2.10^5$

Les évolutions subies par la flore aérobie mésophile (*Bacillus spp.*) et les bactéries du groupe *B. cereus* dans des conditions simulant celles de la production et du stockage du lait pasteurisé sont résumées dans les figures 31 et 32. En prenant en considération qu'il ne s'agit pas du même d'échantillon de lait cru, cette comparaison permet quand même de mettre en évidence que les flores du lait de vache et du lait recombinaé traités thermiquement, ne suivent pas du tout la même évolution durant la production et le stockage.

La flore sporogène aérobie dans les deux types de lait subit des fluctuations plus ou moins importantes dans le nombre de bactéries. En effet la réduction décimale obtenue dans le lait de vache après le traitement de pasteurisation est de 0.33 alors qu'elle est de 1.31 dans le lait recombinaé. Ce rapport est inversé si l'on considère l'augmentation de cette flore durant le stockage à basse température: 1.42 dans le lait de vache pour 0.33 dans le lait recombinaé. Par contre durant le stockage à 30°C pendant 24 h, l'augmentation est sensiblement la même (2.18 vs 2.44).

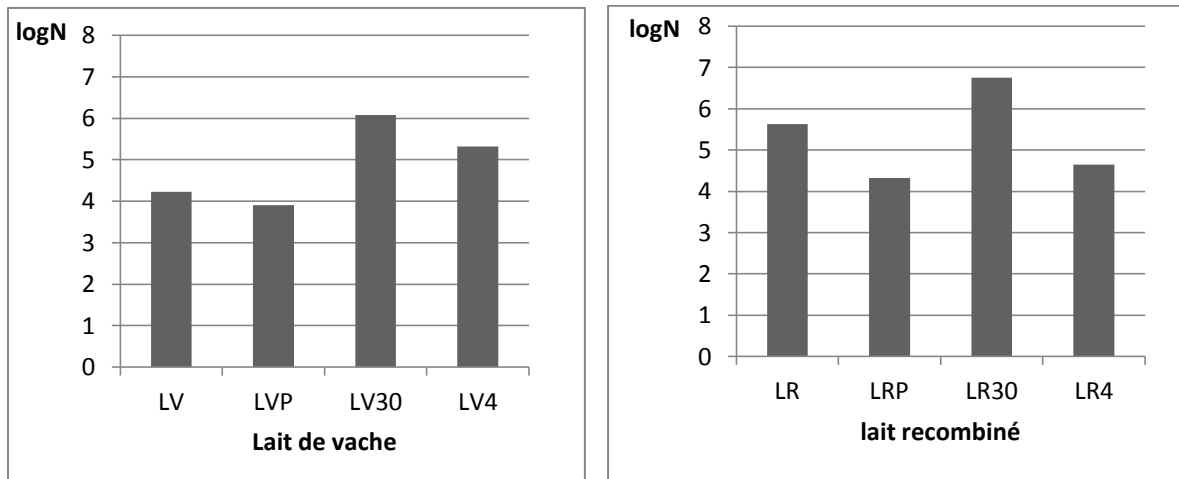


Figure 31 : Evolution des sporogènes aérobies dans le lait durant la production et le stockage.

Dans le cas des bactéries du groupe *B. cereus*, des différences notables sont constatées dans l'abattement de cette flore suite au traitement de pasteurisation. Les réductions décimales enregistrées pour le lait de vache sont égales en moyenne à 0.68 unités logarithmiques seulement, alors qu'elles sont de l'ordre de 2.01 dans le cas du lait recombiné. D'autre part, la flore du lait de vache connaît une augmentation de l'ordre de 3.26 et 2.09 unités logarithmiques respectivement durant l'incubation à 30°C pendant 24 h et 7-10°C pendant une semaine, alors qu'elle est pratiquement inchangée dans le cas de celle du lait recombinée.

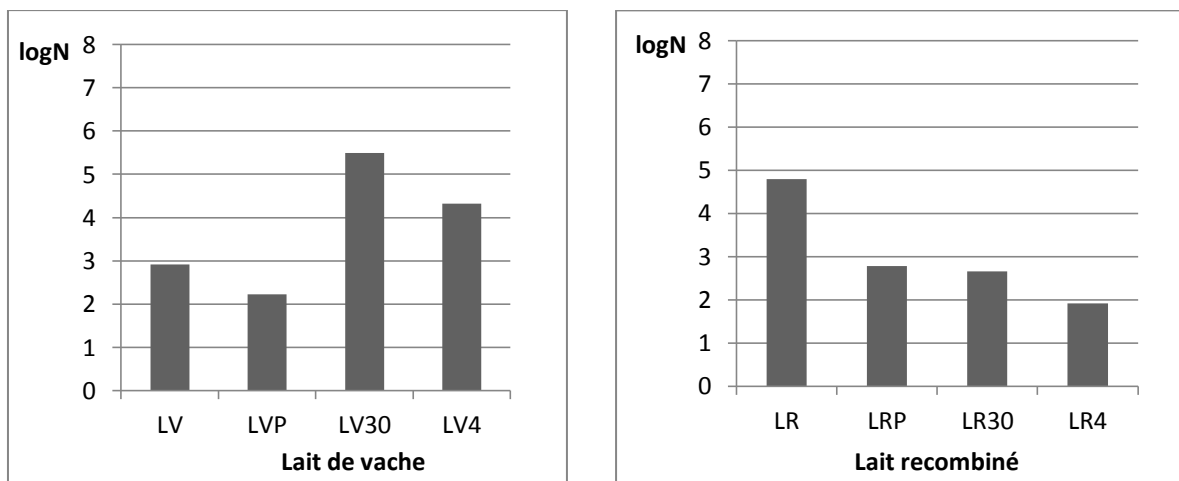


Figure 32 : Evolution de *B. cereus* dans du lait durant la production et le stockage

LV : lait de vache, LVP : LV pasteurisé, LV30 et LV4 : LV incubé à 30°C et à 4°C.
 LR : Lait recombiné, LR P : LR pasteurisé, LR30 et LR4 : LR incubé à 30 et à 4°C

3. Discussion

La contribution des biofilms dans les problèmes de contamination des produits finis est un enjeu majeur pour l'industrie alimentaire. Les altérations qui en résultent contribuent à la dégradation de la qualité des produits transformés, avec des répercussions sur leurs durées de vie et des risques potentiels pour la santé des consommateurs. La connaissance du microbiote dans les établissements de transformation des aliments s'inscrit dans les démarches pour l'amélioration des conditions d'hygiène et par conséquent de la qualité microbiologique des aliments. Ceci passe par l'analyse des communautés bactériennes organisées en biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments, en termes de composition et de densité microbiennes.

Dans cette étude, l'évaluation de la microflore associée aux biofilms inféodés aux équipements dans cinq entreprises de production laitière, situées dans la région de Tlemcen, a permis de révéler une contamination importante au niveau des canalisations de lait par différents groupes de bactéries. Les résultats du dénombrement de la flore aérobie mésophile ont montré que des valeurs maximales atteignant les 10^9 ufc/cm² ont été trouvées dans deux des laiteries étudiées. De tels niveaux de contamination traduisent la présence de biofilms consistants et récalcitrants à la surface de ces équipements. En effet, d'après Gibbson et al., (1999), des densités bactériennes supérieures à 10^8 ufc/cm² sont capables d'engendrer des biofilms constitués d'une multitude de couches. Ces biofilms épais peuvent réduire les transferts de chaleur lorsqu'ils éluent domicile dans des sites tels que les échangeurs thermiques réduisant, ainsi l'efficacité des traitements de pasteurisation. En outre, leur élimination par les procédures de nettoyage et désinfection conventionnelle s'avère difficile. En effet, la persistance des microorganismes après l'application du CIP est une réalité largement soulignée dans la littérature. Certains auteurs (Carpentier et Cerf, 1993 ; Bremer et al., 2006) affirment que même avec des CIP très efficaces les bactéries demeurent sur les équipements et les installations industrielles. Comme en témoignent les résultats obtenus, la charge bactérienne des conduites de lait n'est que très peu réduite après le nettoyage et la désinfection des installations. Les réductions décimales enregistrées couvrent un intervalle relativement étroit (0.039 - 2.398). La réduction la plus forte, 2,398 obtenue dans la laiterie C reste éloignée des 5 réductions logarithmiques requises dans le cas d'un nettoyage efficace (Carpentier et Cerf, 1993). Des défaillances dans le nettoyage pratiqué au sein de ces laiteries peuvent être incriminées, toutefois la charge introduite par le lait cru peut également être responsable, étant donné que les densités bactériennes résiduelles reflètent aussi les niveaux de contamination initiaux, qui sont loin d'être négligeables.

Comme souligné dans la littérature, la charge microbienne du lait cru influence la qualité microbiologique du lait pasteurisé (Banyko et Vyletelová, 2009 ; Barbano et al., 2006 ; Coorvits et al., 2008).

La microflore bactérienne du biofilm des canalisations de lait est intéressante sur le double plan quantitatif et qualitatif. Outre les densités bactériennes conséquentes, les groupes microbiens présents sur les surfaces des équipements laitiers sont affiliés à des genres comprenant des espèces potentiellement pathogènes. Il s'agit des médiateurs *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, et *Enterobacter* qui figurent parmi les pathogènes alimentaires potentiellement persistants sur les surfaces en contact avec les aliments dans les environnements de laiteries (Sharma et Anand, 2002), d'entreprises de viandes et de volailles (Schlegelova et al., 2010) et de produits de la mer (Bagge-Ravn et al., 2003). Les bactéries du groupe *B. cereus* sont des contaminants notoires du milieu laitier. Ils sont présents dans les cinq laiteries analysés contrairement aux autres genres. La présence de *B. cereus* à tous les niveaux de la chaîne de transformation du lait est bien documentée. Des génotypes persistants ont été décrits dans les tanks de stockage du lait cru (Svensson et al., 2004 ; Shaheen et al., 2009) ou dans les segments de post-pasteurisation du lait (Salutioano et al., 2009). Généralement, les bacilles sporogènes aérobies font partie de la flore dominante dans les processus comprenant des traitements thermiques modérés tels que la pasteurisation. Toutefois, une microflore plus variée, comprenant les genres *Lactobacillus*, *Listeria* et *Streptococcus*, est décrite dans les laiteries Indiennes étudiées par Sharma et Anand (2002). Des souches productrices de biofilm, appartenant à *Staphylococcus epidermidis* (Schlegelova et al., 2008) et à *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* (Neicidova et al., 2009) ont été également isolées de laiteries. En réalité, une microflore plus diversifiée reflétant l'aliment transformé compose les biofilms formés sur les surfaces des équipements dans les établissements de transformation des aliments. Elle représente la flore interne ou « in-house-microflora » propre à chaque entreprise alimentaire et qui peut même différer pour un même produit fabriqué dans deux unités différentes, étant donné que les processus technologiques ne sont pas identiques à 100% (Bagge-Ravn et al., 2003). A titre d'exemple une flore particulière, représentée par des espèces inhabituelles dans le milieu laitier : *Rhodococcus erythropolis*, *Methylobacterium rhodesianum*, et *Rhodotorula muciliginosa*, a été isolée dans une laiterie en Norvège, après désinfection par fumigation (Bore et Langsrud, 2005).

La dominance de la flore sporogène aérobie associée à la faible diversité bactérienne relevée dans les biofilms des lignes de production du lait pasteurisé dans les laiteries étudiées traduit une forte pression de sélection au sein de ces laiteries, principalement celle exercée par la température. La dissémination des représentants du groupe *B. cereus* est remarquable. Dans la littérature, de nombreux sites de contamination potentielle par ces bactéries sont identifiés le long des lignes de production du lait. Les tanks de stockage du lait (Moussa Boudjemaa et al, 2004 ; Svensson et al., 2004), les pasteurisateurs (Svensson et al., 2000 ; Te Giffel et al., 1997) et la conditionneuse (Eneroth et al., 2001) ainsi que les différentes sections post-pasteurisation (Salutiano et al., 2009) sont décrites comme des réservoirs de *B. cereus*. Les raisons de cette quasi omniprésence dans l'environnement des laiteries peuvent être attribuées, en plus de la thermorésistance, au grand pouvoir d'adhésion des spores de *B. cereus*, qui sont, par ailleurs, décrites comme d'excellents producteurs de biofilms sur les surfaces souillées de lait (Faille et al., 2001 ; Peng et al., 2002, Shaheen et al, 2009). D'autant plus que des biofilms épais formés par *B. cereus* ont été observés à l'interface air-liquide dans des systèmes industriels de canalisations partiellement remplis durant la production ou là où du liquide résiduel demeure après un cycle de production (Wijman et al., 2007). Ces biofilms sont de véritables nids de spores puisqu'ils en contiennent plus de 90% et sont responsables de leur dissémination dans l'environnement des laiteries. Ce qui suggère que le développement du biofilm peut-être favorisée par des défaillances durant le processus technologique lui-même.

La robustesse des biofilms formés sur ces équipements laitiers n'est pas renforcée uniquement par le nombre de bactéries mais également par leurs caractéristiques physiologiques. Les grands pouvoirs enzymatiques décrits chez la totalité des isolats testés indiquent des potentialités importantes de dégradation des constituants du lait et par conséquent de colonisation et de développement sur les surfaces souillées par cet aliment. De telles bactéries sont également considérées comme de bon producteurs de biofilms (Carpentier et al., 1998). Par ailleurs ces activités hydrolytiques sont d'une grande importance pour l'hygiène alimentaire puisqu'elles sont également impliquées dans les altérations et les défauts de qualité du lait pasteurisé. A juste titre, les membres du groupe *B. cereus* fortement protéolytiques et lipolytiques sont connus pour causer des défauts d'amertume dus à la dégradation des protéines et de la matière grasse durant le stockage du lait pasteurisé (Notermans et al., 1997 ; Vissers et al., 2007)).

La croissance dans une large gamme de température de 7 à 55 °C est un autre indicateur de l'aptitude des souches isolées à se développer dans l'environnement des laiteries. La fréquence de la présence de la microflore psychrotrophe est faible voire nulle dans la majorité des laiteries étudiées. Par contre la flore thermophile est bien représentée. Sachant que la matière première dans ces laiteries est essentiellement la poudre de lait écrémé, il n'est pas surprenant que les isolats soient principalement des bactéries mésophiles ou thermophiles mais pas psychrotrophes. Dans le cas du *B. cereus*, Te Giffel (1997) a montré l'absence de souches psychrotrophes dans la poudre de lait et a attribué cela au processus utilisé pour fabriquer cette poudre. Ceci est aussi valable pour d'autres sporogènes aérobies. La croissance à 55°C peut également être due à la présence de bacilles thermophiles appartenant aussi bien au genre *Bacillus* qu'aux autres genres de sporogènes aérobies, qui sont aussi de fréquents contaminants en industrie laitière. Parmi ces bacilles thermorésistants, *Geobacillus* et *Anoxybacillus* sont reconnus comme normalement présent durant le processus de production de la poudre de lait (Burgess et al., 2010 ; Rueckert et al., 2005). Par ailleurs, la flore de contamination de la poudre connaîtra des évolutions durant le transport et le stockage à l'usine. La reconstitution de la poudre se déroulant à température relativement élevée (40-45°C) est une étape cruciale qui permet le développement des spores et l'augmentation de la charge microbienne du lait reconstitué, durant leur séjour dans les tanks de stockage. Cette étape précédant le traitement de pasteurisation peut durer plusieurs heures.

Ces résultats montrent que la flore bactérienne des biofilms dans les laiteries étudiées n'est pas très diversifiée et est dominée par la flore sporulée. La relation entre les bactéries du biofilm et celle des laits traités et produits dans ces laiteries est évidente. En effet, la flore sporogène aérobie est dominante dans les laits pasteurisés. Elle atteint les valeurs maximales de $2,8 \cdot 10^4$ et $8,3 \cdot 10^5$ ufc/ml dans le lait de vache local et le lait reconstitué respectivement. Les taux enregistrés dans les laits crus sont également importants, $2,8 \cdot 10^5$ et $1,6 \cdot 10^7$ ufc/ml pour les deux laits respectivement. La poudre de lait écrémé héberge également un nombre élevé de bactéries sporulées. En tant que produit déshydraté, ayant subi des traitements thermiques pouvant être relativement élevée, la poudre de lait est une niche écologique pour les spores bactériennes. Dans les laits pasteurisés, par contre, les taux sont inférieurs à ceux des laits crus. Cette diminution du nombre de bactéries sporulées en général et de *B. cereus* en particulier, obtenue dans les laits pasteurisés est probablement due à la germination des spores durant le séjour dans les tanks de stockage avant la pasteurisation, et leur élimination sous forme de cellules végétatives au cours du préchauffage du lait et du traitement de pasteurisation. En effet le double traitement du lait pasteurisé est considéré comme un moyen

efficace d'élimination de *B. cereus* (Lovdal et al.,(2011). Cependant, les spores qui échappent au traitement de pasteurisation, vont germer dans le lait pasteuriser et contribuer à son altération et à la diminution de sa durée de vie.

En effet, et malgré les progrès réalisés en technologie laitière, les bactéries sporulées aérobies sont encore communément décrites comme des contaminants fréquents du lait cru et des laits traités thermiquement et impliqués dans les problèmes de la durée de vie de ces derniers (Banyko and Vyletelova, 2009; Barbano et al., 2006 ; Bartoszewicz et al.,2008 ; De Jonghe et al., 2006 ; 2010 ; Salutiano et al., 2009 ; Ranierie et Boor, 2009 ; Zhou et al., 2008). A titre d'exemple, dans leur étude visant la détermination de l'écologie microbienne du lait pasteurisé aux USA, Ranieri et Boor, (2009), ont trouvé que les genres *Bacillus* et *Paenibacillus* font partie de la flore de contamination qui prédomine dans les échantillons prélevés dans 18 laiteries représentant cinq zones géographiques différentes. En outre, les espèces identifiées au sein du genre *Bacillus*, dans la majorité de ces travaux appartiennent au groupe *B. cereus*, ce qui constitue un risque sanitaire par les laits contaminés. Les trois pathogènes du groupe, *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis*, ont ainsi été trouvés dans une autre étude portant sur la qualité microbiologique du lait pasteurisé, en Chine, soulignant un risque majeur pour le consommateur (Zhou et al., (2008).

En Algérie Peu d'étude ont porté sur la recherche de cette microflore dans le lait cru et pasteurisé. Dans l'unique étude à laquelle, il est fait référence dans ce travail, Moussa Boudjemaa et al., (2004), ont montré que l'incidence de *B. cereus* dans le lait cru et pasteurisé produits dans des laiteries situées dans l'ouest Algérien, est relativement élevée. Les taux obtenus dans la présente étude confirment ces données. *B. cereus* est présent dans les différents laits analysés sous toutes leurs formes. Les taux relevés dans la poudre de lait et le lait recombinaé non traités sont les plus importants comparés au lait de vache cru. Par contre par la suite, le traitement de pasteurisation place les deux types de lait sur un même pied d'égalité, par rapport au nombre de ces bactéries. La situation s'inverse durant le stockage à 30 et 7-10°C où le nombre de *B. cereus* dans le lait de vache connaît une augmentation non négligeable comparé au lait recombinaé dans lequel cette microflore ne parait pas évoluer pour autant. Il semblerait que dans le lait recombinaé le développement de ces bactéries soit concurrencé par d'autres groupes bactériens également présents, et qui émergent durant les premières heures 24 h d'incubation à 30°C. Une telle situation a été rapportée par Aires et al., (2009), pour des laits soumis à une super pasteurisation (96 degrees C pendant 13 s), et pasteurisation (74 degrees C pendant 15 s) qui ont montré des taux élevés

de *B. cereus* mésophiles mais seulement après la deuxième semaine de stockage à basse température (4±2°C). De même, Valik et al., (2003), ont trouvé que le lait pasteurisé est altéré par la croissance de bactéries saprophytes psychrotrophes bien avant que le nombre de *B. cereus* atteigne les niveaux requis pour l'apparition de risque. Une étude récente (Pearce et al., 2012) portant sur la cinétique d'inactivation d'importants pathogènes alimentaires (*S. aureus*, *Yersinia enterocolytica*, *E.coli*, *Cronobacter sakazakii*, *L. monocytogenes* et *Salmonella*) dans les conditions imitant celles de la pasteurisation industrielle a montré que des traitements de cultures de 10⁷ ufc/ml de ces différents pathogènes à des températures n'excédant pas 67.5°C pendant 15 s permettait d'obtenir des réductions décimales moyennes comprise entre 6.7 et 6.9 log₁₀.

Dans le cas des laits analysés dans cette étude, il a été noté l'absence quasi totale de souches psychrotrophes et la présence de souches thermophiles. La sélection des thermophiles dans le cas du lait cru, peut-être due aux conditions climatiques caractérisées par des températures relativement élevées. Il est reconnu que le climat actuel sélectionne les types thermiques et influence la distribution de *B. cereus* : les psychrotrophes sont plus communs dans les régions froides alors que les mésophiles prévalent dans les sols tropicaux (Carlin et al., 2009). De même, dans le lait recombinaison, les thermophiles sont d'abord sélectionnés durant la production de la poudre de lait, qui se fait à des températures relativement élevées, ensuite, dans la laiterie, au cours du processus technologique. La flore bactérienne qui pourrait, de ce fait, concurrencer *B. cereus* dans le lait recombinaison ne peut-être qu'une flore mésophile et/ou thermophile. Les bacilles thermophiles constituent la flore dominante de la poudre de lait (Chopra et Mathurd., 1984 ; Burgess et al., 2010 ; Reginensi et al., 2011 ; Rueckert et al., 2005, Yuan et al., 2012). Ces bacilles sont généralement non pathogènes mais peuvent causer des altérations du lait dues à la production d'acides ou d'enzymes avec l'apparition de défauts de saveurs (Burgess et al., 2010; Rueckert et al., 2005). Il est intéressant de remarquer que certaines des caractéristiques des bacilles thermophiles citées par ces auteurs concordent avec les caractéristiques de la microflore analysées dans ces laiteries. D'abord, les bacilles thermophiles provenant de la poudre de lait sont sélectionnés par les conditions durant le processus de production, en plus, ils montrent une croissance dans un intervalle large de température, un taux de croissance rapide, et forment facilement des biofilms. D'autant plus que les altérations du lait pasteurisé, qui surviennent rapidement à sa sortie de l'usine sont semblables à celle décrites pour ces bacilles notamment l'acidification précoce. L'absence de risque dû à *B. cereus* dans le lait pasteurisé produit localement peut-être due à la présence d'une flore de contamination compétitive.

L'existence d'une telle flore est avantageuse pour la sécurité des aliments contaminés par *B. cereus*. En effet, il a été montré, (Efimochkina et al., 2008), que l'absence d'une microflore de compétition augmente le risque d'accumulation des toxines produites par les souches toxigènes de *B. cereus* dans le lait et les matières premières d'origine végétale.

Pour résoudre le problème de la charge microbienne qui peut être excessive dans le lait pasteurisé, les industriels augmentent les barèmes de traitements thermiques. De nombreux travaux (Aires et al., 2009 ; Hanson et al., 2005 ; Novac et al., 2005 ; Ranieri et al., 2009) ont souligné qu'une telle pratique, non seulement affecte négativement les qualités nutritionnelles et organoleptique du lait traité, mais elle ne provoque aucune amélioration de la qualité microbiologique du lait. Ces études ont démontré que l'élévation de la température dans les traitements thermiques appliqués au lait ne conduit pas nécessairement à la diminution du nombre de bactéries dans le produit fini, mais plutôt affecte inversement les densités microbiennes durant le stockage du lait pasteurisé. Les résultats de certains travaux l'ont confirmé. Le nombre de bactérie dans le lait traité à 72,9 °C était plus faible que celui dans le lait traité à 85.2°C (Raniéri et al., 2009). De même, la croissance de *B. cereus* dans le lait pasteurisé à 80°C pendant 19 secondes était plus forte que dans le lait pasteurisé à 72°C pendant 15 minutes. (Anonyme, 1993). La réglementation américaine spécifie un traitement minimal de 72°C pendant au moins 15 seconde pour le lait pasteurisé HTST (high temperature short time) de la catégorie A (Ranieri et al., 2009). En Algérie, le lait est pasteurisé à 80 – 85°C pendant quelques minutes. Le lait devient acide après 24 h à température ambiante et même à la température du réfrigérateur domestique. Il doit être immédiatement bouilli si on veut lui garantir une conservation plus longue à basse température. Cette pratique a pour effet de réduire encore la flore de contamination, mais sans la détruire complètement. Une étude Indienne (Agarwal et al., 2012), a montré que l'ébullition du lait pasteurisé effectuée à domicile permettait de réduire la flore aérobie mésophile totale. Toutefois, le stockage de ces laits pasteurisés et bouillis à température ambiante et dans les conditions de réfrigération provoquait une augmentation similaire de cette flore à nouveau au terme des 24 h. Cette situation est on ne peut plus évocatrice de celle qui est vécue en Algérie.

En conclusion, le rôle de la température dans la sélection de la flore thermorésistante est à souligner à cause de l'activation des spores bactériennes précédant leur germination et leur multiplication dans le produit traité thermiquement. L'amélioration de la qualité microbiologique du lait pasteurisé nécessite le contrôle correct des procédés de traitement

thermique, ainsi que la mise au point de technologies innovantes permettant l'affranchissement de l'usage de la température. La microfiltration est décrite comme une méthode efficace pour l'élimination des spores du lait cru (Elwell et Barbanon, 2006 ; Madeini et al., 2011; Tomasula et al., 2011). En outre, des mesures à titre préventif, doivent être prises à différents niveaux : chez le fournisseur, dans les laiteries et durant la commercialisation du produit. La production de la poudre de lait, ainsi que les conditions de son transport et stockage, l'hygiène dans les entreprises de production laitière, notamment l'élimination des biofilms, le management du traitement thermique et le respect de la chaîne de froid sont autant de points critiques sur lesquels devraient porter les actions correctives.

CHAPITRE 4: IDENTIFICATION ET DIVERSITE GENETIQUE DES SOUCHES DE *B. cereus*.

B. cereus est largement présent dans le biofilm formé dans les lignes de production du lait pasteurisé, mais également dans le lait cru et pasteurisé ainsi que la poudre de lait qui est utilisée pour la production du lait recombinaé. La présence de *B. cereus* parmi la flore de contamination du lait sous toutes ces formes implique un risque potentiel qu'il est important d'évaluer sachant que les membres de ce groupe varient dans leurs pouvoirs toxigènes, certaines souches s'avérant plus dangereuses que les autres. Les objectifs de cette étude sont d'une part l'identification phylogénétique de 20 souches de *B. cereus*, isolées du biofilm et de la poudre de lait, afin de prédire leur potentiel de production des toxines. D'autre part, le typage moléculaire de ces souches permettra de déterminer leur diversité génétique et de fournir des informations cohérentes sur l'origine de la contamination du lait pasteurisé produit dans la laiterie A. Une détermination préliminaire du profil biochimique de ces souches permettra d'orienter le choix des souches destinés à la caractérisation moléculaire.

1. Matériel et Méthodes

1.1. Description des souches

Cinquante souches appartenant au groupe *B. cereus*, 10 faisant partie de la collection constituée en 2006 et 40 souches nouvellement isolées à partir du biofilms dans la laiterie A ainsi que de la poudre de lait sont utilisées dans cette partie (tableau 11).

Tableau 11 : Caractéristiques des souches de *B. cereus* utilisées dans cette étude.

Nombre de souches	Source	Year
10	lactoducs	2006
30	lactoducs	2010
10	Poudre de lait	2010
1	Souche de référence	

1.2. Identification phénotypique

1.2. 1. Détermination du profil biochimique des souches

Une discrimination préliminaire des souches de *B. cereus* basée sur des caractères morphologiques et biochimiques est réalisée pour faciliter le choix des isolats en vue

dutypage moléculaire. Les 51 souches sont soumises à une identification par le système API 20 E dont seule les 12 premiers caractères ont une signification pour les bactéries du groupe *B. cereus*. (ADH, LDC, ODC, galactosidase, uréase, nitrate réductase, utilisation du citrate, production d'indole, formation d'H₂S, production d'acétoïne, dégradation de la gélatine). La fermentation des sucres nécessite l'emploi des galeries API 50 CHB/E medium, non disponibles en ce temps là.

Les souches conservées dans le bouillon Luria-Bertani (LB) à 30% de glycérol sont revivifiés par passages successifs dans le bouillon LB 18-24 h à 30°C, puis sur la gélose LB. Les galeries API sont inoculées par les suspensions préparées à partir des colonies formées, selon les instructions du manuel, incubées à 30°C pendant 24 h, et lues après ajout des réactifs adéquats.

1.2.2 Recherche du cristal parasporal.

La recherche du cristal parasporal normalement présent chez *B. thuringiensis* a pour but la distinction entre cette espèce et *B. cereus sensu stricto*. Elle est effectuée par des méthodes microscopiques.

1.2.2.1. Observation au microscope optique

Des frottis sont préparés à partir de cultures âgées et colorés à chaud avec une solution de fushine, selon la technique décrite dans les directives canadiennes pour le dépistage de *B.cereus* /*B thuringiensis* dans les aliments (<http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>). Des cultures de 24 h sur bouillon LB sont repiquées sur gélose nutritive inclinée et incubées 24 h à 30°C, puis à la température ambiante pendant 2 à 3 jours. A partir de ces cultures, des frottis sont préparés dans de l'eau distillée stérile, séchés à l'air puis fixés légèrement à la chaleur, avant de subir le traitement suivant : Les lames sont placées sur le support de coloration et submergées avec du méthanol. Après un temps de repos de 30 s le méthanol est enlevé et la lame séchée à l'air et recouverte de fushine basique à 0.5%. Le dessous de la lame est chauffé au bec bunsen légèrement jusqu'à l'apparition de vapeurs. La source de chaleur est retirée pendant 1 à 2 min puis la dernière étape est répétée. Après un temps de repos de 30 s, le colorant est enlevé et la lame rincée à l'eau de robinet. A l'examen microscopique, les spores libres sont faiblement colorés et les cristaux, de taille plus petits, sont colorés en foncés.

Les cristaux généralement plus petits que les spores, abondent normalement dans une culture de 3 à 4 jours de *B. thuringiensis*, mais ils ne peuvent être détectés par la technique de

coloration avant que la lyse du sporange n'ait lieu. Pour cela, à moins que les spores soient visibles, les cultures devraient être maintenues à la température ambiante encore quelques jours supplémentaires, puis réexaminées pour la présence de cristaux de toxines. *B. thurigiensis* produit généralement des cristaux de toxines protéiques qui peuvent être détectés par la technique de coloration, soit sous forme de cristaux libres, soit sous forme de corps d'inclusions parasporaux dans l'exosporium.

1.2.2.2. Observation au microscope à contraste de phase

La présence ou l'absence du cristal parasporal, est également confirmée par des observations au microscope de cultures jeunes (48 h) et âgées (4 jours). L'emploi de ces deux cultures permet d'éviter la confusion des cristaux avec les globules lipidiques également présents dans les cellules de *B. cereus*. Un fragment de colonie poussant sur le milieu Luria agar est déposé au centre d'une lame contenant une goutte d'eau distillée. Le mélange est recouvert d'une lamelle et observé au microscope à contraste de phase (Olympus B x 50) au grossissement x 100. Les spores apparaissent comme des points réfringents de dimensions variables en fonction du stade de sporulation, alors que les cristaux représentés par des points sombres, sont reconnus grâce à leurs formes géométriques caractéristiques.

1.2.2.3. Observation au microscope électronique à balayage

Les mêmes frottis préparés pour la microscopie optique sont utilisés sans coloration pour l'examen au microscope électronique à balayage (MEB) Hitachi TM1000. Il s'agit d'un microscope environnemental, permettant d'observer des échantillons biologiques sans déshydratation préalable, ni aucun autre traitement.

1.3. Caractérisation génotypique

L'identification préliminaire a permis de sélectionner 20 souches de *B. cereus* pour le typage moléculaire. Les souches se répartissent comme suit : 15 sont isolées des lactoducs, en 2006 et 2010 et cinq souches proviennent de la poudre de lait analysée durant la deuxième période.

1.3.1. Extraction d'ADN

La préparation de l'ADN bactérien a été réalisée selon la technique de Guinebretière et Nguyen-the, (2003). Les souches sont repiquées sur gélose luria et incubées une nuit à 30°C. Les cultures (2 oses) sont suspendues dans 575 µl d'un mélange de TSE (525 µl) et de SDS à

20% (50 µl). La suspension ainsi préparée est incubée à 55°C pendant 1 h avec 25 µl de protéinase K (10 µg/ µl). L'ADN a été extrait par des centrifugations successives à 13000 g pendant 5 min, avec du phénol en premier puis du chloroforme. La phase aqueuse est précipitée avec 2,5 volumes d'éthanol froid à 100% et centrifugée à 13 000 g pendant 20 min. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 800 µl d'éthanol froid à 70% à 13000 g pendant 10 min. Le culot est ensuite séché et suspendu dans 100 µl d'eau distillée stérile et stocké à - 20°C. L'ADN est quantifié par mesure de l'absorbance à 260 nm dans un spectrophotomètre. L'ADN ainsi extrait va subir des amplifications par PCR simple de la séquence *pan C*, pour l'identification phylogénétique et par amplification aléatoire (RAPD) utilisant l'amorce M13 extraite du coliphage pour le typage moléculaire selon la technique M13-PCR.

1.3.2. Typage moléculaire par la technique M13-PCR

La technique utilisée est décrite dans Guinebretière et Nguyen-The, (2003), utilisant une séquence spécifique de l'amorce PM13: 5'-GA-GGGTGGCGGCTCT-3'. Le mélange PCR (25 µg) contient 100 ng d'ADN, 1,25 mM du mélange dNTPs (nucléotides), 6 mM MgCl₂, 4,8 µM de l'amorce, 10% (v/v) du diméthyl sulfoxyde et 1,5 U de l'ADN polymérase Goldstar. Les cycles thermiques ont été réalisés dans un thermocycleur pour PCR 9700, selon le programme : 3 min à 94°C, suivi par 35 × [1 min à 94°C, 1 min à 40°C, 8 min à 65°C] and 16 min à 65°C. Les produits de PCR, obtenus par la technique M13-PCR ont été séparés par électrophorèse sur gels d'agarose à 2%, en présence de marqueur de poids Smart Ladder. Les gels sont ensuite colorés avec du bromure d'éthidium et photographié par un gel imager (Bioblock, III-kirch, France).

1.3.3. Identification phylogénétique.

L'identification de *B. cereus* aux sept groupes phylogénétiques, selon Guinebretière et al.(2008), est basée sur l'analyse d'une séquence du gène *pan C*, qui fait partie des gènes chromosomiques conservés (housekeeping gene) du groupe *B. cereus*. L'amplification partielle du gène *pan C*, par PCR, la purification des amplifiats, et le séquençage sont réalisés selon Guinebretière et al.(2008) , et dans le détails selon les protocoles adoptés à l'UMR 408 de l'INRA d'Avignon.

1.3.3.1. Amplification partielle du gène *pan C*

La séquence *pan C* est préparée à partir des extraits d'ADN obtenus en 2.2.1. L'amplification PCR est réalisée selon le protocole décrit dans la technique de Guinebretière et Nguyen-The, (2003). Les amorces suivantes sont utilisées :

5'- TYGGTTTTGTYCCAACRATGG - 3' (l'amorce dégénérée) et

5'- CATAATCTACAGTGCCTTTCG – 3' (l'amorce inverse).

Le mélange PCR final (90µl) contient 300 ng d'extrait d'ADN, 0,2 mM du mélange dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de chaque amorce, 0,75 U de polymérase AmpliTaq et 9 µl de tampon AmpliTaq. Le cycle thermal est effectué dans un thermocycleur selon le procédé suivant : un cycle de démarrage de 5 min à 94°C suivi par 30 cycles de 15 s à 94°C, 30 s à 55°C et 30 s à 72°C et une extension finale de 7 min à 72°C.

1.3.3.2. Purification de la séquence *pan C*

Les produits PCR de la séquence *pan C* sont purifiés en utilisant le kit « high pure PCR product ». Les amplificats (80 µl) sont dilués dans de l'eau purifiée stérile et mélangé à un tampon de liaison. Deux tubes de filtrations sont montés et le mélange est transféré sur le filtre, puis le filtrat est récupéré centrifugé à 13000 g pendant 1 min. Une série de filtrations suivies de lavages de culots à 13000 g pendant 1 min est réalisée. Les amplificats purifiés sont stockés à – 20°C, en attendant d'être envoyés pour le séquençage, utilisant l'amorce : 5' – ATAATCTACAGTGCCTTTCG – 3'.

2. Résultats

2.1. Caractérisation phénotypique

2.1.1. Détermination du profil biochimique

Un mini profil biochimique construit sur la base des 12 premiers tests de la galerie API 20 E a permis de définir quatre groupes (biotypes) présentant une grande similarité, un groupe majeur comportant 42 souches de diverses origines, et 3 groupes mineurs comprenant respectivement 6 souches et une souche chacun pour les 2 derniers groupes. La diversité des profils API 20E ne peut être attribuée en tout qu'à plus d'un ou deux caractères. De même le nombre de caractères positifs est très faible 2 (biotypes I et IV) à 3 (biotypes II et III) tests et ne permet pas une discrimination fiable entre les membres du groupe *B. cereus*. Les souches du groupe majeur n'ont que 2 réactions positives (VP+ et Gelatine+). Un dernier groupe est

constitué par la souche de référence *B. cereus* ATCC 11778, présentant le plus grand nombre de caractères positifs typiques des espèces du groupe *B. cereus*.

Tableau 12 : Distribution de 50 souches de *B. cereus* d'après les caractères phénotypiques

Caractères cultureux	Biotypes (Caractères positifs)	origine	Nombre de souches
A'1, A'2, B'1, B'2, C', D', E'	biotype I	Poudre de lait	10
	(VP, Gel)	segment de pré-pasteurisation	21
		segment de post-pasteurisation	2
		collection 2006	9
C'	biotype II (VP, Gel, NR)	segment de pré-pasteurisation	5
		collection 2006	1
A'1	biotype III (VP, ADH, GEL)	segment de pré-pasteurisation	1
D'	biotype VI (VP, ADH) ONPG, ADH, LDC, ODC, Cit, VP, Gel, NR	segment de pré-pasteurisation	1
		Souche de référence, <i>B. cereus</i> ATCC 11778	1

2.1.2. Caractéristiques morphologiques des colonies sur gélose Luria

L'étude des caractères cultureux dominés par un aspect rhizoïde des colonies a permis de définir 5 types morphologiques (A' à E') (tableau 12). Cette variabilité dans la morphologie des colonies porte sur l'aspect semi-rhizoïdal et la transparence des colonies (A', B', C'), la taille et la régularité des contours des colonies (D' et E'). Les cinq morphotypes sont présents dans le groupe biochimique majeur (biotype I) montrant ainsi une certaine variabilité entre les souches. Cette identification phénotypique préliminaire montre une faible diversité des isolats et la dominance dans l'environnement de la laiterie d'un type spécifique (biotype I) distinct de la souche de référence *B. cereus* ATCC 11778, et rassemblant les différents types de colonies formées sur la gélose Luria. Sur la base de ces critères morphologique et biochimiques 20 souches ont été sélectionnées pour la caractérisation moléculaire.

2.1.3. Caractéristiques microscopiques des cultures de *B. cereus*

D'après les photos obtenues aux microscopes à contraste de phase (figure 33), Les cellules végétatives correspondent aux critères morphologiques des souches de *B. cereus*. Les bacilles sont grands (4 à 5 microns de long et 1 à 1,5 de large) avec des bouts carrés et des coins arrondis. Les spores sont les formes réfringentes à l'intérieur des sporanges (fig. 33 a) ou à l'état libre (fig. 33 b). Des formes arrondies plus ou moins volumineuses sont visibles dans les cellules végétatives et correspondent aux globules lipidiques ou inclusions protoplasmiques de poly-bêta-hydroxybutyrate, caractéristiques des bactéries du groupe *B. cereus*. Pour certaines souches, on peut noter un début de sporulation dans les cultures de 48 h alors que pour d'autres la sporulation est plus tardive. Les taux de sporulation atteints après 4 jours ne sont pas les mêmes selon les souches.

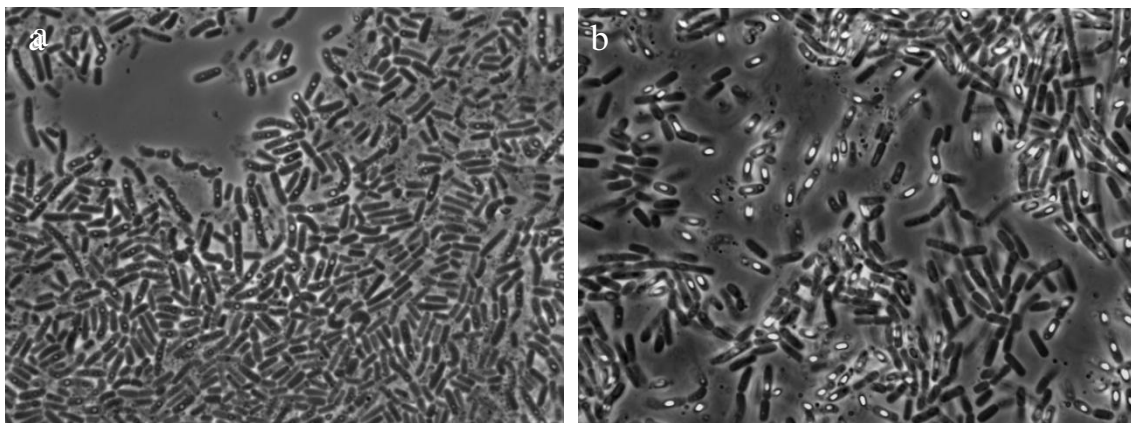


Figure 33 : Photos en microscopie à contraste de phase de cultures de la souche BC3 après 2 jours (a) et 4 j (b) d'incubation à 30°C dans le milieu Luria agar. (G x 100)

La culture de 48 h de la souche BC3 contient en majorité des cellules végétatives, de rares bacilles sont en début de sporulation. Le taux de sporulation est assez faible dans la culture de 4 jours. Les inclusions sont bien visibles dans les deux cultures, mais pas les cristaux parasporaux.

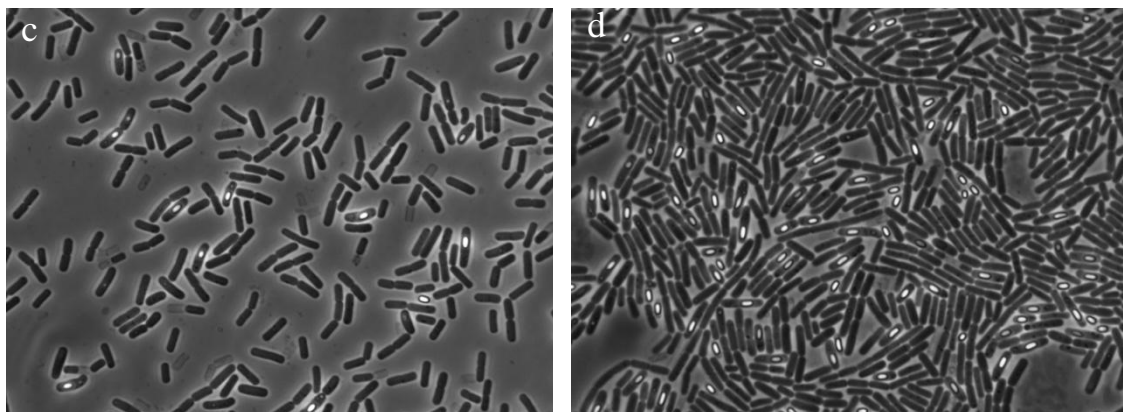


Figure 34 : Photos en microscopie à contraste de phase de cultures de la souche BC4 après 2 jours (c) et 4 j (d) d'incubation à 30°C dans le milieu Luria agar. (G x 100).

La souche BC4 est également caractérisée par un taux de sporulation relativement faible. Beaucoup de cellules sont encore sous forme végétatives dans la culture de 4 jours. L'absence de cristaux est notée. Quelques rares inclusions sont visibles dans les formes végétatives.

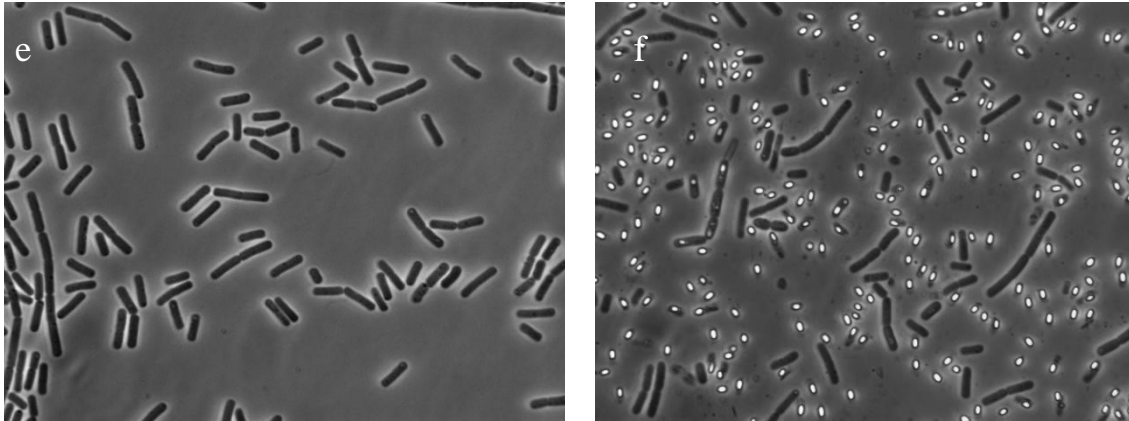


Figure 35 : Photos en microscopie à contraste de phase de cultures de la souche BC14 après 2 jours (e) et 4 j (f) d'incubation à 30°C dans le milieu Luria agar. (G x 100).

La culture de 48 h de la souche BC14 comporte uniquement des formes végétatives. Par contre dans la culture de 4 j les spores libres sont nombreuses. Des inclusions sont visibles dans quelques cellules pour les deux cultures. On peut noter l'absence des cristaux pararsporaux.

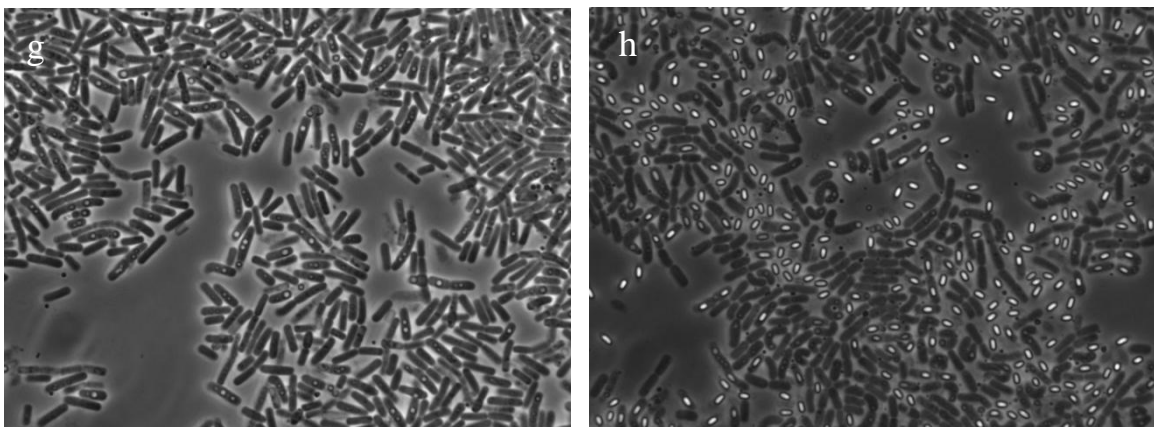


Figure 36 : Photos en microscopie à contraste de phase de cultures de la souche BC15 après 2 jours (g) et 4 j (h) d'incubation à 30°C dans le milieu Luria agar. (G x 100).

La culture de 48 h de la souche BC15 comprend quelques bacilles en début de sporulation, mais beaucoup de cellules végétatives avec des inclusion ou globules lipidiques bien visibles. Les spores sont bien présentes dans la culture âgée mais pas les cristaux.

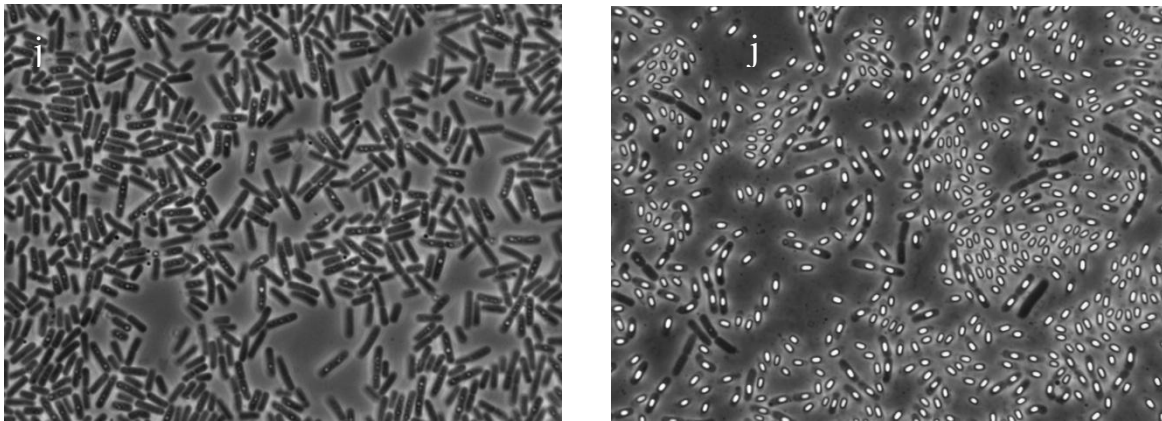


Figure 37 : Photos en microscopie à contraste de phase de cultures de la souche BC19 après 2 jours (i) et 4 j (j) d'incubation à 30°C dans milieu Luria agar. (G x 100).

Comme pour la souche BC15, chez la souche BC19 les inclusions sont bien visibles dans la culture de 48 h composée essentiellement de cellules végétatives. Dans la culture de 4j, le taux de sporulation est élevé, la majorité des cellules sont à l'état de spores libres. Les cristaux ne sont pas présents.

En microscopie électronique à balayage, (figure 38), les spores sont bien visibles (formes pleines grises), accompagnées de structures blanches, de formes plus ou moins circulaires. Ces structures irrégulières peuvent être des inclusions, libérées avec les spores après la lyse du sporange (photo a et c). Les mêmes souches observées au microscope à contraste de phase en contenaient beaucoup. Toutefois ces formes blanches sont plus grandes que les spores dans le cas de la souche BC 15 (photo b) et pourraient provenir d'éléments étrangers aux cellules (fragments de géloses ou tout autre débris) mais peuvent également être des artefacts générés par le microscope électronique à balayage. Aucune de ces photos ne montre les formes géométriques caractéristiques des cristaux de *B. thurigiensis*.

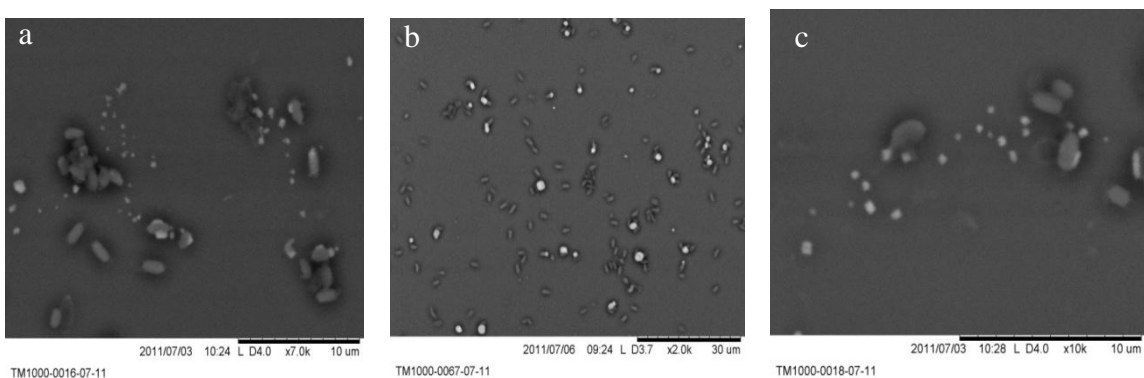


Figure 38 : Photos en microscopie électronique à balayage des souches BC19 (a), BC15 (b) et BC14 (c).

Toutes les techniques microscopiques utilisées n'ont pas permis de mettre en évidence les cristaux parasporaux, ce qui permet de conclure à l'absence de *B. thurigiensis* parmi les souches de *B. cereus* isolées des laiteries étudiées.

2.2. Caractérisation génotypique

2.2.1 Groupement des isolats selon le profil M13-PCR

Après migration électrophorétique des produits d'amplification M13-PCR sur gel d'agarose de chacune des 20 souches analysées, un modèle simple d'empreintes génétiques a été obtenu (figure 39). Tous les isolats ont facilement été classés en trois génotypes M13, un type majeur (A) et deux types mineurs (B) et (C), révélant ainsi une très faible diversité génétique (figure 39). En effet, en dépit de leurs diverses origines, la majorité des souches (17) ont été classées dans le génotype A (tableau 13). Les 17 souches isolées des équipements et de la poudre de lait sont identiques, indiquant que la poudre de lait est la source de contamination des lactoducs. Au contraire les génotypes B et C, respectivement représentés par les souches BC3/BC4 et BC14, ne pourraient pas être rattachés à une source de contamination spécifique et il est improbable qu'elles puissent se retrouver dans le lait pasteurisé. Seul le génotype A, était prélevé sur les segments de post-pasteurisation des canalisations de lait.

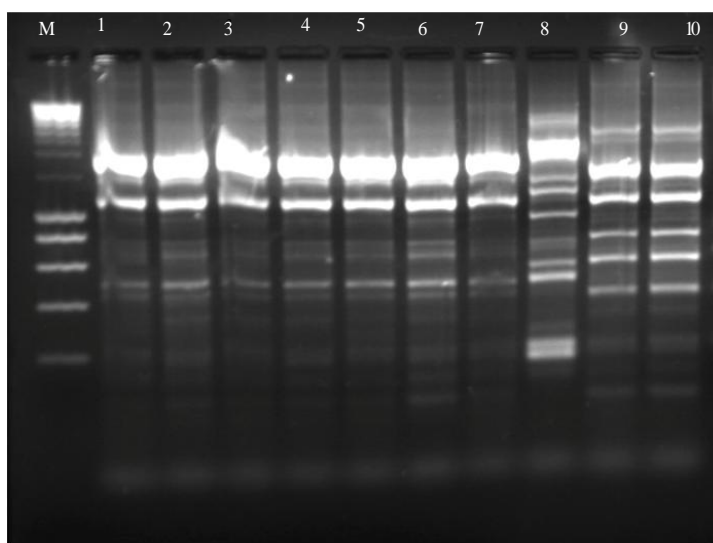


Figure 39 : Les profils M13-PCR des souches de *B. cereus*. Les rangs 1 à 7, M13-PCR (génotype A): souches BC 19, 12, 13, 2, 5, 7, 8, 8, M13-génotype C: strain BC 14. Les rangs 9 et 10, M13-génotype B: les souches BC 4 and BC 3. Lanes M, DNA molecular mass marker (Ladder S L, Eurogentec)

Il est également intéressant de constater que les souches provenant de l'ancienne collection (2006) et celle récemment isolées (2010) font partie du même génotype. Ce qui suggère un phénomène de persistance des génotypes A et B durant 4 années. Il semblerait

qu'étant presque l'unique source de contamination du lait pasteurisé, la poudre de lait apparaît comme une source de contamination homogène.

2.2.2 Identification aux groupes phylogénétique

Les 5 souches représentatives des génotypes M13 sont identifiées grâce à l'analyse des séquences du gène *panC*, sur le site web : <https://tools.symprevius.org/Bcereus/english.php>. L'identification des souches au groupe *B. cereus* est ainsi confirmée et leur assignation aux groupes phylogénétiques, selon la classification de Guinebretière et al. (2008), réalisée.

Les résultats obtenus (tableau 13) montrent que les génotypes A et B à savoir, 19 des 20 souches analysées, sont affiliées au groupe phylogénétique mésophile III, alors que la dernière souche (génotype C), est affiliée au groupe phylogénétique mésophile IV (tableau x). L'appartenance des génotypes A et B au même groupe phylogénétique indique que leur parenté génétique est plus grande qu'avec le génotype C. Ceci corrobore les résultats de l'empreinte génétique obtenue par la M13-PCR. Les deux méthodes moléculaires utilisées ont fourni des résultats cohérents concernant la faible diversité génétique enregistrée. Par ailleurs, l'affiliation au groupe phylogénétique III indique que ces isolats appartiennent à l'un des groupes les plus toxiques (Guinebretiere et al, 2010), comprenant aussi bien des souches diarrhéiques qu'émétiques, et qu'ils peuvent de ce fait constituer un risque potentiel pour le consommateur.

3. Discussion

L'identification au sein du groupe *B. cereus* est difficile et nécessite souvent la combinaison des techniques phénotypiques et moléculaires. Dans cette étude la caractérisation de 50 souches de *B. cereus* a été réalisée par des tests morphologiques et biochimiques, qui ont guidé le choix de 20 souches représentatives des différents phénotypes identifiés en vue d'une caractérisation plus rigoureuse au plan du génome.

Sur le plan morphologique, les cellules végétatives présentent des spores centrales ou paracentrales ne déformant pas le sporange et des globules lipidiques, et confirment l'appartenance au groupe *B. cereus*, des souches isolées sur un milieu sélectif (Harmon et al, 1991 ; Holbrook et Anderson, 1980). Toutes les souches étudiées répondent aux critères du groupe *B. cereus* : taille des bacilles, spore centrale à subterminale ne déformant pas la cellule, et présence d'inclusions lipidiques. L'absence de ces inclusions ou leur faible abondance dans certaines cultures peuvent être attribuée à l'absence de jaune d'œuf dans la

gélose Luria utilisée pour la croissance des souches. En effet, la production de globules graisseux se fait après croissance sur milieux sélectifs à base de jaune d'œufs (Holbrook et Anderson, (1980).

Tableau 13 : Typage moléculaire (M13-PCR) et affiliation phylogénétique de 20 souches de *B. cereus* isolées des différentes sources dans la ligne de production du lait pasteurisé.

origine des souches	année	M13 genotype	Les souches représentatives	Analyse de la séquence du gene <i>panC</i> Groupe phylogenetique	- identity(%)*
Poudre de lait					
BC1	2010	A			
BC5	2010	A			
BC9	2010	A			
BC12	2010	A			
BC19	2010	A	BC19	group III	99.72
Pre-pasteurisation Segments					
BC2	2010	A	BC2	group III	99.72
BC6	2010	A			
BC7	2010	A			
BC8	2010	A			
BC13	2010	A			
BC18	2010	A			
BC20	2010	A			
BC10	2006	A			
BC11	2006	A			
BC17	2006	A			
Post-pasteurisation Segments					
B15	2010	A	BC15	group III	99.72
B16	2010	A			
Pre-pasteurisation Segment					
BC3	2010	B	BC3	group III	100
BC4	2006	B			
Pre-pasteurisation Segment					
BC14	2010	C	BC14	group IV	100

*D'après les groupes phylogénétiques définis dans Guinebretière *et al.* (2008)

L'identification au groupe *B. cereus* par système API nécessite l'utilisation de la galerie API 50 CHB seule ou en combinaison avec les 12 premiers caractères de la galerie API 20 E. (Guinebretière et al., 2001; Logan and Berkeley, 1984). Les tests biochimiques de la galerie API 50CHB sont les tests de référence pour l'identification des bacilles sporogènes aérobies. Toutefois, ils sont parfois décrits comme faiblement discriminatifs aussi bien entre les espèces du genre *Bacillus* qu'entre les membres du groupe *B. cereus* (Carlin et al., 2000 ; Guinebretière et al., 2001). Dans la présente étude seuls les 12 premiers tests de la galerie API 20 E ont été utilisés, l'objectif étant de fournir une discrimination rapide des souches en vue de la sélection de celles qui vont subir le typage moléculaire. Par ailleurs, la majorité de ces caractéristiques biochimiques sont largement utilisées dans les méthodes standards (ISO, FDA, IDF) pour l'identification au groupe *B. cereus*.

Il est intéressant de remarquer dans le cas des souches étudiées, le nombre élevé de tests négatifs, Les souches du biotype majeur ne présentent que 2 réactions positives (VP+ et Gelatine+). Ceci est possible chez les isolats industriels de *B. cereus* pour lesquels des propriétés phénotypiques telles que la réduction des nitrates, l'activité des lécithinases ne sont pas jugées fiables (Pirttijarvi et al., 2000).

Cette mini caractérisation biochimique suggère une faible diversité des isolats et la dominance d'un type spécifique de *B. cereus* distinct de la souche de référence *B. cereus* ATCC 11778. La caractérisation morphologique a permis d'écarter la présence de *B. thuringiensis* parmi les souches testées à cause de l'absence du cristal parasporal recherché par trois techniques microscopiques différentes. La mobilité des isolats déterminée par des examens à l'état frais est en faveur de l'absence de *B. anthracis*, qui est la souche immobile du groupe. Enfin, la proportion faible des souches psychrotrophes peut suggérer que la présence des psychrotrophes du groupe, à savoir, *B. pseudomycooides* et *B. wehneinstepahnensis* n'est pas très probable. Dans le groupe *B. cereus*, il ne reste que *B. cereus sensu stricto*, l'hôte privilégié de l'environnement laitier et qui compte un certain nombre de souches psychrotrophes. La nouvelle espèce *B. cytotoxicus* (Guinebretière et al., 2012 ; Lapidus et al., 2008) est également improbable dans les échantillons analysés, en raison de son extrême rareté et de sa toxicité sévère.

A ce jour, les techniques phénotypiques conservent leur importance et sont souvent combinées aux techniques moléculaires pour la recherche et la caractérisation des souches de *B. cereus* dans les aliments. Dans deux études récentes (Chon et al., 2012 ; Lee et al., 2012), la détermination du profil toxigénique, de l'antibiorésistance et des caractères biochimiques

classiques associées aux techniques moléculaire ont été utilisées pour la caractérisation des souches de *B. cereus* isolées d'un aliment prêt à manger (ready-to-eat) en Corée.

Dans la présente étude, l'analyse génotypique a confirmé les résultats obtenus par la caractérisation phénotypique. En effet, les méthodes moléculaires utilisées dans cette étude ont permis le typage moléculaire des 20 souches de *B. cereus* isolées dans la laiterie analysée et l'affiliation des souches représentatives des types génétiques aux groupes phylogénétiques de la classification de Guibretière et al., (2008). Toutes les souches ont été caractérisées avec succès par la technique de PCR utilisée et leur distribution au sein de la laiterie élucidée avec précision.

Les empreintes génétiques produites par la M13-PCR ont révélé une faible diversité génétique des isolats, déjà suggérée par les profils biochimiques déterminés par la galerie API 20 E. Les 17 souches identiques du génotype A (biotype I) ont été trouvées aux différents sites d'échantillonnage de la ligne de production du lait pasteurisé, (les segments de pré et post-pasteurisation) ainsi que de la poudre de lait. Ceci est en contradiction avec les données de la littérature où une grande diversité dans les profils RAPD est enregistrée parmi les souches de *B. cereus* isolées dans des unités de production laitière (Svensson et al., 1999; 2000; 2004). A titre d'exemple, Eneroth et al., (2001) ont trouvé que de nombreux types RAPD proviennent d'un échantillon unique.

La faible diversité génétique montrée par nos résultats pourrait être attribuée, en premier, à la nature de la matière première, à savoir la poudre de lait utilisée, qui ne devait héberger initialement que quelques génotypes. En effet les produits déshydratés ne sont pas supposés avoir les conditions favorables pour une large diversité, à cause des traitements thermiques qu'ils ont subis et des faibles activités d'eau qui les caractérisent (Guinebretière and Nguyen-The, 2003). En second lieu, la pression exercée par les conditions des processus de transformation des aliments sont supposées sélectionner quelques groupes génétiques (Carlin et al., 2009). Par conséquent, des procédés restrictifs tels que le traitement thermique, souvent réalisés à des températures abusives, aussi bien au cours du processus de production de la poudre de lait que celui de sa transformation, peuvent aboutir à une réduction de la diversité de la microflore de la laiterie. Ceci est en accord avec le concept de la « microflore interne » (in-house-microflora) (Bagge-Ravn et al., 2003), qui pourrait être, en partie le reflet de la matière première utilisée et en partie le reflet du climat chaud qui prévaut en Algérie.

Cependant, ici, la microflore interne est presque limitée à une seule lignée avec un phénomène de persistance durant 4 années. Ceci suggère une forte adaptation de cette lignée à l'égard de la niche écologique que représente la laiterie étudiée. En effet certaines entreprises de production laitière sont supposées héberger particulièrement des souches de *B. cereus* spécifiques à l'usine, qui contribuent constamment à la contamination post-pasteurisation (Schraft et al., 1999). De même, Salutiano et al., (2009) ont trouvé que la plupart des souches isolées à partir des surfaces des équipements de post-pasteurisation appartiennent au même groupe ribosomal. A partir du moment qu'il est récupéré à partir des segments de post-pasteurisation, la température semble être le facteur majeur qui a sélectionné et maintenu le génotype A, qui a le mieux survécu aux différents stress thermiques subis dans la laiterie et bien avant. D'autant plus que, la classification phylogénétique avait déjà révélé une structure génétique de *B. cereus*, correspondant à des adaptations différentes des souches à la température. Ainsi, le groupe phylogénétique III contient des souches mésophiles dont les spores sont caractérisées par une thermorésistance relativement élevée (in Carlin et al., 2010).

La protection des souches au sein des biofilms formés à l'intérieur des lactoducs peut aussi être une stratégie de survie pour le génotype sélectionné. Ce phénomène est très bien connu en industrie laitière (Tauveron et al., 2006; Wijman et al., 2007; Salutiano et al., 2009; Schlegelova et al., 2010, Shaheen et al., 2010), où le type prédominant est celui qui est le mieux capable de contaminer le système de production du lait. Ceci est particulièrement vrai pour les souches *B. cereus* qui ont largement été décrites comme des producteurs efficaces de biofilms. En outre, Il a été récemment découvert que les spores de *B. thuringiensis* et pas seulement celles *B. cereus sensu stricto* sont caractérisées par un grand potentiel d'adhésion aux surfaces inertes (Auger et al, 2009; Ankolekar and Labbé, 2010).

La faible diversité enregistrée peut également être appréhendée à la lumière de la structure des populations. Les souches étudiées ont pour origine principale la poudre de lait qui, elle, provient de différentes origines géographiques (différents pays d'Europe et d'Amérique). Le génotype A pourrait provenir d'au moins deux poudres différentes, celles de 2006 et 2010. Cette distribution mondiale du même génotype est en faveur d'une structure allopatrique des populations de *B. cereus*, et peut expliquer cette faible diversité des souches. En effet, selon Vilas-Boas et al., (2002) les population sympatriques de *B. cereus* sont plus diversifiées que les populations allopatriques, à cause des échanges génétiques qui s'opèrent entre les populations locales. L'importance des transferts horizontaux des gènes (HGT) en tant que facteur façonnant la structure des populations du complexe *B. cereus*, est soulignée

(Cardazzo et al., 2008). D'après, Sorokin et al., (2006), la séparation écologique des populations allopatriques semble être plus puissante que l'aptitude de ces bactéries à échanger leur matériel génétique. L'influence des facteurs écologiques et anthropologiques sur la structure des populations de *B. thuringiensis* est mise en évidence par Raymond et al., (2010). Ces auteurs ont démontré qu'une population de *B. thuringiensis* a montré une structure presque épidémique dominée par un génotype enthomopathogène unique dans un champ expérimental soumis à des hôtes insectes et des pesticides à *B. thuringiensis*. L'approche structure des populations doit, néanmoins être vérifiée par des données moléculaires fournies par des analyses plus approfondies telles que le multi locus sequencing typing (MLST).

En conclusion, l'origine commune, associée aussi bien à la pression de sélection de la température et à la persistance dans des biofilms pourraient être responsables de cette distribution spécifique dans la laiterie A, de ce génotype particulier de *B. cereus* du groupe phylogénétique III.

L'intérêt particulier des groupes génétiques III et IV est qu'ils contiennent des souches qui possèdent divers gènes codant pour la production de toxines, représentant ainsi, un grand risque d'empoisonnement alimentaire (Guinebrière et al., 2010). Les gènes entérotoxigènes, *hbl*, *cytK-2* et *nhe* sont présents chez les souches des deux groupes génétiques, tandis que le gène émétique *ces* est présent chez certains membres du groupe phylogénétique III. Ainsi que précédemment indiqué (Svensson et al., 2006), la poudre de lait représente une source importante de bactéries émétiques. En générale, la présence de souches de *B. cereus* pathogènes et non-pathogènes dans l'environnement laitier est bien établie. De nombreuses études ont montré que cet organisme passe du lait cru à l'équipement de production et peut contaminer le produit transformé. De tels produits laitiers, notamment le lait pasteurisé, peuvent être des aliments à haut ou à faible risque en fonction du potentiel de production de toxines des souches contaminant. Ceci illustre bien le besoin de techniques discriminatives capables de fournir rapidement et avec précision des indications sur le risque d'intoxication associé aux *B. cereus*, tel que formulé dans plusieurs études (Thorsen et al., 2010, Chaves et al., 2011, Oh et al., 2012). L'association des groupes phylogénétiques aux différents potentiels de virulence des *B. cereus*, observée pour la première fois dans Guinebrière et al., (2010), répond à ces exigences.

Dans cette étude, grâce au typage moléculaire par M13-PCR, il a été possible d'identifier la source initiale de contamination par les bactéries du groupe *B. cereus* et de tracer leur présence à la poudre de lait et non pas seulement aux équipements laitiers tel qu'il

était prévisible. Ce qui permet de conclure qu'en plus du transfert des bactéries du biofilm au lait pasteurisé, la contamination initiale du lait (liquide et en poudre) contribue à introduire régulièrement une charge microbienne importante qu'il est difficile de maîtriser par le traitement thermique ou par les procédures de nettoyage et désinfection et qui est responsable, elle aussi de la contamination du lait pasteurisé. D'autre part, l'affiliation aux groupes phylogénétiques, a confirmé l'identification au groupe *B. cereus* et a permis de donner une indication sur le potentiel de toxicité des souches testées. La persistance dans la laiterie étudiée d'un génotype spécifique et potentiellement dangereux constitue un risque qu'il est important d'évaluer avec précision par la recherche et le dosage des toxines produites.

CHAPITRE 5 : ADHESION DE *B.cereus* A L'ACIER INOXYDABLE

L'adhésion aux surfaces est une étape primordiale dans le processus de formation de biofilm. Elle est sous l'influence de nombreux paramètres. Dans cette partie l'intérêt est porté sur des paramètres propres aux bactéries, principalement l'état physiologique (spore et cellules végétatives) ainsi que les propriétés de surface de spores tels que l'hydrophobicité et les caractères donneur d'électron/ accepteur d'électrons (base et acide selon Lewis). Parmi les paramètres environnementaux, les nutriments sont importants, l'adhésion aux molécules nutritives est un phénomène qui se rencontre souvent sur les surfaces en contact avec les aliments. La capacité d'adhérence à des surfaces en acier inoxydable de quelques souches de *B. cereus* est étudiée par mesure du nombre de spores et des cellules végétatives capables d'adhérer, par unité de surface (cm²). Les propriétés de surface sont déterminées par la méthode MATS (microbial adhesion to solvents). L'effet des facteurs nutritionnels sur l'adhésion de *B.cereus* est examiné via le film de conditionnement.

1. Matériel et méthodes.

L'adhésion à l'acier inoxydable est étudiée sur 6 souches isolées du système de canalisation du lait pasteurisé de la laiterie A.

1.1 Adhésion des spores et des cellules végétatives de *B. cereus* à l'inox

Les souches conservées sur gélose nutritive inclinée sont revivifiées sur milieu LB puis enrichies par ensemencement de 1ml dans 7 ml du bouillon LB. Ces cultures enrichies vont servir pour la préparation des suspensions sporales et des cellules végétatives.

1.1.1 Préparation des suspensions sporales :

Les suspensions sporales sont préparées selon la technique de Mazas (1995). Les cultures enrichies (0.1 ml) sont ensemencées par étalement au râteau sur des boîtes contenant de la gélose LB fortifiée (additionnée de Mg⁺⁺ (40 mg) et de CaCl₂ (100mg) par litre de milieu. L'ajout de ces sels stimule le phénomène de sporulation. Les boîtes sont incubées 5 à 7 jours à 30°C. Le taux de sporulation est vérifié par examen microscopique de frottis colorés au bleu de méthylène ou à la fushine. Ces cultures sont utilisées à plus de 90% de spores.

Les spores sont récupérées comme suit : Le tapis formé à la surface des boîtes de pétri est inondé d'eau distillée stérile et raclé à l'aide d'un râteau. La suspension ainsi obtenue subit

une série de centrifugations. La première à 500 g pendant 5 min, permet de débarrasser les spores des débris du milieu de culture. Le culot est ainsi jeté, et le surnageant transféré dans un autre tube, subit une centrifugation à 2000 g pendant 20 min. A l'issue de cette deuxième centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot suspendu dans le même volume d'eau distillée stérile, est centrifugé à 2000 g pendant 20 min. Le culot est récupéré, additionné d'eau distillée stérile, et soumis à un traitement thermique de 80 °C pendant 10 min afin d'éliminer les cellules végétatives. Enfin et après la mesure de leurs densités optiques, les suspensions sporales sont conservées à 4°C en vue de leur utilisation.

1.1.2. Préparation des cellules végétatives

Les cultures d'enrichissement de 16- 18 h sur milieu LB sont transvasées dans des tubes à hémolyse et centrifugées à deux reprises à 2000 g pendant 20 min. A chaque fois le surnageant est jeté et le culot récupéré, est suspendu dans du TSE, au même volume que le surnageant. Les suspensions de cellules végétatives ainsi obtenues sont conservées à 4°C, après mesure de leurs densités optiques.

1.1.3. Préparation des surfaces en acier inoxydable

Le matériau utilisé dans cette étude est l'acier inoxydable 304 L destiné à l'industrie laitière. Le découpage de l'acier inoxydable en pièces de différentes dimensions a été fait industriellement. Les termes lames et coupons sont utilisés indifféremment pour désigner ces pièces dont les dimensions (5 x5 cm ; 2 x 2 cm, ou 1 x 5 cm) sont fixées par les conditions d'expérimentation. Pour les préparer aux essais d'adhésion et de formation de biofilms, ces lames doivent subir un traitement qui consiste en un dégraissage, un nettoyage acido-basique et une stérilisation. Le protocole utilisé est celui décrit par Peng et al., (2001) avec quelques modifications.

Les lames sont d'abord submergées dans un mélange d'acétone et d'éthanol (v/v) pour enlever toute trace de matière grasse. Elles subissent ensuite un nettoyage acido-basique, par immersion dans une solution de NaOH à 2% suivie d'un rinçage à l'eau distillée, puis dans une solution d'acide nitrique à 1% suivie d'un rinçage final à l'eau distillée. Les deux traitements sont effectués à 75° pendant 5 min. Les lames sont séchées et la surface d'inoculation est marquée en délimitant au centre des lames un carré de 1cm² à l'aide d'un marqueur indélébile. Elles sont finalement placées dans des boites de petri en verre stérilisées par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

1.1.4. Inoculation des lames pour l'adhésion

L'adhésion à l'acier inoxydable est réalisée selon la technique porte-germe de Marris (1992) qui est également utilisée pour l'obtention de biofilms expérimentaux sur des surfaces ouvertes. Elle consiste à inoculer le centre de la lame, préalablement traitée, et placée dans une boîte de pétri stérile, par 100 µl d'une culture bactérienne (cellules végétatives ou suspensions sporales) d'environ 10^7 ufc par ml (figure 40). La boîte est mise à l'étuve et incubée en atmosphère saturée en humidité pendant une durée déterminée. La phase d'adhésion achevée, les lames sont lavées à l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules faiblement attachées, puis elles sont soit préparées pour la formation du biofilm soit pour le dénombrement des cellules adhérentes.

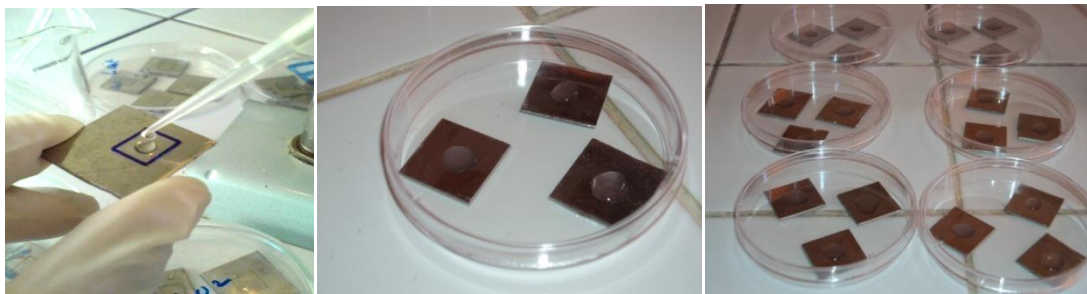


Figure 40 : Adhésion à l'acier inoxydable par technique d'inoculation.

1.1.5. Récupération et numération des cellules adhérentes

Après incubation, les boîtes d'adhésion sont sorties de l'étuve, puis les lames sont retirées et rincées 3 fois à l'EDS pour éliminer les cellules faiblement adhérentes. Les cellules adhérentes sont récupérées comme suit :

- Ecouvillonnage: A l'aide d'un écouvillon humidifié par de l'eau physiologique, le film d'adhésion est enlevé de la surface de la lame. L'écouvillon est remis dans le tube contenant l'eau physiologique et subit le traitement suivant :
- Agitation au vortex : Le tube est agité au vortex pendant 1 minute.
- Préparation des dilutions et dénombrement : A partir du tube agité au vortex, des dilutions décimales sont préparées et 0.1 ml sont étalées sur milieu solide (LB agar ou gélose nutritive) pour le dénombrement. Le nombre de cellules est exprimé en UFC/cm², selon la formule : $N_{(ufc/cm^2)} = N_c \times 1/d \times 10$

N_c : nombre de colonies

D : facteur de dilution.

1.2. Détermination de la cinétique d'adhésion chez *B. cereus*.

Les lames d'acier inoxydables préparées comme précédemment et inoculées des cultures sous forme de spore ou de cellules végétatives sont incubées à différents temps d'adhésion (1 min, puis toutes les heures jusqu'à 5 h). Les cellules adhérentes sont dénombrées, selon le même protocole.

1.3. Formation du film de conditionnement sur les lames en inox

L'effet du film de conditionnement sur l'adhésion de *B. cereus* à l'acier inoxydable a été étudié selon la méthodologie décrite dans les travaux de Sommer et al.,(1999)

1.3.1. Préparation des lames « préconditionnées » ou souillées

Pour former des films de conditionnement sur l'acier inoxydable, les lames en inox de 1 x 5 cm, traitées comme précédemment (2.1.1.3) sont recouvertes du liquide nutritif étudié, avant la stérilisation. Cette phase nutritive est constituée du lait écrémé à 10%, du lait entier recombiné et local, d'une solution de caséine à 3% et une solution de lactose à 2%. Ces différentes concentrations représentent les teneurs moyennes de ces constituants dans le lait entier. Des dilutions au 1/10 et au 1/100 sont également préparées à partir de ces solutions. Un volume de 0.1 ml est versé au centre de la lame. Celle-ci est séchée à l'air libre, mise dans un tube à essai et autoclavée pendant 15 minutes. Des lames témoins dites propres car non conditionnées sont également préparées dans les mêmes conditions.

1.3.2. Adhésion sur lames conditionnées

Des lames conditionnées et non conditionnées sont inoculées avec 100 µl des suspensions bactériennes. Celles-ci sont préparées à partir des suspensions mères des spores et des cellules végétatives, par dilutions décimales dans le milieu considéré (le milieu d'adhésion), et ajustée à la densité bactérienne appropriée (10^7 ufc/ ml). Les lames conditionnées sont ensuite placées dans des boîtes de pétri stériles, mises à l'étuve saturée en humidité et incubée à 30°C. A la fin du temps d'adhésion, les boîtes sont sorties de l'étuve et soumises au protocole de dénombrement des cellules adhérentes par unité de surface (cm²).

1.4. Caractérisation des propriétés de surface des spores.

Les propriétés de surface des spores de 23 souches de *B. cereus* dont 13 font partie du génotype PCR-M13 A et 10 non typées, ont été déterminées selon la méthode MATS, microbial adhesion to solvent (Bellon-Fontaine et al., 1996).

Le caractère hydrophobe/hydrophile des spores est déterminé par la mesure de l'adhésion au solvant apolaire : l'hexadécane. Les propriétés acide/base de Lewis sont déterminés en utilisant les paires de solvants : hexadecane/ chloroforme et hexane/éther diéthylique. Les solvants d'une même paire doivent avoir la même constante de lifshitz van der Waals. L'adhésion des cellules au chloroforme (accepteur d'électrons) et à l'éther (donneur d'électrons), par comparaison à l'adhésion à l'hexadécane et à l'hexane permet de connaître respectivement les caractéristiques basiques (donneur d'électrons) ou acides (accepteur d'électrons) de la souche bactérienne.

Toutefois pour le détail du protocole de mesure de l'adhésion aux différents solvants nous nous sommes inspirés des travaux portant sur les bacilles sporogènes (Simmonds et al., 2003 ; Seale et al., 2008; Tauveron et al., 2006), avec des modifications mineures. Brièvement, les suspensions sporales précédemment préparées sont ajustées à des densités optiques de 0.6-1 à 595 nm (A0). Des lavages de culot sont réalisés avant chaque manipulation, ensuite des aliquotes (2 ml) sont ajoutées à 400 µl de solvant et mélangées au vortex pendant 1 min à vitesse maximale. Après un temps de repos de 15 min, permettant la séparation des deux phases, la DO (595 nm) de la phase aqueuse (A1) est lue. Le pourcentage de spores adhérentes au solvant (A), est déduit utilisant la formule suivante : $A = (A0 - A1)/A0 \times 100$. Chaque mesure est répétée au moins trois fois.

Pour l'hexadécane lorsque A est inférieur à 40%, la souche est dite hydrophile. Si A est compris entre 40 et 60%, la souche est dite moyennement hydrophobe. La souche est hautement hydrophobe pour $A > 60\%$ (Simmonds et al., 2003).

Lorsque A de l'éther diéthylique est plus élevé que A de l'hexane, la souche est dite acide accepteuse d'électrons. Lorsque A du chloroforme est plus élevé que A de l'hexadecane, la souche est dite basique donneuse d'électrons (Bellon-Fontaine et al., 1996).

1. 5. Analyse statistique

Les résultats des différents tests sont soumis à des traitements statistiques sur le logiciel Minitab 15. L'influence des différentes conditions expérimentales sur le nombre de cellules adhérentes est réalisée par des analyses de variance. Des corrélations sont également réalisées entre l'hydrophobicité des spores et leur adhésion à l'acier inoxydable propre ainsi qu'aux différents films de conditionnement.

2. Résultats

2.1. Cinétique d'adhésion de *B.cereus* à l'acier inoxydable

L'adhésion des spores et des cellules végétatives à l'acier inoxydable a été évaluée à des intervalles réguliers de temps afin de déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'état stationnaire correspondant au maximum d'adhésion chez les souches testées. L'adhésion des spores et des cellules végétatives de six souches de *B. cereus* isolées du biofilm formé dans les canalisations du lait pasteurisé, à des taux d'inoculum de l'ordre de 10^7 ufc/ml, est présentée dans les (figures 41 et 42 et 43). Les résultats sont exprimés en nombre de cellules adhérees par unité de surface (\log ufc/cm²). Une variabilité entre les souches est notée dans le nombre de cellules adhérees après la première minute et le temps requis pour atteindre l'état stationnaire. Il faut noter que les niveaux d'adhésion initiale varient peu entre les spores et les cellules végétatives. Les valeurs enregistrées sont comprises entre 3 et 4.39 \log ufc/cm², toutefois l'évolution de ce nombre au cours du temps d'incubation révèle que les souches testées adhèrent selon des modèles différents plus ou moins influencé par leur état physiologique (spores ou cellules végétatives).

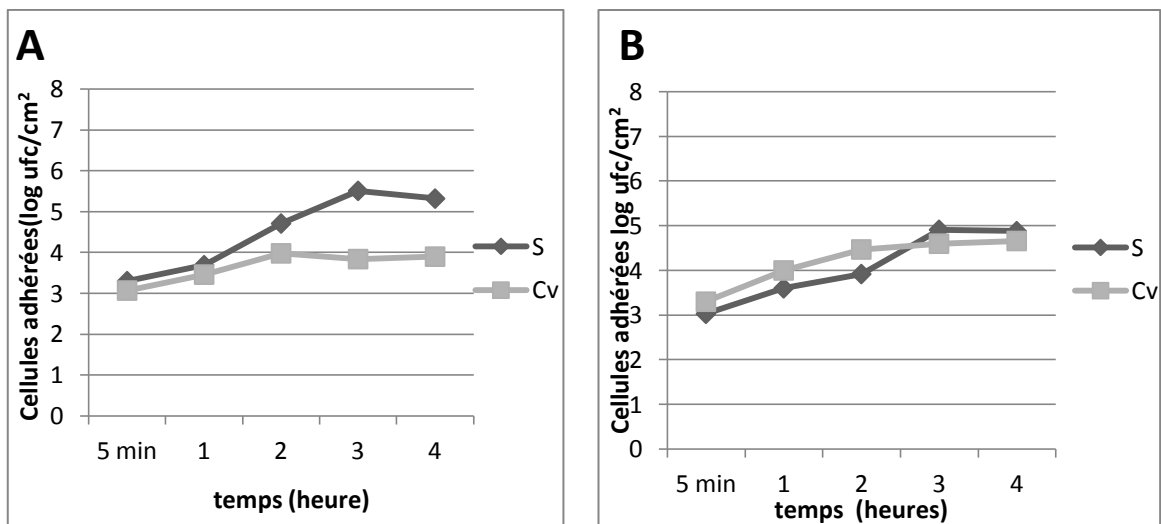


Figure 41: Adhésion des spores et des cellules des souches BC1 (A), et BC2 (B) à l'acier inoxydable en fonction du temps d'incubation.

Pour les souches BC1 et BC2 (figure 41), l'adhésion des cellules végétatives survient après 2 h d'incubation, alors que celle des spores nécessite une heure supplémentaire. L'adhésion des spores et des cellules végétatives de la souche BC1 est la même durant les premières heures, ensuite les spores se démarquent nettement par une adhésion maximale de l'ordre d'environ $5 \cdot 10^5$ ufc/cm² contre $5 \cdot 10^3$ ufc/cm² pour les cellules végétatives. A

l'inverse, les spores et les cellules végétatives de la souche BC2 semblent suivre le même modèle d'adhésion.

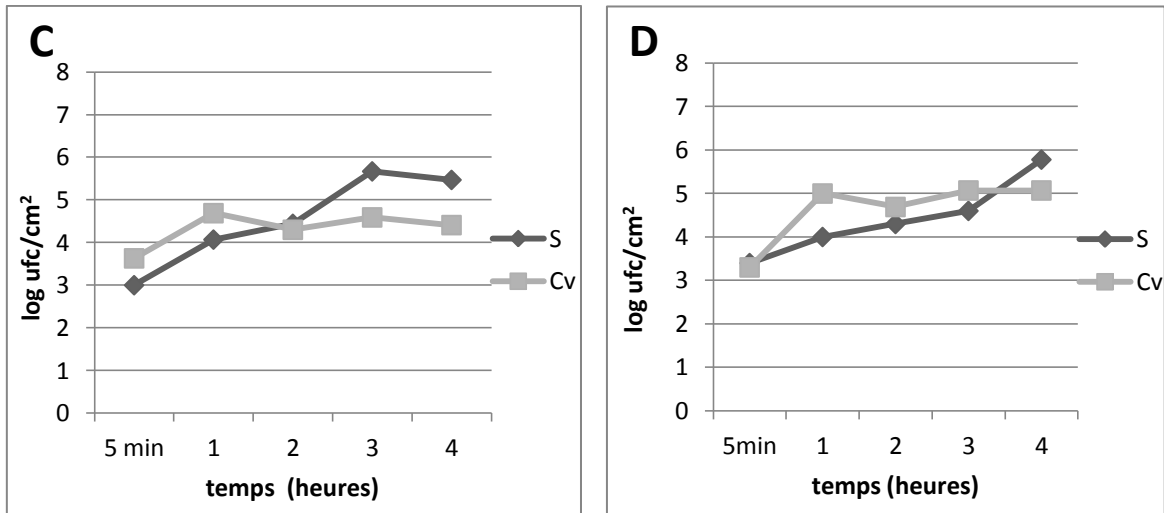


Figure 42 : Adhésion des spores et des cellules des souches BC3 (C), et BC4 (D) à l'acier inoxydable en fonction du temps d'incubation.

Les cellules végétatives des souches BC3 et BC4 ont une adhésion rapide et plus importante que les spores pour le même temps d'incubation (figure 42). Elles parviennent respectivement à 5.10^4 et 10^5 ufc/cm² après seulement une heure d'adhésion. Le maximum d'adhésion ($5,1.10^5$ ufc/cm²) des spores de la souche BC3 est atteint après la 3^{ème} heure, alors que celles de la souche BC4 parviennent à un niveau plus élevé ($6,1.10^5$ ufc/cm²) mais après la 4^{ème} heure. C'est le délai d'adhésion le plus long obtenu pour les souches testées.

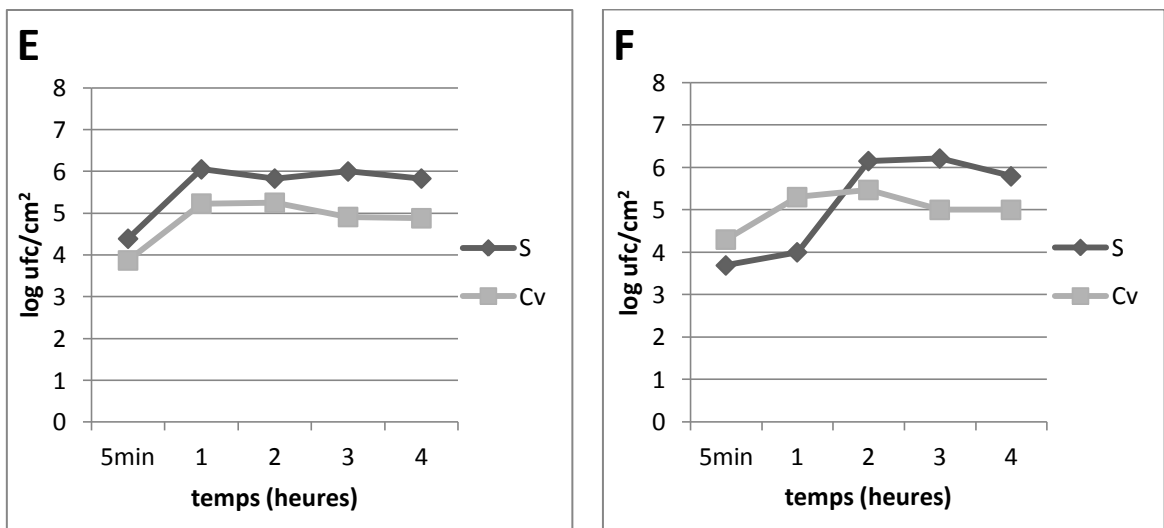


Figure 43 : Adhésion des spores et des cellules des souches BC5 (E), et BC6 (F) à l'acier inoxydable en fonction du temps d'incubation.

Dans le modèle d'adhésion de la souche BC5 les spores et les souches végétatives suivent la même évolution, même si le taux d'adhésion chez les spores est plus élevé (figure

43). En revanche, il est intéressant de noter que l'adhésion des spores est aussi rapide que celle des cellules végétatives (1 h), et que ce temps est le plus court qui soit obtenu, comparé aux spores des cinq autres souches de *B. cereus*. Le même modèle d'adhésion est présenté par les spores et les cellules végétatives de la souche BC6, la différence réside dans le temps nécessaire et qui est de deux heures. Le nombre de spores adhérentes (10^6 ufc/cm) est plus important que celui des cellules végétatives (10^5 ufc/cm²).

2.2. Adhésion des spores de *B.cereus* à l'inox propre et souillé

L'adhésion des spores et des cellules végétatives des six souches de *B. cereus* (BC1 – BC6) est comparée sur des lames en acier inoxydable propres et des lames conditionnées avec du lait écrémé à 1%, représentant les résidus de lait qui peuvent rester sur les équipements dans les entreprises de production laitière.

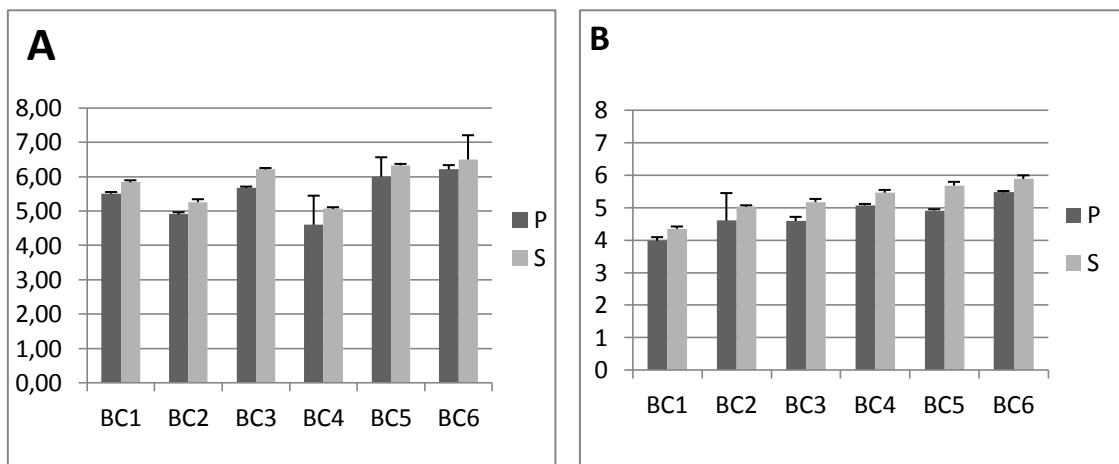


Figure 44 : Adhésion des spores (A) et des cellules végétatives (B) de six souches de *B. cereus* à l'inox propres (P) et souillé (S) au lait écrémé.

D'après la figure 44, à l'exception de la souche BC4, les spores des cinq souches adhèrent en plus grand nombre que les cellules végétatives sur les deux types de lames en acier inoxydable. Les spores de cette souche présentent un score d'adhésion inférieur à celui des spores des autres souches et à celui de son état végétatif. Les niveaux d'adhésion les plus élevés sont montrés par la souche BC6 à l'état sporulé et végétatif et par les spores de la souche BC3. L'état de l'inox souillé ne semble pas influencer l'adhésion des cellules végétatives de façon significative. En effet, malgré la légère augmentation du nombre de cellules adhérentes sur l'inox traité au lait écrémé, l'analyse de la variance n'a pas révélé de différence significative ($p > 0.05$) entre les taux d'adhésion des cellules végétatives sur lames propres et lames souillés. La variabilité est due aux propriétés d'adhérence intrinsèques des souches ($p < 0.01$). Le maximum d'adhésion est montré par les spores sur les lames souillées,

dont l'effet est significatif ($p < 0.05$), comparé à l'adhésion sur l'inox propre. Toutefois, le facteur souche est déterminant, l'adhésion pouvant varier d'une souche à l'autre ou d'un groupe de souche à l'autre. En éliminant ce facteur, le classement selon l'ANOVA a montré que l'adhésion des cellules végétatives à l'inox propre et souillé est faible, celle des spores sur l'inox propre est moyenne, l'adhésion la plus forte étant obtenue par les spores sur les lames souillées.

2.3. Adhésion des spores de *B. cereus* au film de conditionnement

L'adhésion des spores des six souches de *B. cereus* à l'acier inoxydable recouvert des films de conditionnement composés de différents laits (LE : lait écrémé, LR : lait reconstitué et LV : lait de vache local), ainsi que des constituants majeurs du lait (Cas : caséine et Lac : lactose) est donné par les figures (45, 46 et 47). L'adhésion dans ces différentes conditions nutritionnelles est comparée à l'adhésion sur l'inox « nu » ou propre, autrement dit non recouvert du film de conditionnement.

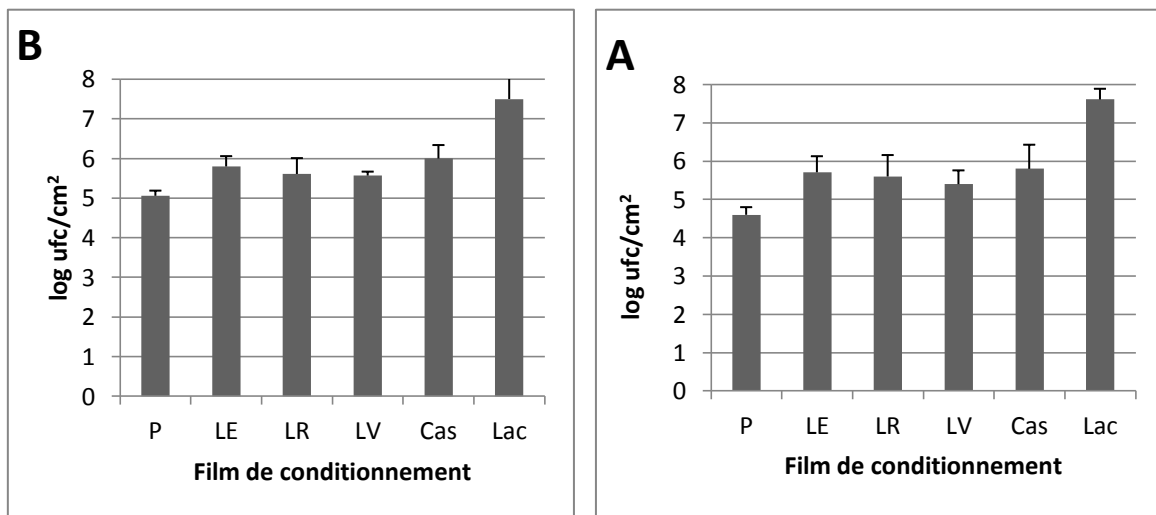


Figure 45 : Adhésion des spores des souches BC1 (A) et BC4 (B) à l'inox conditionné avec le lait et les constituants du lait. P : propre, LE : lait écrémé, LR, lait reconstitué, LV, lait de vache local, Cas : caséine, Lac : lactose.

A première vue des variations dans le nombre de spores adhérentes sont observées en fonction des souches et des films de conditionnement. Le modèle d'adhésion présenté par les souches BC1 et BC4 est caractérisé par une augmentation du nombre de spores adhérentes des deux souches, légère en présence du lait sous toutes ses formes et de la caséine, mais plus importante en présence du lactose. Le nombre de spores adhérentes dans le film de conditionnement de lactose augmente de 2.4 et 3 unités logarithmiques par rapport à l'inox propre pour les souches BC1 et BC4 respectivement.

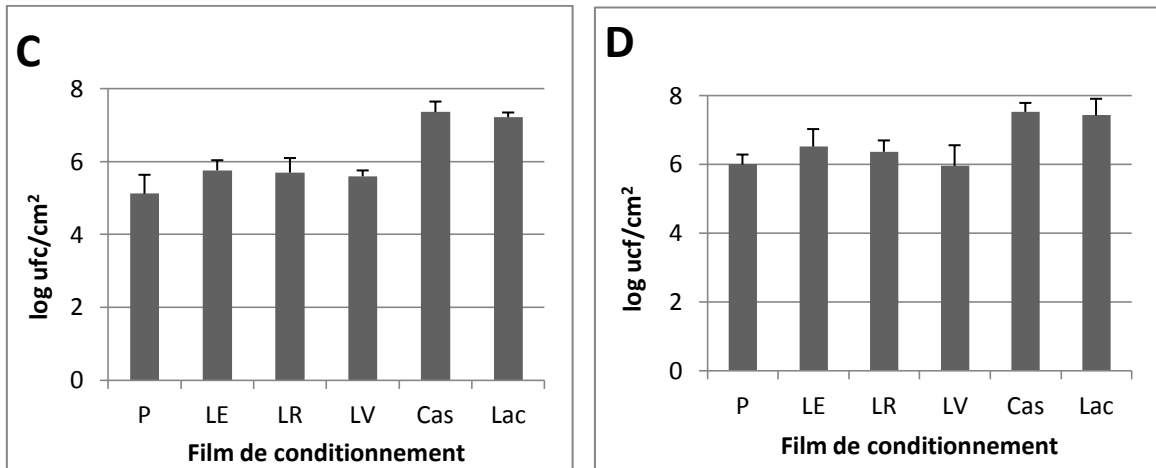


Figure 46 : Adhésion des spores des souches BC3 (C) et BC5 (D)   l'inox conditionné avec le lait et les constituants du lait. P : propre, LE : lait écrémé, LR, lait recombinaé, LV, lait de vache local, Cas : caséine, Lac : lactose.

Dans le modèle d'adhésion au film de conditionnement des spores des souches BC3 et BC5, une augmentation assez importante du nombre de spores adhérées est observée sur les films de conditionnement de caséine et de lactose. Le taux d'adhésion de la souche BC3 est augmenté de 2.4 et 2.1 log ufc/cm² en présence de caséine et de lactose respectivement. Ce taux est légèrement inférieur dans le cas de la souche BC5 pour laquelle, une augmentation respective de 1.53 et 1.73 ufc/cm² est notée.

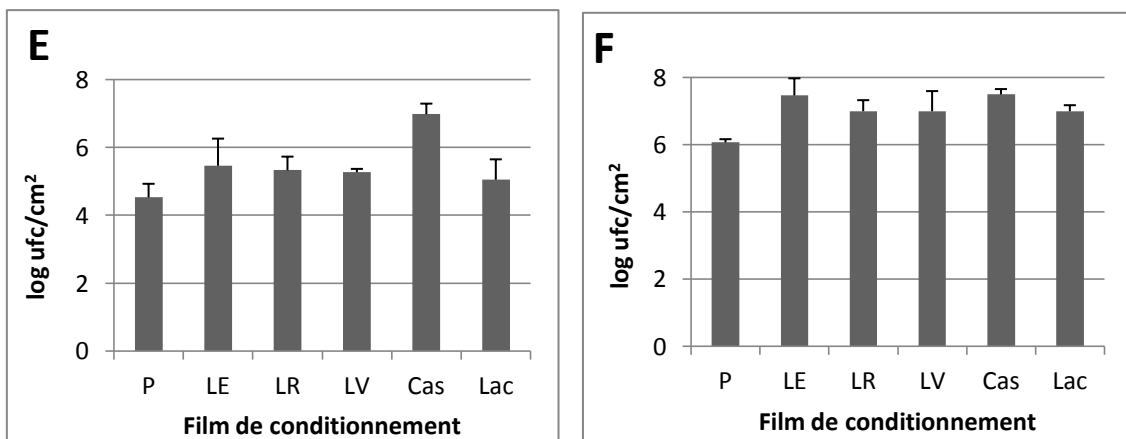


Figure 47 : Adhésion des spores des souches BC2 (E) et BC6 (F)   l'inox conditionné avec le lait et les constituants du lait. P : propre, LE : lait écrémé, LR, lait recombinaé, LV, lait de vache local, Cas : caséine, Lac : lactose.

L'effet positif de la caséine sur l'adhésion des spores de *B. cereus* est également visible dans le cas de la souche BC2, où une augmentation de 2.45 log ufc/cm² est notée. Hormis cet effet caséine, l'adhésion des spores de cette souche ne semblent pas être affectée par les autres films de conditionnement. Inversement, une augmentation plus ou moins importante en présence de tous les films de conditionnements est notée pour les spores de la souche BC6. L'adhésion de cette souche est affectée de la même façon (1.4 log ufc/cm²) en

présence de lait écrémé et de caséine. Le lactose et les autres laits induisent une augmentation de l'adhésion de 0.93 unités logarithmiques. Comparées aux autres souches l'effet du film de conditionnement sur l'adhésion des spores est plus visible chez cette souche.

L'effet du film de conditionnement sur l'adhésion des spores est analysé statistiquement par comparaison à l'inox propre (le témoin). L'analyse de la variance montre que l'effet souche est hautement significatif ($p < 0.01$), alors que celui des constituants du film de conditionnement est significatif ($p < 0.05$). Le classement de l'ANOVA montre que les taux d'adhésion en présence des trois types de lait sont les plus faibles, suivis par ceux obtenus en présence du lactose, constituant groupe intermédiaire. L'adhésion la plus forte est enregistrée en présence de la caséine.

2.4. Les propriétés de surface des spores

L'hydrophobicité des spores des 23 souches de *B. cereus* varie de 15.2 à 51.6 % d'adhérence à l'hexadecane (figure 48). Les spores sont classées en hydrophiles et hydrophobes modérés, sachant que le pourcentage d'adhésion à l'hexadecane le plus élevé (51.6%) est inférieur à 60%, valeur seuil pour être classée comme hautement hydrophobe. Les souches hydrophiles (13 souches) sont plus importantes en nombre que les souches hydrophobes (10 souches). D'autant plus que les valeurs de l'hydrophobicité des spores hydrophobes, telles que montrées par le pourcentage d'adhérence à l'hexadecane couvrent un intervalle relativement étroit, de 42.3 à 51.6%. L'absence de spores hautement hydrophobes est à souligner. Par ailleurs, le caractère hydrophile des spores est marqué, sachant qu'à l'exception d'une souche, les pourcentages d'adhésion à l'hexadecane sont inférieurs à 30%, et à 20% pour quatre souches. La prédominance de spores hydrophiles parmi les souches de *B.cereus* est également à souligner, sachant que les spores de ce groupe de bactéries sont généralement considérées comme hydrophobes et hautement hydrophobes.

Les propriétés acide-base des spores telles que révélées par les valeurs d'adhésion aux différents solvants (tableau 14) sont variables entre les souches, qui se répartissent à première vue en trois catégories. Cinq souches n'ont pas montré de caractère donneur d'électron ou accepteur d'électron, leurs affinités respectives pour le chloroforme et l'éther d'éthyle étant inférieures à celles montrées à l'hexadecane et à l'hexane. Les valeurs les plus faibles sont montrées par la souche BC23 avec 49.3 et 21.1% pour le couple hexadecane/chloroforme et 53.6 et 8.4% pour le couple hexane/éther d'éthyle. Il est intéressant de remarquer que les spores de toutes ces souches sont hydrophobes. Quatre souches hydrophiles ont exprimé à la

fois un caractère donneur d'électrons et accepteur d'électron. Les valeurs d'adhésion aux solvants polaires sont assez faibles et ne dépassent pas 44.4% d'adhésion au chloroforme pour 31.5% à l'hexadecane et 34.7% d'adhésion à l'éther d'éthyle pour 33.4% à l'hexane (souche BC5). Ce qui indique que les caractères donneur d'électrons et surtout accepteur d'électrons sont faibles. Deux souches hydrophiles ont exprimé un caractère faiblement accepteur d'électrons, l'adhésion à l'éther d'éthyle ne dépassant pas 31.5% pour 24.9% à l'hexane (souche BC12). Les deux dernières souches (BC19 et BC3), l'une hydrophile (28.4% d'adhésion à l'hexadecane), l'autre hydrophobe (44.5% d'adhésion à l'hexadecane) ont exprimé un caractère faiblement donneur d'électron, l'adhésion au chloroforme étant égale à 42.8% et 48.9% respectivement. Le caractère base de la souche hydrophobe est encore plus faible que celui de la souche hydrophile. Au vu de ces résultats, il semblerait que les spores hydrophiles aient un caractère donneur et accepteur d'électron pouvant basculer soit vers l'un soit vers l'autre. Alors que les souches hydrophobes n'expriment aucun caractère dans ces conditions expérimentales, la souche BC3, donneuse d'électron, fait l'exception.

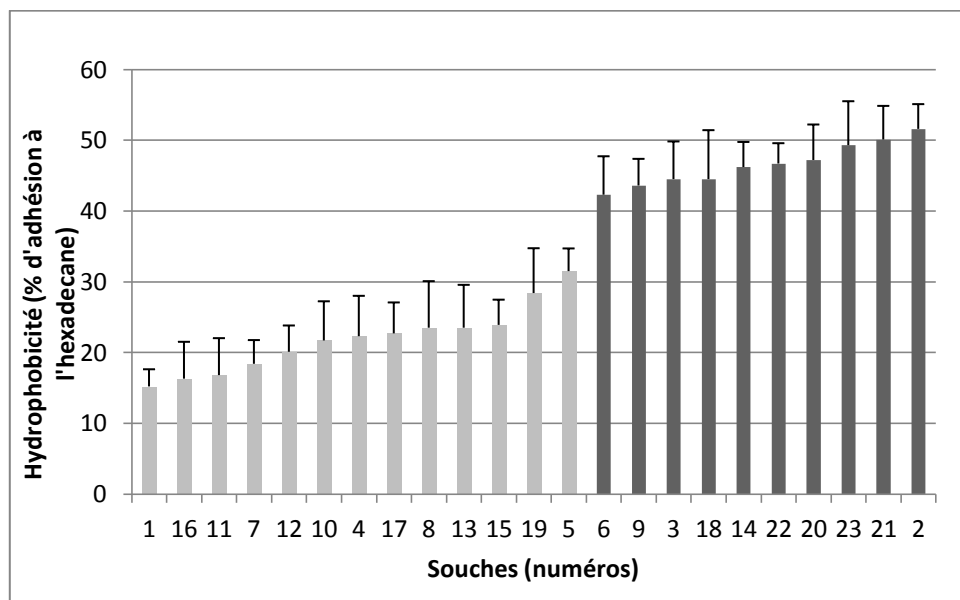


Figure 48 : Hydrophobicité des spores de 23 souches lactières de *B. cereus* : les spores hydrophiles (gris clair), les spores hydrophobes (gris foncé).

Tableau 14 : Propriétés acide-base de 13 souches de *B. cereus*

Souche	Hexadecane (E)	Choroforme (E)	Hexane (E)	Ether (E)	Caractère*
BC1	15,2 (2)	29,1 (6.1)	18,2 (2.8)	21,1 (5.6)	D et A
BC7	18,4 (4,2)	23,9 (5.3)	21,1 (3.7)	27,3 (3.9)	D et A
BC8	23,6 (3,7)	33,8 (3.6)	25,8 (8.3)	27,6 (8.3)	D et A
BC5	31,5 (4,5)	44,4 (4.1)	33,4 (7.7)	34,7 (6.7)	D et A
BC12	20,1 (6,5)	15,7 (6)	24,9 (5.4)	31,5 (7)	A
BC4	22,3 (3,2)	15,6 (4.7)	23,5 (6.2)	25,1 (8.6)	A
BC19	28,4 (9,4)	42,8 (7.8)	34,2 (4.8)	28,43 (10)	D
BC3	44,5 (6,3)	48,9 (8.5)	46,7 (4.4)	26,5 (9.6)	D
BC6	42,3 (2,4)	37,3 (3.9)	45,4 (7.2)	19,9 (7.9)	N D, N A
BC9	43,6 (3,5)	37,3 (3.2)	45,2 (6.1)	19,9 (5.8)	N D, N A
BC22	46,7 (2,8)	32,2 (5.2)	49,2 (4.6)	6,1 (7.4)	N D, N A
BC23	49,3 (5,2)	21,1 (4.3)	53,6 (5.6)	8,4 (8.5)	N D, N A
BC2	51,6 (2,4)	38,9 (2.7)	53,3 (3.1)	15,2 (4.2)	N D, N A

(E) : Les valeurs de l'écart type.

*D : donneur d'électron, A : accepteur d'électrons, ND, NA, non donneur d'électrons et non accepteurs d'électrons.

2.5. Relation entre l'hydrophobicité et l'adhésion

La relation entre l'hydrophobicité de la surface des spores et leur adhésion à l'inox propre et conditionné est déterminée par des corrélations/régressions (figure 49). Le calcul du coefficient de corrélations de Pearson a permis de conclure à une absence de corrélation entre cette propriété et l'adhésion à l'inox propre et conditionné avec le lait, [$r = 0.045$ et 0.124 ($p > 0.05$)] respectivement. Par contre, une corrélation positive significative et une corrélation négative significative sont notées avec l'adhésion à la caséine [$r = 0.901$, $p < 0.05$] et au lactose [$r = -0.861$, ($p < 0.05$)] respectivement. L'adhésion à l'inox nu ou conditionné avec le lait est indépendante de l'hydrophobicité des spores. Par contre, cette propriété de surface est liée à l'adhésion à l'inox recouvert de caséine ou de lactose. Ces résultats corroborent ceux obtenus par l'ANOVA, qui a montré un effet significatif du film de conditionnement de caséine et de lactose sur l'adhésion, cet effet pourrait être dû au caractère hydrophobe/hydrophile des spores.

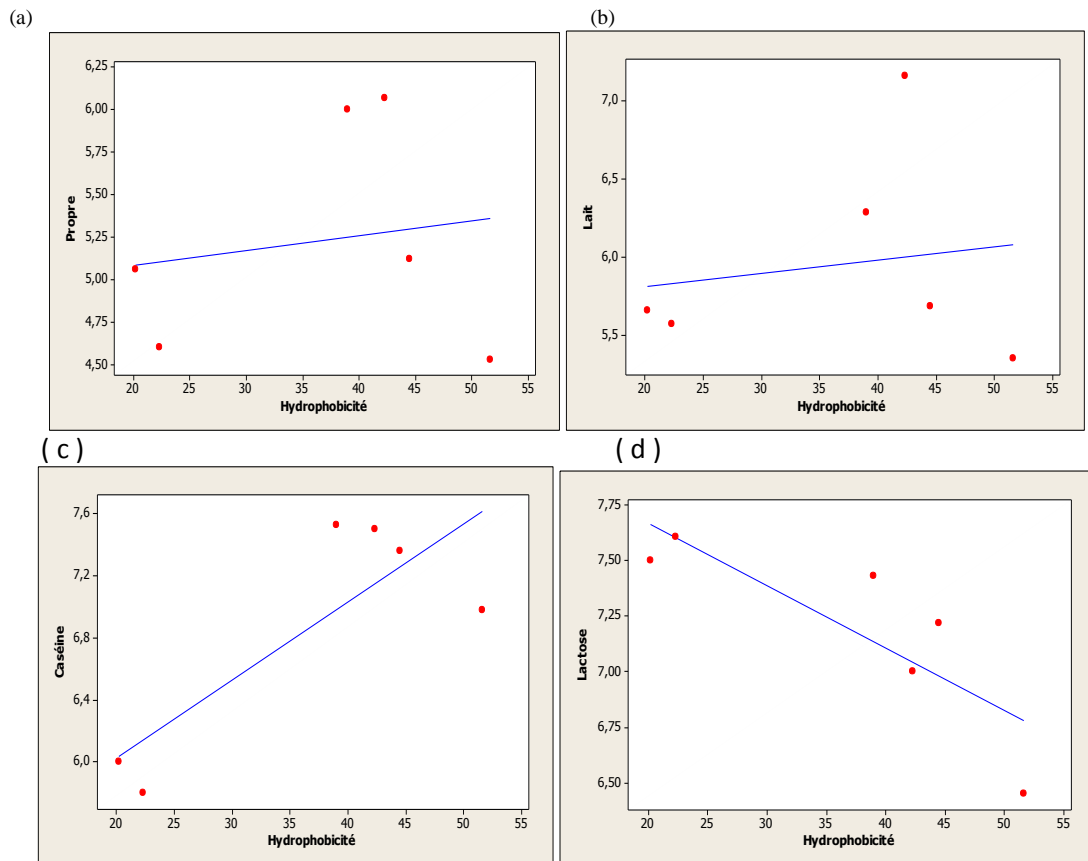


Figure 49 : Corrélations entre l'hydrophobicité et l'adhésion à l'inox, propre (a) et conditionné avec le lait (b), la caséine (c) et le lactose (d).

3. Discussion

La caractérisation des propriétés d'adhérence de *B. cereus* telles que mesurées par l'adhésion à l'acier inoxydable et l'adhésion aux solvants apolaires et polaires révèle des différences plus ou moins importantes entre les souches testées. L'adhésion survient dès les premières secondes où les cellules bactériennes entrent en contact avec le support et se poursuit pendant un laps de temps qui varie selon les espèces. Il est important d'identifier les modèles d'adhésion propres aux souches étudiées et de déduire les paramètres réellement significatifs de l'adhérence aux surfaces inertes pour ce groupe de bactéries.

Concernant l'adhésion à l'acier inoxydable, la comparaison des souches a porté sur l'adhésion initiale (durant les 5 premières minutes), l'adhésion maximale et le temps nécessaire pour l'atteindre. Sur la base de ces critères, différents modèles d'adhésion sont montrées par les souches étudiées. D'une manière générale, l'adhésion est précoce chez les cellules végétatives mais le nombre de bactéries adhérees reste nettement inférieur à celui des spores. Par ailleurs, des différences sont notées dans les délais nécessaires pour atteindre l'adhésion maximale ainsi que dans les nombres de cellules adhérees. C'est la tendance

générale chez l'ensemble des souches étudiées. Concernant le temps d'adhésion, il est de 2 à 3 heures pour la plupart des souches, certaines d'entre elles (la souche BC4) montrent une adhésion légèrement plus tardive (4 heures) ou nettement plus précoce, 1 heure, (la souche BC5). Dans la littérature, l'adhésion bactérienne aux surfaces inertes est décrite comme un phénomène rapide qui peut s'effectuer une à deux heures après l'inoculation (Frank et Koffi, 1990, Vanhaecke et al., 1990). Mais ce temps est variable selon les souches. Un temps moyen de 4 heures est nécessaire à l'adhésion de *B. cereus* (Peng et al., 2001) ainsi qu'à celle de *Pseudomonas spp.*, *Listeria monocytogenes* (Fatemi et Frank, 1999) et de *S. aureus* (Pompermayer et Gaylarde, 2000). Pour Sommer et al., (1999), l'adhésion de bactéries Gram+ et Gram- survient après 3 h d'incubation. Un intervalle de temps plus long (huit heures) est requis pour l'adhésion de *Shewanella putrefasciens* (Bagge et al., 2001). Des niveaux mesurables de bactéries survenant après 30 secondes d'adhésion à l'inox ont été rapportées pour des souches de *Pseudomonas aeruginosa* (Vanhaecke et al., 1999). Les valeurs maximales d'adhésion des spores varient également entre les souches. Les souches BC5 et BC 6 parviennent à des valeurs maximales de l'ordre de 10^6 spores/cm² pour un inoculum de 10^7 ufc/ml, révélant une plus grande capacité d'adhésion chez ces souches. Pour les cellules végétatives, l'adhésion est rapide, les nombres de cellules adhérentes durant les premières minutes sont parfois plus élevés mais ils se stabilisent par la suite et restent inférieurs à ceux des spores à l'exception de la souche BC4. L'adhésion élevée des cellules végétatives dans le cas de cette souche pourrait être attribuée, entre autres, à leur état physiologique, car d'après Peng et al., (2001), les cellules végétatives de *B. cereus* adhèrent en grand nombre quand elles sont en phase stationnaire. Quand au temps d'adhésion des cellules végétatives, il est de 1 h pour la plupart des souches. Cette rapidité dans le processus d'adhésion des cellules végétatives par rapport aux spores peut être expliquée par leur mobilité, sachant le rôle des flagelles dans les stades initiaux de l'adhésion de *B. cereus* (Houry et al., 2010) et de nombreuses autres bactéries telles que *P. aeruginosa* (Klausen et al., 2003) et *L. monocytogenes* (Lemon et al., 2006).

Néanmoins il est reconnu que les spores adhèrent en plus grand nombre que les cellules végétatives dans le groupe *B. cereus* (Peng et al., 2001 ; Faille et al., 2001). Des différences dans les structures et la composition chimique caractérisent l'extrême surface des cellules végétatives et des spores, notamment la présence de l'exosporium et des appendices chez ces dernières. La forte adhésion des spores à l'acier inoxydable a des implications pour l'hygiène des surfaces puisqu'elle est responsable de leur résistance aux procédures de nettoyage (Anderson et Ronner, 1998 ; Faille et al., 2002 ; 2010 b). En effet Anderson et

Ronner, (1998) ayant étudié l'adhésion des spores de *B. cereus* durant leur cycle de vie, ont montré que les spores sont 33 à 48% plus adhérentes que les spores germinatives. Ces dernières sont également plus facilement enlevées que les spores dormantes.

Pour simuler les conditions d'un bon ou d'un mauvais nettoyage des équipements en industrie laitière, l'adhésion de *B. cereus* a été étudiée sur des lames en acier inoxydable propres ou « souillées » avec du lait écrémé à 1%. Le nombre de spores adhérentes est plus élevé que celui des cellules végétatives dans les deux types de lames. De même le taux d'adhésion des spores sur lames traitées au lait écrémé est plus important que sur les lames non traitées. Toutefois, certaines souches montrent les mêmes capacités d'adhésion chez les spores et les cellules végétatives, alors que pour d'autres, l'adhésion des cellules végétatives est même supérieure à celle des spores sur ce même type de lames. Sachant que l'adhésion chez ces souches est rapide et survient après une heure d'incubation sur lames nues, le nombre de cellules végétatives adhérentes après 3 h sur lames conditionnées, traduirait plutôt une multiplication bactérienne, le film de conditionnement servant de support nutritionnel également. Le rôle du film de conditionnement dans l'influence positive ou négative de l'adhésion bactérienne est largement reconnu (Gottenbos et al., 1999 ; Lorite et al. 2011 ; Van der Mei et al., 2008). Dans le cas, de *B. cereus*, l'adhésion des spores à l'acier inoxydable peut-être influencée par le niveau d'encrassement, qui constitue, selon Faille et al, (2002), un élément significatif de la résistance des bactéries aux procédures de nettoyage.

L'étude de l'influence du niveau d'encrassement sur l'adhésion des spores de *B. cereus* a été affinée via la variation de la composition des films de conditionnement. En plus du lait écrémé, le lait de vache local et le lait reconstitué ainsi que les constituants majeur du lait (lactose et caséine) sont utilisés pour le revêtement des lames en inox.

Les taux d'adhésion obtenus sur les lames traitées au lait local et au lait reconstitué sont sensiblement les mêmes, alors qu'une augmentation plus ou moins importante mais non significative est enregistrée dans le cas du lait écrémé. Un effet significatif sur l'adhésion des spores est noté dans le cas des lames conditionnées de lactose et de caséine. L'adhésion au lait de souches de *B. cereus* isolées du biofilm est évidente en raison de leur large colonisation des surfaces des équipements laitiers nettoyées ou souillées par le lait. L'adhésion de *B. cereus* à l'acier inoxydable en présence de lait entier a été rapporté dans le cas de souches isolées des tanks de stockage du lait (Shaheen et al., 2009). Le rôle du lait ou de ses constituants est controversé dans la littérature. L'adhésion à l'acier inoxydable de pathogènes alimentaires tels que *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *Serratia marcescens*, (Barnes et al.,

1999), et *L. monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* (Helke et al., 1993) est inhibée en présence du lait ou des protéines du lait particulièrement les caséines. De même, l'adhésion des spores et cellules végétatives de bacilles thermophiles est diminuée sur l'inox conditionné avec des protéines du lait écrémé (Parkar et al., (2001), alors qu'elle est augmentée 10-100 fois en présence de lait (Flint et al., 2001). D'après Helke et al., (1993), parmi les composants individuels du lait, les protéines sont le principal agent inhibiteur de l'adhésion. Inversement, le rôle des protéines du lait dans la promotion de l'adhésion bactérienne est également rapporté. D'après Kumar, (1998), les protéines du lactosérum non seulement provoquent une augmentation dans l'adhésion bactérienne, mais augmentent sélectivement l'adhésion des microorganismes originaires du lait.

Le rôle des protéines adsorbées dans la promotion ou l'inhibition de l'adhésion bactérienne est souligné dans la littérature (Tang et al, 2006 ; Vejborg et al., 2008 ; Benborn et al, 2009). Les résidus alimentaires ne favorisent pas toujours l'adhésion aux surfaces des équipements et installations alimentaires. Bien au contraire, l'adhésion des pathogènes alimentaires bactériens est réduite par certains films de conditionnement alimentaires. Il a été en effet, montré que le conditionnement des surfaces en acier inoxydable avec des extraits aqueux de muscle de poisson peut entraver significativement l'adhésion bactérienne (Bernborn et al., 2009 ; Vejborg et al., 2008). Cet effet antiadhésif a été attribué à la formation d'un film de conditionnement composé en premier lieu de protéines de poissons. Celles-ci ont également réduit l'adhésion bactérienne à plusieurs autres matériaux comprenant les polymères, le plastique, et le verre, par la formation d'une couche antiadhésive considérable.

Le rôle des protéines adsorbées est multiple : elles peuvent servir de nutriments pour les bactéries, elles peuvent être des récepteurs aux bactéries, ou au contraire limiter l'interaction entre les bactéries et la surface (Al Makhalfi et al., 1994). Les protéines peuvent améliorer l'adhésion des bactéries aux surfaces grâce aux interactions ligand-récepteurs ou acide/base de Lewis ou au contraire limiter l'adhésion bactériennes par des interactions répulsives le plus souvent électrostatiques. (Katsikogianni,et., Missirlis, , 2004, Tang et al, 2006). Les protéines de la surface peuvent également constituer un support nutritif pour les bactéries qui vont les métaboliser ce qui est de nature à modifier l'état de surface, avec une influence sur la poursuite de l'adhésion et la prolifération bactérienne par la suite.

Dans la présente étude, le deuxième nutriment qui influençait positivement l'adhésion des spores de *B. cereus* est le lactose. L'adhésion au lactose est égale ou supérieure à celle

exprimée vis-à-vis de la caséine en fonction des souches et selon le classement de l'ANOVA, elle se met en position intermédiaire entre l'adhésion au lait et à la caséine. Un effet positif dans l'adhésion de *L. monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* (Helke et al., 1993) a été attribué au lactose. Le rôle des protéines dans l'adhésion bactérienne, est confirmé, leur influence étant positive dans le cas des isolats de *B. cereus* d'origine laitière. Pour les sucres, il a été montré que les polysaccharides, sont capables de promouvoir l'adhésion bactérienne dans le milieu marin (Bakker et al., 2003 ; Compère et al., 2001). En effet, dans leur étude de la cinétique de formation du film de conditionnement sur des lames en acier inoxydable immergées dans l'eau de mer, Compère et al., (2001), ont montré que les protéines adhèrent très rapidement suivi de près par les sucres. De même, Bakker et al., (2003) ont trouvé que l'adhésion initiale de certaines souches de bactéries augmentait en fonction de la concentration du carbone organique dissout (COD) dans les films de conditionnement formés par immersion de lames en verre dans l'eau de mer de différentes compositions. Jain et Bhosle, (2009), ayant comparé l'adhésion de trois souches bactérienne : deux *Pseudomonas* et un *Bacillus* au verre conditionné de sucres et de protéines, ont trouvé une corrélation significative (positive ou négative) avec les hydrates de carbone mais pas avec les protéines.

Ce film de conditionnement qui se forme en amont de l'adhésion des bactéries a beaucoup été étudié dans le milieu marin (Bakker et al., 2003 ; 2004 ; Compère et al., 2001 ; Jain et Bhosle, 2009), et est considérée comme un facteur de complication dans l'étude des mécanismes de l'adhésion bactérienne (Bakker et al., 2004). La formation du film de conditionnement sur les dispositifs médicaux est également indésirable, et beaucoup de travaux portent sur les moyens d'empêcher sa formation. La situation en industrie laitière peut-être des plus ambiguës, puisque le film de conditionnement à base de lait quasi inévitable, peut réduire à néant les stratégies prévenant la formation de biofilm. Il a été montré, en effet, que les films de conditionnement formé par les protéines du lait et du lactosérum étaient capables de masquer l'effet antibactérien des surfaces recouvertes par des ions d'argent induisant des taux d'adhésion similaires à ceux obtenus avec les témoins (Mehak, 2012).

En conclusion, nous pouvons dire que, bien que l'adhésion de *B. cereus* soit favorisée par le lait, parmi ses constituants les caséines et le lactose semblent être les paramètres les plus significatifs de l'adhésion à l'acier inoxydable conditionné, chez les souches étudiées. Néanmoins, l'adhésion des bactéries aux surfaces est un processus multifactoriel dont la compréhension nécessite la prise en considération de tous les facteurs ensemble. En effet, si

l'on prend en considération l'hydrophobicité de surface des spores, il est intéressant de remarquer l'existence d'une corrélation positive et négative significative entre cette propriété et l'adhésion des spores à l'inox conditionné de solutions de caséine et de lactose respectivement. Ceci signifie que les spores hydrophobes sont attirées par la caséine alors que les spores hydrophiles le sont par le lactose. Cette variabilité dans l'adhésion en présence de lactose et de caséine, apparemment liée à l'hydrophobicité, peut-être expliquée par des différences dans la composition chimique de la surface des spores. Le caractère hydrophobe est lié à la concentration en azote, en protéine et en carbone sous la forme d'hydrocarbure alors qu'une surface hydrophile est associée à une concentration élevée en oxygène et la présence de polysaccharides (Hamadi et al., 2012). Sachant que les protéines sont les composants majeurs de la surface des spores de *B. cereus* telles que montrées chez des souches hydrophobes et hautement hydrophobes (Failles et al., 2010 a), il serait justifié de penser que chez les souches laitières de *B. cereus* qui sont hydrophiles, les polysaccharides seraient les composants majeurs de surface de leurs spores. Les molécules de surface des cellules interagissent avec les composants du substratum qui appartiennent à la même espèce chimique. Les sites hydrophobes libres à la surface des bactéries permettent des interactions avec les sites hydrophobes du substratum et vice versa (Doyle 2000).

Les propriétés acide-base de Lewis des spores semblent confirmer ces résultats et appuyer la thèse selon laquelle la variabilité trouvée dans l'hydrophobicité des spores et leur adhésion à l'inox reflète des différences dans la composition de leurs structures de surface. En effet, l'étude des caractéristiques de surface des spores de *B. cereus* selon la méthode MATS, (Belon-Fontaine et al., 1996) a permis de montrer une certaine variabilité entre des souches génétiquement proches, dans les caractères hydrophobe/ hydrophiles et acide-base de Lewis. La forte proportion des souches hydrophiles n'est pas conforme aux données de la littérature, sachant que, dans ce groupe de bactéries, les spores sont généralement reconnues comme étant hydrophobes ou hautement hydrophobes (Faille et al., 2010 a ; Ankelokar and Labbé, 2010 ; Simmonds et al., 2003 ; Tauveron et al., 2006). Outre le caractère hydrophile majoritaire, l'hydrophobicité des autres spores est très modérée (< 50%) dans l'ensemble. A notre connaissance, les spores hydrophiles dans le groupe *B. cereus* ont été rarement décrites. Auger et al., (2009) ont trouvé des spores hydrophiles chez des souches émétiques de *B. cereus* alors que les souches diarrhéiques étaient majoritairement hydrophobes. Des spores hydrophiles sont été décrites chez d'autres espèces du genre *Bacillus* telles que *B. subtilis* (Faille et al., 2002), ainsi que chez des bacilles thermophiles isolés de la poudre de lait (Seale et al., 2008).

Au sein du groupe *B. cereus* la variabilité entre des souches dans les propriétés de surface, notamment l'hydrophobicité a déjà été rapportée (Tauveron et al., 2006). D'après ces auteurs, cette variabilité qui portait principalement sur le nombre et la longueur des appendices, était souche-dépendante et non liée à la niche écologique. L'importance des appendices dans la distinction phylogénétique et taxonomique des souches de *B. cereus* est soulignée (Driks, 2007). D'après Zolock et al., (2006), la morphologie de la surface des spores ne permet pas de distinguer uniquement entre les espèces du groupe *B. cereus* mais également entre souches étroitement apparentées au sein de la même espèce. Toutefois, l'hydrophobicité des souches peut également être influencée par des facteurs environnementaux et refléter une adaptation exceptionnelle à des environnements spécifiques. Ceci pourrait être le cas des souches isolées dans la présente étude. En effet, les résultats obtenus montrent que la variabilité enregistrée chez des souches génétiquement proches isolées du biofilm, et la dominance nette des spores hydrophiles, peuvent traduire au moins partiellement une adaptation à la niche écologique, ainsi qu'au mode de vie sessile. En effet, il a été récemment montré que des changements dans les propriétés de surface des cellules bactériennes, notamment une diminution dans l'hydrophobicité et la charge de surface surviennent durant la formation de biofilm (Mukherjee et al., 2012). En outre il a été antérieurement suggéré (Faille et al., 2002) et confirmé récemment (Beloin et al., 2008 ; Karunakaran and Biggs, 2011), que les caractéristiques de surface des cellules planctoniques ne sont pas les mêmes que celles des cellules organisées en biofilm.

D'autre part, le caractère hydrophile des isolats laitiers de *B. cereus* pourrait également être lié à une adaptation à des conditions de pH alcalin. Des travaux, ont en effet montré que l'hydrophobicité augmentait à pH acide (Moorman et al., 2008 ; Seale et al., 2008), alors qu'elle diminuait à pH alcalin (Lindsay et al., 2002, Giotis et al., 2009). Une diminution de l'hydrophobicité a été observée chez les spores d'une souche de *B. cereus* alcali-tolérante (Bernardes et al., 2010). Ces données sont confirmées par les résultats obtenus par Hamadi et al., (2005) qui ont trouvé que le caractère hydrophile de souches de *S. aureus* et *E. coli* est plus apparent pour des pH neutre à alcalin (>5 à 11) alors que l'hydrophobicité est plus apparente à pH acide (2 à 3). Dans nos résultats, l'hydrophilicité associée à une hydrophobicité très modérée est un argument en faveur de l'adaptation à des conditions de pH alcalin. Un autre argument en faveur de cette adaptation est les propriétés acide-base exhibées par les spores. Le caractère faiblement donneur d'électron/accepteur d'électrons des spores des isolats laitiers de *B. cereus* n'est pas conforme aux données de la littérature. Un caractère fortement donneur d'électrons a été trouvé chez des souches hydrophobes de *B. cereus*

(Klavenes, 2003) et des souches hydrophiles d'*E. coli* (Hamadi et al., 2012). Faille et al., (2002) ont trouvé que l'affinité d'une souche *B. cereus* pour les 4 solvants de la MATS était très élevée > 80%, exprimant un caractère fortement hydrophobe, et fortement donneur d'électron. D'après ces auteurs, une affinité élevée pour ces 4 solvants indique une nature hydrophobe, et inversement une affinité faible (< 20%) indique un caractère hydrophile marquée. La co-existence des caractères acide-base dans une même souche a été trouvé chez une souche de *B. subtilis* très hydrophile (Faille et al. 2002). Alors que sous certaines conditions de culture (milieu de culture et force ionique), des souches d'*E. coli* et *P. aeruginosa* n'ont exprimé aucun caractère donneur ou accepteur d'électron (Hamadi et al., (2008).

Généralement à pH neutre la surface cellulaire microbienne est fortement donneuse d'électrons et faiblement accepteuse d'électron (Bellon-Fontaine et al., 1996), Le caractère donneur d'électron étant attribué à la présence de groupement carboxyl (COO⁻) à la surface des cellules ainsi qu'à la présence de groupements phosphates et NH₂ (Hamadi et al., (2012). Des concentrations élevées en polysaccharide, plus exactement le ratio C/N (polysaccharides / protéines), semblent être responsables du caractère hautement accepteur d'électron (acide), (Hamadi et al., 2012). La surface des spores de *B. cereus* est essentiellement formée de glycoprotéines et dans une moindre mesure de sucres (Faille et al, 2010 a). D'une part, le caractère donneur d'électron et accepteur d'électron faible exprimé par les spores hydrophiles et d'autre part l'absence de tout caractère donneur d'électron ou accepteur d'électron chez les spores hydrophobes semblent suggérer une composition particulière de la paroi de ces spores, caractérisé par des variations dans les ratios C/N. Et bien que les spores hydrophiles et les spores hydrophobes, puissent présenter des altérations dans leurs structures pariétales sous l'influence du stress acido-alcalin, leur potentiel d'adhésion à l'inox n'est toutefois pas affecté. Il a été montré, en effet (Lequette et al., (2011) que l'absence d'une glycoprotéine de l'exosporium (BcIA) fait augmenter l'hydrophobicité des spores entières démontrant ainsi que le caractère hydrophobe des souches peut refléter une altération dans les structures de surface des spores. De même d'après Parkar et al., (2001), la viabilité des spores ou des cellules végétatives n'affecte pas leur adhésion à l'acier inoxydable. Par ailleurs, l'expression des propriétés acide-base chez une même souche bactérienne induit selon Faille et al., (2002) une grande affinité pour l'eau, ce qui pourrait augmenter l'adhésion de *B. cereus* à l'inox des surfaces industrielles caractérisées par une humidité importante. De ce point de vue, les propriétés physico-chimiques de surface des spores des isolats laitiers ont probablement

contribué à leur persistance sur les équipements laitiers via la création d'une adhésion solide avec l'acier inoxydable.

L'importance des interactions acide-base de Lewis dans les phénomènes d'adhésion aux surfaces inertes est largement reconnue (Bellon-Fontaine et al., 1996 ; Carpentier et Cerf, 1993 ; Chen et al., 2011, Van Oss, 1993). Ces interactions sont jugées de loin les plus puissantes comparées aux forces de Van der Waals ou aux interactions électrostatiques (Van Oss, 2003). La relation entre le caractère hydrophobe des bactéries et leur capacité d'adhésion est encore à ce jour le centre d'une controverse assez complexe. Dans le cas de *B. cereus*, La capacité des spores d'adhérer fermement aux surfaces des équipement dans les entreprises de transformation des aliments est bien établie et attribuée à leur hydrophobicité élevée (Faille et al., 2010 ; Peng et al., 2001 ; Shaheen et al., 2009 ; Simmonds et al., 2003). La ré-adhésion des spores de *B. cereus* a été démontrée durant l'application même du système CIP (Le Gentil et al, 2010). Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que les spores de *B. cereus* hydrophiles ont les mêmes capacités d'adhésion que des spores hydrophobes. Ceci ne constitue pas une contradiction en soit faute des données sur l'adhésion des spores hydrophiles au sein du groupe *B. cereus*.

D'après ces premiers résultats, l'adhésion de *B. cereus* à l'acier inoxydable apparait comme un phénomène complexe essentiellement souche dépendant même si l'influence des facteurs environnementaux n'est pas à exclure. Toutefois la contribution de l'environnement dans les interactions bactérie-substratum, notamment les propriétés de surface de l'inox conditionné, ne pourra être estimée à sa juste valeur qu'après la caractérisation rigoureuse des propriétés de surface de ces isolats bactériens « spécial-laiteries ». Ceci est possible via l'identification des structures chimiques et morphologiques telles que façonnées par la niche écologique représentée par les cycles thermiques ainsi que par les cycles chimiques du nettoyage acido-alcalin appliqués dans ces laiteries. En d'autres termes, cette caractérisation permettra en outre de répondre de façon définitive à la question de savoir si le caractère hydrophile des spores est souche dépendant ou est plutôt le reflet d'une adaptation aussi bien au mode de vie sessile qu'aux procédures du nettoyage acido-alcalin.

CHAPITRE 6 : CARACTERISATION DU BIOFILM DE *B. cereus*

La caractérisation des biofilms formés à la surface des équipements dans les ateliers de transformation des aliments est un préalable à leur élimination. L'élaboration de stratégies efficaces de lutte contre le biofilms nécessite la connaissance des facteurs et conditions qui favorisent leur formation. Dans le cadre de cette étude il a été montré que la flore bactérienne qui persiste sur les canalisations de lait est quantitativement importante. D'autre part, dans le modèle statique d'adhésion des spores de *B. cereus* à l'acier inoxydable, certains nutriments sont des facteurs d'influence non négligeables. En prenant en considération les conditions statiques d'adhésion et de développement du biofilm, les facteurs environnementaux retenus, dans cette étude, sont le milieu de culture, la taille de l'inoculum et l'âge du biofilm. Les biofilms matures formés dans ces conditions seront caractérisés sur les plans du décompte de leurs bactéries constitutives, de leur structure microscopique et de leur comportement vis-à-vis des désinfectants classiques d'usage courant en industrie laitière. Sachant que la plupart des laiteries locales réalisent un simple nettoyage des installations sans désinfection, l'aptitude des biofilms à ré-adhérer après un nettoyage acido-alcalin est évaluée par une technique simple.

1. Matériel et méthodes

1. 1. Formation de biofilms

Des suspensions sporales des 23 souches préalablement caractérisées (chapitre 3) sont préparées selon la technique de Simmonds et al., (2003). Les cultures de 4 à 5 jours sur gélose LB subissent trois centrifugations successives à 2000 g pendant 20 min, le surnageant étant à chaque fois jeté et remplacé par le même volume d'EDS stérile. Après traitement thermique les suspensions sporales sont conservées à 4°C jusqu'à leur emploi.

1.1.1. Développement des biofilm sur les lames en inox.

Les biofilms sont formés sur les lames en acier inoxydable par la technique d'inoculation décrite précédemment (Maris et al., 1992 et Sommers et al., 1999) pour le dénombrement sur plaque, et par technique d'immersion selon les travaux de Faille et al., (2002) et Peng et al., (2002), pour la microscopie électronique.

Les suspensions sporales sont diluées dans de l'eau distillée stérile et ajustées à 10^7 - 10^8 ufc/ml. L'adhésion doit se faire préalablement à la formation de biofilm, et est réalisée selon le protocole décrit précédemment (chap.3). Après 3 heures d'adhésion, les lames sont rincées afin d'éliminer les cellules faiblement attachées, et le même volume que l'inoculum (100 μ l) de milieu de culture (le bouillon LB ou le lait écrémé à 10%) est versé sur les spores adhérents. Les lames ainsi inoculées, sont placées dans des boîtes de pétri et incubées à 30°C en atmosphère saturée en humidité. Après 24 h d'incubation elles sont retirées et rincées à l'EDS stérile pour l'élimination des cellules faiblement attachées. Selon l'usage qui en sera fait, les lames sont soit préparées au dénombrement des bactéries du biofilm de 24 h, soit de nouveau réincubées pour la formation d'un biofilm plus âgé, après avoir renouvelé le milieu de culture. En effet, le renouvellement du milieu de culture se fait toute les 24 h par ajout de 100 μ l du milieu liquide après rinçage des lames, et ce jusqu'à l'âge désiré. Le dénombrement des bactéries du biofilm formé par cette technique se fait selon le même protocole de dénombrement des cellules adhérentes (chap.3).

Les lames destinées à la microscopie sont immergées dans la suspension sporale contenue dans des tubes à essai pour l'adhésion, puis dans le milieu de culture liquide (LB ou lait écrémé) pour la formation de biofilm (figure 50). Les milieux sont renouvelés toutes les 48 h. Les mêmes opérations de rinçages précédemment décrites sont pratiquées sur ces lames.



Figure 50 : Adhésion et formation de biofilm par immersion dans des milieux liquides.

1.1.2. Développement de biofilms dans des microplaques en polystyrène.

La technique de culture des biofilms dans les microplaques de titration, utilisée est celle décrite par Auger et al., (2006). Des plaques à 96 puits en polystyrènes sont remplies de 100 μ l de bouillon luria etensemencées avec le même volume de suspensions sporale dont les densités optiques sont ajustées à 0.8 à 595 nm. Les plaques sont incubées 24 h à 30°C, puis soumises au traitement suivant : les puits sont vidés, lavés doucement à l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules libres ou faiblement attachées. Les plaques sont ensuite, séchées en position renversée puis colorées avec une solution de cristal violet à 1% pendant 10 mn. A

l'issue de ce délai, le colorant est jeté, et les puits lavés à l'eau distillée stérile et séchés. Les biofilms colorés sont solubilisés par un mélange d'acide acétique glacial (50 ml), méthanol (200 ml) et d'eau distillée (250 ml). Les plaques sont introduites dans un spectrophotomètre muni d'un lecteur de plaque et les DO mesurées à 595 nm (figure 51).

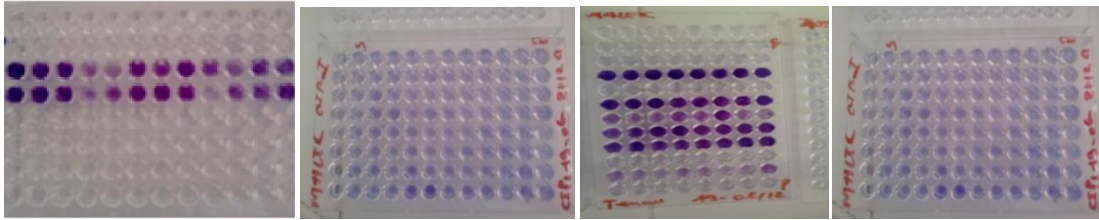


Figure 51 : Formation de biofilm dans les microplques de titration à 96 puits.

1.1.3. Caractérisation microscopique des biofilms

Des biofilms de 24 h préparés sur les lames en inox dans le milieu LB ou le lait écrémé sont rincés, séchés 24 à 48 h dans des boites de pétri et observé au microscope électronique à balayage, Hitachi 100 TM, sans aucun traitement. Des photographies sont prises également sans traitement d'image.

1.2. Traitements d'élimination du biofilm.

1.2.1. Désinfection de biofilms formés sur l'acier inoxydable

Les traitements de désinfections des biofilms de *B. cereus* sont réalisés selon la technique de Sommers et al., (1999). Des biofilms de 48 h de la souche BC1, cultivés dans le milieu LB sur les lames en inox, à différentes densités d'inoculum (10^3 , 10^5 et 10^8 ufc/ml des suspensions sporales, sont soumis à l'action de différents agents de désinfection couramment utilisés dans les I.A.A, pour la désinfection des surfaces) : l'ASEP 150, et l'OXY-ANIOS 5TC sont des produits à base de d'acide peracétique et peroxyde d'hydrogène, avec des pH respectifs de 2.6 et 1, L'EAS est un produit alcalin (pH 9), ainsi que l'hypochlorite de Na et un produit à base d'ammonium quaternaire (AQ) (Divosan® QC Johnson Diversey F). Ces désinfectants préparés par dilution dans l'eau distillée, sont utilisés dans les conditions maximales en termes de concentration, température et temps de contact, telles que recommandés par les fournisseurs pour chacun d'eux (tableau 15). Les réactions de désinfection sont stoppées par les solutions de neutralisation suivantes :

- Un tampon phosphate pH 7.4 additionné de tween 80 à 3% pour les désinfectants acides et l'ammonium quaternaire
- une solution de thiosulfate de Na 0.1 N pour l'hypochlorite de Na.

Tableau 15 : les désinfectants et les conditions d'utilisation

	ASEP	EAS	OXY	AQ	NaOCl
Concentration (%)	0.2	0.5	1.5	1	2.5
Température (°C)	60	70	60	30	30
Temps (min)	60	60	20	20	20

Les lames recouvertes des biofilms de 48 h sont rincées puis immergées dans la solution désinfectante pendant le temps requis pour chaque produit. La désinfection est stoppée par immersion des lames dans les solutions de neutralisation pendant un temps égal à celui de la désinfection. Les cellules survivantes du biofilm sont récupérées par écouvillonnage et dénombrées sur Luria agar (N). Des lames témoins, sans désinfectants sont préparées dans les mêmes conditions, et dénombrées (N_0). Les résultats sont exprimés $\log \text{ufc/cm}^2$ et comparés au témoin. Les réductions décimales ($-\log N/\log N_0$) sont également calculées.

1.2.2. Effet du nettoyage sur la désinfection des biofilms

Des biofilms de 48 h de la souche BC1, à 10^8 ufc/ml d'inoculum, sont soumis à un nettoyage acido-basique simulant celui du CIP industriel (cleaning-in-place). Celui-ci consiste en un lavage acido-alkalin à chaud. Les lames recouvertes du biofilm sont d'abord immergées dans une solution de NaOH à 2% pendant 10 min à 80°C, puis dans le tampon de neutralisation (tampon phosphate de Sørensen 0.2 M pH 7.4) et rincés à l'eau distillée stérile. Pour le lavage acide les lames sont plongées dans une solution de HNO₃ à 1% pendant 10 min à 70°C, puis dans le tampon de neutralisation. Un dernier rinçage à l'EDS termine ce nettoyage. Pour la désinfection, les lames sont traitées par les différentes solutions de désinfectants selon le même protocole (voir 5.1.2.1)

1.2.3. Effet du nettoyage sur la ré-adhésion des biofilms

Des biofilms de 48 h de la souche BC1 cultivés dans le bouillon LB dans les microplaques de titration, sont soumis au nettoyage acido-basique simulant le CIP industriel. La réponse des biofilms à ce stress acido-alkalin est étudiée selon le principe, de la méthode du Calgary biofilm device (CBD), décrite par Ceri et al., (1999). La culture du biofilm se fait dans les microplaques de titration à 96 puits à la place du dispositif pour les biofilms de

Calgary (CBD). Les biofilms ainsi formés sont soumis alternativement à l'action des solutions basique (NaOH à 2%) et acide (HNO₃ à 1%) préchauffées à 80 et 70°C respectivement. Les biofilms sont d'abord traités par la base (200 µl) pendant 10 min puis neutralisées avec du tampon phosphate de Sørensen 0.2 M pH 7.4 et rincés à l'eau distillée stérile. Les puits sont ensuite remplis par 200 µl de la solution acide. Après un temps d'exposition de 10 min, ils sont vidés, neutralisés puis rincés à l'EDS. Les puits sont de nouveau remplis avec du bouillon LB et soumis à un traitement aux ultrasons pendant 3 min pour le détachement du biofilm. Les suspensions de biofilm ainsi obtenues sont transvasées dans de nouvelles microplaques à 96 puits (plaques II). Les microplaques initiales (plaques I) dont le biofilm a été détaché sont remplies de bouillon LB (200 µl). Les deux types de plaques sont incubés à 30 °C pendant 72 h, puis colorées au cristal violet et préparées pour la lecture au spectrophotomètre. La somme des DO mesurées dans les plaques I et II permettront d'évaluer la tolérance du biofilm au traitement acido-basique.

2. Résultats

2.1. Le potentiel de formation du biofilm chez *B.cereus*

Comme montré par la figure 52, les populations des biofilms de 24 h formés sur lames en acier inoxydable à 10⁸ ufc/ ml d'inoculum, par les 23 souches de *B. cereus* varient de 5.45 à 8.41 log ufc/ cm². Ces densités microbiennes révèlent des aptitudes importantes à former le biofilm chez les souches testées. L'analyse de la variance a permis de définir 3 groupes statistiquement différents. Le premier groupe comprend cinq souches (BC7, BC2, BC6, BC22 et BC1) dont le nombre de cellules en biofilm n'est pas moins que 10⁸ ufc/ cm². Parmi ces souches, les souches BC1, BC2 et BC6 sont caractérisées par des capacités d'adhésion à l'acier inoxydable relativement importantes. Le groupe 2 contient 11 souches dont les densités cellulaires en biofilm varient de 6.82 à 7, 64 log ufc/cm². Dans ce groupe figurent les souches BC3 et BC5, dont les spores adhèrent en grand nombre à l'inox. Le groupe trois comprend 7 souches dont les populations en biofilms varient de 5.49 à 6.22 log ufc/cm². Ces taux bactériens sont élevés et l'ensemble des souches des trois groupes peuvent être considérées comme fortement productrices de biofilms. Ces niveaux de formation de biofilms peuvent être appréciés comme bon (+ : groupe 3) fortement (++ : groupe 2) et très fortement (+++ : groupe 1) producteur de biofilm.

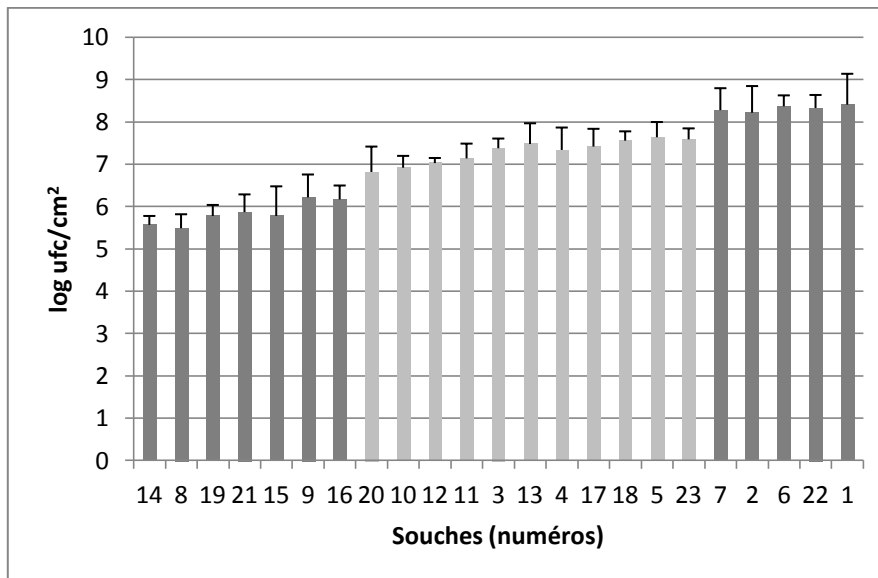


Figure 52 : Formation de biofilms sur l'acier inoxydable après 24 h de culture à 30°C dans le milieu LB. Les barres gris foncées représentent les groupes statistiquement différents.

Les populations des biofilms de 24 h formés dans les microplaques de titration (figure 53) montrent des variations plus importantes que celles obtenues dans les biofilms formés sur l'acier inoxydable. Les valeurs des densités optiques enregistrées varient de 0.6 à 1.86. Si on fixe à 0.6 la valeur de densité optique seuil pour le classement dans la catégories des grands producteurs de biofilm, valeur supérieure à celle citée dans la littérature (0.5) pour les bactéries du groupe *B. cereus* (Auger et al., 2009), les 23 souches testées peuvent être caractérisées comme telles. Les souches BC7, BC2, BC6, BC22 et BC1, montrent les densités des biofilms les plus élevées, celles-ci varient de 1.71 à 1.86. Le même classement a été obtenu pour les biofilms formés sur l'acier inoxydable pour ces souches. Un deuxième groupe contient les souches dont les DO sont également élevées (1.47 à 1.56). Le groupe 3 est caractérisé par des DO de l'ordre de 1.23 à 1.37. Dans les groupes 4 et 5 les DO varient de 0.9 à 1 et de 0.6 à 0.8 respectivement. Mises à part les souches les plus fortement productrices de biofilm ($DO > 1.7$) classées dans des groupes similaires par les deux techniques, la technique des microplaques de titration révèle une plus grande variabilité chez les autres souches. Les souches des groupes 1 et 2 sont caractérisées par le potentiel de formation de biofilm les plus élevés, celles des groupes 3 et 4 montrent des capacités modérées. Le dernier groupe renferme les souches dont le potentiel de formation du biofilm est le plus faible. Toutefois l'évolution globale du développement des biofilms de la collection est identique même si les valeurs de DO sont relativement inférieures à celles du décompte bactérien.

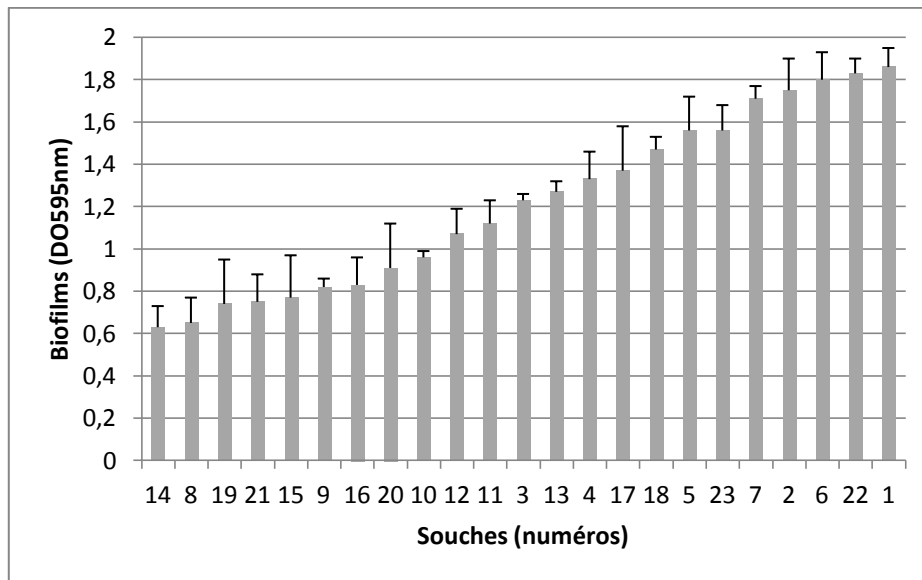


Figure 53 : Formation de biofilms dans des microplaques de titration en polystyrène après 24 h de culture à 30°C dans le milieu LB.

2.2. Evolution de la population du biofilm en fonction de l'âge et la taille de l'inoculum

Les populations des biofilms formés sur l'acier inoxydable à un taux d'inoculum de 10^7 ufc/ml et à différents temps d'incubation montrent des évolutions différentes en fonction des souches. D'après les résultats obtenus, trois modèles représentés par les souches BC1, BC2 et BC6 (figure 54) sont identifiés chez l'ensemble des souches testées. Dans les trois modèles, les biofilms sont développés au bout de 6 h d'incubation à 30°C. Les densités cellulaires au sein de ces biofilms sont maintenues à des niveaux élevés durant les six jours qui suivent. Toutefois les densités cellulaires maximales ainsi que l'état stationnaire diffèrent entre les souches. La population du biofilm formé par la souche BC1 atteint rapidement, après 2 jours, le taux maximal de 10^7 ufc/cm². L'état stationnaire se maintient pendant 2 jours environ, puis le nombre de bactérie du biofilm diminue jusqu'à 10^6 ufc/cm², le sixième jour. Chez la souche BC2 la croissance du biofilm est linéaire et atteint l'état stationnaire le 4ème jour, et reste constante jusqu'au 6ème jour. La population du biofilm de la souche BC6 croît à un taux ralenti, le nombre maximal $6.7 \log$ ufc/cm² est atteint au bout de six jours d'incubation. D'après ces résultats on remarque que les densités cellulaires dans les biofilms qui résultent d'un inoculum élevé (10^7 ufc/ml) sont également importantes.

Les variations des populations du biofilm en fonction de la taille de l'inoculum sont montrées par la figure 55. Les densités cellulaires maximales sont proportionnelles à la taille de l'inoculum. Elles sont élevées quand l'inoculum est élevé et inversement. Le nombre de bactéries le plus élevé ($> 10^7$ ufc/cm²) est obtenu pour la même densité de l'inoculum. Cette

valeur est atteinte au bout de 2 jours, qui constituent le délai d'incubation le plus court. Malgré la diminution que connaît ce nombre par la suite, il reste quand même élevé (10^6 ufc/cm²) jusqu'au 6^{ème} jour. A un taux modérée d'inoculation (10^5 ufc/ml), la population du biofilm connaît un accroissement plus lent, la densité maximale est atteinte plus tardivement (après 4 jours), mais peut-être élevée (10^6 ufc/cm²) et se maintient pendant quelques jours encore. Les bactéries du biofilm sont maintenues à un niveau le plus bas (10^4 ufc/cm²), dans ces conditions expérimentales, si l'inoculum est faible (10^3 ufc/ml). D'autant plus que cette valeur maximale n'est obtenue qu'après six jours de la croissance du biofilm. En effet jusqu'au 4^{ème} jour, la population du biofilm n'excède pas les 10^3 ufc/cm². D'après ces résultats la relation entre la taille de l'inoculum et la population du biofilm est évidente.

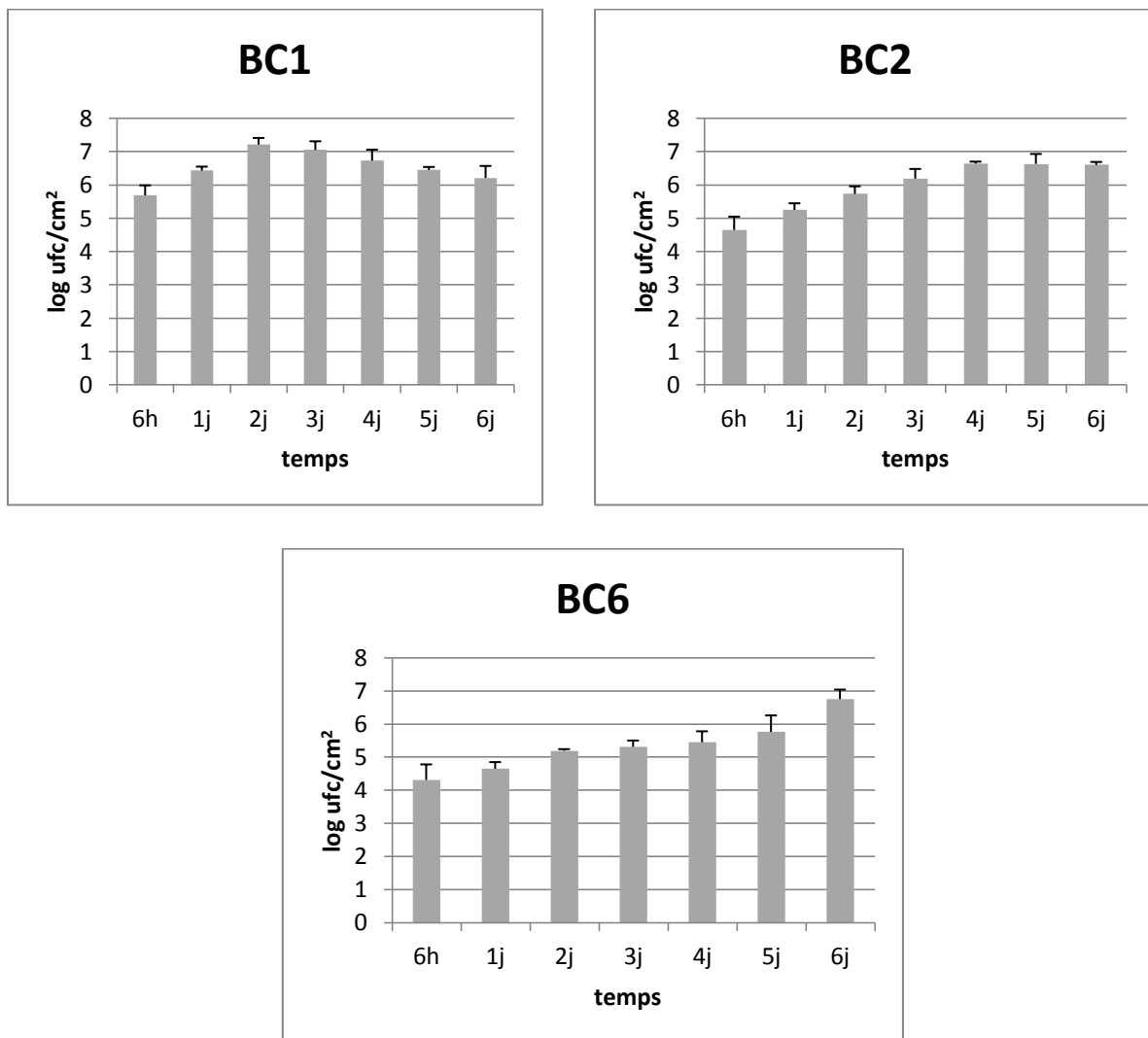


Figure 54 : Evolution de la population du biofilm des souches BC1 (A), BC 2 (B) et BC3 (C) en fonction du temps d'incubation dans le milieu LB

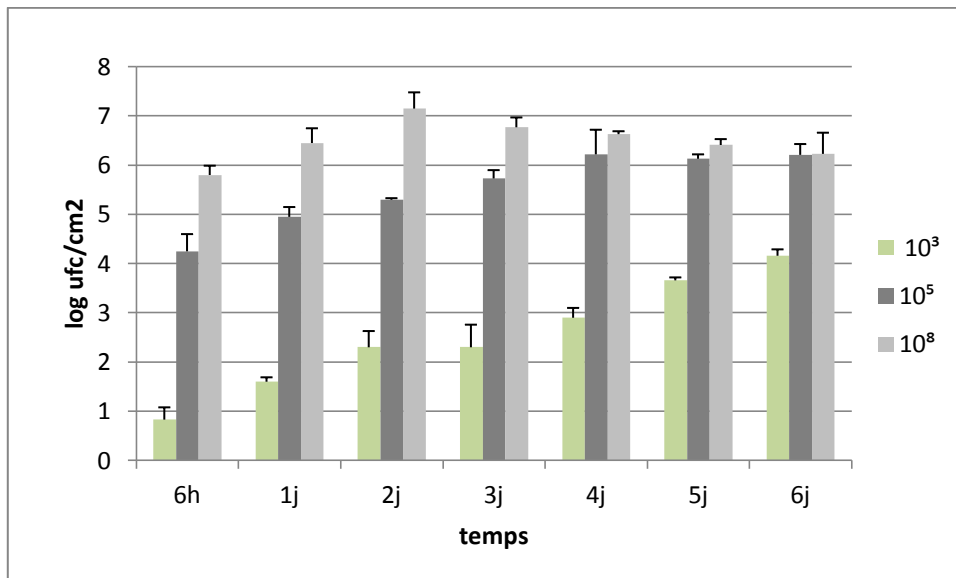


Figure 55 : Evolution de la population du biofilm de la souche BC1 en fonction de la taille de l'inoculum et du temps d'incubation

2.3. La morphologie et la structure du biofilm

Les lames en acier inoxydable utilisées pour la formation de biofilm ont une topographie variable telle que montrée par les photos obtenues en microscopie à balayage. Au début l'inox avait un aspect assez homogène, sans imperfections visibles (figure 56 a). Ces lames ont été utilisées et ré-utilisées de nombreuses fois et à chaque fois nettoyées aux mélanges alcool-acétone et acido-basique à chaud. L'usage et le nettoyage chimique ont provoqué des altérations de l'acier inoxydable (figure 56 b, c et d), caractérisées par l'apparition de fissures, sillons, anfractuosités et creux de largeur et de profondeur variable à la surface du matériau. Ces défauts de la surface de l'acier inoxydable constituent des abris où les bactéries sont protégées contre les agressions extérieures et peuvent croître en formant des biofilms.

Le film de conditionnement masque la surface de l'inox et modifie ses caractéristiques topographiques ainsi que ses propriétés physico-chimiques de surface. La figure 57 montre la surface d'une lame en inox entièrement recouverte par le lait ayant servi à la culture du biofilm formé sur cette lame. Le lait recombinaé utilisé pour la culture du biofilm a formé un film de conditionnement qui a entièrement recouvert la surface de la lame en inox.

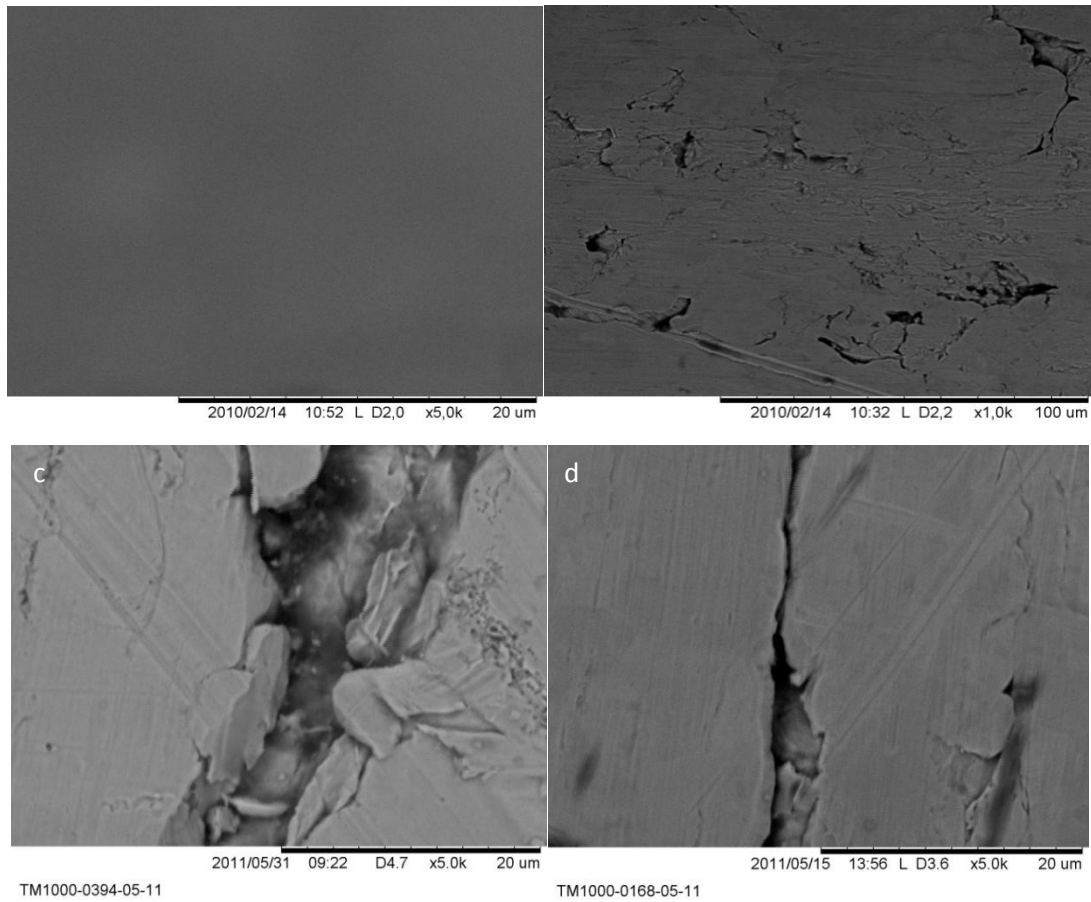


Figure 56 : Micrographes électroniques montrant la microstructure de l'acier inoxydable neuf (a) ou après l'usage (b, c,et d)

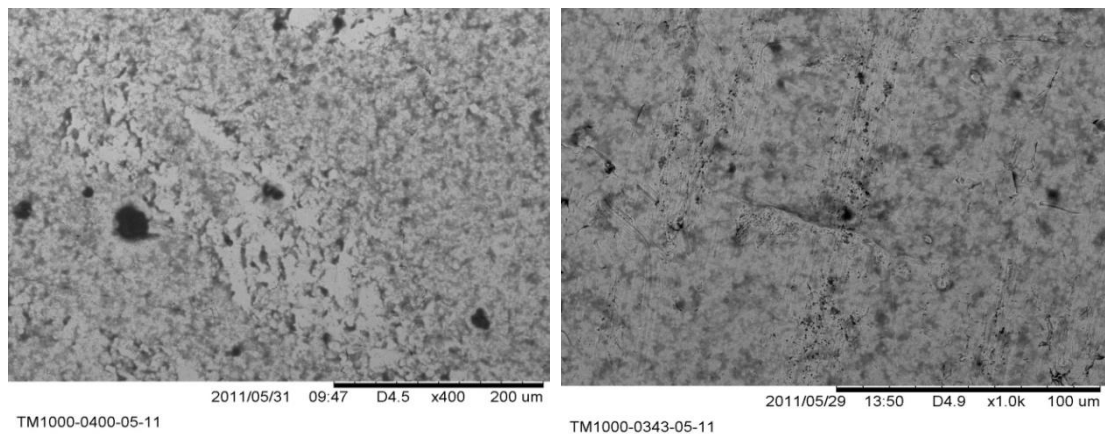


Figure 57: Micrographes électroniques montrant l'acier inoxydable recouvert de lait, les tâches noires correspondent à des fragments de biofilms.

Les figures (58 et 59) montrent des biofilms formés par les souches de *B. cereus* en fonction de la composition du milieu de culture (bouillon nutritif ou lait reconstitué) et le temps d'incubation (âge du biofilm). L'aspect morphologique de ces biofilms varie en fonction des souches et des conditions de culture pour la même souche. La figure 58 montre des biofilms de 20 h formés par la souche (BC4) en phase de dispersion. La dispersion du

biofilm se déroule selon deux procédés : soit par formation de cavités se remplissant de bactéries mobiles qui vont se disperser suite à la rupture de ces cavités (photo c), soit par dispersion à partir des zones superficielles du biofilm (photo a et b). La photo a est un agrandissement d'un des biofilms de la photo b.

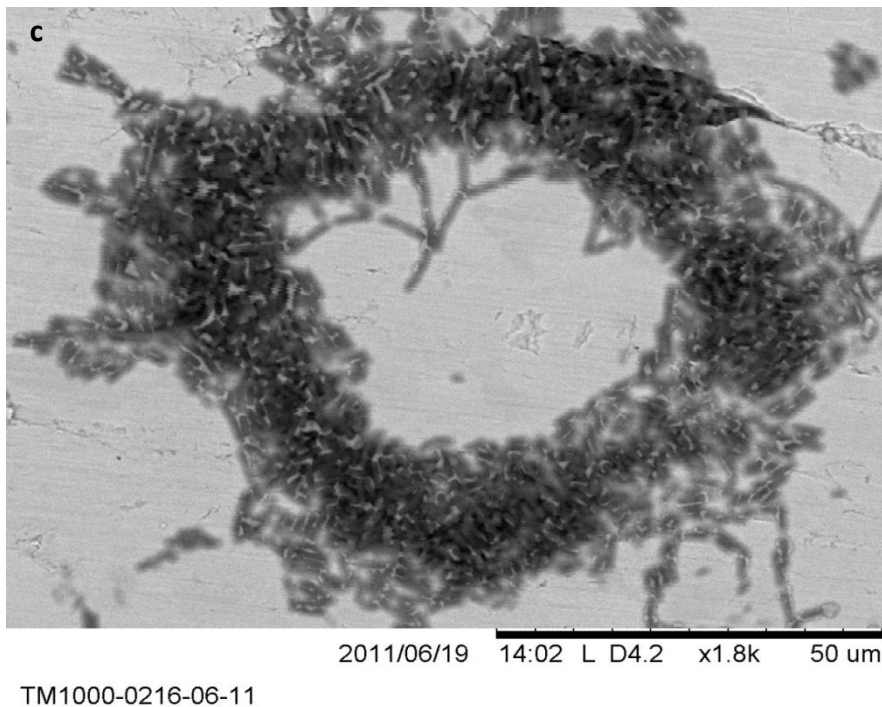
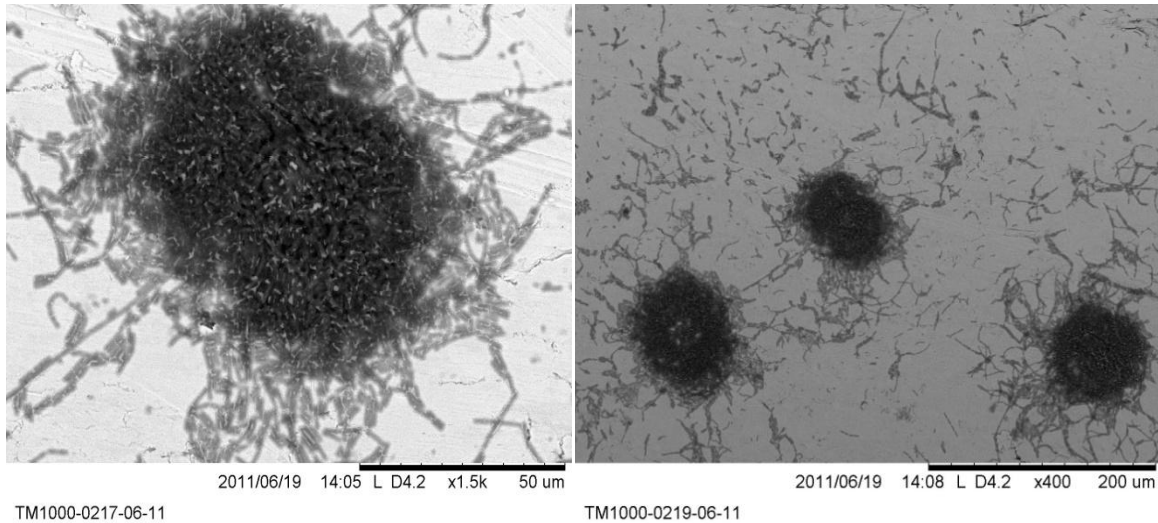


Figure 58 : Micrographes électroniques des biofilms de 20 h formés par la souche BC4 dans le bouillon nutritif. Les cellules en gris (foncé) sont mobiles donc vivantes, les cellules noirs correspondent probablement aux cellules mortes. La matrice en gris clair n'est pas très bien visible.

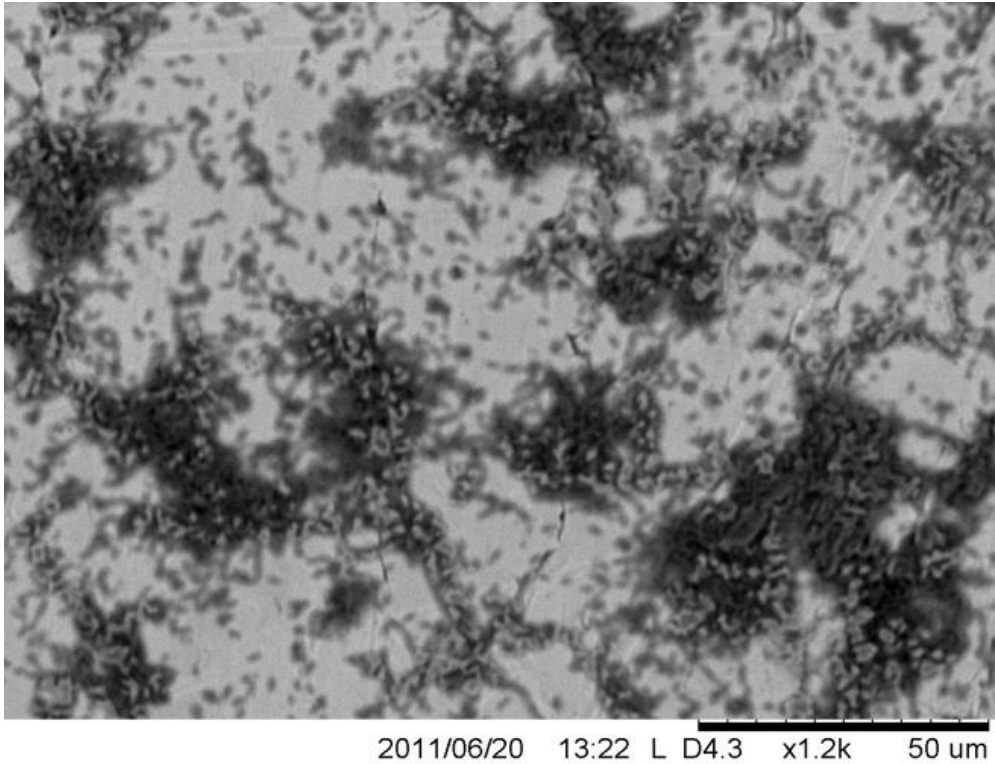
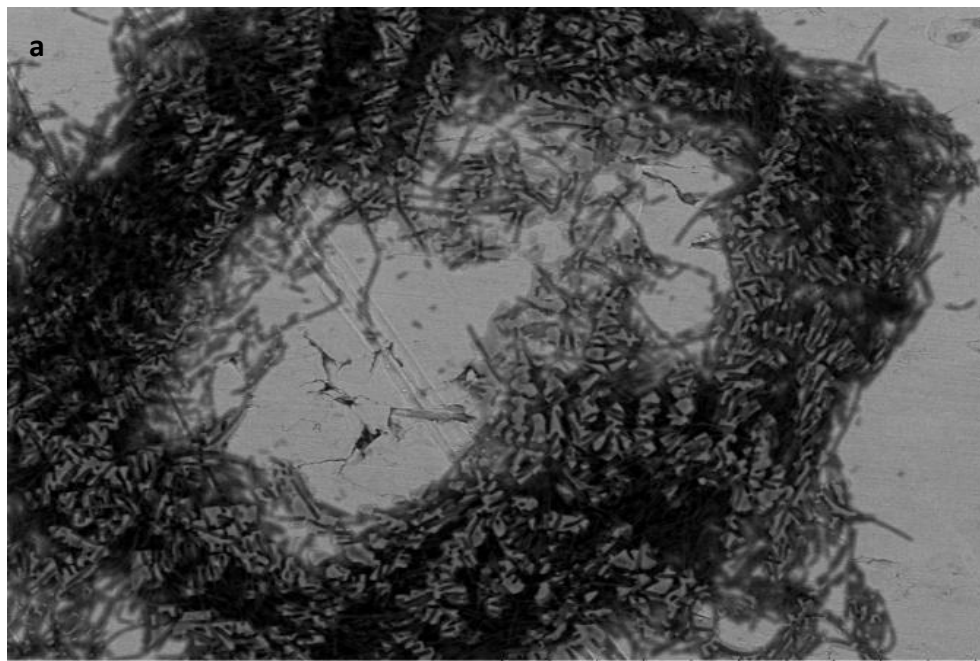
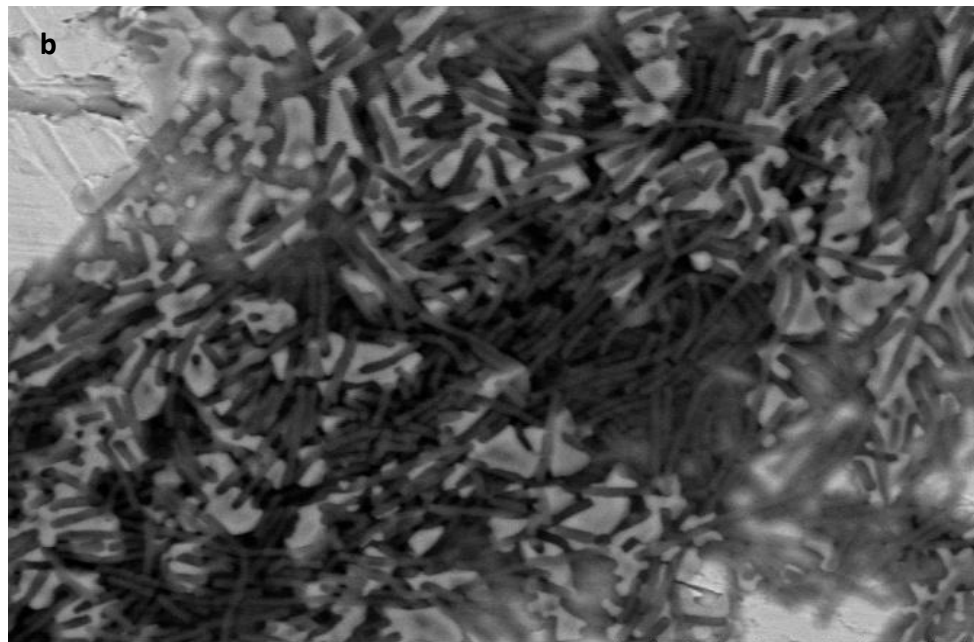


Figure 59 : Micrographes électroniques de biofilms de 20 h formés par la souche BC17 dans le bouillon nutritif. La dispersion ou dissolution des biofilms a provoqué la libération des cellules après rupture des cavités. Les bactéries libres se fixent en d'autres sites sur la surface en inox. La matière organique est réduite, probablement suite à sa dégradation par les cellules en dispersion.

Dans la dispersion par formation de cavité observée chez le biofilm de la souche BC3 (figure 60 a et b), il est possible d'observer la matrice organique bien visible en gris clair, (b) étant un grossissement de (a). L'apparence de la matrice sous cette forme pourrait être due à des déformations, résultant de sa forte hydratation.



TM1000-0203-06-11



TM1000-0204-06-11

Figure 60 : Micrographes électroniques des biofilms de 24 h formés par la souche (BC3) (a et b) dans le bouillon nutritif. Les structures en gris clair représentent la matrice organique qui est également visible.

La structure des biofilms de la souche BC14 est influencée par le milieu de culture. Un biofilm bien développé, de structure compacte et spongiforme est formé dans le bouillon nutritif après 20 h de culture (figure 61). Les trous représentent probablement les pores ou canaux interstitiels du biofilm, dont l'architecture rappelle la forme d'un bouton de rose.

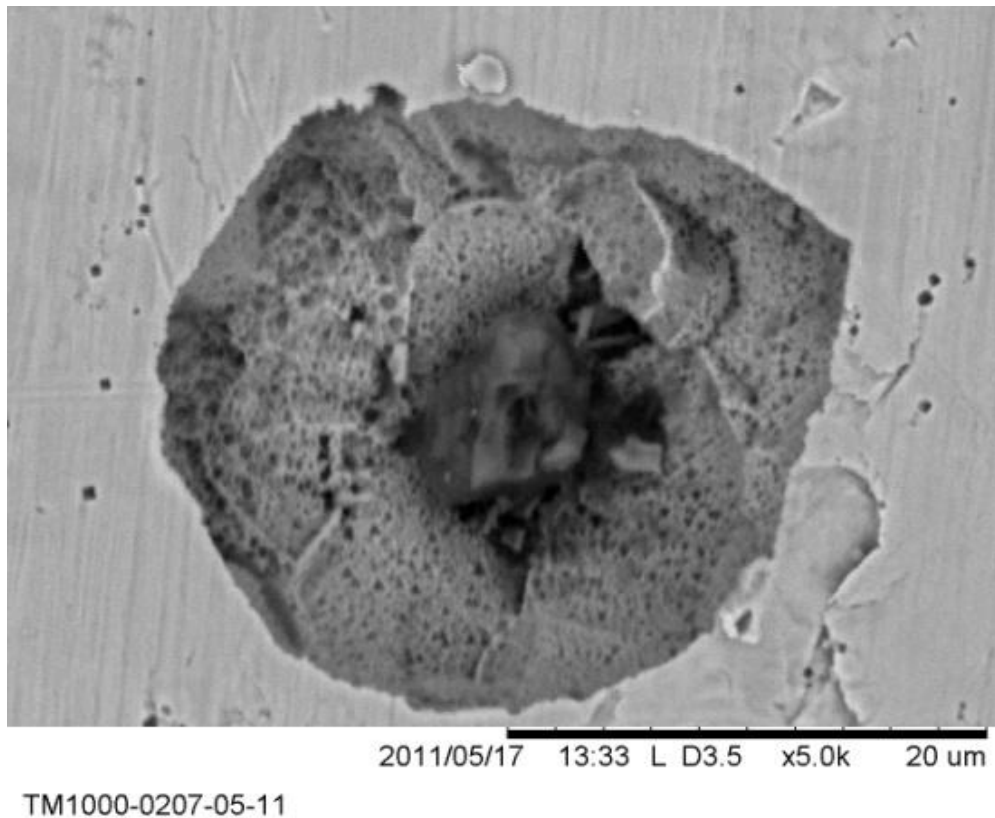


Figure 61 : Micrographie électronique d'un biofilm de 20 h formés par la souche BC14 dans le bouillon nutritif

Par contre le biofilm de 20h formé dans le lait reconstitué dilué au 1/1000 (figure 62 b) n'est pas encore bien développé et semblerait encore aux premiers stades du processus, les cellules sont encore en phase d'adhésion (figure 62 a et b). Les cellules (noires) s'entourent d'une gaine grise suite à la production des substances polymériques extracellulaires (EPS), elles sont encore dans la phase l'adhésion irréversible. Le biofilm formé dans la crevasse (fig.56 c) est dans un stade de développement plus avancé, probablement à cause des conditions plus favorables à la croissance dans cet abri. Bien que formés, sur la même lame, ces biofilms montrent des stades de développement différents montrant que la formation de biofilm sur un support est hétérogène et non continue. Ces biofilm (b, c et d) ont tendance à s'étaler sur le support alors que celui de la photo (a) présente plutôt un développement en hauteur. Contrairement aux biofilms des souches BC4 et BC3, ceux formés par la souche BC14, semblent dominés par la matrice organiques enveloppant les cellules (photos b et c). Le biofilm montré par la photo (c) est nichée dans une crevasse. Ces biofilms montrent des situations de développement dans un milieu riche en nutriments (bouillon nutritif) et pauvre

(lait dilué). Ce qui montre bien que les souches de *B. cereus* forment des biofilms consistants dans des milieux riches.

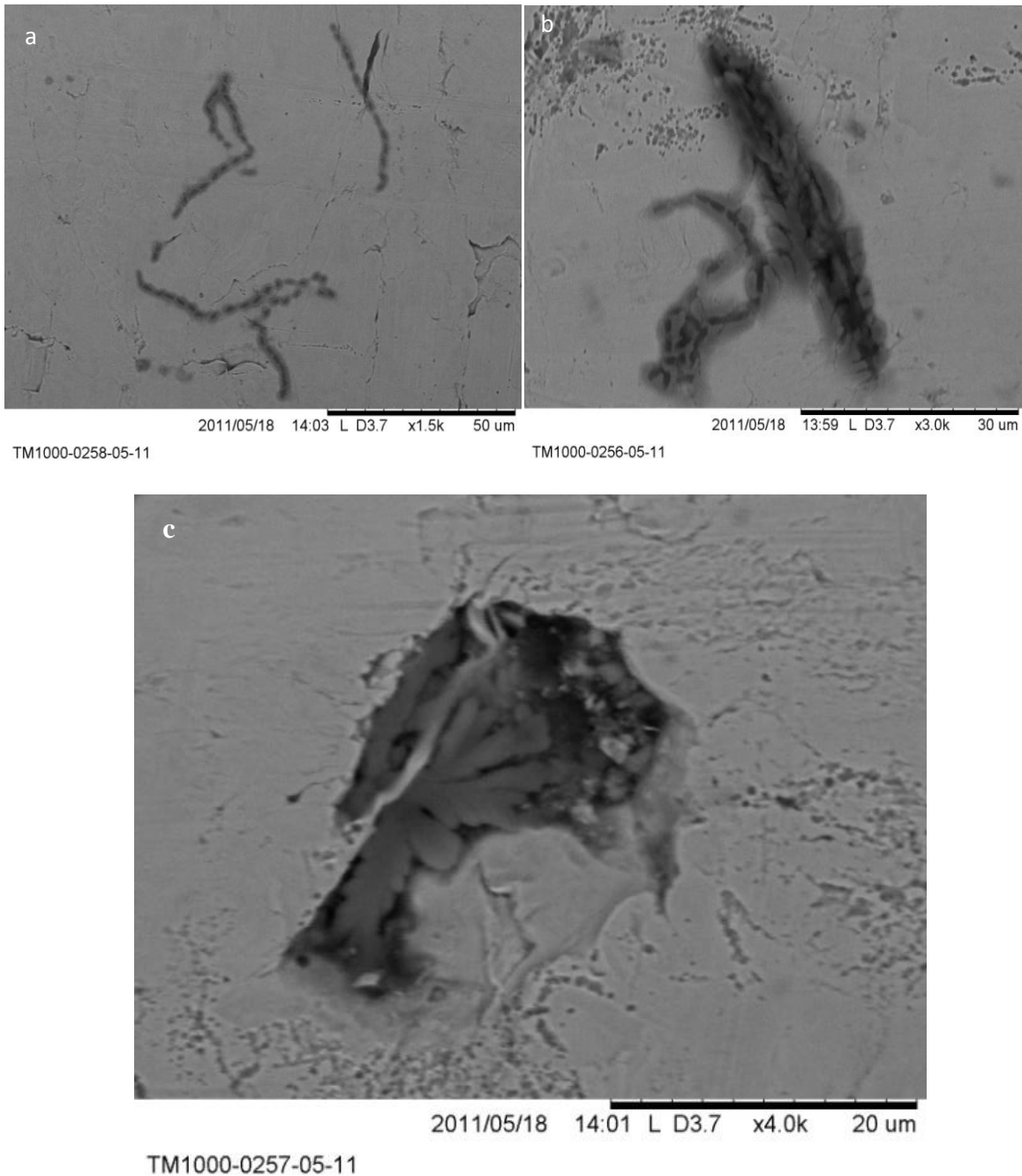


Figure 62 : Micrographes électroniques de biofilms de 20 h formés par la souche BC14 dans le recombéné dilué au 1/100 (a,b, et c).

Des biofilms dont les cellules sont complètement enfouies dans la matrice organique sont également formées par d'autres souches aussi bien dans le bouillon nutritif que dans le lait recombéné (figure 63). C'est le cas des souches BC6 (photos a et b) et de la souche BC2 (photo c). Des variations dans le morphotype de ces biofilms en fonction de la souche et du milieu de culture, sont également visibles. Ces formes opaques, noires à surfaces lisses ou comportant des ondulations et des plis peuvent correspondre à des fragments de la matrice

organique dépourvus de cellules mais peuvent également constituer un biofilm entier tel que montré dans la figure 64. Il s'agit de biofilms âgés (7 jours), dont la croissance cellulaire s'est arrêtée alors que la maturation de la matrice organique s'est poursuivie, aboutissant à des structures masquant complètement les microcolonies.

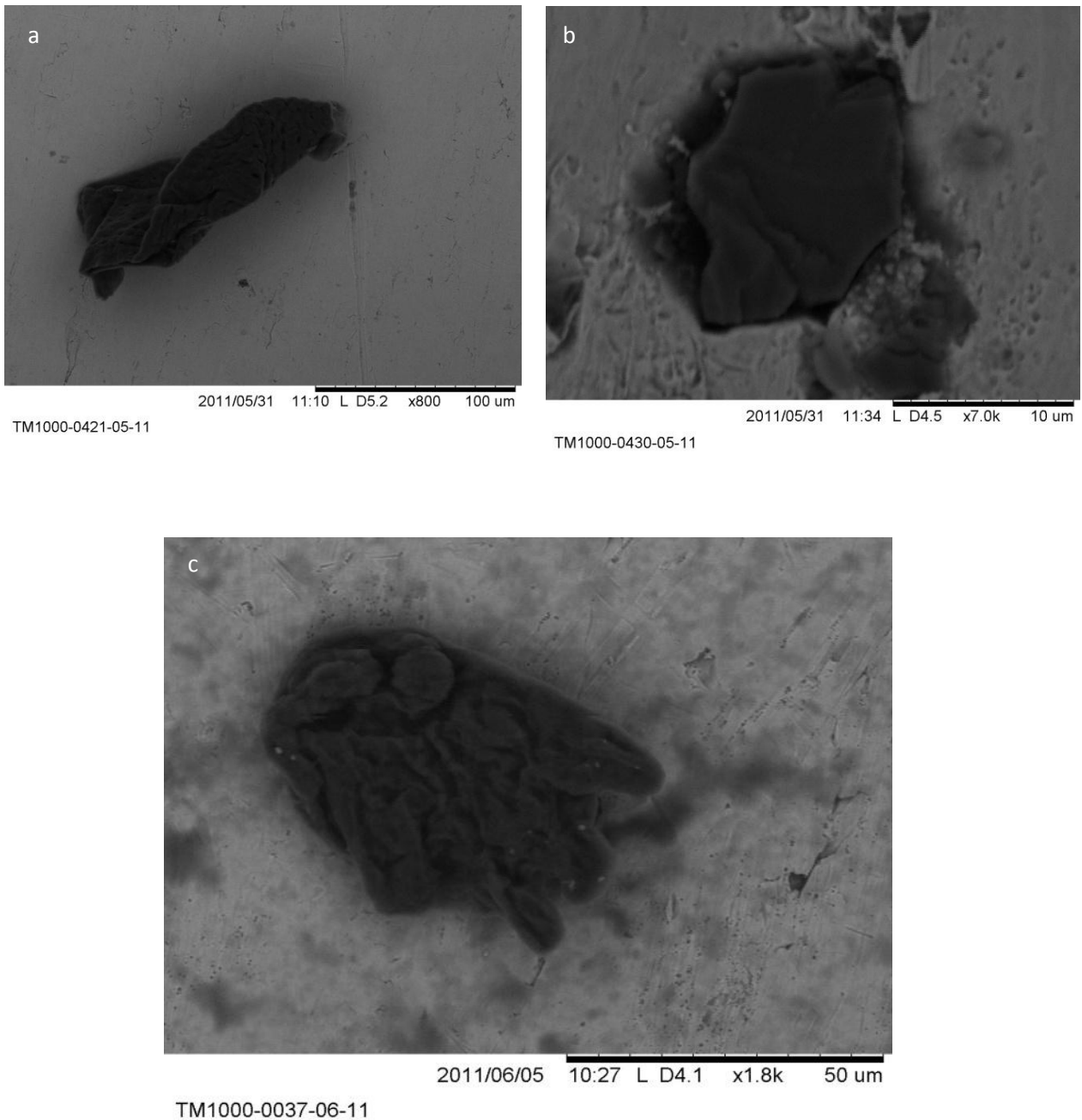
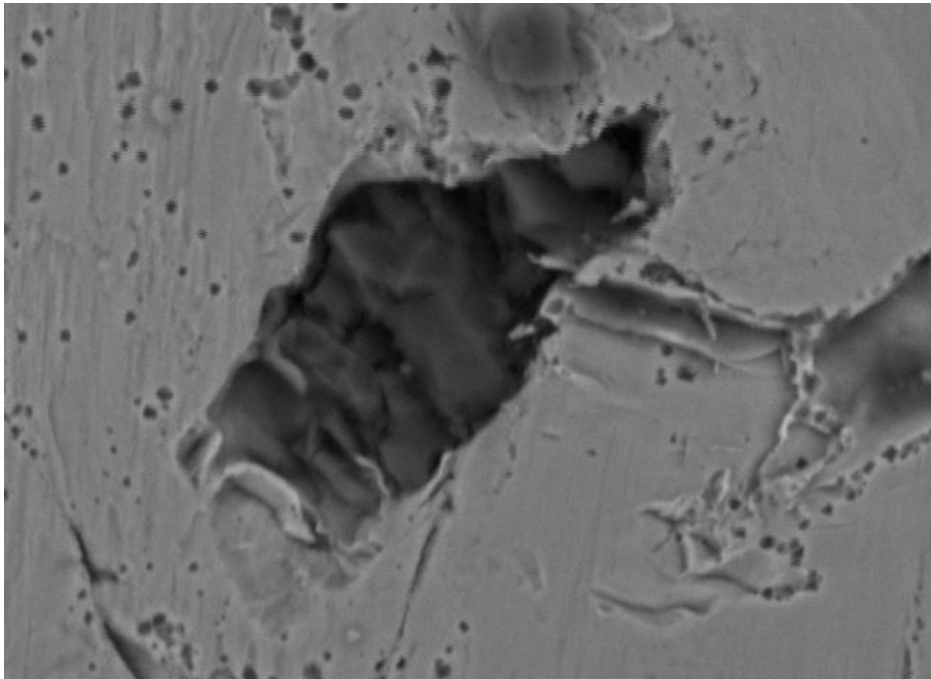


Figure 63 : Micrographes électroniques de biofilms de 7 jours formés par la souche BC6 dans le bouillon nutritif (a) et le recombéné (b), et la souche BC2 (c) dans le lait recombéné.



2011/05/17 14:07 L D3.4 x6.0k 10 um

TM1000-0215-05-11

Figure 64 : Micrographie électronique d'un biofilm de 20 h formé par la souche S41 dans le bouillon nutritif.

2.4. Tolérance des biofilms de *B. cereus* aux biocides

L'effet des différentes formulations des agents de nettoyage, sur des biofilms formés sur l'acier inoxydable à différents taux de l'inoculum est montré par la figure 65. L'efficacité des cinq désinfectants utilisés est faible, si on considère les réductions logarithmiques enregistrées quelle que soit la valeur de l'inoculum. Celles-ci sont comprises entre 1.2 et 2.23 log ufc/cm². Toutefois si on compare les flores résiduelles, on constate qu'elles sont proportionnelles à la contamination transférée à l'inox. Dans le cas de l'inoculation de l'inox à des taux élevés (10⁸ ufc/ml) le nombre de bactéries survivantes (10⁶ ufc/cm²) reste élevé comparé au témoin. Par contre, un inoculum modéré (10⁵ ufc/ml) ou faible de 10³ ufc/ml, permet des réductions plus importante 2.23 et 1.8 logs respectivement, avec des taux de bactéries résiduelles inférieurs à 10 ufc/cm² dans le dernier cas. Ces résultats montrent que l'efficacité des désinfectants est liée à densité microbienne dans les biofilms natifs et jeunes (24 h), situation pouvant se rencontrer dans les I. A.A.

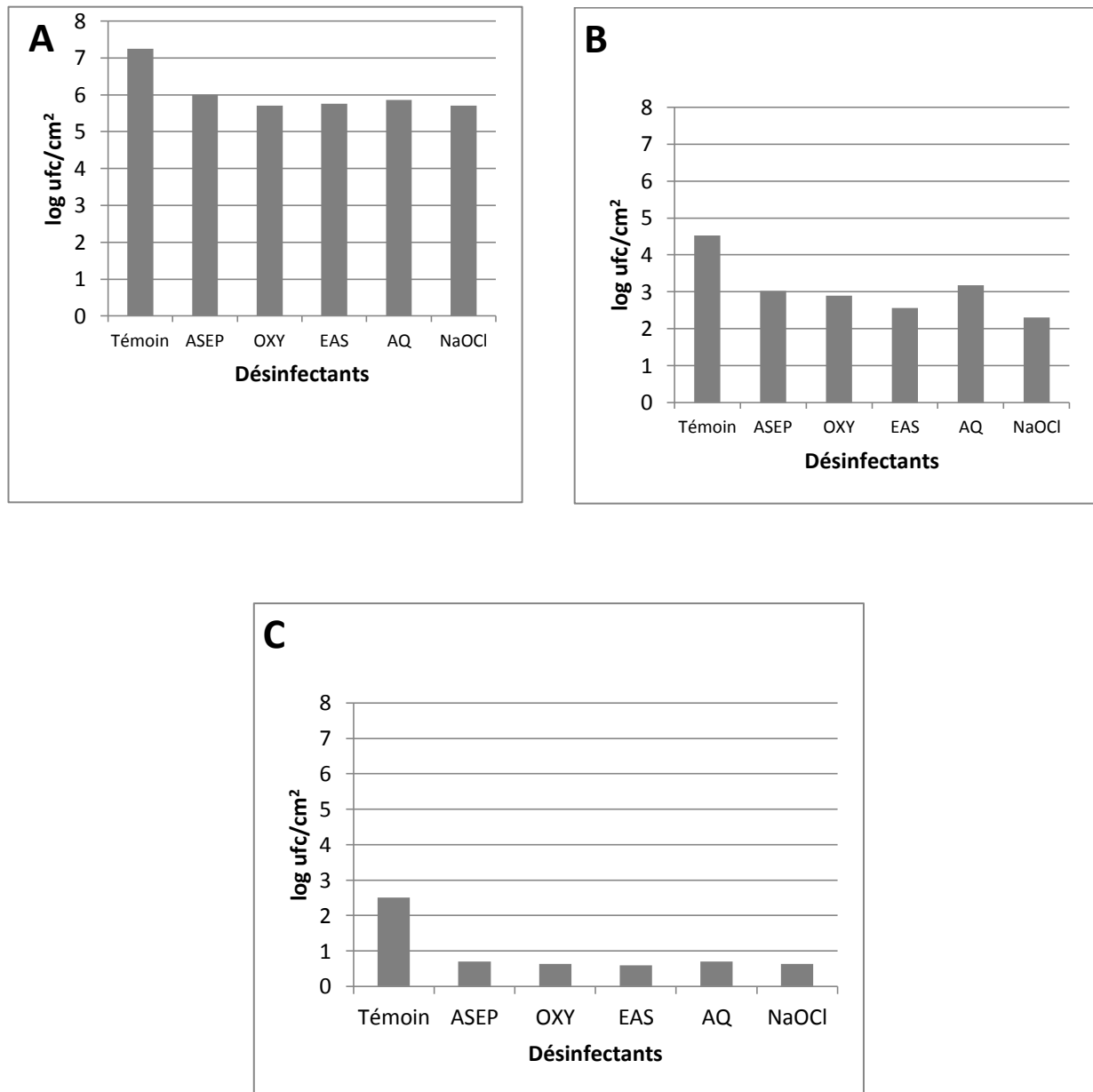


Figure 65 : Effets de différents désinfectants sur des biofilms de 24 h formés par *B. cereus* sur l'acier inoxydable à des concentrations variables en inoculum : 10^8 , 10^5 et 10^3 ufc/ml (A), (B) et (C) respectivement.

Comparés aux biofilms de 24 h, les biofilms de 6 jours sont plus résistants à tous les désinfectants (figure 66). Les réductions décimales enregistrées sont très faibles et varient de 0.6 à 1.14 logs. Le traitement de biofilms à différents âges a permis de déceler une variabilité dans l'action des désinfectants, le chlore et le détergent alcalin étant légèrement plus actifs, avec des réductions égales à 1.14 et 0.87 logs respectivement.

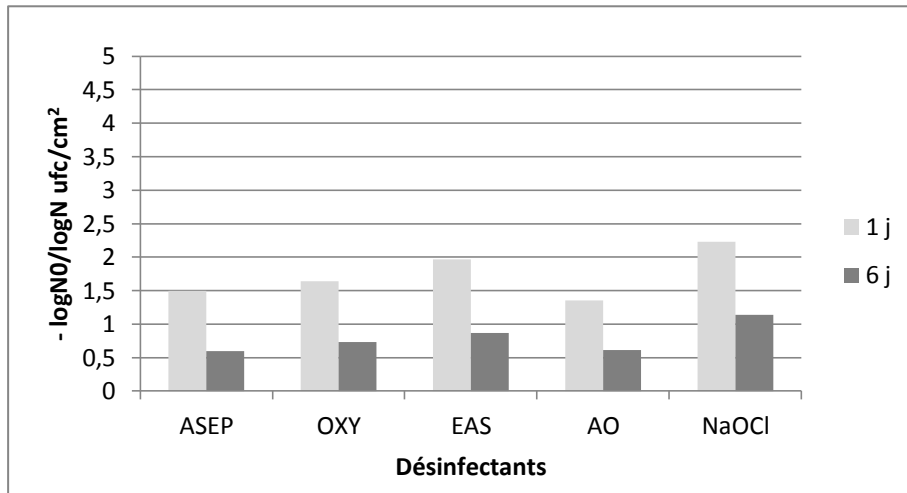


Figure 66 : Effets de différents désinfectants sur des biofilms de différents âges (1 et 6 jours) formés par *B. cereus* sur l'acier inoxydable, (inoculum : 10^5 ufc/ml).

Par contre si les biofilms à taux d'inoculation élevés (10^8 ufc/ml) sont soumis à l'action de détergents chimiques en amont de la désinfection, le résultat de celle-ci est amélioré. Les résultats (figure 67) montrent que le traitement de désinfection de biofilms soumis à une procédure de nettoyage simulant le CIP industriel, permet d'obtenir des réductions décimales supérieures à 3 log ufc/cm². Celles-ci atteignent les valeurs de 4 et 4.45 dans le cas de certains désinfectants (EAS et NaOCl, respectivement). Ces résultats indiquent clairement qu'un nettoyage des surfaces est un préalable à tout acte de désinfection.

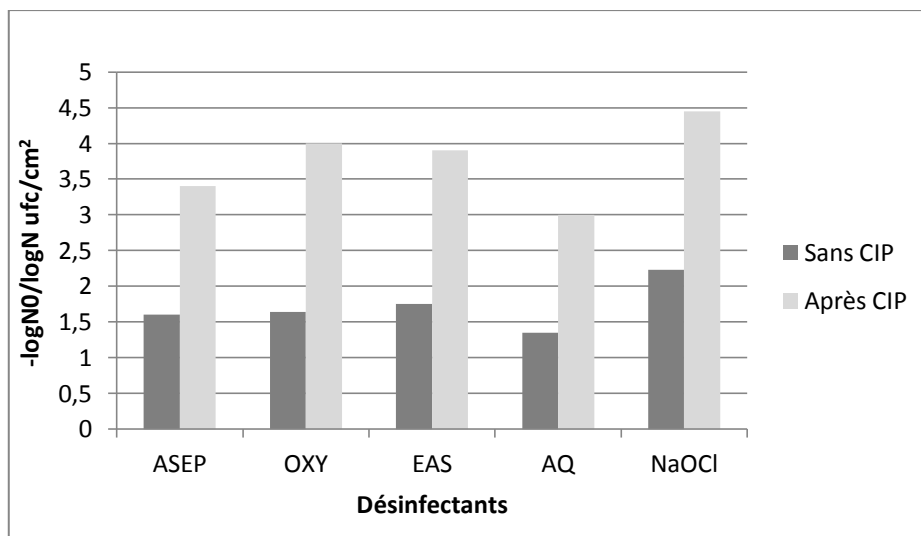


Figure 67 : Effet de différents désinfectants sur des biofilms de 24 h formés par *B. cereus* sur l'acier inoxydable et soumis à un stress CIP-like, (inoculum : 10^8 ufc/ml).

Les DO obtenues après l'application du traitement acido-basique sur les biofilms formés dans les microplaques de titrations, étaient très faibles voire nulles, malgré la présence d'un trouble et d'un voile dans les puits indiquant une croissance planctonique des bactéries. Toutefois, les cellules bactériennes étaient devenues incapables d'adhérer après le traitement acido-alkalin à chaud.

3. Discussion

La croissance des souches de *B. cereus* dans les biofilms formés sur l'acier inoxydable est importante et les densités cellulaires atteintes sont relativement élevées, supérieures en moyenne à 10^6 ufc/cm². Ce développement est liée à leurs capacités d'adhésion à l'acier inoxydable telles que révélées par les nombres de spores et de cellules végétatives adhérees, mais également à leur potentiel de croissance dans les biofilms dans les conditions de culture utilisées. L'influence de certains facteurs de développement des biofilms sur l'évolution de leur population est comparée aux données de la littérature. La formation de biofilms dans les conditions de richesse en nutriment est rapportée pour des bactéries adaptées aux environnements riches telles que les pathogènes alimentaires et cliniques. Le développement de bactéries appartenant aux genres *Listeria*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus* et *Acinetobacter* sur l'acier inoxydable dans le milieu TSB, a montré des densités cellulaires maximales pouvant excéder 10^7 ufc/cm² (Sommers et al, 1999). Des résultats similaires sont obtenus par Wirtanen and Mattila-Sandholm (1993). L'adhésion de *B. cereus* et la formation de biofilm sur l'acier inoxydable est largement documentée et est utilisée notamment dans les travaux portant sur le décrochement des biofilms et leur élimination, dans les conditions simulant celles des processus industriels (Faille et al., 2001 ; Lee et al., 2010 ; Peng et al, 2001 ; Ryu et Beuchat, 2005 ; Salutiano et al., 2010 ; Simoes et al., 2011 ; Wijman et al., 2007). En effet, les biofilms formés sur l'innox sont consistants et les densités cellulaires conséquentes.

B. cereus adhère également à d'autres matériaux tels que les polymères et les plastiques. Néanmoins dans le cas des biofilms obtenus dans les microplaques de titration en polystyrène, les densités optiques maximales (1.8) sont inférieures à celles trouvées par Auger et al., (2009) dans des plaques en PVC, (2.8) pour les biofilms formés par des souches cliniques de *B. cereus*. Sachant que dans nos résultats, les DO minimales biofilms de *B. cereus* (0.6) sont supérieures à la valeur seuil pour être considéré comme un bon producteur de biofilm, fixée à 0.5 par Auger et al. (2009), l'écart enregistré entre les deux études, peut-

être attribué également au type de matériau d'adhésion et non pas uniquement au potentiel des souches à former le biofilms. En effet d'après (Auger et al., 2006), l'adhésion de *B. cereus* au polystyrène est faible. Toutefois El Hariry (2011) a trouvé que des souches de *B. cereus* isolées du réseau de distribution d'eau étaient caractérisées par une aptitude d'adhésion au polystyrène élevée. Ces souches peuvent être génétiquement éloignées de nos isolats laitiers, l'adhésion de *B. cereus* aux surfaces inertes étant également souche dépendante. Ce qui indique que le faible développement de biofilms dans les microplaques en polystyrène est lié au potentiel d'adhésion des souches, sur ce type de matériau et non pas à leurs capacités de formation du biofilm. Ces résultats sont confirmés par la relation linéaire trouvée entre les densités cellulaires des biofilms formés sur l'acier inoxydable par la souche de *B. cereus*, BC1 et la taille de l'inoculum, les valeurs maximales étant enregistrées pour des taux d'inoculation supérieurs à 10^5 ufc/ml. Cette relation n'est pas toujours vérifiée chez d'autres groupes bactériens, la formation de biofilm pouvant ne pas être liée à l'adhésion mais plutôt au potentiel de croissance des souches dans le biofilm (Sommer et al. 1999), ou alors être liée au deux (Mulla et Revdiwalla, 2011). Par ailleurs, la formation de biofilm par *B. cereus* dans les microplaques de titration s'est révélée dépendre fortement du temps d'incubation, de la température, du milieu de culture et des souches, certaines d'entre elles montrant une formation de biofilm en 24 h et une dispersion durant les 24 h suivantes (Wijman et al., 2007). En outre, cette formation de biofilm était optimale à l'interface air/eau plutôt que dans les parties immergées. Par ailleurs, une souche de référence, *B. cereus* ATCC 14579 n'a pas formé de biofilm dans des microplaques de titration en PVC (Auger et al., 2006) alors qu'elle était capable de le faire dans des plaques en polystyrène (Hsueh et al., 2006).

Les techniques des microplaques sont largement utilisée pour apprécier le potentiel de formation des biofilms chez les bactéries et les mycètes (Djordjevic et al., 2002 ; Hou et al., 2012, Mulla et Urmi, 2012 ; O'Toole, 2011 ; Pui et al., 2011 ; Pearce et al., 2008; Zmantar et al., 2010) mais elles sont à chaque fois optimisées en fonction de l'organisme étudié. Comme souligné dans la littérature, (Carpentier et cerf , 2011), les conditions favorables à la croissance ne sont pas toujours favorables pour l'adhésion des bactéries. Le choix du matériau dans lequel ces microplaques sont fabriquées, reste aussi un impératif afin d'éviter des interférences négatives avec les propriétés d'adhésion des microorganismes testés. Ceci illustre bien le besoins de techniques fiables et reproductibles pour la culture et le développement du biofilm.

Concernant la cinétique de croissance des biofilms, les souches de *B. cereus* testées, étaient capables de former des biofilms dont les populations excédaient 10^5 ufc/ cm^2 , après 6 h de culture et sont donc caractérisées par une certaine rapidité dans ce processus. Cette rapidité a été décrite chez des espèces de Bacilles thermophiles formant des biofilms matures avec des densités cellulaires supérieures à 10^6 ufc/ cm^2 après 6h de culture dans le lait écrémé pasteurisé sur l'acier inoxydable (Parkar et al, 2004). Des populations de 10^7 ufc/ cm^2 sont obtenues dans des biofilms de 24 h formés sur l'acier inoxydable par *Shewanella putrefaciens* en culture batch et sont supérieures à celles obtenues dans des conditions de flux laminaire (10^2 ufc/ cm^2) (Bagge et al., 2001.) Toutefois, des fluctuations dans les densités cellulaires sont observées entre les souches en fonction de l'âge des biofilms. Des trois souches de *B. cereus* testées, la souche BC1 est réellement la plus rapide puisqu'elle était capable d'atteindre les densités cellulaires maximales au bout de 2 jours alors que pour les deux autres des délais plus longs étaient nécessaires, 6 jours dans le cas de la souche BC3. L'évolution de la population du biofilm après l'état stationnaire, est caractérisée par une diminution du nombre de cellules des biofilms des deux autres bactéries. Ceci pourrait être dû à des modifications de l'environnement physico-chimique (pH, molarité), affectant leur viabilité. La production de substances inhibitrices peut également être responsable. En effet, Parkar et al.,(2004) ont trouvé que la réduction du nombre de bactérie en biofilm après 30 h était due à la production d'une substance inhibant la croissance des souches. La densité bactérienne du biofilm peut également rester constante pendant des temps plus ou moins longs après l'état stationnaire. A titre d'exemple, La population d'*Ecoli* O157 : H7 en Biofilm était maintenue constante dans des conditions de milieu de culture pauvre en nutriment pendant 6 jours (Ryu et al., 2004)

Il est reconnu que les biofilms se forment en réponse à des signaux environnementaux qui diffèrent d'une espèce à une autre. Parmi ces signaux la disponibilité des nutriments et le quorum-sensing interviennent dans la régulation de la maturation du biofilm (Satneley et Lazazzera, 2004). D'après ces auteurs, la disponibilité des nutriments régule la profondeur du biofilm de manière à assurer une acquisition optimale des nutriments. A des taux extrême de richesse ou de pauvreté en nutriments, un grand nombre de cellules sont à l'état planctonique d'où elles ont un plus grand accès aux nutriments ou elles peuvent être distribuées à des environnements nouveaux. La concentration en nutriment influence aussi bien la population du biofilm que sa morphologie. L'épaisseur du biofilm en présence de concentrations croissante de glucose (40-400 mg/l) (Stoodley et al., 1999), augmente de 30 à 130 μ au bout de 17 h de culture sous flux turbulent. Kamali et al., (2011), ont montré que tous les sucres,

acides aminés et cations testés favorisaient le développement du biofilm de *P. fluorescens* alors que le phosphore le réduisait.

En effet, les nutriments n'influent pas uniquement sur le nombre de cellules dans les biofilms mais également leur structure et leur morphologie générale. D'une manière générale, les biofilms formés dans des conditions dynamiques sont plus consistants que ceux développés dans les conditions statiques (batch culture). Des différences de structure et composition sont notées entre les biofilms obtenus en culture continue sous flux laminaire ou turbulent (Stoodlet et al., 1999 ; Simoes et al., 2007). Dans le cas des souches étudiées, les biofilms sont formés dans les conditions statiques et les photos obtenues en microscopie électronique à balayage ont montré qu'ils étaient influencés par le milieu de culture, le temps d'incubation, et la souche. La structure des biofilms âgés (7 jours) des souches BC2, et BC6 formés dans le bouillon LB ou le lait recombiné étaient dominée par la matrice organique. Le même aspect a été observé par Epstein et al, (2011), chez un biofilm de *B. subtilis* et cette structure de la matrice organique a été caractérisée comme récalcitrante à la pénétration des liquides et des gaz. La souche BC 14 donne un biofilm plus compact avec une architecture bien individualisée en bouton de rose ou tulipe, après seulement 20 h d'incubation dans le milieu Luria. Par contre le biofilm du même âge, formé dans le lait recombiné dilué au 1/1000 n'est encore qu'aux premiers stades de son développement. Ce qui illustre bien la nécessité de milieux riches pour la formation de biofilms par ces souches de *B. cereus*, adaptées à un environnement caractérisé par la disponibilité des nutriments. Les biofilms de 20 h des souches BC 3, BC5 et BC17 sont principalement constitués de cellules. Le biofilm d'une souche de *B. cereus* (Simoes et al., 2007) formé par culture sur l'inox dans un bioréacteur pendant 7 jours était également constitué en majorité de cellules et caractérisé par une stabilité mécanique plus grande que celle du biofilm de *P. aeruginosa* formé dans les mêmes conditions.

Le rôle des nutriments dans la formation des biofilms bactériens peut également être perçu à travers le quorum-sensing. Il a été montré que le rôle du QS dans la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* dépendait des conditions nutritionnelles (Kim et al., 2012). Le QS contrôle la formation de canaux et peut assurer un approvisionnement efficace des cellules dans le biofilm en nutriments (Staneley et Lazazzera, 2004). Il intervient également dans le phénomène de dispersion.

Les photos obtenues en CLSM (figure 6), illustrant la dispersion ou dissolution par formation de cavités chez des biofilms matures, âgés de *Pseudomonas aeruginosa*, sont

identique à celles obtenues au microscope électronique à balayage dans le cas des souches étudiées. La dispersion du biofilm se déroule selon le processus décrit par Ma et al., (2009) par formation de cavités centrale dépourvues de matrice organiques. Dans le cas de ces souches lactières de *B. cereus*, cette forme de dispersion est survenue à un stade plus précoce, chez des biofilms très jeunes, dont l'âge ne dépasse pas les 20 h. Ce qui confirme d'une part, leur caractère fortement producteur de biofilm, et d'autre par le rôle des nutriments dans la dispersion, celle-ci survenant suite à l'épuisement des éléments nutritifs en l'absence du renouvellement du milieu de culture. Outre l'âge, ces biofilms sont obtenus par des techniques différentes, Le biofilm de *P. aeruginosa* était développé en réacteur, dans une cellule à flux, ce qui permet d'obtenir des biofilms quantitativement plus importants. L'avantage de la CLSM est de fournir des images de biofilms intacts sans les altérations et déformations générées par le microscope électronique à balayage (Cortizo et al., 2003 ; Dohnalkova et al., 2011). Toutefois, l'observation des biofilms natifs des souches de *B. cereus*, dans le MEB environnemental a permis d'obtenir des images dont la qualité est comparable à celle de la CLSM. En effet, le MEBE produit des images à partir d'échantillons de biofilms pleinement hydratés et non recouverts de métal conducteur, tout en préservant l'intégrité de la structure de la matrice organique, évitant l'effondrement qui se produit dans les image obtenues au MEB (Little et al., 1991 ; Priester et al., 2007 ; Ramirez-Camacho et al., 2008 ; Trinidad et al., 2010).

La dispersion par formation de cavité, bien visible chez la souche BC17, s'accompagne d'une reprise de la mobilité de type swimming des cellules du biofilm permettant aux cellules nageuses de le quitter, après la rupture des cavités (Sauer et al., 2002, Stoodley et al., 2002 ; Ma et al., 2009). Ceci était bien visible chez la souche BC17 dont les biofilms s'étaient complètement effondrés et les cellules mobiles se sont échappées par les ouvertures formées dans les cavités, bien que le MEB ne permette pas de visualiser la mobilité. Telle que montré dans les travaux précédents, la dispersion du biofilm s'accompagne de l'induction de nombreux gènes, notamment ceux impliqués dans la mobilité de type swimming, ou dans le quorum-sensing. La structure des biofilms montrant ce type de dispersion est dominée par les cellules, comparées aux biofilm à forte teneur en EPS. Ces biofilms épais sont caractérisés par le détachement de fragments, sous l'effet des forces de cisaillement ou lorsque l'épaisseur définitive est atteinte (Donlan et Costerton, 2002).

Le biofilm âgé formé par ces souches de *B. cereus* dans les conditions statiques est complètement enfoui dans la matrice organique, dont la topographie varie entre un aspect

lisse, homogène et un aspect irrégulier semblable à celui décrit par Epstein et al., (2011). La composition de la matrice organique du biofilm de *B. cereus* n'est pas bien connue (Vilain et al., 2009). Ces auteurs ont trouvé que l'ADN extracellulaire (eDNA) trouvée dans la matrice polymérique extracellulaire était nécessaire à l'adhésion et la formation de biofilm chez *B. cereus*. L'ADN extracellulaire est lié au quorum-sensing (Spoering et Gilmore, 2006) et joue un rôle même dans la structure du biofilm (Vilain et al., 2009). En outre, il a été montré (Simoes et al., 2007), que le contenu en protéine et polysaccharide du biofilm de *B. cereus* obtenu par culture continue, était relativement faible.

Les caractéristiques de surface des matériaux ou topographie, qu'elles soient natives ou acquises, influencent l'attachement des cellules bactériennes aux surfaces inertes. Les propriétés de surface de l'inox, principalement sa rugosité et les altérations et défauts sont en grande partie responsables de son attaque par les microorganismes. Si la relation de l'adhésion bactérienne avec la rugosité de l'inox est largement controversée dans la littérature, les imperfections et défauts de l'inox tels que les anfractuosités, les creux et crevasses, les fissures (Carpentier et Cerf, 2011 ; Medilanski et al., 2002 ; Shi et Zhu, 2009, Whitehead et Veran, 2006.), ainsi que sa capacité de nettoyage (Chaturongkasumrit et al., 2011 ; Hilbert et al., 2003) sont reconnus comme étant des paramètres significatifs dans l'adhésion aux surfaces inertes et la formation de biofilm. D'après Carpentier et Cerf, (2011), indépendamment de leurs propriétés particulières, les bactéries trouvent dans ces abris ou refuges les conditions favorables à leur croissance et de là elles peuvent persister à l'abri des agressions extérieures. D'après Hilbert et al., (2003) et Chaturongkasumrit et al., (2011) la rugosité est plutôt liée à l'aptitude des surfaces au nettoyage, et est supposée être le facteur le plus important dans le nettoyage des surfaces associée aux biofilms. Des surfaces lisses seraient plus faciles à nettoyer et sont plus résistantes à la corrosion que les surfaces rugueuses. Toutefois, la pratique industrielle qui consiste à utiliser des surfaces en inox hautement polies, dans le but de minimiser l'adhésion et améliorer l'aptitude au nettoyage a été critiquée (Riedwald, 2006).

Les photos en MEB ont également montré que l'adhésion des souches de *B. cereus* à l'acier inoxydable était hétérogène et se faisait préférentiellement à certains sites plutôt qu'à d'autres. La distribution des cellules sur les surfaces d'adhésion est en effet, irrégulière (Medilanski et al., 2002 ; de Oliveira et al., 2010) et dépend selon Whitehead et Veran, (2006) de la taille des rayures et sillons et de l'orientation des cellules . La surface de contact diminue lorsque la largeur des sillons est trop faible ($< 0.5\mu\text{m}$) ou trop forte ($> 5\mu\text{m}$), ce qui

met les cellules dans des orientations non favorables à l'adhésion (Whitehead et Veran, 2006). Les irrégularités de l'acier inoxydable utilisé dans cette étude étaient accentuées par l'usage répété des lames et les traitements de nettoyage subis. Les défauts de la surface des lames révélés au MEB étaient importantes, principalement les creux et cavités dont les grandes largeurs et profondeurs, ont servi de niches pour le développement de biofilms.

Conformément aux données de la littérature, le traitement des biofilms de *B. cereus* formés sur l'acier inoxydable par des désinfectants classiques pour CIP, a montré une efficacité faible de ces produits à éliminer les biofilms. Les réductions décimales étaient inférieures à 2 logs ufc/cm² et éloignées des 5 unités logs requises dans le cas d'une désinfection efficace selon la norme AFNOR, (1997). Les désinfectants testés dans cette étude sont choisis parmi ceux qui sont les plus couramment utilisés pour la désinfection des surfaces à savoir, l'hypochlorite de sodium (halogènes), des produits à base d'acide peracétique et de peroxyde d'hydrogène (ASEP et OXY), un désinfectant basique (EAS) et un composé dérivé des ammonium quaternaires (Divosan). Ces désinfectants et beaucoup d'autres ont été largement testés sur de nombreuses bactéries à l'état planctonique et en biofilm dans diverses conditions expérimentales (concentrations en produits, températures temps de contact, matériau du support) (Best et al., 1990 ; Caixeta et al., 2012 ; Christensen et al., 1990, Lindsay et al, 2002 ; Ronner et Wong, 1993 ; Tuncan, 1993 ; Taylor et al, 1999, Pan et al., 2006). L'efficacité de ces produits sur l'élimination du biofilm était faible ou nulle. Les résultats obtenus dans la présente étude confirment ces données de la littérature. Même testés dans les conditions maximales de concentration, températures et temps de contact, ces produits se sont révélés faiblement efficaces à éliminer des biofilms de *B. cereus* formés sur l'acier inoxydable. Par ailleurs même à l'état planctonique, la résistance des bactéries aux désinfectants est prouvée être la conséquence de l'adaptation à ces produits (Langsrud et al., 2003).

Devant l'échec des méthodes traditionnelles de nettoyage et désinfection à lutter contre le biofilm, des méthodes alternatives ont été développées. Parmi elles, l'utilisation des détergents enzymatiques (Johansen et al., 1997 ; Marion et al, 2006 ; Lequette et al., 2010 b, Leslie, 2011), les nouvelles formulations de produits détergent et/ ou leur combinaison aux désinfectants chimiques (Antoniou et Frank, 2005 ; Hansen et al., 2003 ; DeQueiroz et Day 2007, ; Vickery et al., 2004) ainsi que l'utilisation des huiles essentielles (Hendry et al., 2009 ; Niu et Gilbert, 2004 ;) et autres biocides naturels (Knowles et Roller, 2001 ; Lebert et al., 2007). Dans certains travaux, les huiles essentielles se sont révélées plus efficaces in-vitro que

la plupart des produits chimiques classiques (Chorianopoulos et al., 2008 ; Lebert et al., 2007). L'activité d'un produit naturel le chitosane, s'est même révélée, dans certains cas, plus efficace sur des biofilms que sur les cellules planctoniques (Knowles et Roller, 2001, Orgaz et al., 2011). Le maximum de réduction (8 log) a été obtenu par l'action de l'hydrolysate enzymatique de ce produit sur les cellules adhérentes de *B. cereus* (Orgaz et al., 2011). Sous certaines formes les désinfectants classiques ont été prouvés être plus efficaces dans l'élimination du biofilm. Dans une étude, Srinivasan et al. (2005), ont trouvé que les vapeurs préparées à partir de désinfectants classiques (acide peracétique, hypochlorite de Na, EDTA) produisaient une inactivation des biofilms supérieure à celle obtenue par les mêmes biocides en solutions. De même, une meilleure efficacité est attribuée au peroxyde d'hydrogène sous forme gazeuse (Linley et al., 2012) et aux aérosols générés par l'hypochlorite de Na et l'acide peracétique (Park et al., 2012).

Les travaux ont également porté sur l'optimisation des systèmes CIP conventionnels (Bremer et al, 2006 ; Parkar et al, 2004, Salutiano et al., 2010) et autres procédures classiques de nettoyage/désinfection (Lee et al., 2010 ; Vickery et al., 2009 ; Simoes et al., 2011). De plus en plus, l'accent est mis sur l'action de la détergence, et son importance dans le détachement du biofilm et la destruction de l'EPS facilitant aux désinfectants l'accès aux cellules du biofilms. L'opération du nettoyage en amont de la désinfection dans l'élimination du biofilm s'est instaurée en vérité d'ordre général. En effet, à la question de savoir comment les biofilms pouvaient-ils être éliminés dans les industries alimentaires ? Carpentier et Cerf (1993) avaient répondu qu'il existait deux méthodes à la portée de l'industrie alimentaire : le nettoyage et la désinfection. Vingt ans après, il n'a pas été trouvé de meilleure réponse. Dans leurs revues sur les stratégies courantes et émergentes de contrôle des biofilms, Arujo et al., (2011), Flemming et Ridgwell, 2008 et Simoes et al., (2010) désignaient le nettoyage/désinfections comme la stratégie la plus importante, méritant la plus haute considération, pour le contrôle de la contamination des surfaces. D'après, Arujo et al., (2011) aucune des stratégies de contrôle existantes n'a permis jusqu'alors d'inactiver les biofilms, de les enlever ou d'empêcher leur recroissance après le traitement antimicrobien. D'autant plus que pour Flemming et Ridgwell, (2008), tuer les organismes du biofilm ne résout pas le problème du biofouling, sachant que la biomasse constitue principalement le problème et doit être enlevée. Un regain d'intérêt est alors apporté à l'amélioration des procédés traditionnels du nettoyage et désinfection (Bae et al., 2011, Faille et al., 2010 b, Knight et Craven, 2010, Kostaki et al., 2012 ; Salutiano et al., 2010).

Dans les résultats de cette étude, les seuls paramètres significatifs dans l'action des désinfectants sur les biofilms de *B. cereus* étaient l'inoculum et l'âge du biofilm. La présence d'une charge microbienne élevée sur les lames en acier inoxydable (10^8 ufc/ml), induit une résistance des biofilms, comparés aux biofilms formés à partir d'un taux d'inoculation faible (10^3 ufc/ml) et même modéré (10^5 ufc/ml). Pour ces souches, il a été montré que, les densités cellulaires dans le biofilm reflétaient le nombre de bactéries mises en contact avec le support. D'autant plus que d'après les observations faites au MEB, les biofilms jeunes (24 h) étaient dominés par les cellules, alors que la matrice extracellulaire était peu développée. Par ailleurs, pour un taux d'inoculation modéré la réduction cellulaire dans ces biofilms était supérieure à 2 logs en présence du chlore. Dans ces conditions, la résistance du biofilm est due à une charge microbienne élevée.

L'âge du biofilm joue un rôle aussi. Les biofilms de 6 jours sont plus résistants à tous les désinfectants que ceux de 24 h. Le traitement de biofilms à ces différents âges a permis de déceler une variabilité dans l'action des désinfectants, le chlore et le désinfectant alcalin étant légèrement plus actifs. La MEB a montré que les biofilms de 24 h et moins étaient en phase de dispersion et par conséquent les cellules se trouvaient en majorité à l'état planctonique ou dans les stades initiaux d'adhésion et donc plus sensibles à l'action des désinfectants. Ceci n'est pas le cas dans les biofilms de 6- 7 jours où le nombre de cellules est plus élevé et la matrice organique plus développée, par conséquent leur résistance est plus grande. Un des paramètres significatifs de la résistance des biofilms est la diffusion des biocides dans la matrice organique (Mah et O'Toole, 2001 ; Czechowski et Stoodley, 2002). Dans le cas des biofilms où les cellules étaient complètement enfouies dans la matrice organique, leur résistance était attribuée à la difficulté de pénétration des biocides à cause de la non-mouillabilité de cette structure (Epstein et al, 2011). En effet, d'après cette étude, ces propriétés non-mouillantes sont le résultat synergique de la composition de la matrice extracellulaire, et de sa topographie ainsi que d'autres facteurs liés à la nature dynamique de la surface du biofilm. Il a été également montré l'impénétrabilité de la surface de ce biofilm par des gaz, et par conséquent la capacité de défense contre des agents antimicrobiens en phase vapeur. Dans les biofilms âgés (6-7 jours), la résistance serait donc liée à l'EPS plutôt qu'aux cellules. Par contre, pour Sommer et al., (1999), la résistance au chlore augmentait avec l'âge du biofilm, mais elle était indépendante de la structure du biofilm. D'une manière générale, l'inefficacité du chlore sur les biofilms épais dans le milieu laitier est prouvée (Jang et al., 2006). D'après Carpentier et Cerf, (1993), les désinfectants permettent la survie sélective des microorganismes qui produisent de larges quantités d'EPS qui les protègent. Ce

qui nécessite des stratégies de lutte contre le biofilm basées sur l'attaque de la matrice organique.

Alors que la variabilité des activités des différents désinfectants n'était pas significative sur les biofilms natifs, un effet significatif est enregistré sur les biofilms soumis au nettoyage acido-alcalin simulant les conditions du système CIP industriel. Les réductions décimales enregistrées variaient de 3 à 4.5 logs. Le maximum de réduction est obtenu en présence du chlore. D'autant plus que, si la désinfection des biofilms natifs n'a pas permis de déceler de différences significatives entre les produits utilisés, la désinfection après le nettoyage acido-alcalin a permis de mettre en évidence l'efficacité intrinsèque des désinfectants.

Ces résultats corroborent certaines données de la littérature, et sont en contradictions avec d'autres. L'efficacité du chlore et de l'ammonium quaternaire bien que démontré sur les cellules planctoniques de *B. cereus* est faible sur les biofilms soumis à un CIP conventionnel (Peng et al., 2002). Le chlore a été trouvé plus efficace sur des cellules de *B. cereus* adhérentes à l'inox que le dioxyde de chlore (Kreske et al., 2006a), ainsi qu'en biofilm Ryu et Beuchat (2005). Dans une autre étude (Knight et Craven, 2010), les mêmes types de désinfectants testés sur des cultures mixtes de biofilms de bactéries isolées de laiteries en Australie (*Pseudomonas*, coliformes et *Staphylococcus*), après l'application d'un procédé de nettoyage ont réduit significativement le nombre de cellules des trois groupes de bactéries.

Le traitement des biofilms par des détergents ou leur incorporation dans les solutions désinfectantes augmentait l'efficacité de la désinfection. Les détergents chlorés alcalins sont plus efficaces pour le détachement des biofilms suivis par les détergents alcalins non chlorés (Czechowski et Stoodley, 2002). L'effet du nettoyage alcalin est souligné (Antanio et Frank 2005 ; Vickery et al., 2009 ; Lee et al., 2010). Même le nettoyage enzymatique est améliorée par la solubilisation des enzymes dans un tampon contenant des agents surfactants, dispersant et des chélateurs (Lequette et al., 2010). En effet parmi les agents chimiques pouvant renforcer l'action des détergents, les agents chélateurs tels que l'EDTA biofilm (Donlan et al., 2011 ; Turakhia et al., 1983) ou le dodecyl sulfonate de sodium (SDS) (Hijnen et al., 2012) sont reconnus pour améliorer le détachement du biofilm des surfaces inertes.

Dans leur étude, (Peng et al., 2002), ont également démontré que l'introduction d'un détergent alcalin en amont du CIP provoquait 6.1 réductions logarithmiques contre les 1.47 obtenues avec le CIP traditionnel, dans les biofilms de *B. cereus*. De même, Salutiano et al., (2010), ont montré que les conditions d'un nettoyage/désinfection ayant causé une réduction

de *B. cereus* à un taux minimal (0.85 ufc/cm²), comprenaient un détergent alcalin composé de NAOH, EDTA et dodecyl sulfonate de NA , un détergent acide et un désinfectant chloré. En outre, après ce nettoyage les spores survivantes de *B. cereus* n'étaient plus capables d'adhérer à l'inox. En effet, Il a été montré (Knight et Craven, 2010) que les désinfectants pouvaient altérer la surface des microorganismes influençant leur attachement et leur persistance dans les laiteries. La caractérisation de bactéries après le nettoyage et désinfections dans des laiteries Norvégiennes a montré que les souches les plus résistantes aux désinfectants avaient un degré d'attachement plus faible que celui des souches sensibles (Bore et Langsrud, 2004).

De ce fait, la persistance des souches dans les établissements de transformation des aliments peut-être due à l'adhésion ou à la résistance des souches. Ceci pourrait expliquer, dans nos résultats, la non-adhésion au polystyrène des microplaques de titration des souches laitières de *B. cereus* après le nettoyage acido-basique des biofilms.

Malgré le développement accru des désinfectants, l'hypochlorite de Na reste le produit le plus utilisé en industrie alimentaire (Van houdt et al, 2010). En plus de ses propriétés désinfectantes, le chlore possède aussi une excellente activité détergente (Fukzaki, 2006). Le chlore est reconnu pour causer le détachement du biofilm (Flemming et Ridgwell, 2008) permettant une meilleure accessibilité aux cellules. Raison pour laquelle il est souvent combiné à d'autres désinfectants assurant des niveaux de désinfections plus élevés que ceux obtenus avec chacun des produits seuls (De Queiroz et Day , 2008). Toutefois l'efficacité du chlore est limitée dans les biofilms matures formés de plusieurs couches. Sachant que l'efficacité du chlore dépend du chlore libre disponible (Fukzaki, 2006), celle-ci est diminuée par la réaction du chlore avec les différents composants de la matrice organique. La faible activité du chlore dans les biofilms matures est attribuée, selon Stewart et al., (2001), à la perte d'activité du chlore quand il parvient aux cellules du biofilm plutôt qu' à des problèmes de diffusion. La consommation du chlore libre par les biofilms augmente avec l'âge et la structure du biofilm, le chlore liée combiné à d'autre molécule perd son pouvoir désinfectant et devient inactif (Sommer et al, 1999).

Les résultats obtenus montrent que le maximum de réduction logarithmique est obtenu avec le chlore mais de fortes concentrations, de l'ordre de 0.3%, sont requises puisque même à 0.1%, ce produit était complètement inactif. Ces concentrations sont excessives comparées à celles citées dans la littérature. Peng et al., (2002) obtiennent 2.09 et 2.27 réductions logarithmique sur des biofilms matures (8 jours) pour des concentrations d'hypochlorites très faibles, de l'ordre de 0.0025 et 0.005 % respectivement. Il est connu qu'aux fortes

concentrations le chlore peut générer certaines nuisances telle que la corrosion des matériaux et peut se retrouver dans l'aliment traité.

Les biofilms à espèce unique sont rares, et aussi bien dans la nature que dans le milieu industriel, les biofilms sont constitués d'espèces multiples qui interagissent et s'influencent les unes, les autres. Dans les biofilms mixtes, il a été montré que certaines espèces pouvaient influencer positivement ou négativement la résistance d'autres espèces. Ainsi, la résistance de *B. cereus* est diminuée en présence du biofilm de *P. fluorescens* (Simoes et al., 2007), alors que le biofilm de *Salmonella enterica* augmente la résistance de *L. monocytogenes* (Kostaki et al., 2012). La résistance de *P. fluorescens* au dioxyde de chlore a été augmenté en présence *B. cereus* en biofilm binaire alors que l'effet inverse a été observé pour cette dernière souche (Lindsay et al., 2002). De même le biofilm de *P. fluorescens* a été trouvé plus résistant au glutaraldéhyde que celui formé par *B. cereus* (Simoes et al., 2011). Par contre les biofilms mixte formés par ces deux bactéries ont été trouvés plus résistants à ce désinfectant que les biofilms mono-espèce. Une recroissance des deux types de biofilms a été observée 12 h après les traitements de désinfection.

Même s'ils sont loin de la réalité industrielle, les résultats obtenus dans cette étude confirment l'impact de l'environnement dans la formation des biofilms et leur résistance aux procédures classiques du nettoyage et de la désinfection chimique. Des niveaux de contaminations élevés, associés aux irrégularités de la surface de l'acier inoxydable sont des facteurs d'influence significatifs pour le développement de biofilms consistants et récalcitrants aux procédés visant leur élimination des surfaces industrielles. Un consensus est établi sur l'importance du nettoyage efficace des équipements qui est reconnu être une opération clé dans la lutte contre les biofilms, et qu'il faut optimiser à tous les niveaux.

CONCLUSION

Les bactéries forment des communautés spatiales hautement organisées et résistantes aux agents antimicrobiens : ce sont les biofilms. Dans les industries alimentaires, les biofilms sont une source de contamination qui impacte la qualité hygiénique et sanitaire des aliments transformés, avec des conséquences sur leur durée de vie et la santé du consommateur. La connaissance de la microflore constitutive des biofilms est, de ce fait, un préalable à la mise au point des techniques visant leur élimination des surfaces industrielles.

Dan cette étude, nous avons tout d'abord mis en évidence l'installation, sur les équipements laitiers, d'une flore persistante impossible à éviter connaissant la source de contamination initiale, à savoir la poudre de lait. Ceci a été possible via la caractérisation phénotypique et génotypique de la microflore des biofilms formés l'intérieur du système de canalisations du lait pasteurisé (lactoducs). Les taux de contamination correspondant au nombre de bactéries adhérents par unité de surface ($\log \text{ufc/cm}^2$), ont été évalués par les techniques propres à la microbiologie des surfaces, en termes d'échantillonnage, de culture et de dénombrement des bactéries.

Nous avons également pu montrer que cette flore dominante du biofilm est constituée par des bacilles sporogènes aérobies principalement les bactéries du groupe *Bacillus cereus*, qui ont été affiliées aux groupes phylogénétiques mésophiles selon la classification de Guinebretière et al., (2008). Les résultats du typage moléculaire par M13-PCR ont montré une faible diversité génétique parmi les souches de *B. cereus*, identifiées dans la poudre de lait et sur les équipements. Cette faible diversité semble être due, d'une part, à la poudre de lait, généralement décrite comme peu favorable à la diversité des taxons, d'autre part à la sélection de ces souches et leur adaptation aux conditions environnementales ou niche écologique. En d'autres termes, la flore microbienne homogène du biofilm est le reflet de la qualité de la matière première ainsi que des conditions du processus technologique et du niveau d'hygiène qui prévaut dans cette entreprise de production laitière.

Les potentiels d'adhésion et de formation de biofilm de ces isolats laitiers sur l'acier inoxydable 304 L sont importants. L'adhésion à ce matériau est influencée par l'état physiologique (spores ou cellules végétatives) et le niveau d'encrassement du support tel que montré dans les conditions simulant la propreté et le manque d'hygiène en industrie laitière (lames propres et souillées avec le lait écrémé). La nature de la souillure est, aussi, un facteur d'influence sachant qu'un effet significatif est observé sur l'adhésion à l'inox conditionné de

lactose ou de caséine. Ce résultat est confirmé par les propriétés de surface des spores notamment leur hydrophobicité et leurs propriétés acide-base de Lewis, mesurées par la technique MATS. En effet les spores se répartissent en deux catégories. Elles sont soit hydrophobes, ne montrant aucun caractère donneur d'électrons ou accepteur d'électrons, soit hydrophiles et exprimant un caractère à la fois donneur d'électron et accepteur d'électron. La relation de ces propriétés à l'adhésion à l'inox est déterminée par des corrélations/ régressions qui ont montré que les spores hydrophobes adhèrent préférentiellement à la caséine alors que l'adhésion des spores hydrophiles est favorisée par le lactose. Cette variation dans les propriétés de surfaces des spores appartenant à des souches qui sont génétiquement très proches, (M13-PCR génotype A), pourrait être due à des différences notables dans leurs structures chimiques et morphologiques de surface. Ces génotypes récurrents ont des spores qui les rendent résistants au traitement thermique et au nettoyage et qui possèdent des propriétés d'adhésion responsables de leur persistance dans la chaîne de production.

Le développement de biofilm sur l'acier inoxydable se fait dans les milieux riches tels que le bouillon LB ou le lait entier et le lait écrémé et est influencé par la taille de l'inoculum et l'âge du biofilm. Tels que montrés par les micrographes obtenus au microscope électronique à balayage, ces deux paramètres influencent également la structure et la morphologie du biofilm ainsi que les processus de dispersion /détachement. L'âge du biofilm et la taille de l'inoculum ont aussi un effet significatif sur la résistance des biofilms à l'action des désinfectants utilisés en industrie. Le nettoyage acido-alcalin effectué sur l'inox recouvert de biofilms améliore les performances de ces produits de désinfection, en augmentant la sensibilité des biofilms à leur action.

Ces résultats constituent des indices pour l'industrie laitière pouvant être utilisés dans les mesures de contrôle du biofilm. Celles-ci doivent également tenir compte du fait que la flore microbienne composant le biofilm est composée essentiellement de bacilles sporulés. Les spores de *B. cereus* sont parmi les plus adhérentes aux surfaces inertes et par conséquent les plus difficiles à contrôler. Leur présence dans l'environnement de ces laiteries est préoccupante sachant le rôle des biofilms dans leur dissémination, ce qui crée des réseaux de contamination en boucle dont il est difficile d'en assurer le contrôle. En effet, le système CIP adopté par les laiteries, bien que correct, s'est révélé peu efficace dans l'élimination des bactéries du biofilm, les réductions du nombre de cellules viables étant faibles. En outre, les bactéries non éliminées par le CIP deviennent plus résistantes aux produits chimiques utilisés. Elles peuvent aussi ré-adhérer et former le biofilm. Par ailleurs, les propriétés de surface de

ces spores peuvent aussi être modifiées par les procédures du nettoyage avec des conséquences sur l'aptitude à l'adhésion et la formation de biofilm.

En tenant compte de ces résultats, les actions visant la maîtrise de la contamination du lait pasteurisé dans ces laiteries doivent, cibler l'éradication non seulement du biofilm mais aussi celle de la flore sporulée.

- ✚ L'implantation des bactéries sporulées peut être empêchée en :
 - Limitant leur entrée dans les ateliers de production via la matière première
 - Choissant une méthode appropriée de leur élimination : déclenchement de leur germination ou son inhibition, ou adoption d'un procédé non thermique tel que la microfiltration.
 - Adaptant les traitements thermiques en fonction du procédé d'élimination des spores qui sera choisi.
- ✚ Le contrôle du biofilm doit passer obligatoirement par l'amélioration du système de nettoyage/désinfection, en :
 - renforçant l'étape du nettoyage alcalin,
 - intégrant la désinfection dans le programme du CIP.

Nous proposons ces démarches dans les perspectives de ce travail et préconisons à cet effet :

- Une identification plus rigoureuse de la flore sporogène aérobie notamment les bacilles thermophiles, contaminant la matière première à savoir le lait cru local et la poudre importée ainsi que le produit fini : le lait pasteurisé
- Une caractérisation plus approfondie des souches par rapport à leurs propriétés de thermorésistance, d'adhérence aux surfaces solides et de leur potentiel de production des toxines.
- L'adaptation du système CIP au contrôle du biofilm notamment par la mise au point de traitements de sensibilisation du biofilm à l'égard des agents de nettoyage et des désinfectants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abee T, Groot MN, Tempelaars M, Zwietering M, Moezelaar R, van der Voort M.** 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiol.*, 28:199-208.
- Agarwal A., V. Awasthi, A. Dua, S. Ganguly, V. Garg, S. S. Marwaha.** 2012. Microbiological profile of milk: Impact of household practices. *Indian J Public Health* 56:88-94
- Ahimou F., M. Paquot, P. Jacques , P. Thonart, P. G. Rouxhet.** 2001. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus swbtilis*. *Journal of Microbiological Methods*, 45: 119-126
- Aires GS, Walter EH, Junqueira VC, Roig SM, Faria JA.** 2009. ***Bacillus cereus* in refrigerated milk submitted to different heat treatments.** *J Food Prot* 72: 1301-1305. References and further reading may be available for this article. To view references and further reading you must.
- Alhede M., K. Qvortrup, R. Liebrechts, N. Høiby, M. Givskov, T. Bjarnsholt.** 2012. Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 65:335-42.
- Al-Makhlafi, H., McGuire, J., Daeschel, M.** 1994. Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 3560-3565.
- Ambalam P., K. K. Kondepudi, I. Nilsson, T. Wadström, Å. Ljungh.** 2012. **Bile stimulates cell surface hydrophobicity, Congo red binding and biofilm formation of *Lactobacillus* strains** *FEMS Microbiology Letters*, 333 : 10-19.
- An HY, Friedman RJ.** 1998. **A concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces.** *Biomed. Mater. Res.*, 43: 338-348.
- Andersson, A., and U. Rönnner.** 1998. Adhesion and removal of dormant, heat-activated, and germinated spores of three strains of *Bacillus cereus*. *Biofouling* 13:51-67.
- Ankolekar C, Labbé RG.** 2010. Physical characteristic of spores of food-associated isolates of the *B. cereus* group. *Appl Environ Microbiol* 76: 982-984.
- Antoniou K, Frank JF.** 2005. Removal of *Pseudomonas putida* biofilm and associated extracellular polymeric substances from stainless steel by alkali cleaning. *J. Food Prot.* 68: 277-81.
- Aragon-Alegro LC, Palcich G, Lopes GV, Ribeiro VB, Landgraf M, Destro MT.** 2008. Enterotoxigenic and genetic profiles of *Bacillus cereus* strains of food origin in Brazil. *Food Prot.*, 71:2115-8.
- Araújo EA, Andrade NJ, da Silva LH, Bernardes PC, de C Teixeira AV, de Sá JP, Fialho JF Jr, Fernandes PE.** 2012. Antimicrobial effects of silver nanoparticles against bacterial cells adhered to stainless steel surfaces. *J Food Prot.*, 75: 701-5.
- Araújo P., M.Lemos, F.Mergulhão, L. Melo and M.Simões.** 2011. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *FORMATEX* 2011.
- Arnold JW, Bailey GW.** 2000. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poult Sci.*, 79:1839-45.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D.,** 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.*, 13:202-206.
- Auger S, Ramaro N, Faille C, Fouillet A, Aymerich S, Gohar M** (2009) Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and non pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* 75: 6676-6618.
- Auger S, Krin E, Aymerich S, Gohar M.** 2006. Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 72:937-941.
- Austin, J.W., G. Bergeron.** 1995. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of dairy research* 62: 509-519.
- Azeredo J, Sutherland IW.** 2008. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol.*, 9:261-6.

- Azeredo J., J. Visser, R. Oliveira.** 1999. Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14 : 141–148
- bacterial outer surface. *J Food Prot.*, 64:1542-8.
- Bae YM, Baek SY, Lee SY.** 2008. **Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers.** *Lett Appl Microbiol.* 46:176-80.
- Bagge D., M. Hjelm, C. Johansen, I. Huber, L. Gram.** 2001. *Shewanella putrefaciens* Adhesion and Biofilm Formation on Food Processing Surfaces. *Applied and environmental microbiology.*, 67: 2319–2325.
- Bagge-Ravn D, Ng Y; Hjelm M, Christansen JN, Johansen C, Gram L.** 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries - analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *Int J Food Microbiol* 87: 239-250.
- Bahar O. , T. Goffer, S. Burdman.** 2009. Type IV Pili Are Required for Virulence, Twitching Motility, and Biofilm Formation of *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*. *MPMI*, 22 : 909–920.
- Bakker DP, Klijstra JW, Busscher HJ, van der Mei HC.** 2003. The effect of dissolved organic carbon on bacterial adhesion to conditioning films adsorbed on glass from natural seawater collected during different seasons. *Biofouling*, 19: 391-7.
- Bakker D. P, H. J. Busscher, J. van Zanten, J. de Vries J. W. Klijstra, H. C. van der Mei.** 2004. Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coatings after reconditioning film formation in the marine environment. *Microbiology*, 150: 1779–1784.
- Banyakó J, Vyletelová M.** 2009. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Lett Appl Microbiol* 48: 318-323.
- Barbano DM, Santos MV.** 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf-life. *J Dairy Sci* 89: 15-29.
- Bartoszewicz M., B.M. Hansen and I. Swiecicka.** 2008. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food microbiology*, 25: 588-596.
- Bayoudh S, Othmane A, Mora L, Ben Ouada H. 2009. **Assessing bacterial adhesion using DLVO and XDLVO theories and the jet impingement technique.** *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 73 :1-9.
- Bazaka K., M.V. Jacob, R. J. Crawford, E. P. Ivanova.** 2012. Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95: 299-311.
- Bellon-Fontaine MN, Mozes N, van der Mei HC, Sjollem J, Cerf O, Rouxhet PG, Busscher HJ.** 1990. A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophys.*, 17:93-106.
- Bellon-Fontaine M.N., Rault J., Van Oss C.J.** 1996. Microbial adhesion to solvents, a novel method to determine the electron–donor/electron–acceptor or Lewis acid–base properties of microbial cells. *Colloid. Surface. B.*, 7: 47-53.
- Beloin C., A. Houry, M. Froment, J.-M. Ghigo, N. Henry.** 2008. A Short–Time Scale Colloidal System Reveals Early Bacterial Adhesion Dynamics. *Plos Biology*, 6, e167.
- Bendinger B, Rijnaarts HHM, Altendorf K AJB Zehnder.** 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3973-397.
- Bénézech T., C. Lelièvre, J.M. Membré, A.-F. Viet, C. Faille.** 2002. A new test method for in-place-cleanability of food processing equipment. *Journal of food engineering*, 54: 7-15.
- Bernardes P. C., N. J. de Andrade, S. O. Ferreira, J.P. N. de Sá, E. A. Araújo, D. M. Z. Delatorre, L. M. Pinheiro Luiz.** 2010. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate of *Bacillus cereus* from a dairy plant. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 984-992
- Bernbom N, Ng YY, Jørgensen RL, Arpanaei A, Meyer RL, Kingshott P, Vejborg RM, Klemm P, Gram L.** 2009. Adhesion of food-borne bacteria to stainless steel is reduced by food conditioning films. *J Appl Microbiol.* 106: 1268-79.
- Best M, ME Kennedy, F Coates.** 1990. Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. *Applied and environmental microbiology* 56: 377-380
- Bhardwaj SB, Mehta M, Gauba K.** 2009. **Nanotechnology: role in dental biofilms.** *Indian J Dent Res.*, 20:511-3.

- Blanpain-Avet P. , C. Faille, G. Delaplace, T. Bénézech.** 2011. Cell adhesion and related fouling mechanism on a tubular ceramic microfiltration membrane using *Bacillus cereus* spores. *Journal of Membrane Science* 385–386: 200–216.
- Boks N. P. W. Norde, H. C. van der Mei, H. J. Busscher.** 2008. Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiology*, 154: 3122–3133
- Bore, E., and S. Langsrud .** 2005. Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. *J. Appl. Microbiol.* 98: 96-105.
- Bos, R. H C Van der Mei, J Gold, H J Busscher. **2000. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett. ,189: 311-5.**
- Botton S, Verliefe AR, Quach NT, Cornelissen ER. **2012. Influence of biofouling on pharmaceuticals rejection in NF membrane filtration. Water Res. 15;46: 5848-60.**
- Boulange-Petermann L., B.Baroux, M.N. Bellon-Fontaine.** 1993. The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion.. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 7: 221-230.
- Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R.** 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol.*, 59:1229-38.
- Bremer P.J., S. Fillery, and A.J. McQuillan.** 2006. Laboratory scale clean in place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International journal of food microbiology* 106: 254-262.
- Bremer PJ, Seale B, Flint S, Palmer J.** 2009. Biofilms in dairy processing. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, IV, editors. *Biofilms in the food and beverage industries*. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head, p 396–431.
- Brigmon R. L., C. Berry, R.N. Singh, R. J. Narayan.** 2012. Applications of Biotechnology in Development of Biomaterials: Nanotechnology and Biofilms. *Journal of the South Carolina Academy of Science*, 9: 33.
- Brooks J.D., and S.H. Flint.** 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International journal of food and science technology* vol. 43 (12): 2163-2176.
- Brossard KA, Campagnari AA.** 2012. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun.* ,80: 228-33.
- Bruellhoff K, Fiedler J, Möller M, Groll J, Brenner RE.** 2010. Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces. *Int J Artif Organs.*, 33: 646-53.
- Burfoot D., K.E. Middleton and J.T. Holah.** 2009. Removal of biofilms and stubborn soil by pressure washing. *Trends in Food Science & Technology* 20 S45eS47.
- Burgess S. A., D. Lindsay, S. H. Flint.** 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *Journal of microbiological methods* vol. 144 (2): 215-225.
- Burrows L.L.** 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu. Rev. Microbiol.*, 66:493–520.
- Busscher H. J. ,A. H. Weerkamp.** 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrats. *FEMS microbiology letters*, 1: 163-166.
- Caiazza, N. C., Merritt, J. H., Brothers, K. M. O'Toole, G. A. 2007.** Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 189, 3603–3612
- Caixeta D. S., T. H. Scarpa, D. F. Brugnera, D. O. Freire, E. Alves, L.R. de Abreu, R. Hilsdorf Piccoli.** 2012. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 32: 142-150.
- Cardazzo B., E. Negrisolo, L. Carraro, L. Alberghini, T. Paternello, v. Giaccone.** 2008. Multiple locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food borne isolates. *App. and Env. Microbiol.*, 74: 850-860.
- Carlin, F., M. H. Guinebretiere, C. Choma, R. Pasqualini, A. Braconnier, and C. Nguyen-The.** 2000. Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurized and chilled vegetable pureés. *Food Microbiol.* 17:153–165.
- Carlin F, Brillard J, Broussolle V, Clavel T, Duport C, Jobin M, Guinebretière MH, Auger S, Sorokine A, Nguyen-The C.** 2009. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food research international* 43: 1885-1894.
- Carpentier B., O. Cerf.** 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygien in the food industry-a review. *Journal of applied bacteriology*, 75: 499-511.

- Carpentier, B., A.C.L. Wong, O. Cerf.** 1998. Biofilms on dairy plants surfaces: what's new. Bulletin of the IDF 329.
- Carpentier B, Cerf O.** 2011. Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int. J. Food Microbiol. 145:1-8.
- Castellanos T., F. Ascencio, Y. Bashan.** 1997. Cell-surface hydrophobicity and cell-surface charge of *Azospirillum* spp. FEMS Microbiology Ecology 24: 159-172
- Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliveira R, Azeredo J. **2005. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. Res Microbiol. 156: 506-14.**
- Ceri H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. M. Orck, A. Buret.** 1999. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. Journal of clinical microbiology, 37:1771-1776.
- Chracklis W. C., K. C. Koosey.** 1983. Biofilms and microbial fouling. Adv. Appl. Microbiol. 29: 93-137.
- Chaturongkasumrit, Y. H. Takahashi, S. Keeratipibul, T. Kuda, B. Kimura.** 2011. The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. Food Control, 22 : 1893-1899.
- Chaves JQ, Pires ES, Vivoni A Marcos.** 2011. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *B. cereus* isolated from food in Brazil over three decades. Int J Food Microbiol 147: 12-16.
- Chen Y, Busscher HJ, van der Mei HC, Norde W.** 2011. Statistical analysis of long- and short-range forces involved in bacterial adhesion to substratum surfaces as measured using atomic force microscopy. Appl Environ Microbiol. 77: 5065-70.
- Chia T. W. R. V. T. Nguyen, T. McMeekin, N. Fegan, G.A. Dykes.** 2011. Stochasticity of bacterial attachment and its predictability by extended DLVO theory. Applied and environmental microbiology, 77: 3757-3764.
- Chmielewski R.A.N., and J.F. Frank.** 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive reviews in food science and food safety Vol. 2: 23-32.
- Choi, Y. C., E. Morgenroth.** 2003. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. Water Sci. Technol. 47:69-76.
- Chon JW, Kim JH, Lee SJ, Hyeon JY, Seo KH.** 2012. Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik. . Food Microbiol. 32:217-22.
- Chopra A.K., D . K. Mathurd.** 1984, Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products. Journal of Applied Bacteriology 57, 263-271
- Chorianopoulos NG, Giaouris ED, Skandamis PN, Haroutounian SA, Nychas GJ. **2008. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. J Appl Microbiol. 104(6):1586-96.**
- Christensen B. E., H. N. Trønnes, K. Vollan, O. Smidsrød R. Bakke. **1990. Biofilm removal by low concentrations of hydrogen peroxide. Biofouling, 2: 165-175.**
- Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, Kroll G, Schulze C, Buck F, Mack D, Aepfelbacher M, Rohde H.** 2010. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. Mol Microbiol., 75:187-207.
- Compère C, M-N Bellon-Fontaine, P Bertrand, D Costa, P Marcus, C Poleunis, C-M Pradier^e, B Rondot^f & M G Walls.** 2001. Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research, 17: 129-145.
- Conibear T.C.R., S. L. Collins, J.S. Webb.** 2009. Role of Mutation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. PLoS ONE 4(7): e6289.
- Coorevits A, Dinsdale AE, Halket G, Lebbe L, De Vos P, Van Landschoot A, Logan NA.** 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol., 62(Pt 7):1470-

- Coorevits A., De Jonghe V., Vandroemme J., Reekmans R., Heyrman J., Messens W., De Vos P., Heyndrickx M.** 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional farms. *Syst. Appl. Microbiol.*, 31: 126-40.
- Cortizo MC, de Mele MFL.** 2003. Microstructural characteristics of thin biofilms through optical and scanning electron microscopy. *World journal of microbiology and biotechnology*, 19: 805-810.
- Costerton J. W. G.G. Geesey, K.J. Cheng.** 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, 238: 86-95.
- Costerton J.W., J.J. Cheng, G.G. Geesey, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta, T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual reviews of microbiology*, 41: 435-464.
- Costerton J. W., Z lewandowski, D.E. Caldwell, D. R. Corber, H.M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Annual reviews of microbiology*, 49: 711-745.
- Costerton J. W., P. S. Stewart, E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284: 1318-1322.
- Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR.** 2005. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs.*, 28:1062-8.
- Cotter PD, Hill C.** 2003. Surviving to acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:429-453.
- Czaczyk K, K. Myszka.** 2007. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances(EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation *Polish J. of Environ. Stud.*, 16 : 799-806.
- Czechowski M. H., P Stoodley.** 2002. Antimicrobials and biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29: p325.
- Davey ME, O'toole GA.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 64:847-67.
- De Jonghe V, Coorects A, De Block J, Van Coillie E, Grijspeerdt K, Herman L, De Vos P, Heyndrickx M.** 2010. Toxigenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int J Food Microbiol* 136: 318-25.
- De Kievit TR.** 2009. Quorum sensing in *P. aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 11: 279-88.
- De Oliveira M. M. M., D. F. Brugnera; E. Alves; R. Hilsdorf Piccolil,** 2010. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Braz. J. Microbiol.*, 41-106.
- DeQueiroz GA, Day DF.** 2012. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *J Antimicrob Chemother*, 67:1589-96.
- De Vries YP, Van Der Voort M, Wijman J, Van Shalk W, Hornstra LM, De Vos WM, Abee T.** 2004. Progress in food-related research focusing on *Bacillus cereus*. *Microbes Environ.* 19:265-269.
- Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE.** 2006. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Applied and environmental microbiology*, 72:2837-2848.
- Didelot X, Barker M, Falush D, Priest FG.** 2009. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst Appl Microbiol* 32: 81-90.
- Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B.** 2007. In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci.*, 115: 459-67.
- Djeribi R., W. Bouchloukh, T. Jouenne, B. Mena.** 2012. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *American Journal of Infection Control* xxx (2012) 1-6
- Djordjevic D., M. Wiedmann, L. A. McLandsborough.** 2002. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied and environmental microbiology*, 68 : 2950–2958.
- Dohnalkova, A.C. M.J. Marshall, B. W. Arey, K. Williams, E.C. Buck, J. K. Fredrickson.** 2011. Imaging Hydrated Microbial Extracellular Polymers: Comparative Analysis by Electron Microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 77: 1254-1262.
- Donlan R.M.** Biofilm: microbial life on surfaces. 2002. *Emerg Infect Dis.*, 8: 881-90.
- Donlan, R.M., and J.W. Costerton.** 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, Vol.15 (2): 167-193.
- Donlan RM.** 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol.*, 17:66-72.

- Donlan RM.** 2011. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clin Infect Dis.*, 52:1038-45.
- Doyle RJ.** 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes Infect.* 2: 391-400
- Driks A.** 2007. Surface appendages of bacterial spores. *Molecular Microbiology*, 63 : 623–625
- Dunlop P, Oliver L, Byrne T, McAdams E.** 2005. Detection and removal of pathogenic biofilms on medical implant surfaces. *Stud Health Technol Inform.* 117:213-7.
- Durr H.** 2007. Influence of Surface Roughness and Wettability of Stainless Steel on Soil Adhesion, Cleanability and Microbial Inactivation. *Food and Bioproducts Processing*, 85: 49-56.
- Efimochkina NR, Batishcheva Slu, Bykova IB, Sheveleva SA.** 2012. The significance of some potentially pathogenic microorganisms in occurrence of food toxicoinfections. Report 2. Assessment of the role of toxigenic strains of *Bacillus cereus*. *Vopr Pitan.* 81:24-9.
- Ehling-schulz M, Svensson B, Guinebretière MH, Lindback T, Anderson M, Schulz A, Fricker M, Christiansson A, Granum PE, Martlbauer E, Nguyen-The C, Salinkoja-Salonen M, Scherer S.** 2005. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 15: 183-97.
- Elangovan T, George RP, Kuppusami P, Mangalaraj D, Bera S, Mohandas E, Kim DE.** 2012. Development of a CrN/Cu nanocomposite coating on titanium-modified stainless steel for antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling.*, 28: 779-87.
- Elhariry H.M.** 2011. Attachment strength and biofilm forming ability of *B. cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food Microbio.*, 28: 1266-74.
- Elwell MW, Barbano DM.** 2006. Use of microfiltration to improve fluid milk quality. *J Dairy Sci.*, 89 Electronic Supplement: E20-E30.
- Eneroth A, Svensson B, Moli G, Christiansson A.** 2001. Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. *J Dairy Res* 68: 189-196.
- Epstein A. K., B. Pokroy, A. Seimanar, J. Aizenberg.** 2011. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting end gas penetration. 108:995-1000.
- Erbil H. Y.** 2011. Bacterial Adhesion to Low Energy Solid Surfaces: A Surface Thermodynamics Approach. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 25: 2137-2153.
- Fagerlund A., J. Brillard, R. Fürst, M.-H. Guinebretière P. E. Granum.** 2007. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiology*, 7:43.
- Faille C., F. Fontaine, T. Bénézech.** 2001. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *Journal of applied microbiology* 90: 892-900.
- Faille C, Jullien C, Fontaine F, Bellon-Fontaine MN, Slomianny C, Bénézech T.** 2002. Adhesion of *Bacillus cereus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can. J. Microbiol.* 48:728-38.
- Faille C, Carpentier B.** 2009. Food contact surfaces, surface soiling and biofilm formation. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, IV, editors. *Biofilms in the food and beverage industries*. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head Publishing Limited. p 304–30.
- Faille C, Lequette Y, Ronse A, Slomianny C, Garénaux E, Guérardel Y.** 2010 a. Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus cereus* spores surrounded or not with an exosporium Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* 143:125-135.
- Faille C, Sylla Y, Le Gentil C, Bénézech T, Slomianny C, Lequette Y.** 2010 b. Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. *Food Microbiology* 27:769-776.
- Faille, T. Bénézech, W. Blel, A. Ronse, G. Ronse, M. Clarisse, C. Slomianny.** 2013. Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. *Food microbiology*, 33: 179-157.
- Falentin-Daudré C., E. Faure, T. Svaldo-Lanero, F. Farina, C. Jérôme, C. Van De Weerd, J. Martial, A.S. Duwez, C. Detrembleur.** 2012. Antibacterial Polyelectrolyte Micelles for Coating Stainless Steel. *Langmuir*, 28: 7233–7241
- Fatemi P., J.F. Frank.** 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/ *Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of food protection*, 62: 761-765.

- Flemming H.-C.** 2008. Why Microorganisms Live in Biofilms and the Problem of Biofouling. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Flemming H.C., H. Ridgway.** 2008. The dynamic antimicrobial action of chlorine, a quaternary ammonium compound, glutaraldehyde, and Biofilm Control: Conventional and Alternative Approaches. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi:10.1128/AAC.01734-09.
- Flemming HC, J Wingender.** 2010. The biofilm matrix. Nature reviews Microbiology, 8: 623-633.
- Flint S., J. Palmer, K. Bloemen, J. Brooks R. Crawford.** 2001. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. Journal of Applied Microbiology, 90: 151- 157
- Flint, S.H. P. J. Bremer, J. D. Brooks.** 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. Biofouling, Vol. 11, issue 1: 81-97.
- Flint, S.H.; Brooks, J.D.; Bremer, P.J.** 2000. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. J.Food Eng. 43: 235-242.
- Forsyth, G., N.A. Logan, P. De Vos,** 1998. Revue taxonomique du genre *Bacillus*. Bull. Soc. Fr. Microbiol., 13: 114-129.
- Francolini I, Donelli G. **2010. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 59:227-38.**
- Frank J.F., R.A. Koffi.** 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactants, sanotizers and heat. J. Food Protection, 53: 550-554.
- Fritze D.,** 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera : The Aerobis Endospore-Forming Bacteria. The American Phytopathology Society, Vol. 94, No. 11 : 1245-1248.
- Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM.** 2009. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. Antimicrob Agents Chemother., 54:397-404
- Fukuzaki S. 2006. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. Biocontrol sci., 11: 147-157.**
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P.** 2005. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol., 13: 34-40.
- Galopin E, Piret G, Szunerits S, Lequette Y, Faille C, Boukherroub R.** 2010. Selective adhesion of *Bacillus cereus* spores on heterogeneously wetted silicon nanowires. Langmuir., 26: 3479-84.
- Ghelardi, E. F. Celandroni, S. Salvetti, C. Barsotti, A. Baggiani S. Senesi.** 2002. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. FEMS microbiology letters, 208: 129-134.
- Gibson, H., J.H. Taylor, K.E. Hall, and J.T. Holah.** 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in term of removal of bacterial biofilms. J. applied microbiology 87: 41-48.
- Gilbert E. S., J.D. Keasling.** 2004. **Bench Scale Flow Cell for Nondestructive Imaging of Biofilms.** Methods in Biotechnology, 16: 109-118.
- Giotis ES, Blair IS, McDowell DA.** 2009. Effect of short-term alkaline adaptation on surfaces properties of *Listeria monocytogenes* 10403S. The open food science journal **3**: 62-65.
- Gottenbos B., H.C. van der Mei, H. J. Busscher.** 1999. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. Methods in Enzymology, 310: 523-33.
- Gounina-Alouane R, V. Broussole, F. Carlin.** 2008. Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrient inosine and L-alanine on *B. cereus* spore germination. Food microbiology 25, 202-206.
- Guinebretière MH, Berge O, Normand P, Morris C, Carlin F, Nguyen-The C.** 2001. Identification of bacteria in pasteurized Zucchini purée stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. Appl Environ Microbiol 67: 4520-4530.
- Guinebretière MH, Nguyen-The C.** 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. FEMS Microbiology Ecology 43: 207-215.
- Guinebretiere, M. H. and V. Sanchis .** 2003. "*Bacillus cereus sensu lato*." Bulletin de la société Française de Microbiologie 18: 95-103.

- Guinebretière MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-schulz M, Svensson B, sanchis V, Nguyen-The C, Heyndrickx M, De Vos P.** 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology* 10: 851-865.
- Guinebretière MH, Velge P, couvert O, Carlin F, debuyser ML, Nguyen-The C.** 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J of Clinical microbial* 48: 3388-3391.
- Guinebretiere MH, Auger S, Galleron N, Contzen M, De Sarrau B, De Buyser ML, Lamberet G, Fagerlund A, Granum PE, Lereclus D, De Vos P, Nguyen-The C, Sorokin A.** 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63: 31-40.
- Hall-Stoodley, Luanne, Rayner, Joanna C., Stoodley P. and Lappin-Scott, H.M.** (1999) Establishment of experimental biofilms using the modified robbins device and flow cells. In, Edwards, C. (ed.) *Environmental Monitoring of Bacteria.* New York, US, Humana Press, 307-319.
- Hamadi F., H. Latrache, A. El Ghmari, M. El louali, M. Mabrouki, N. Kouider.** 2004. Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology,* 54: 213-225.
- Hamadi F., H. Latrache.** 2008. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor–electron acceptor (acid–base) properties of bacterial surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 65 (2008) 134–139
- Hamadi F, H. Latrache, H. Zahir, S. El Abed, M. Ellouali and I. k. Saad.** 2012. The Relation between the surface Chemical Composition of *Escherichia coli* and their Electron Donor/ Electron Acceptor (Acid-base) Properties. *Research Journal of Microbiology* 7: 32-40.
- Hansan E. H., L. Albertsen, T. Schaffer, C. Johansen, J. C. Frisvad, S. Molin, and L. Gram.** 2003. *Curvularia* Haloperoxidase: Antimicrobial Activity and Potential Application as a Surface Disinfectant. *Applied and environmental microbiology,* 69:4611–4617.
- Hanson ML, Wendorff WL, Houck KB.** 2005. Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. *J. Food Protec.* 68 (7): 1484-1486.
- Harmon SM, Kautter DA, Lancette G.** 1991. Lipid globule staining to aid in differentiating *Bacillus* species. *J. Assoc Off Anal Chem.* 74 :649-51.
- Haussler S.** 2010. Multicellular signalling and growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol.* 300: 544-8.
- Hazan Z., J. Zumeris, H. Jacob, H. Raskin, G. Kratysh, M. Vishnia, N. Dror, T. Barliya, M. Mandel, G. Lavie.** 2006. Effective Prevention of Microbial Biofilm Formation on Medical Devices by Low-Energy Surface Acoustic Waves. *Antimicrobial agents and chemotherapy,* 50: 4144–4152.
- Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A., Kolstø, A.B.,** 2004. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 191e201.
- Helke DM, Somers EB, Wong ACL.** 1993. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. *J. Food Protection,* 56: 479-484.
- Hendry E. R., T. Worthington, B. R. Conway and P. A. Lambert.** 2009. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64, 1219–1225.
- Hermansson M.** 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14, 105–119
- Heydorn A., A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersbøll, S. Molin.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT *Microbiology,* 146: 2395–2407.
- Hijnen WAM., C. Castillo, A.H. Brouwer-Hanzens D.J.H. Harmsen E.R. Cornelissen, D. van der Kooij.** 2012. Quantitative assessment of the efficacy of spiral-wound membrane cleaning procedures to remove biofilms. *Water research,* 46: 6369-6381.

- Hilbert L R, D Bagge-Ravn' J Kold', L Gram.** 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International journal of biodeterioration and biodegradation*, 52: 175-185.
- Holbrook, R., Anderson, J. M.** 1980. An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Canadian Journal of Microbiology*, 26 . 753-759.
- Honraet K., Nelis H.J.,** 2006. Use of the modified Robbins device and fluorescent staining to screening plant extracts for the inhibition of *S. mutans* biofilm formation. *Journal of microbiological method* 64: 217-224.
- Hood S.K., E.A. Zottola.** 1995. Biofilms in food processing. *Food control*, 6: 9-18.
- Hori K, Matsumoto S.** 2010. Bacterial adhesion : from mechanism to control. *Biochemical engineering journal*, 48: 424-434.
- Hornstra LM., P.L. de Leeuw, R. Moezelaar, E.J. Wolbert, Y.P. de Vries, W.M. de Vos, and T.Abee.** 2007. Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. *Int. J. Food microbio.* 116: 367-71.
- Hou W, Sun X, Wang Z, Zhang Y.** 2012. **Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 53: 5624-31.
- Houry A., R. Briandet, S. Aymerich¹ and M. Gohar.** 2010. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation *Microbiology*, 156: 1009–1018.
- HØiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O.** 2010. Antibiotic résistance of bacterial biofilms. *Int.j. Antimicrob Agents*, 35 (4); 322-32.
- Hsueh, Y.H. E. B. Somers, D. Lereclus, A. C. L. Wong.** 2006. Biofilm Formation by *Bacillus cereus* Is Influenced by PlcR, a Pleiotropic Regulator. *Appl Environ Microbiol.* 72: 5089–5092. Department of Food Microbiology and Toxicology, Food Research Institute, University of Wisconsin, 1925 Willow Drive, Madison, Wisconsin 53706,¹ Unité Génétique Microbienne et Environnement, Institut National de la Recherche Agronomique, La Minière, 78285 Guyancourt Cedex, France²
- Huck JR, BH Hammond, Murphy SC, Woodcock NH, Boor KJ.** 2007. Tracking Spore-Forming Bacterial Contaminants in Fluid Milk-Processing Systems. *J Dairy Sci* 90: 4872-4883.
- Husmark U, Ronner U.** 1992. The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. *Biofouling* 5:330-334.
- Jacobs A, Lafolie F, Herry JM, Debroux M.** 2007. Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: cell surface properties and adhesion rate. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 59:35-45.
- Jain A, Bhosle NA.** 2009. Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion *Biofouling*, 25: 13-19.
- Janakiraman V, Englert D, Jayaraman, A, BaskaranH.** 2009. Modeling growth and quorum sensing in biofilm grown in microfluidic chamber. *Ann. Biomed Eng.*, 37: 1206-16.
- Jang A. J. Szabo . A. A. Hosni, M. Coughlin, P. L. Bishop.** 2006. Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection *Applied microbiology and biotechnology*, 72:368-376.
- Johansen C., P. Falholt, L. Gram.** 1997. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3724-3728.
- Johnson L.R.** 2013. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 251 : 24-34.
- JØrgensen TM, Haagenen J, Sternberg, C, Molin S.** 2003. Quantification of medical structure from confocal imaging. Summary, medical vision day at DTU.
- Josefsen M.** 2012. MogR regulates flagellar synthesis, cell motility and biofilm formation in the *Bacillus cereus* group. <https://www.duo.uio.no/handle/123456789/34315>.
- Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmüller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C.** 2010. Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel *in situ*. *Journal of Microbiological Methods.*, 81:166-174.
- Jung M. Y., J.S. Kim, W. K. Paek, J. Lim, H. Lee, P. Kim, J. Y. Ma, W. Kim, Y.H. Chang.** 2011. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a New Member of the *Bacillus cereus* Group Isolated from Foreshore Tidal Flat Sediment. *The Journal of Microbiology*, 49: 1027-1032.

- Kamali A., M. Ahmadzade, K. Behbodi.** 2011. Investigation on biofilm formation stages in some strains of *Pseudomonas fluorescens* and the influence of some nutritional factors on biofilm formation of selected strain. Iran. J. Plant Path., 47: 153-154.
- Kamlesh A. A R. Nannapaneni.** 2010.. Removal of *Listeria monocytogenes* Biofilms with Bacteriophage P1003. 2010. Journal of Food Protection, 73: 1519–1524.
- Karatan E, Watnick p.** 2009. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms Microbiol Mol Biol Rev., 73: 310–347.
- Karanukaran E, Biggs CA.** 2011. Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89:1161-75.
- Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B. and Biggs, C.A.** 2011. "Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. Appl. Microbiol Biotechnol 90, 1869-1881.
- Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F.** 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-materials interactions. European Cells and Materials, 8: 37-57.
- Kayahan E., H.Oktemb, F. Hacizade , H. Nasibov , O. Gundogdu.** 2010. Measurement of surface roughness of metals using binary speckle image analysis. Tribology International 43:307–311
- Kharazmi A, Giwercman B, Højby N.** 1999. Robbins device in biofilm research. Methods Enzymol. 310 :207-15.
- Kim L.** 2001. Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy, 45: 999-1007.
- Kim A.S.', H. Chen, R. Yuan.** 2006. EPS biofouling in membrane filtration: An analytic modeling study. Journal of Colloid and Interface Science, 303: 243-249.
- Kim J., J.S. Hahn, M.J. Franklin, P.S. Stewart, and J. Yoon.** 2008. Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. Journal of antimicrobial chemotherapy, 63: 129-135.
- Kim JB, Jeong HR, Park YB, Kim JM, Oh DH.** 2010. Food poisoning associated with emetic-type of *Bacillus cereus* in Korea. Foodborne Pathog Dis., 7:555-63.
- Kim J., H.D. Park, S. Chung.** 2012. Microfluidic Approaches to Bacterial Biofilm Formation. Molecules, 17: 9818-9834.
- Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aes-Jørgensen, S. Molin T.Tolker-Nielse.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Molecular Microbiology, 48: 1511–1524.
- Klavnes A. T. Stalheim, O. Sjøvold, K. Josefsen, P.E. Granum.** 2002. Attachment of *Bacillus Cereus* Spores With and Without Appendages to Stainless Steel Surfaces. Food and Bioproducts Processing, 80: 312–318
- Knight G.C., H.M. Craven.** 2010. A model system for evaluating surface disinfection in dairy factory environments. International Journal of Food Microbiology 137: 161–167
- Knowles J, Roller S.** 2001. Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. Food Prot., 64:1542-8.
- Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R.** 2010. D-amino acids trigger biofilm disassembly. Int J Med Microbiol., 300: 544-8.
- Kokare C. R., S.Chakraborty, CA. N. Khopade, K. R. Mahadik.** 2009. Biofilms importance and application. Indian journal of biotechnology, 8: 159-168.
- Kostaki M, Chorianopoulos N, Braxou E, Nychas GJ, Giaouris E.** 2007. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. J Appl Microbiol. 103:794-802.
- Kreft J.-U. ,J.W.T. Wimpenny.** 2001. Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. Water Science and Technology, 43: 135–141.
- Krekeler C, Ziehr H, Klein J.** 1989. Physical methods for characterization of microbial surfaces. Experientia. 45(11-12):1047-55.
- Krogfelt KA.** 1991. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. Rev Infect Dis., 13:721-35.

- Kusumaningrum, H. D., G. Riboldi, W.C. Hazeleger, and R.R.O Beumer.** 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International journal of food microbiology* 85: 227-236.
- Lai S.,J. Tremblay, Eric Déziel. **2009. Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental Microbiology*, 11: 126-136.**
- Langsrud S., B. Baardsen, G. Sundheim 2000. Potentiation of the lethal effect of peroxygen on *Bacillus cereus* spores by alkali and enzyme wash *International Journal of Food Microbiology* 56 :81–86.
- Langsrud S., B. Baardsen, G. Sundheim.** 2000. Potentiation of the lethal effect of peroxygen on *Bacillus cereus* spores by alkali and enzyme wash. *International Journal of Food Microbiology* 56 : 81–86
- Langsrud S., M.S. Sidhu, E. Heir' A.L. Holck.** 2003. Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation, Hygiene and Disinfection*, 51: 283-290.
- Lapidus A, Goltsman E, Auger S, Galleron N, Ségurens B, Dossat C, Land ML, Broussolle V, Brillard J, Guinebretiere MH, Sanchis V, Nguen-The C, Lereclus D, Richardson P, Wincker P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A.** 2008. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem Biol Interact.*, 171: 236-49.
- Lawrence J.R., P.J. Delaquis, D.R. Korber, D. E. Cadwell.** 1987. Behaviour of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironment. *Microbial ecology*, 14: 1-14.
- Lebert I, Leroy S, Talon R.** 2012. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Appl Environ Microbiol.*, 78:2586-95
- Lee M. J., J.H. Ha, Y.S. Kim, J.H Ryu, and S.D Ha.** 2010. Reduction of *Bacillus cereus* Contamination in Biofilms on Stainless Steel Surfaces by Application of Sanitizers and Commercial Detergent. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 53: 89-93
- Lee N, Sun JM, Kwon KY, Kim HJ, Koo M, Chun HS.** 2012. Genetic diversity, antimicrobial resistance, and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from SunsikJ Food Prot. **75:225-30.**
- Le Gentil C., Y. Sylla, et C. Faille.** 2010. Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *Journal of food engineering* 96: 37-42.
- Lemon K., P, Darren E. Higgins, R. Kolter.** 2007. Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Journal of bacteriology*, 189: 4418–4424.
- Lequette Y, Boels G, Clarisse M, Faille C. **2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 26:421-31.**
- Lequette Y, Garénaux E, Tauveron G, Dumez S, Perchat S, Slomianny C, Lereclus D, Guérardel Y, Faille C. **2011. Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology* 77:4905-4911.**
- Leslie A.** 2011. Preventing biofilm formation using microbes and their enzymes. *Basic Biotechnology*, 7:6-11.
- Li, B. B.E. Logan.** 2004. Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 36: 81–90.
- Li Y., G. Hao, C. D. Galvani, Y. Meng, L. De La Fuente, H. C. Hoch, T. J. Burr.** 2007. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell–cell
- Lin S, Schraft H, Odumeru JA, Griffiths MW.** 1998. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int J Food Microbiol* 43: 159-171.
- Lindsay D, Brözel VS, Mostert JF, von Holy A.** 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *J Appl Microbiol.*, 92:352-61.
- Lindsay D, Brozel VS, Mostert JF, von Holy A.** 2000. Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide pH range. *J. Food Microbiol.* 54:49-62.
- Lindsay D, Oosthizen MC, Brozel VS, von Holy A.** 2002. Adaptation of a neutrophilic dairy-associated *Bacillus cereus* isolate to alkaline pH. *J. Appl. Microbiol.* 92:81-9.
- Linley E, Denyer SP, McDonnell G, Simons C, Maillard JY. **2012. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Int J Food Microbiol.* 153: 465-473.**
- Little B, Wagner P, Ray R, Pope R, Scheetz R. **1991. Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts during SEM preparation. *Journal of industrial microbiology*, 8: 213-222.**

- Logan, N. A., R. C. W. Berkeley. 1984.** Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.* 130:1871–1882.
- López D, Vlamakis H, Kolter R.** Biofilms. 2010. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, a000398.
- Lorite GS, Rodrigues CM, de Souza AA, Kranz C, Mizaikoff B, Cotta MA.** 2011. The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci.* 359:289-95.
- Løvdaal IS, Hovda MB, Granum PE, Rosnes JT.** 2011. Promoting *Bacillus cereus* spore germination for subsequent inactivation by mild heat treatment. *J Food Prot.*, 74:2079-89.
- Lowery CA, Dickerson TJ, Janda KD.** 2008. Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. *Chem Soc Rev.*, 37: 1337-46.
- Lowery CA, Park J, Kaufmann GF, Janda KD.** 2008. An Unexpected Switch in the Modulation of AI-2-Based Quorum Sensing Discovered through Synthetic 4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione Analogues. *J Am Chem Soc.*, 130:9200–9201
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K.** 2009. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathog* 5(3): e1000354.
- Madaeni S.S., M. Yasemi, A. Delpisheh.** 2011. Milk sterilization using membranes. *Journal of Food Process Engineering*, 34: 1071-1085.
- Mah T.-F.** 2012. Regulating Antibiotic Tolerance within Biofilm Microcolonies. *Journal of Bacteriology*, 194: 4791–4792.
- Mah TF, O'Toole GA.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.*, 9:34-9.
- Mann, E. E., and D. J. Wozniak.** 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche
- Marchand, S. J. De Block, V.e De Jonghe, A. Coorevits, M. Heyndrickx, L. Herman.** 2012. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 133-147.
- Marion K, Freney J, James G, Bergeron E, Renaud FN, Costerton JW.** 2006. Using an efficient biofilm detaching agent: an essential step for the improvement of endoscope reprocessing protocols. *J Hosp Infect.*, 64 :136-42.
- Maris, P.** 1992. Biofilm and disinfection of microorganism carrier-surface method. *Sciences des aliments.* 12: 721-728.
- Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW.** 1982. Scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation.*, 66:1339-41.
- Marsh E.J, H. Luo, H. Wang.** 2003. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities *FEMS Microbiology Letters*, 228: 203-210.
- Marshall K. C. R., Stout, R. Mitchell.** 1971. Mechanism of the initial event in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of general microbiology*, 68: 337-348.
- Marshall K. C., R. H. Cruickshank.** 1973. Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces. *Archiv für Mikrobiologie*, 91: 29-40.
- Mashburn-Warren L, McLean RJ, Whiteley M.** 2008. Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. *Geobiology.* 6:214-9.
- Maughan H., G.VanderAuwera.** 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution* 11 : 789–797
- McDougald D., S. A. Rice, N. Barraud, P. D. Steinberg, S. Kjelleberg.** 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* 10: 39-50.
- Medilanski E; Kaufmann K; Wick LY; Wanner O; Harms H.** 2002. Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, Vol. 18 (3): 193-203.
- Mercier-Bonin M., A. Dehouche, J. Morchain, P. Schmitz.** 2011. Orientation and detachment dynamics of *Bacillus* spores from stainless steel under controlled shear flow: Modelling of the adhesion force. *International Journal of Food Microbiology* 146 :182–191.

- Merritt J.H., K.M. Brothers, S.L. Kuchma, G. A. O'Toole. 2007.** SadC Reciprocally Influences Biofilm Formation and Swarming Motility via Modulation of Exopolysaccharide Production and Flagellar Function. *Journal of bacteriology*, 189 :8154–8164 .
- Meyer B.** 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation, Hygiene and Disinfection*. 51 : 249-253.
- Mittelman M.W. 1998.** Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. *J. Dairy Sci.*, 81: 2760-4.
- Molobela P., T. E. Cloete, M. Beukes. 2010.** Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4 : 1515-1524,
- Mols M, Abee T. 2011.** *Bacillus cereus* response to acid stress. *Environmental Microbiology* **13**:2835-2843.
- Mols M, van Kranenberg R, van Melis CC, Moezelaar R, and Abee T. 2010.** Analysis of acid-stressed *Bacillus cereus* reveals a major oxidative response and inactivation-associated radical formation. *Environ. Microbiol.* **12**:873-85.
- Monds R. D., G.A. O'Toole. 2005.** The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Stud Health Technol Inform.*,117: 213-7.
- Moore G., Griffith C. 2002.** Factors influencing recovery of microorganisms from surfaces by use of traditional hygien swabbing. *Dairy, food and environmental sanitation*, 22: 410-42.
- Moorman MA., Thelemann CA, Zhou S. Pestka JJ., Linz JE., Ryser ET. 2008.** Altered hydrophobicity and membrane composition in stress-adapted *Listeria innocua*. *Journal of food protection* **71**:182-185
- Morente E.O, M. A. Fernández-Fuentes, M. J. Grande Burgos, H.Abríouel, R. Pérez Pulido, A.Gálvez. 2013.** Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 162:13–25
- Morisaki H., S. Nagai, H. Ohshima, E. Ikemoto, K. Kogure. 1999.** The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment *Microbiology*, 145: 2797–2802.
- Morra M, Cassinelli C. 1997.** Bacterial adhesion to polymer surfaces: a critical review of surface thermodynamic approaches. *J Biomater Sci Polym Ed.*, 9:55-74.
- Moussa Boudjema B, Kihal M, Lopez M, Gonzalez J 2004.** The incidence of *Bacillus cereus* spores in Algerian milk: a study on the chief sources of contamination. *Archive fur leben smittelhygiene* 55:73-76.
- Mozes N, Léonard AJ, Rouxhet PG. 1988.** On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochim Biophys Acta.* , 945(2):324-34.
- Mukherjee J, Karunakaran E, Biggs CA. 2012.** Using a multi-faceted approach to determine the changes in bacterial cell surface properties influenced by a biofilm lifestyle. *Biofouling* **28**:1-14
- Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. 2009.** Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. 4(11):e1000213
- Mulla S. A., J. Urmi N. 2012.** Assessment of biofilm formation by the causative organisms of ventilator associated pneumonia at intensive care unit of a tertiary care hospital. *National journal of medical research*, 2: 15-19.
- Mulla SA, Revdiwala S. 2011.** Assessment of biofilm formation in device-associated clinical bacterial isolates in a tertiary level hospital. *Indian J Pathol Microbiol.* 54:561-4
- Murphy, P., D. Lynch, and P. Kelly. 1999.** Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *Int. J. Dairy Technol.* 52:45–50.
- Murthy PS., Venkatesan R. 2008.** Industrial biofilm and their control. Springer series in biofilms.
- Myszka K., Czaczyk K., Schmidt M.T, Olejnik A.M. 2007.** Cell surface properties as factors involved in *Proteus vulgaris* adhesion to stainless steel under starvation conditions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 23: 1605-1612. Find all citations by this **author** (default). Or Find all citations by this **author** (default).
- Nakamura S, Higashiyama Y, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Mizuta Y, Kohno S. 2008.** The roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Infect Dis.*, 61:375-8.
- Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA, Belyaev SS, Ivanov MV. 2001.** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from

- petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* Int J Syst Evol Microbiol., 51: 433-446**
- Necidova L., B. Janstova, S. Karpiskova, S. Cupakova, M. Duskova, and R. Karpiskova. 2009.** Importance of *Enterococcus spp.* For forming a biofilm. Czech J. Food Sci., Vol. 27 No. 2: S354-S356.
- Neu TR, Manz B, Volke F, Dynes JJ, Hitchcock AP, Lawrence JR. 2010.** Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. FEMS Microbiol Ecol., 72 (1): 1-21.
- Nijland R, Hall MJ, Burgess JG. 2010.** Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase. PLoS ONE 5(12): e15668.
- Nistico L, Gieseke A, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Kerschner JE, Ehrlich GD. 2009.** "in situ" hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa. Methods Mol Biol. 2009;493:191-213.
- Niu C. , E. S. Gilbert. 2004.** Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components that Affect Biofilm Formation and Structure. Applied and environmental microbiology, 70:6951–6956.
- Notermans S, Dufrenne J Teunis PBeumer R, Giffel Mte, Weem PP , 1997.** A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. Food Microbiology, 14: 143-151.
- Novaks J.S., J. Call, P. Tomasula, J.B. Luchansky. 2005.** An assessment of pasteurization treatment of water, media, and milk with respect to *Bacillus* spores. J. Food Prot., 68 (4): 751-7.
- O'May C. N. Tufenkji. 2007.** The Swarming Motility of *Pseudomonas aeruginosa* Is Blocked by Cranberry Proanthocyanidins and Other Tannin-Containing Materials. Applied and environmental microbiology, 77: 3061-3067.
- Oh MH, Ham JS, Cox Jm. 2012.** Diversity and toxigenicity among members of the *B. cereus* group. Int J Food Microbiol 152: 1-8.
- Okner R., A.J. Domb D. Mandler. 2009.** Electrochemically deposited poly (ethylene glycol)-based sol-gel thin films on stainless steel stents. New J. Chem., 33: 1596-1604.
- Oliveira K., T. Oliveira, P. Teixeira, J. Azeredo, R. Oliveira. 2007.** Adhesion of *salmonella* enteritidis to stainless steel surfaces. Brazilian journal of microbiology, 38:318-323.
- Oliveira R., J. Azeredo, P. Teixeira and A. P. Fonseca. 2001.** The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. hydrophobicity and adhesion BioLine.
- O'Neil HS, Marquis H. 2006.** *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. Infect Immun.,74:6675-81
- Oosthuizen M. C., B. Steyn, J. Theron, P. Cosette, D. Lindsay, A. von Holy, V. S. Brözel. 2002.** Proteomic Analysis Reveals Differential Protein Expression by *Bacillus cereus* during Biofilm Formation. Applied and environmental microbiology, 68: 2770–2780.
- Orgaz B., J.Kives , A. M. Pedregosa , I. F. Monistrol ,F. Laborda , C. SanJosé. 2006.** Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. Enzyme and Microbial Technology 40:51–56.
- Orgaz B., M. M. Lobete, C. H. Puga, C. S. Jose. 2011.** Effectiveness of Chitosan against Mature Biofilms Formed by Food Related Bacteria. Int J Mol Sci. 12(1): 817–828.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000.** Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 54:49-79.
- O'Toole GA, Kolter R. 1998.** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol., 30:295-304.
- O'Toole GA. 2011.** Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp 30. pii: 2437.
- Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T. 2009.** Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. Cytometry A. 75:90-103.
- Pan Y., F. Jr. Breidt, S. Kathariou. 2006.** Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. Applied and environmental microbiology, 72: 7711-7717.
- Park S.H. , H.-L. Cheon, K.-H. Park, M.-S. Chung, S. H. Choi, S. Ryu, D.-H. Kang. 2012.** Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. International Journal of Food Microbiology, 154 : 130-134.

- Parkar, S. G., S. H. Flint, J. S. Palmer, and J. D. Brooks.** 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *J. Appl. Microbiol.* 90:901–908.
- Parkar S.G., S.H. Flint; J.D. Brooks.** 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, 96: 110-116.
- Patriquin G.M., E. Banin, C. Gilmour, R. Tuchman, E. P. Greenberg, K. Poole.** 2008. Influence of Quorum Sensing and Iron on Twitching Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 190 : 662–671
- Pearce L. E., B. W. Smythe, R. A. Crawford, E. Oakley , S. C. Hathaway J. M. Shepherd.** 2012. Pasteurization of milk: The heat inactivation kinetics of milk-borne dairy pathogens under commercial-type conditions of turbulent flow. *J. Dairy Sci.* 95:20–35.
- Peng J.S., W. C. Tsai, and C.C. Chou.** 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International journal of food microbiology* 65: 105-111.
- Peng J.S., W. C. Tsai, and C.C. Chou.** 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International journal of food microbiology* 77: 11-18.
- Pérez-Rodríguez F., A. Valero, E. Carrasco, R. Ma. Garcia, G. Zurera.** 2008. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19 131e144.
- Petrus R. r., Loiola CG, Olivira CA.** 2010. Microbiological shelf life of pasteurized milk in bottle and pouch. *J. Food Sci.*, 75 (1): 36-40.
- Picioreanu C. J.-U. Kreft, M. Klausen, J.A.J. Haagenen, T. Tolker-Nielsen, S. Molin.** 2007. Microbial motility involvement in biofilm structure formation – a 3D modelling study. *Water Science & Technology*, 55 : 337–343.
- Pierce C. G., P. Uppuluri, A R. Tristan, F.L. Wormley Jr., E. Mowat, G. Ramage, J L. Lopez-Ribot.** 2008. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc.* 3: 1494–1500.
- Pieters RJ.** 2011. Carbohydrate mediated bacterial adhesion. *Adv Exp Med Biol.*,715:227-40.
- Pirttijarvi T.S.M., M.A. Andersson, and M.S. Salkinoja-Salonen.** 2000. Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. *International journal of food microbiology* 60: 231-239.
- Pitts B., Hamilton M.A., Zelver N., Stewart P.S.** 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods.* 54, 269-276.
- Pompermayer D.M.C., C.C. Gaylarde.** 2000. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *E. coli* to polypropylene. *Food microbiology*, 17: 361-365.
- Poortinga A T, Bos R, Norde W, Bussher H J.** 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface sciences reports* 47: 1-32.
- Pratt L. A., R. Kolter.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30 : 285–293.
- Priest, F.G., Barker, M., Baillie, L.W., Holmes, E.C., Maiden, M.C.** 2004. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.*186, 7959e7970.
- Priester JH, Horst AM, Van de Werfhorst LC, Saleta JL, Mertes LA, Holden PA.** 2007. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. 68: 577-587.
- Prokopovich P, Perni S.** 2009. An investigation of microbial adhesion to natural and synthetic polysaccharide-based films and its relationship with the surface energy components. *J. Mater Sci Mater Med.*, 20:195-202.
- Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Lee, H. Y., Tang, J. Y. H., Noorlis, A., Farinazleen, M. G., Cheah, Y. K., Son, R.** 2012. Biofilm formation by *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit. *International Food Research Journal*, 18: 31-38.
- Ramírez-Camacho R, González-Tallón AI, Gómez D, Trinidad A, Ibáñez A, García-Berrocal JR, Verdaguer JM, González-García JA, San Román J.** 2008. Environmental scanning electron microscopy for biofilm detection in tonsils. *Acta Otorrinolaringol Esp.*, 59:16-20.
- Ranieri M. L., and Boor K. J.** 2009. Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States. *Journal of Dairy Science*, 92 (10): 4833-4840.

- Ranieri ML., J.R. Huck M. Sonnen, D.M. Barbano, K.J. Boor.** 2009. High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 92 (10): 4823-32.
- Rasko D. A. , M. R. Altherr , C. S. Han , J. Ravel.** 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbil. Rev.*, 29: 303-329.
- Ray VA, Morris AR, Visick KL.** 2012. A semi-quantitative approach to assess biofilm formation using wrinkled colony development. *J Vis Exp.* 7;(64):e4035.
- Raymond B., K.L. Wyres, S. K. Sheppard,R. J. Ellis, M. B. Bonsall.** 2010. Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. *Plos pathog.*, 6 (5): e 1000905.
- Reddy, G.S M. N. Nadagouda, J. A. Sekhar.** 2012. Nano structured surfaces that show antimicrobial, anticorrosive and anti biofilm properties. *Key Engineering Materials*, 521: 1-33.
- Reginensi S M, M. J. González , J. A. Olivera, M. Sosa, P. Juliano, J. Bermúdez.** 2011. RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International Journal of Food Microbiology* 148: 36–41.
- Reid G.Pieter L. Cuperus, A. W. Bruce, H.C. Van Der Mei L. Tomeczek, A.H. Houry, H. J. Busscher.** 1992. Comparison of Contact Angles and Adhesion to Hexadecane of Urogenital, Dairy, and Poultry Lactobacilli: Effect of Serial Culture Passages. *Applied and environmental microbiology*, 58: 1549-1553
- Remis J.P. , J. W. Costerton M. Auer.** 2010. Biofilms: structures that may facilitate cell–cell interactions. *The ISME Journal*, 4: 1085–1087
- Rice G. , A. Barber, A. O'Connor, G. Stevens, S. Kentish.** 2009. Fouling of NF membranes by dairy ultrafiltration permeates. *Journal of Membrane Science*, 330: 117-126.
- Riedewald F.** 2006. Bacterial adhesion to surfaces: the influence of surface roughness. *PDA J Pharm Sci Technol.*, 60: 164-71.
- Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Rqckert, A., Morgan, H.W.** 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology* 85, 45–61.
- Ronner AB ; Wong ACL,** 1993. Biofilms developpement and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimiriumon* stainless steel and Buna-n rubber. *J. food protection*, 56: 750-758.
- Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E.** 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbon: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9:29-33.
- Rosmaninho R., O. Santos, T. Nylander, M. Paulsson, M. Beuf , T. Benezech, S. Yiantsios, N. Andritsos.** 2007. Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling –Evaluation of fouling by milk components. *Journal of Food Engineering* 80: 1176-1187.
- Rueckert A, Ronimus RS, Morgan HW.** 2005. Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. *Microbiol Methods.*, 60:155-67.
- Ruiz J C, C. Alvarez-Lorenzo, P. Taboada, G Burillo, E Bucio, H J Nelis, T coenye, A Concheiro.** 2008. Propylene grafted with smart polymers for loading and controlled release of vancomycine. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 70 : 467-477.
- Ryu JH, Beuchat LR.** 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. 71:247-54.
- Ryu JH, Kim H, Beuchat LR.** 2004. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *Food Prot.*, 67:2123-31.
- Salustiano V.C., N.J. Andrade, J.I. Ribeiro Junior, P.E. Fernandes; J.P. Lopes P.C. Bernardes J.G. Portugal.** 2010. Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedures used in dairy plants. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62 (6).
- Salustiano, J.C., N.J. Andrade, N.F.F. Soares, J.C. Lima, P.C. Bernardes, L.M.P. Luiz, and P.E. Fernandes.** 2009. Contamination of milk with *B.cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food control* vol.20, Issue 4: 439 - 442.

- Sanchez B., S. Arias, S. Chaignepain, M. Denayrolles, J. M. Schmitter, P. Bressollier, M. C. Urdaci.** 2009. Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. *Microbiology*, 155, 1708–1716.
- Sanchis V.** 2006. Multiple locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Applied and environmental microbiology*, 72: 1569-1578.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., and Davies, D.G.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184: 1140–1154.
- Sauer K.** 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4:219
- Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P.** 2009. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *J Microsc.* 235:124-7.
- Scheffler R.** 2009. Maximizing sanitation efforts in food processing: the importance of conveyor hygiene *Trends in Food Science & Technology* 20 S40eS43.
- Schlegelova J, Babak V, Holasova M, Konstantinova L, Necidova L, Sisak F, Vlkova H, Roubal P, Jaglik Z.** 2010. Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech J Food Sci* 28: 450-461.
- Schlegelova J., V. Babak, M. Holasova, and M. Dendis.** 2008. The biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* isolates in raw materials, foodstuffs and on contact surfaces in processing plants. *Folia Microbiol.* 53: 500-504.
- Schmidt T. R., E. J. Scott D.W. Dyer.** 2011. Whole-genome phylogenies of the family *Bacillaceae* and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. *BMC Genomics*, 12:430
- Schooling S.R., A. Hubley, T. J. Beveridge.** 2009. Interactions of DNA with Biofilm-Derived Membrane Vesicles. *Journal of bacteriology*, 191: 4097-4102.
- Schooling SR, Beveridge TJ.** 2006. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* 188: 5945–5947.
- Schraft H, Steele M, McNab B, Odumeru J, Griffiths MW.** 1999. Epidemiological typing of *Bacillus spp.* isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 62: 4229-4232.
- Seale RB, Flint SH, McQuillan AJ, Bremer PJ.** 2008. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 74:731-737.
- Shaheen R., B. Svensson, M.A. Andersson, A. Christiansson, and M. Salkinjova-Salonen.** 2009. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology* 27 (3): 347-55.
- Shakerifard P, Gancel F, Jacques P, Faille C.** 2009. Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. *Biofouling.*, 25:533-41.
- Sharma, M., and S.K. Anand.** 2002. Characterization of constitutive of microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food microbiology* 19: 627-636.
- Sharma PK, Rao KH.** 2002. Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry. *Adv Colloid Interface Sci.*, 98(3):341-463.
- Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P.** 2009. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *J Microsc.* 235(2):124-7.
- Shi X., and X. Zhu.** 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in food science and technology* 20: 407-413.
- Shrout J.D., D. L. Chopp.** 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional *Molecular Microbiology* 62, 1264–1277
- Silvestry-Rodriguez N., K. R. Bright, D. C. Slack, D. R. Uhlmann, C. P. Gerba.** 2008. Silver as a Residual Disinfectant To Prevent Biofilm Formation in Water Distribution Systems. *Applied and environmental microbiology*, 74: 1639–1641.
- Simmonds, P., B. L. Mossel, T. Intaraphan, and H. C. Deeth.** 2003. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *Journal of food protection* 66: 2070-2075

- Simoões M., M. O. Pereira, S. Sillankorva, J. Azeredo, M.J. Vieira.** 2007. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, 2007; 23(3/4): 249 – 258.
- Simões LC, Lemos M, Araújo P, Pereira AM, Simões M.** 2011. The effects of glutaraldehyde on the control of single and dual biofilms of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. *Biofouling*. 27:337-46.
- Simoes M., L.C. Simoes, and M.J.Vieira.** 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* 43: 573-583.
- Simon M., Hansen P.** 2001. Effect of various dairy packaging materials on the shelf life and flavor of pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 84: 767-73.
- Singh R, Ray P, Das A, Sharma M.** 2009. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *J Med Microbiol.*, 58(Pt 8):1067-73.
- Singh R.P., M. K. Shukla, A. Mishra, C.R.K. Reddy, B. Jha.** 2013. Bacterial extracellular polymeric substances and their effect on settlement of zoospore of *Ulva fasciata*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103: 223-230.
- Sommer P., Martin-Rouas C., Mettler E.** 1999. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food microbiology*, 16: 503-515.
- Sorokin A., B. Candelon, K. Guillout, N. Galleron, N. Wackerow-Kouzova, S. D. Ehrlich, Denis Bourguet, Spoering A. L, M. S. Gilmore.** 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 9:133–137.
- Srey S., I.K. Jahid, S.D. Ha.** 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food control*, 31: 572-585.
- Srinivasan, R., Stewart, P. S., Griebe, T., Chen, C.-I., & Xu, X.** 2005. Biofilm parameters influencing biocide efficacy. *Biotechnology and Bioengineering*, 46, 553–560.
- Sriramulu D D, H Lunsdorf, J S Larn, U Romling.** 2005. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *Journal of medical microbiology*, 54: 667-676.
- Stanley NR, Lazazzera BA.** 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol.* 52:917-24.
- Sternberg C, Tolker-Nielsen T.** 2006 Growing and analyzing biofilms in flow cells. *Curr Protoc Microbiol.* Chapter 1:Unit 1B.2.
- Stewart P.S., M. Franklin.** 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature review microbiology* 6: 199-210.
- Stoodley P, Hall-Stoodley L, Lappin-Scott HM.** 2001. Detachment, surface migration, and other dynamic behavior in bacterial biofilms revealed by digital time-lapse imaging. *Methods in Enzymology*, 337:306-319.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.*, 56:187-209.
- Stoodley, P., A. Jacobsen, B. C. Dunsmore, B. Purevdorj, S. Wilson, H. M. Lappin-Scott, and J. W. Costerton.** 2001. The influence of fluid shear and AlCl₃ on the material properties of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Desulfovibrio* sp. EX265 biofilms. *Water Sci. Technol.* 43:113–120.
- Strevett KA, Chen G.** 2003. Microbial surface thermodynamics and applications. *Res Microbiol.*, 154:329-35.
- Svensson B, Eneroth A, Brendehaug J, Christiansson A.** 1999. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. *International dairy journal* 9: 903-912.
- Svensson B, Eneroth A, Brendehaug J, Molin G, Christiansson A.** 2000. Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant. *J Dairy Res* 67: 455-460.
- Svensson B, Ekelund K, Ogura H, Christiansson A.** 2004. Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International dairy journal* 14: 17-27.
- Svensson B, Monthan A, Shaheen R, Andersson MA, Salkinojova-Salonen M, Christiansson A.** 2006. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *International dairy journal* 16: 740-749.
- Sutherland IW.** 2001. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.*, 9 (5): 222-7.

- Tang, H., Wang, A., Liang, X., Cao, T., Salley, S.O., McAllister III, J.P., Ng, K.Y.S.** 2006. Effect of surface proteins on *Staphylococcus epidermidis* adhesion and colonization on silicone. *Colloids Surf. B*, 51: 16-24.
- Tang H., T. Cao, X. Liang, A. Wang, S. O. Salley, J. McAllister II, K. Y. Simon Ng.** 2009. Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 88: 454-463.
- Takahashi H, Suda T, Tanaka Y, Kimura B.** 2010. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology* 50:618-625.
- Tauveron G, Slomianny C, Henry C, Faille C.** 2006. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *Int J Food Microbiol* 110: 254-262.
- Taylor JHS, J Rogers; JT Tolah.** 1990. A comparison of the bacterial efficacy of 18 disinfectants used in food industry against *E. coli* O157:H7 and *P. aeruginosa* at 10 and 20 °C. *Journal of applied microbiology* 87: 718-725.
- Te Giffel M., R.R. Beumer, L.P.M. Langeveld, and F.M. Rombouts.** 1997. The role of heat exchangers in the contamination of milk with *B.cereus* in dairy processing plants. *International journal of dairy technology* vol. 50: 43-47.
- Thomassin S., M. P. Jobin, P. Schmitt.** 2006. The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH. *Archives of Microbiology*, 186: 229-239.
- Thorensen , Azokpota P, Hansen BM, Hounhouigan DJ, Jakobsen M.** 2010. Identification, genetic diversity and cereulide producing ability of *Bacillus cereus* group strains isolated from Beninese traditional fermented food condiments. *Int J Food Microbiol* 142: 247-50.
- Timp W, Mirsaidov U, Matsudaira P, Timp G.** 2009. Jamming prokaryotic cell-to-cell communications in a model biofilm. *Lab. Chip.*, 9(7):925-34.
- Todar K.** 2008. *Bacillus* and related endospore-forming bacteria. Chapter: The genus *Bacillus*. *Todar's on line textbook of bacteriology*. textbookofbacteriology.net/Bacillus_5.html
- Todhanakasem T, Young GM.** 2008. Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *J. Bacteriol.* 190:6030-4.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S., and Molin, S.** 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol* 182: 6482–6489.
- Tolker-Nielsen T., S. Molin.** 2000. Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microbial ecology*, 40: 75-84
- Tomás I, Henderson B, Diz P, Donos N.** 2010. In vivo oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.) ©FORMATEX.
- Tomasula PM, Mukhopadhyay S, Datta N, Porto-Fett A, Call JE, Luchansky JB, Renye J, Tunick M.** 2011. Pilot-scale crossflow-microfiltration and pasteurization to remove spores of *Bacillus anthracis* (Sterne) from milk. *J Dairy Sci.*, 94: 4277-91.
- Tourasse, N.J., Helgason, E., Økstad, O.A., Hegna, I.K., Kolstø, A.B.** 2006. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *J. Appl. Microbiol.* 101, 579e593.
- Tourasse N. J., E. Helgason, A. Klevan, P.Sylvestre, M. Moya, M. Haustant, O. A. Økstad, A. Fouet , M.Mock, A.-B. Kolstø.** 2011. Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiology* 28 : 236e244.
- Tremblay J. E. Déziel.** 2010. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility *BMC Genomics*, 11:587.
- Treter J., A. J. Macedo.** 2011. Catheters: a suitable surface for biofilm formation *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A_ Méndez Vilas (ED). Formatex 2011.
- Trinidad A., A. Ibáñez, D. Gómez, J.R. García-Berrocal, R. Ramírez-Camacho.** 2010. Application of environmental scanning electron microscopy for study of biofilms in medical devices. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.). Formatex 2010.

- Tuncan EU.** 1993. Effect of cold temperature on germicidal efficacy of quaternary ammonium compound, iodophor, and chlorine on *Listeria*. *Journal of food protection* 56:1029-1033.
- Turakhia m. H., K. E. Cooksey, W. G. Characklis.** 1983. Influence of a Calcium-Specific Chelant on Biofilm Removal. *Applied and environmental microbiology*, 46: 1236-1238.
- Valík L. .F. Görner, D. Lauková.** 2003. Growth Dynamics of *Bacillus cereus* and Shelf-life of Pasteurised Milk. *Czech J. Food Sci.*, 21: 195–202.
- Van Houdt R, C.W. Michiels. **2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Appl Microbiol.*, 109:1117-31.**
- Van Oss C.J., 1993.** Acid-base interfacial interaction Forces in Aqueous Media. *Colloids and surface A*, 78: 1-49.
- Van Oss CJ.** 2003. Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *J Mol Recognit.*, 16(4):177-90.
- Van Ulsen P.** 2011. Protein folding in bacterial adhesion: secretion and folding of classical monomeric autotransporters. *Adv Exp Med Biol.*, 715:125-42
- Vanhaecke E., J.P. Remon, M. Moors.** 1990. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion to 304 and 316-L Stainless Steel: Role of Cell Surface Hydrophobicity. *Applied and environmental microbiology*, 56: 788-795.
- Vejborg RM, Bernbom N, Gram L, Klemm P.** 2008. Anti-adhesive properties of fish tropomyosins. *J. Appl. Microbiol.*, 105:141-50.
- Verran J, Packer A, Kelly P, Whitehead KA.** 2010. Titanium-coating of stainless steel as an aid to improved cleanability. *Int. J. Food Microbiol.*, 141. Supplement 1: S134-9.
- Verstraeten N., K. Braeken, B. Debkumari, M. Fauvart, J. Fransaeer, J. Vermant J. Michiels.** 2008. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Journal of Theoretical Biology*, 251 : 24–34.
- Vertes A., V. Hitchins , K. S. Phillips.** 2012. Analytical Challenges of Microbial Biofilms on Medical Devices. *Anal. Chem.*, 84 : 3858–3866
- Vickery K, Ngo QD, Zou J, Cossart YE.** 2009. The effect of multiple cycles of contamination, detergent washing, and disinfection on the development of biofilm in endoscope tubing. *Am J Infect Control.* 37: 470-5
- Vilain S., J. M. Pretorius J. Theron, V. S. Brözel.** 2009. DNA as an Adhesin: *Bacillus cereus* Requires Extracellular DNA To Form Biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 75: 2861–2868.
- Vilas-Boas G., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M.V., Bourguet, D.,** 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1414e1424.
- Vials-Boas G.T., A.P.S. Peruca, O.M.N. Arantes.** 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* 53: 673-687.
- Vilinska A., K.H. Rao.** 2011. Surface thermodynamics and extended DLVO theory of *Leptospirillum ferrooxidans* cells' adhesion on sulfide minerals. *Minerals and metallurgical processing*,: 151-158.
- Vissers MM, Te Giffel MC Driehuis F De Jong P, Lankveld JM.** 2007. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*, 90: 3286-329. Find all citations by this **author** (default). Or Find all citations by this **author** (default). Or
- Vlkova H., V. Babak, R. Seydlova, I. Pavlik, and J. Schlegelova.** 2008. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and effectiveness on biofilms – a review. *Czech j. food.sci.* Vol. 26, (5): 309-323.
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP.** 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14 (7): 2535-54.
- Wallstrom S., S. Karlsson.** 2004. Biofilms on silicone rubber insulators; microbial composition and diagnostics of removal by use of ESEM/EDS Composition of biofilms infecting silicone rubber insulators. *Polymer Degradation and Stability* 85, 841e846.
- Whitehead K.A., J. Verran.** 2006. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Trans IChemE, Part C, Food and Bioproducts Processing*, 84: 253–259.
- Wijman JGE, de Leeuw PPLA, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T.** 2007. Air liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation and Dispersion. *Appl Environ. Microbiol* 73: 1481-1488.

- Wirtanen G., T. Mattila-Sandholm.** 1993. Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne bacteria biofilm grown on stainless steel surfaces. *J. Food Protect.*, 56: 678-683.
- Yoshinari M, Kato T, Matsuzaka K, Hayakawa T, Shiba K.** 2010. Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides. *Biofouling.*, 26:103-10.
- Yuan D. D, G.C. Liu , D.Y Ren , D. Zhang , L. Zhao , C.P. Kan ,Y.Z. Yang , W. Maa, Y. Li, L.B Zhang.** 2012. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control*, 25: 752-757.
- Zhang F, Kang ET, Neoh KG, Wang P, Tan KL.** 2001. Surface modification of stainless steel by grafting of poly(ethylene glycol) for reduction in protein adsorption. *Biomaterials.* 22: 1541-8.
- Zhang X., P. L. Bishop.** 2003. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* 50 :63–69.
- Zhang W., T. S. Sileika, C. Chen, Y. Liu, J. Lee, A. I. Packman.** 2011. A novel planar flow cell for studies of biofilm heterogeneity and flow–biofilm interactions. *Biotechnology and Bioengineering*, 208: 2571–2582.
- Zhou G, Liu H, He J, Yuan Y, Yuan Z.** 2008. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. *Int J Food Microbiol.*, 121 : 195-200.
- Zmantar T., B. Kouidhi, H. Miladi K. Mahdouani, A. Bakhrouf.** 2010. A Microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New microbiologica*, 33: 137-145.
- Zolock R.A., G. Li, C. Bleckmann, L. Burggraf, D.C.** 2006. Fuller Atomic force microscopy of *Bacillus* spore surface morphology. *Micron* 37 : 363–369
- Zygoura P., Moysiadi T., Badeka A., Kondyli E., Savvaidis I., Kontominas M. G.** 2004. Shelf life of whole pasteurized milk in Greece: effect of packaging material. *Food chemistry*, Vol. 87 (1): 1-9.

PUBLICATIONS

Full Length Research Paper

Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk

Malek F.1, B. Moussa-Boudjemâa1*, F. Khaouani-Yousfi3, A. Kalai1 and M. Kihel2

1Laboratory of Applied Microbiologys to Food, Health and Environmental (LAMAABE), Faculty of Natural and Live Sciences, Tlemcen University, Tlemcen 13000, Algeria. 2Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of sciences, Oran University, Oran 31000, Algeria. 3Department of biology, Faculty of sciences, Mostaganem University, Mostaganem, Algeria. Accepted 27 February, 2012

Bacterial contamination of pasteurized milk may originate from different sources: raw milk, process equipment surfaces and packaging materials. It is hypothesized that post-pasteurization contamination along the milk processing lines is responsible of reducing shelf life of Algerian pasteurized milk. This assumption was investigated through assessment of both the microflora of biofilms in milk pipeline systems at five dairy plants of Northwestern Algeria and the effectiveness of a quaternary ammonium based compound used for the disinfection of the plant equipment. Samples were collected before and after cleaning-in-place (CIP) systems from different segments of pasteurization lines with sterile cotton swabs. Quantitative assessment showed little reduction of the total bacteria count after CIP. On the average bacterial numbers were 5.6×10^3 , 1.2×10^4 , 5.1×10^4 , 2.5×10^5 and 9.7×10^7 cfu/cm², respectively, in the different units. Phenotypic identification of isolates revealed predominance of Gram-positive bacilli belonging to *Bacillus* and notably the *Bacillus cereus* group, at maximal levels of 72 and 21% respectively. The other Gram-positive microflora included *Staphylococcus* (30%) and *Micrococcus* (10%). In contrast, the incidence of the Gram-negative bacteria was relatively low. Two genera, identified as *Pseudomonas* (9%) and *Enterobacter* (6%), were found only in two dairies. Three dairies were Gram-negative bacteria-free. That should be the result of common contamination sources or highly environmental selective pressure. Further studies have to address these hypotheses. Treatment of experimental *Bacillus cereus sensu lato* strains biofilms with a 50, 100 and 150 ppm of quaternary ammonium disinfectant, showed a significant resistance of biofilms to this product even after long exposure time (15 min). This study emphasized the importance of aerobic spore-forming bacteria in dairy-processing equipment as they are able to built recalcitrant biofilms on the inside equipment surfaces with subsequent resistance to conventional CIP system and potential transfer to pasteurized milk. Therefore, in order to reduce the contamination levels of spore-forming bacteria and improve the quality and shelf life of the product, these dairies have, besides improvement in the hygienic status of the plant equipments, also to monitor either the pasteurization process or the contamination from raw material (that is, milk powder).

Key words: Milk contamination, pasteurization, biofilm, cleaning-in-place (CIP).

Identification and genetic diversity of Bacillus cereus strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria

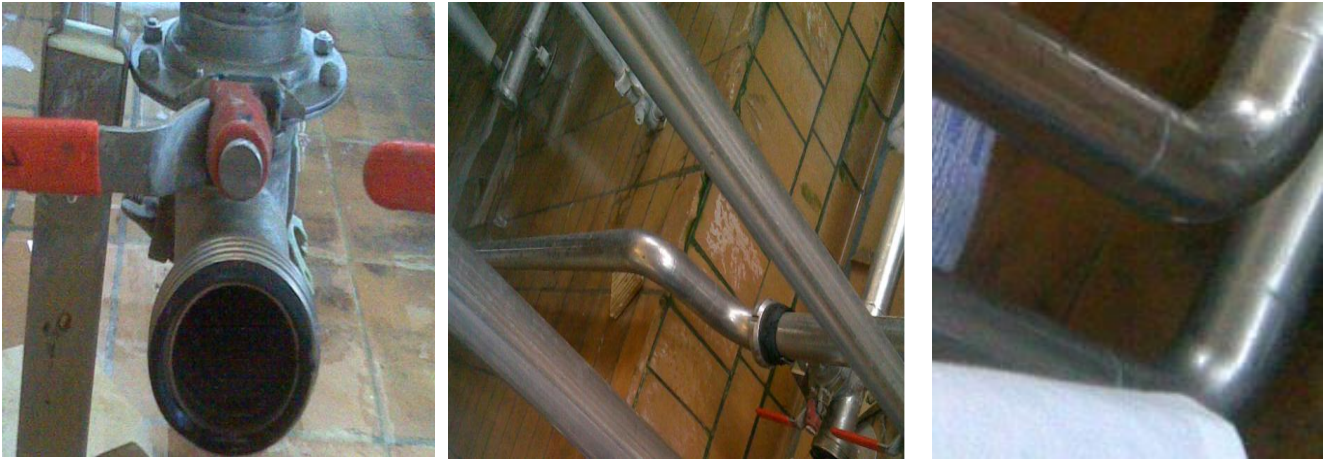
F. Malek, B. Moussa Boudjemaa, A. Aouar-Métri & M. Kihal

Abstract

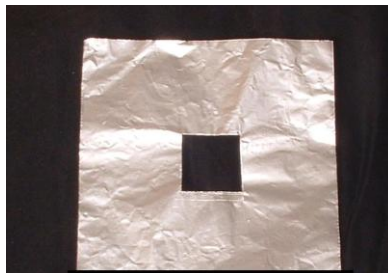
Bacillus cereus is a food pathogen of major concern to the dairy industry. Strains of *B. cereus* were isolated in 2006 and 2010 from a pasteurized milk processing line in a dairy plant in Algeria. Pasteurized milk is obtained from reconstituted and processed milk powder. This study was designed to discriminate between the isolated *B. cereus* strains and to predict their food poisoning potential. Strains were fingerprinted by M13-PCR, and identified at the phylogenetic group level by amplified panC gene sequence analysis. They were clustered into three distinct M13-PCR groups: one major group which included 17 strains and two minor groups which contained two and one strains, respectively. Strains originating from both the process equipment and milk powder were from the major group indicating that milk powder was the main source of initial contamination. Strains from the major and second group were affiliated to the mesophilic phylogenetic group III while the unique strain of the third group was classified into the mesophilic phylogenetic group IV. The data presented in this study showed a very low genetic diversity among *B. cereus* strains identified in milk powder and secondly by milk processing systems, as well as persistence in the dairy environment of specific *B. cereus* genotypes, across 4 years. M13-PCR typing and phylogenetic affiliation were useful for characterizing *B. cereus* dairy isolates



ANNEXES



Sites de prélèvements au niveau des canalisations.



Guide confectionné au laboratoire et utilisé pour les prélèvements par écouvillonnage.



Prélèvement à partir d'une surface



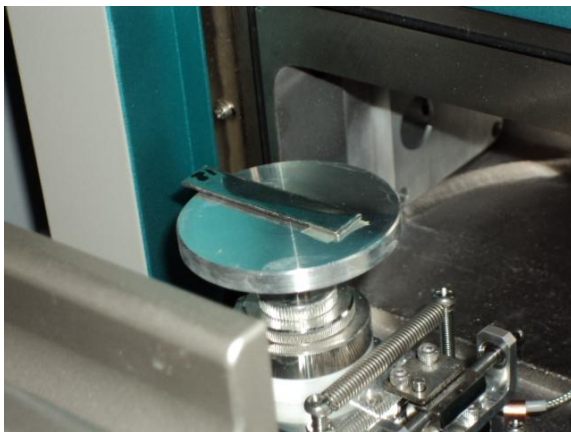
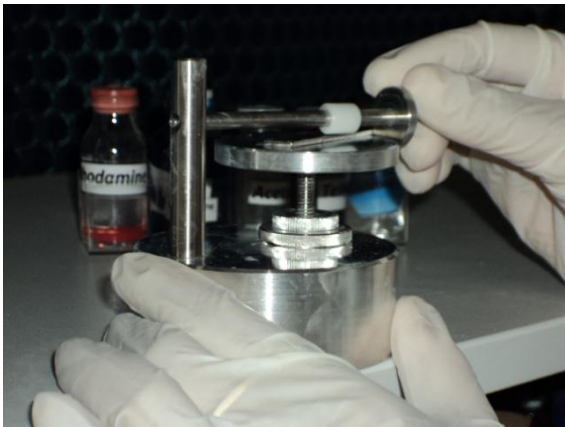
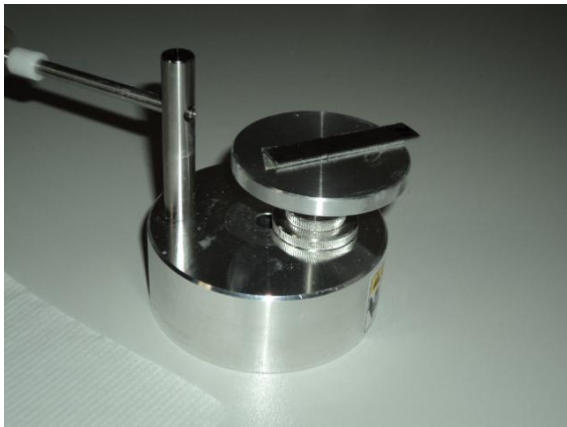
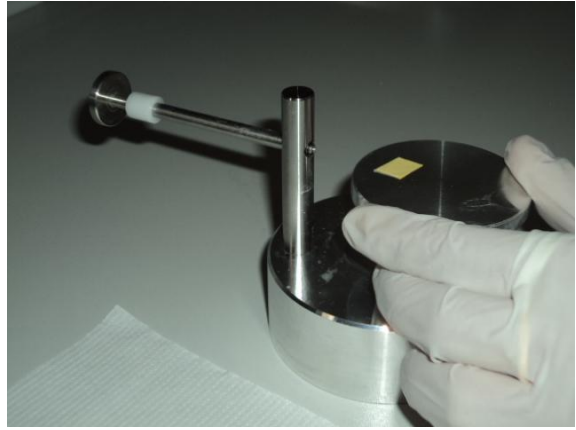
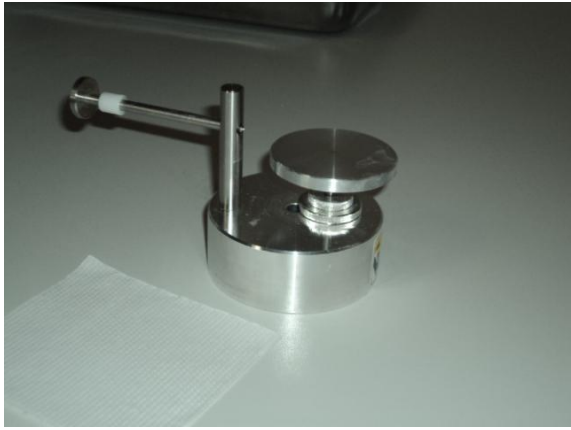
Agitation au vortex de la solution mère et préparations des solutions décimales.



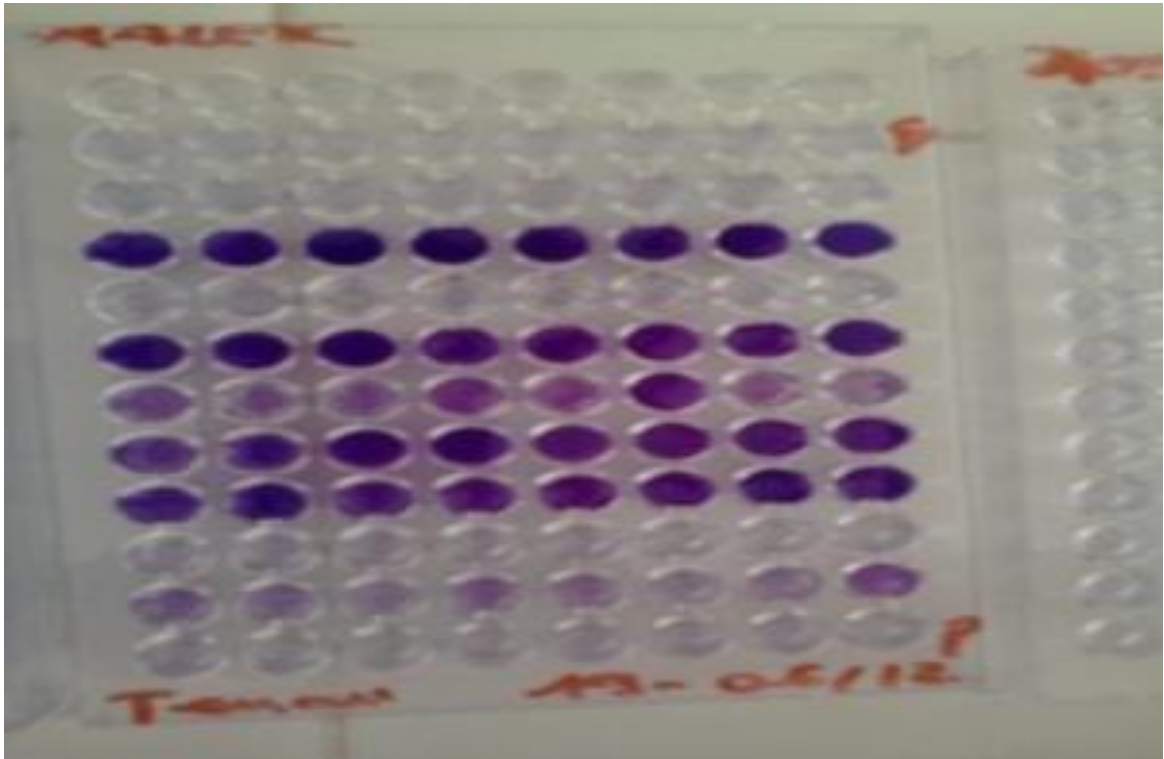
Le microscope électronique à balayage utilisé dans ce travail



Un microscope confocal à balayage laser



Disposition de la lame dans la chambre d'observation du MEB



AMPLITAQ GOLD

AB Applied Biosystems

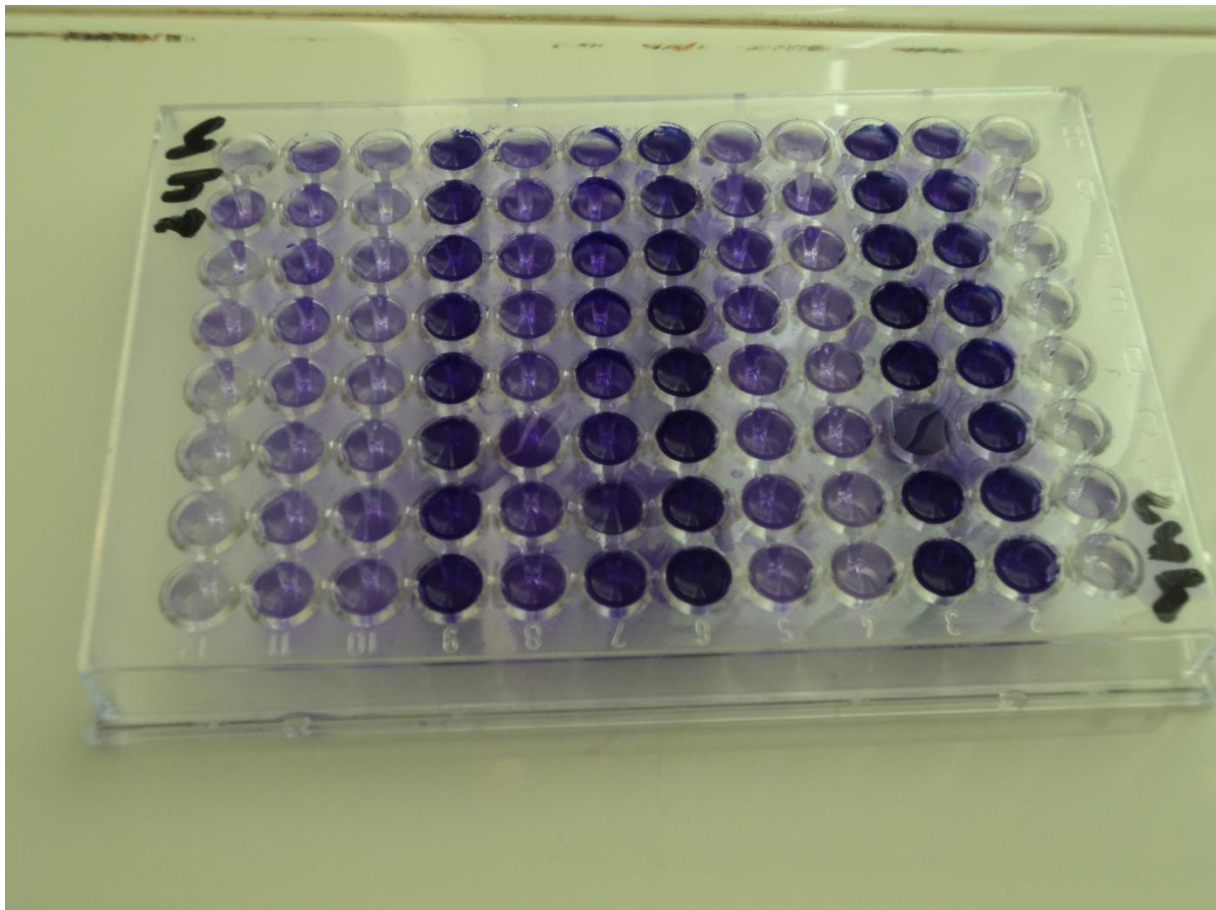
96-Well Plate Template

Date: --/--/--

Experiment/Plate #:

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Microplaque de titration et fiche de lecture



Date: --/--/--

Experiment/Plate #:

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Microplaque de titration et fiche de lecture

Antimicrobial Sensitivity: Biofilm vs. Planktonic Cells (Using the MBEC Assay System HTP¹)

Introduction

One of the most important properties of biofilms is the increased resistance to antimicrobial** substances, both disinfectants and antibiotics. This resistance has implications for both clinical and industrial microbiology. This exercise illustrates a method for determining the resistance of biofilms to disinfectants and antibiotics and for comparing that resistance to planktonic cells of the same species. The exercise employs the MBEC – Assay System (minimal biofilm eradication concentration), also called the Calgary Biofilm Device and devised at the University of Calgary.

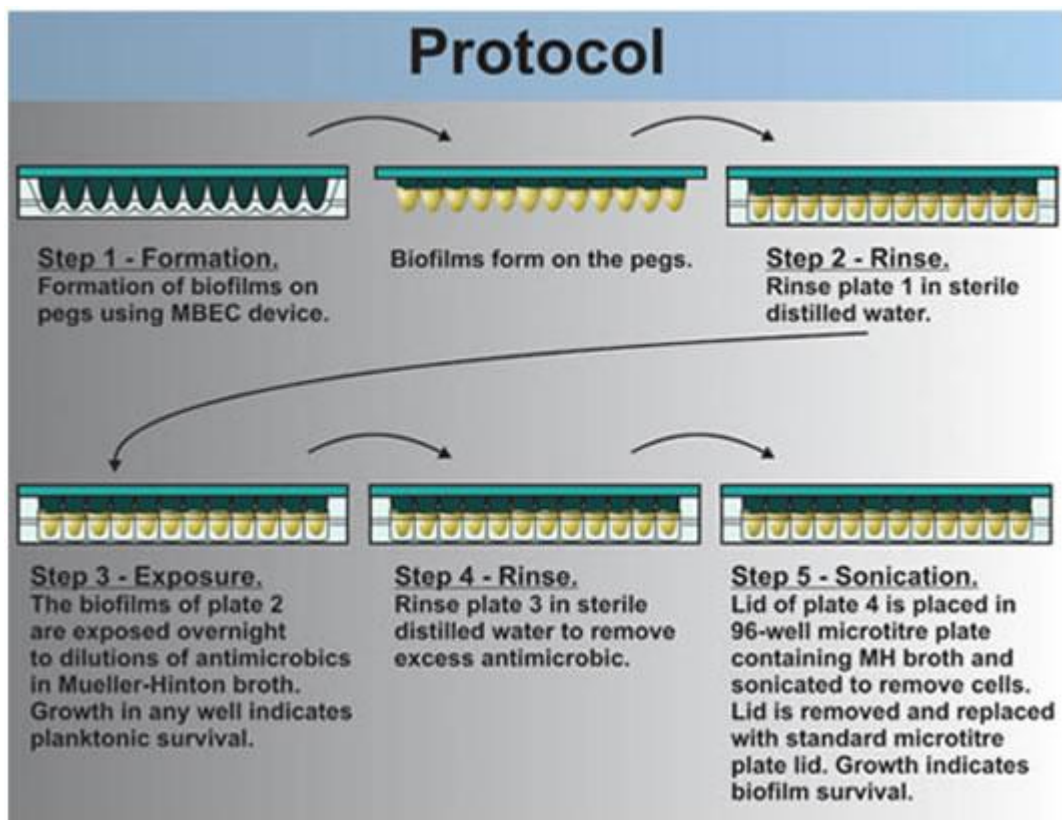


Figure 68 :. Diagram of the sequence of plates used to expose biofilms to the antibiotic and to assess the results (four plates).

Identification and genetic diversity of Bacillus cereus strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria

**F. Malek, B. Moussa Boudjemaa,
A. Aouar-Métri & M. Kihal**

Dairy Science & Technology

Official journal of the Institut National
de la Recherche Agronomique
(INRA) Formerly 'Le Lait'

ISSN 1958-5586

Volume 93

Number 1

Dairy Sci. & Technol. (2013) 93:73-82

DOI 10.1007/s13594-012-0093-2



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by INRA and Springer-Verlag France. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria

F. Malek · B. Moussa Boudjema · A. Aouar-Métri · M. Kihal

Received: 1 May 2012 / Revised: 4 September 2012 / Accepted: 6 September 2012 /
Published online: 18 October 2012
© INRA and Springer-Verlag France 2012

Abstract *Bacillus cereus* is a food pathogen of major concern to the dairy industry. Strains of *B. cereus* were isolated in 2006 and 2010 from a pasteurized milk processing line in a dairy plant in Algeria. Pasteurized milk is obtained from reconstituted and processed milk powder. This study was designed to discriminate between the isolated *B. cereus* strains and to predict their food poisoning potential. Strains were fingerprinted by M13-PCR, and identified at the phylogenetic group level by amplified *panC* gene sequence analysis. They were clustered into three distinct M13-PCR groups: one major group which included 17 strains and two minor groups which contained two and one strains, respectively. Strains originating from both the process equipment and milk powder were from the major group indicating that milk powder was the main source of initial contamination. Strains from the major and second group were affiliated to the mesophilic phylogenetic group III while the unique strain of the third group was classified into the mesophilic phylogenetic group IV. The data presented in this study showed a very low genetic diversity among *B. cereus* strains identified in milk powder and secondly by milk processing systems, as well as persistence in the dairy environment of specific *B. cereus* genotypes, across 4 years. M13-PCR typing and phylogenetic affiliation were useful for characterizing *B. cereus* dairy isolates,

F. Malek · B. M. Boudjema

Laboratory of Applied Microbiology (LAMAABE), University of Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria

A. Aouar-Métri

Department of Ecology and Environment, University of Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria

M. Kihal

Laboratory of Applied Microbiology, University of Senia, Oran 31000, Algeria

F. Malek (✉)

Department of Biology, University of Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria

e-mail: malekfad@yahoo.fr

permitting their differentiation within the *B. cereus* group, and showing homogeneous contamination throughout the pasteurized milk processing line. The recurrent genotypes which belong to the potentially toxigenic group III *B. cereus* could threaten pasteurized milk safety.

阿尔及利亚巴氏杀菌乳加工生产线上分离的蜡状芽孢杆菌的分离鉴定与遗传多样性的研究

摘要：蜡状芽孢杆菌是乳品行业中比较受关注的一种食品级病原菌。在2006年和2010年从阿尔及利亚乳品厂巴氏杀菌乳加工生产线上分离出蜡状芽孢杆菌。该工厂巴氏杀菌乳以复原乳和奶粉为原料。本研究目的是分离鉴别蜡状芽孢杆菌并预测他们对食物的潜在毒性。分离的菌株通过M13引物PCR指纹法分析，菌株的系统发育组别水平通过panC 基因序列分析法来鉴定。这些菌株被分成三个不同的M13-PCR菌群：一个是具有17 菌株的大菌群和两个分别仅含有2株和1株的小菌群。这些菌株既来自加工设备，也来自奶粉，其中奶粉是菌株的主要来源物，奶粉是主要的污染源。来自主要菌群的菌株和次级菌群中的1株菌株属于嗜温菌种属III，然而第三组菌群中仅有的1株菌株属于嗜温菌种属IV。本研究的数据表明从奶粉和奶加工体系中分离的蜡状芽孢杆菌有较低的遗传多样性，在四年生产过程中特殊的蜡状基因型菌株一直存在于乳品环境中。M13-PCR 分类技术和菌种隶属对蜡状芽孢杆菌的定性很有用，允许蜡状芽孢杆菌菌属内部存在差异，同时表明了在整个巴氏杀菌乳生产线上存在相似的污染。重复出现的基因型菌株属于潜在的产毒蜡状芽孢杆菌属III，能够严重威胁到巴氏杀菌乳的安全。

Keywords *Bacillus cereus* group · M13-PCR typing · Phylogenetic groups · Dairy equipment · Milk powder · Pasteurized milk

关键词 蜡状芽孢杆菌属 · M13-PCR 分类 · 系统发育组 · 乳品设备 · 奶粉 · 巴氏杀菌乳

1 Introduction

Bacillus cereus sensu lato comprises closely related species that are of significant economic and clinical importance. With respect to human health, these bacteria can cause a wide range of diseases, including food poisoning, systemic infections, and highly lethal forms of anthrax (Didelot et al. 2009). *Bacillus cereus sensu stricto* is a frequent contaminant of food processing plants and is associated with food poisoning and spoilage. Hence, identification of *B. cereus sensu lato* is an important concern for the food industry.

Recent changes in the classification of the *B. cereus* group notably definition of phylogenetic groups (Guinebretière et al. 2008), modified to a large extent, identification within this group of bacteria. Indeed, the *B. cereus* group is actually composed by species that are not considered as separate genomic species but are distributed between seven phylogenetic groups (Guinebretière et al. 2008, 2010). These phylogenetic groups can be recovered in the Tourasse-helgason MLST database (<http://mlstoslo.uio.no/>). In addition to the six known species (*B. cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, and *Bacillus weihenstephansis*), a potentially novel species, *Bacillus cytotoxicus* has been placed in the phylogenetic group VII, and characterized by its high toxicity, its particular thermotolerance (growth at 50 °C), and its relatively rare occurrence.

Strains of the *B. cereus* group are also recognized to be highly, weakly, or non-pathogenic, depending on their potential to produce or not produce toxins (Svensson et al. 2007; Guinebretière et al. 2008, 2010; De Jonghe et al. 2010). Moreover, the ability of strains to cause food poisoning was recently reported to vary according to their phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation (Guinebretière et al. 2010). Consequently, in the food industry identification of bacterial strains at the phylogenetic group level is more pertinent than at species level to assess the food safety of the products.

In the dairy industry, *B. cereus* group spp., especially psychrotrophic strains, are recognized to limit the keeping quality of pasteurized milk (Svensson et al. 2004; Hanson et al. 2005; Barbano and Santos 2006; Aires et al. 2009). Contamination of pasteurized milk has been mainly traced to raw milk (Lin et al. 1998; Huck et al. 2007; Banykó and Vyletelová 2009) and/or equipment surfaces. The role of processing equipment as a reservoir for *B. cereus* milk recontamination is well documented (Te Giffel et al. 1997; Svensson et al. 1999, 2000, 2004; Schlegelova et al. 2010) notably post-pasteurization contamination (Eneroth et al. 2001; Sharma and Anand 2002; Salustiano et al. 2009). Currently, the persistence of this pathogen in various environments has been attributed to the formation of spores as well as biofilms. Thus it is important to accurately identify the sources of contamination and trace the spread of *B. cereus* in dairy plants. This may lead to a reduction in the level and incidence of *B. cereus* in pasteurized milk and improve the quality and shelf-life of the product.

Previous studies have reported a high incidence of *B. cereus* group strains in Algerian raw and pasteurized milk samples (Moussa Boudjema et al. 2004). High counts of these bacteria were also found on the process equipment surfaces of five dairy plants, which were suspected to be an important source of potential pasteurized milk recontamination (unpublished data). However, these strains have not been characterized further.

Rapid molecular typing methods such as sequence-based PCR or RAPD are widely used for typing *B. cereus* isolates (Guinebretière and Nguyen-The 2003; Svensson et al. 2004; Ehling-Schulz et al. 2005; Svensson et al. 2006; Thorensen et al. 2010). These genotypic methods are recognized to be good tools for tracing contaminations routes of *B. cereus* in pasteurized milk and have successfully been used for this purpose (Te Giffel et al. 1997; Svensson et al. 1999, 2000; Eneroth et al. 2001). Likewise the *panC* gene is a housekeeping gene described to provide a better opportunity to distinguish very closely related ecological populations, than ribosomal sequence data, and to rapidly assign bacterial isolates to groups I to VII of the phylogenetic classification (Guinebretière et al. 2008, 2010).

In the present study, isolates from one of these dairy plants, which had been investigated for several years for the presence of strains of *B. cereus*, were further characterized using the molecular typing M13-sequence-based polymerase chain reaction (M13-PCR). They were also assigned to phylogenetic groups (I to VII) based on *panC* sequence analysis. The main objectives were (1) to give more comprehensive data concerning the main sources of contamination for pasteurized milk, (2) to predict, in a first rapid step, their food poisoning potential using, as suggested by Guinebretière et al. (2010), a more accurate identification of representative strains (affiliation to phylogenetic groups within the *B. cereus* group).

2 Materials and methods

2.1 The processing plant

B. cereus isolates were collected in a dairy plant situated in northwest Algeria. Approximately 60,000 l of milk are handled per day in the plant. As local milk production is insufficient, in the 1970s the Algerian authorities began to import milk powder from various foreign countries. The milk powder is reconstituted and processed to obtain recombined pasteurized milk (Fig. 1).

2.2 Bacterial strains

Fifty strains belonging to the *B. cereus* group were isolated from monthly samplings of a pasteurized milk processing line over 4 years (in 2006 and 2010), and also from milk powder samples. All isolates were Gram-positive rods, spore producers, catalase positive, motile, and produced typical reactions on MYEP agar and hemolysis in blood agar. From these 50 isolates, 20 strains were selected for a more accurate molecular typing, based on their origin and morphological aspect of colonies. This resulted in a set of 20 strains with distinct origins and isolation periods (Table 1).

2.3 Molecular typing

2.3.1 M13-PCR

DNA preparation was performed according to the protocol described by Guinebrière and Nguyen-The (2003). The 20 isolates were typed by M13-PCR, using

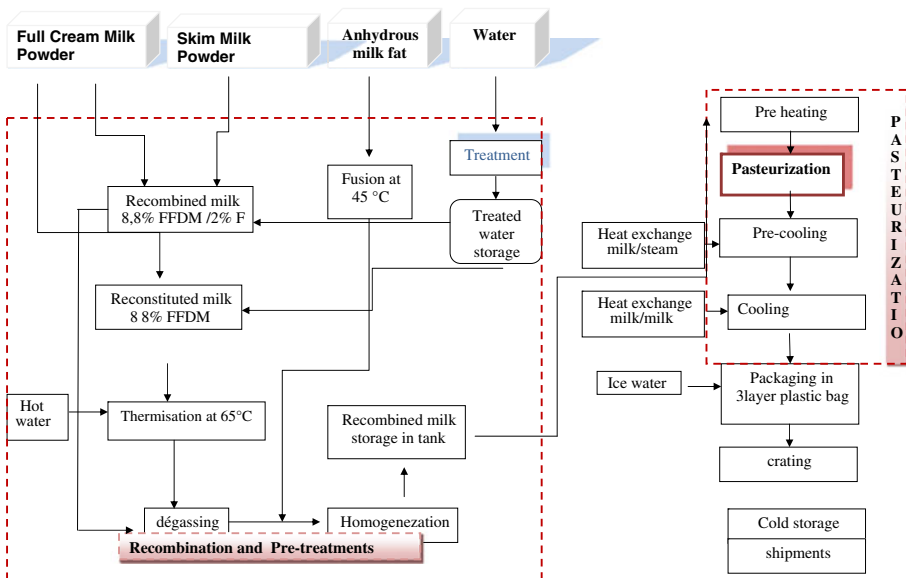


Fig. 1 Process flow diagram of recombined pasteurized milk at the dairy plant

Table 1 Molecular typing (M13-PCR) and phylogenetic affiliation of 20 *B. cereus* group strains isolated from different origins along the processing line

Strain origin	Year	M13 genotype	Representative strains	<i>Pan C</i> gene sequence analysis phylogenetic group—identity (%) ^a	
Milk powder					
BC1	2010	A			
BC5	2010	A			
BC9	2010	A			
BC12	2010	A			
BC19	2010	A	BC19	Group III	99.72
Pre-pasteurization					
Segments					
BC2	2010	A	BC2	Group III	99.72
BC6	2010	A			
BC7	2010	A			
BC8	2010	A			
BC13	2010	A			
BC18	2010	A			
BC20	2010	A			
BC10	2006	A			
BC11	2006	A			
BC17	2006	A			
Post-pasteurization					
Segments					
B15	2010	A	BC15	Group III	99.72
B16	2010	A			
Pre-pasteurization					
Segment					
BC3	2010	B	BC3	Group III	100
BC4	2006	B			
Pre-pasteurization					
Segment					
BC14	2010	C	BC14	Group IV	100

^a According to phylogenetic groups defined in Guinebretière et al. (2008, 2010)

the PCR reaction and the thermal cycling previously described (Guinebretière and Nguyen-The 2003). PCR products from M13-PCR were separated on 1.5% agarose gel, and the molecular weight DNA marker SmartLadder SL (Eurogentec) was used as a reference. Gels were stained with ethidium bromide and digitized using a gel imager (Bioblock, III-kirch, France).

2.3.2 *PanC* gene sequence analysis

The *panC* gene was sequenced for representative strains of the three M13-PCR groups. Polymerase chain reaction amplification, purification, and sequencing were

carried out as previously described in Guinebretière et al. (2008). Affiliation to the phylogenetic groups using the resulting *panC* gene sequences was performed on the web site: <http://www.tools.symprevius.org/Bcereus/english.php>

3 Results

3.1 Clustering of isolates according to their M13-PCR patterns

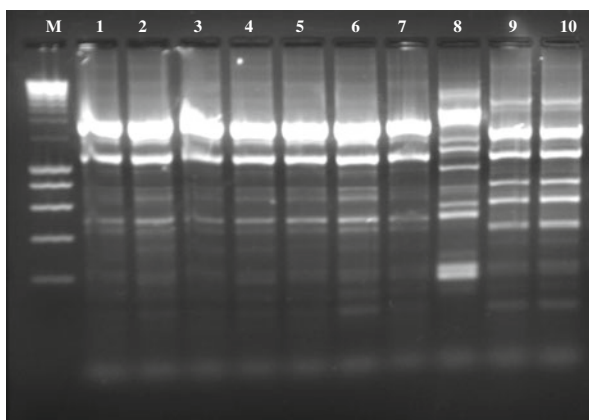
After gel electrophoresis of the M13-PCR products for each of the 20 analyzed strains, a relatively simple profile of DNA fragments was obtained (Fig. 2). Thus, all the isolates were easily classified into three M13 genotypes, a major one (A) and two minor (B and C). A very low level of genetic diversity was identified between these strains. Indeed, most of the strains were represented in the major M13 genotype A, despite their various origins (Table 1). Seventeen strains isolated from the processing equipment and milk powder were similar (genotype A), suggesting that the milk powder is the source of contamination of the milk processing system. In contrast, genotypes B and C, represented respectively by strains BC3/BC4, and BC14, could not be related to a specific source of contamination and were not recovered in the pasteurized milk (only genotype A was recovered in the post-pasteurization segments).

Interestingly, strains originating from the 4-year-old culture collection were identical to recently isolated strains from the same processing line, suggesting the persistence of genotypes A and B. As the nearly unique source of contamination for the pasteurized milk, the milk powder seems to be a source of homogeneous contamination.

3.2 Identification to phylogenetic groups

Five strains representative of the M13 genotypes were identified by *panC* gene sequences analysis on the web site: <https://tools.symprevius.org/Bcereus/english.php>.

Fig. 2 M13-PCR patterns generated for *B. cereus* group strains. Lanes 1 to 7 M13-PCR (genotype A): strains BC 19, 12, 13, 2, 5, 7, and 8. Lane 8 M13-genotype C: strain BC 14. Lanes 9 and 10 M13-genotype B: strains BC 4 and BC 3. Lane M DNA molecular mass marker (Ladder S L, Eurogentec)



The *B. cereus* group identity of isolates was thus confirmed and their assignment to phylogenetic groups, according to the Guinebretière et al. (2008) classification, was achieved (Table 1).

Results showed that genotypes A and B (i.e., 19 out of 20 analyzed strains) were affiliated to the mesophilic phylogenetic group III, whereas the last one (genotype C) to the mesophilic phylogenetic group IV (Table 1). Genotypes A and B are from the same phylogenetic group (group III), indicating a higher genetic relatedness than with genotype C. This finding corroborates the M13-PCR fingerprinting results. Therefore, the affiliation to phylogenetic groups III also indicates that these strains belong to one of the most cytotoxic groups (Guinebretière et al. 2010) comprising diarrheic as well as emetic strains, and that they probably represent a potential risk for consumers.

4 Discussion

Molecular methods used in this study allowed the genotyping and affiliation to phylogenetic groups of 20 *B. cereus* strains isolated from an investigated dairy plant. All strains were successfully characterized by the M13-PCR method used and their plant distribution accurately elucidated.

The fingerprints generated by M13-PCR revealed a low genetic diversity among the isolates. The 17 undistinguishable strains (genotype A) were found at different sampling points of the pasteurized milk processing line (pre- and post-pasteurization segments) and milk powder. This contrasts with data from the literature where a greater diversity of RAPD patterns among *B. cereus* strains isolated from dairy plants was recorded (Svensson et al. 1999, 2000, 2004). As an illustration, Eneroth et al. (2001) found that several *B. cereus* RAPD types originated from one sample only. The low genetic diversity identified by our results should be, first, ascribed to the nature of the raw material, i.e., milk powder which initially may harbor only a few genotypes. Indeed dehydrated products are assumed not to have favorable conditions for a wide diversity (Guinebretière and Nguyen-The 2003). Secondly, the pressure exerted by food processing conditions in factories is assumed to select some genetic groups (Carlin et al. 2010). Accordingly, restrictive processes such as heat treatment, often at abusive temperatures, both during milk powder production and milk powder processing may result in reducing the diversity of the processing plant microflora. This is consistent with the concept of the in-house microflora (Bagge-Ravn et al. 2003), which may be partly a reflection of the raw material used and partly a reflection of the particular warm climate that prevails in Algeria.

However, the in-house microflora investigated in this study was almost restricted to a single lineage with a persistence phenomenon across 4 years. This suggests a strong adaptation pattern of this lineage towards the ecological niche represented by the processing unit. Indeed, certain dairy plants are assumed to harbor particular plant-specific *B. cereus* which constantly contributes to post-pasteurization contamination (Schraft et al. 1999). Similarly, Salustiano et al. (2009) found that most of the *B. cereus* strains isolated from post-pasteurization equipment surfaces belonged to the same ribogroup. Once it is recovered from post-pasteurization segments, temperature appears to be the major factor that selects and maintains genotype A which best

survives the various thermal stresses undergone in the unit and before that. Finally, phylogenetic classification previously revealed a genetic structure of *B. cereus* strains corresponding to groups with different abilities to adapt to temperature. Thus, *B. cereus* group III contains mesophilic strains characterized with a comparatively high heat resistance of their spores (in Carlin et al. (2010)).

Protection of strains within biofilms formed inside pipe milking system may also be a survival strategy for the selected genotype. This phenomenon is well known in the dairy industry (Tauveron et al. 2006; Wijman et al. 2007; Salustiano et al. 2009; Schlegelova et al. 2010; Shaheen et al. 2010), where the predominant type that could be detected is best capable of contaminating the milk processing system. This is particularly true for *B. cereus* strains which have frequently been described as efficient biofilm formers. Furthermore, spores of *B. thuringiensis* and not only *B. cereus sensu stricto* were recently found to have high potential to adhere to inert surfaces (Ankolekar and Labbé 2010; Auger et al. 2009).

In conclusion, the common origin associated to both the selective pressure of temperature and persistence into biofilms should be responsible for this plant-specific distribution of group III *B. cereus* specific genotype.

A particular interest of the genetic groups III and IV is that they contain strains which carry various genes encoding toxins, representing a high risk for food poisoning (Guinebretière et al. 2010). The enterotoxigenic genes, *hbl*, *cytK-2*, and *nhe*, are present in strains of the two genetic groups, while the emetic gene *ces* is present in some members of the phylogenetic group III. As previously reported (Svensson et al. 2006), milk powder represents an important source of emetic bacteria. Overall, the occurrence of both pathogenic and non-pathogenic *B. cereus* strains in the dairy environment is well-established. Numerous studies have shown that this organism originates from the raw milk and contaminates the process equipment and may contaminate the processed products. Such dairy products, notably pasteurized milk products, should be low at-risk or high at-risk foods depending on the toxins production potential of contaminating strains. This illustrates the need for techniques that rapidly and accurately provide discriminative and informative data for the food-poisoning risk associated with *B. cereus* strains, as expressed in several reports (Thorensen et al. 2010; Chaves et al. 2011; Oh et al. 2012). Associating the phylogenetic groups with the different virulence potentials of *B. cereus* strains, first observed in Guinebretière et al. (2010), meets this requirement.

Algerian pasteurized milk is consumed by a large segment of the population including infants of less than 2 years. With regard to the food poisoning potential of identified strains, it may represent a health risk for consumers. However, to the best of our knowledge, no episodes of food poisoning have been reported after the consumption of pasteurized milk in Algeria. The reason for this may be the fact that the product is boiled by consumers before consumption. Unfortunately, this additional heating compromises once again the nutritional attributes of the product previously submitted to several heat treatments. Processors have then to particularly be aware that high temperature not only negatively affects the nutritional value of pasteurized milk but may also result in increasing *B. cereus* count in this product as shown by several studies (Hanson et al. 2005; Aires et al. 2009; Ranieri et al. 2009). Moreover, more attention must be paid to the quality and safety of Algerian pasteurized milk as an infant food, taking into account the particularities of this group of consumers.

To our knowledge, this is the first report on molecular typing and phylogenetic affiliation of *B. cereus* strains isolated in Algeria. It is also the first practical application of this classification to the study of an individual plant. M13-PCR analysis successfully traced the spread of *B. cereus* strains in the dairy plant, indicating that contamination of pasteurized milk could be traced also to milk powder, and not as previously expected, only to the process equipment. The two molecular methods revealed the persistence of specific and potentially toxin-producing *B. cereus* genotypes. The toxigenic profiles of the corresponding strains have to be further determined in order to accurately assess pasteurized milk safety.

Acknowledgments The authors wish to express their gratitude to Dr. C. Nguyen-The for kindly playing host to Fadila Malek at UMR 408, INRA, Avignon France and to Dr. M.H. Guinebretière for coaching her on the molecular analysis and for critical reading of the manuscript.

References

- Aires GS, Walter EH, Junqueira VC, Roig SM, Faria JA (2009) *Bacillus cereus* in refrigerated milk submitted to different heat treatments. *J Food Prot* 72:1301–1305
- Ankolekar C, Labbé RG (2010) Physical characteristic of spores of food-associated isolates of the *B. cereus* group. *Appl Environ Microbiol* 76:982–984
- Auger S, Ramaro N, Faille C, Fouillet A, Aymerich S, Gohar M (2009) Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and non pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* 75:6618–6676
- Bagge-Ravn D, Ng Y, Hjelm M, Christiansen JN, Johansen C, Gram L (2003) The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *Int J Food Microbiol* 87:239–250
- Banyakó J, Vyletelová M (2009) Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Lett Appl Microbiol* 48:318–323
- Barbano DM, Santos MV (2006) Influence of raw milk quality on fluid milk shelf-life. *J Dairy Sci* 89:15–29
- Carlin F, Brillard J, Broussolle V, Clavel T, Dupont C, Jobin M, Guinebretière MH, Auger S, Sorokine A, Nguyen-The C (2010) Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Res Int* 43:1885–1894
- Chaves JQ, Pires ES, Vivoni AM (2011) Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *B. cereus* isolated from food in Brazil over three decades. *Int J Food Microbiol* 147:12–16
- De Jonghe V, Coorects A, De Block J, Van Coillie E, Grijspeerd K, Herman L, De Vos P, Heyndrickx M (2010) Toxigenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int J Food Microbiol* 136:318–325
- Didelot X, Barker M, Falush D, Priest FG (2009) Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst Appl Microbiol* 32:81–90
- Ehling-schulz M, Svensson B, Guinebretière MH, Lindback T, Anderson M, Schulz A, Fricker M, Christiansson A, Granum PE, Martlbauer E, Nguyen-The C, Salinkoja-Salonen M, Scherer S (2005) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 15:183–197
- Eneroth A, Svensson B, Moli G, Christiansson A (2001) Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. *J Dairy Res* 68:189–196
- Guinebretière MH, Nguyen-The C (2003) Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 43:207–215
- Guinebretière MH, Thompson FL, Sorokin A, Normand P, Dawyndt P, Ehling-schulz M, Svensson B, Sanchis V, Nguyen-The C, Heyndrickx M, De Vos P (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ Microbiol* 10:851–865
- Guinebretière MH, Velge P, Couvert O, Carlin F, Debuyser ML, Nguyen-The C (2010) Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J Clin Microb* 48:3388–3391

- Hanson ML, Wendorff WL, Houk KB (2005) Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. *J Food Protec* 68:1484–1486
- Huck JR, Hammond BH, Murphy SC, Woodcock NH, Boor KJ (2007) Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. *J Dairy Sci* 90:4872–4883
- Lin S, Schraft H, Odumeru JA, Griffiths MW (1998) Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int J Food Microbiol* 43:159–171
- Moussa Boudjemaa B, Kihal M, Lopez M, Gonzalez J (2004) The incidence of *Bacillus cereus* spores in Algerian milk: a study on the chief sources of contamination. *Archive fur leben smittelhygiene* 55:73–76
- Oh MH, Ham JS, Jm C (2012) Diversity and toxigenicity among members of the *B. cereus* group. *Int J Food Microbiol* 152:1–8
- Ranieri ML, Huck JR, Sonnen M, Barbano DM, Boor KJ (2009) High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized milk. *J Dairy Sci* 92:4823–32
- Salustiano JC, Andrade NJ, Soares NFF, Lima JC, Bernardes PC, Luiz LMP, Fernandes PE (2009) Contamination of milk with *B. cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control* 20:439–442
- Schlegelova J, Babak V, Holasova M, Konstantinova L, Necedova L, Sisak F, Vlkova H, Roubal P, Jaglik Z (2010) Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech J Food Sci* 28:450–461
- Schraft H, Steele M, McNab B, Odumeru J, Griffiths MW (1999) Epidemiological typing of *Bacillus* spp. isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 62:4229–4232
- Shaheen R, Svensson B, Andersson MA, Christiansson A, Salkinjoiva-Salonen M (2010) Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol* 27:347–355
- Sharma M, Anand SK (2002) Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol* 19:627–636
- Svensson B, Eneroth A, Brendehaug J, Christiansson A (1999) Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. *Int Dairy J* 9:903–912
- Svensson B, Eneroth A, Brendehaug J, Molin G, Christiansson A (2000) Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant. *J Dairy Res* 67:455–460
- Svensson B, Ekelund K, Ogura H, Christiansson A (2004) Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *Int Dairy J* 14:17–27
- Svensson B, Monthan A, Shaheen R, Andersson MA, Salkinojova-Salonen M, Christiansson A (2006) Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *Int Dairy J* 16:740–749
- Svensson B, Monthan A, Gunibretière MH, Nguyen-The C, Christiansson A (2007) Toxin production potential and the detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the production chain. *Int Dairy J* 17:1201–1208
- Tauveron G, Slomianny C, Henry C, Faille C (2006) Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *Int J Food Microbiol* 110:254–262
- Te Giffel M, Beumer RR, Langeveld LPM, Rombouts FM (1997) The role of heat exchangers in the contamination of milk with *B. cereus* in dairy processing plants. *Int J Dairy Technol* 50:43–47
- Thorensen I, Azokpota P, Hansen BM, Hounhouigan DJ, Jakobsen M (2010) Identification, genetic diversity and cereulide producing ability of *Bacillus cereus* group strains isolated from Beninese traditional fermented food condiments. *Int J Food Microbiol* 142:247–250
- Wijman JGE, de Leeuw PPLA, Moezelaar R, Zwietering MH, Abec T (2007) Air liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation and dispersion. *Appl Environ Microbiol* 73:1481–1488

Full Length Research Paper

Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk

Malek F.¹, B. Moussa-Boudjemâa^{1*}, F. Khaouani-Yousfi³, A. Kalai¹ and M. Kihel²

¹Laboratory of Applied Microbiologies to Food, Health and Environmental (LAMAABE),
Faculty of Natural and Live Sciences, Tlemcen University, Tlemcen 13000, Algeria.

²Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of sciences, Oran University, Oran 31000, Algeria.

³Department of biology, Faculty of sciences, Mostaganem University, Mostaganem, Algeria.

Accepted 27 February, 2012

Bacterial contamination of pasteurized milk may originate from different sources: raw milk, process equipment surfaces and packaging materials. It is hypothesized that post-pasteurization contamination along the milk processing lines is responsible of reducing shelf life of Algerian pasteurized milk. This assumption was investigated through assessment of both the microflora of biofilms in milk pipeline systems at five dairy plants of Northwestern Algeria and the effectiveness of a quaternary ammonium based compound used for the disinfection of the plant equipment. Samples were collected before and after cleaning-in-place (CIP) systems from different segments of pasteurization lines with sterile cotton swabs. Quantitative assessment showed little reduction of the total bacteria count after CIP. On the average bacterial numbers were 5.6×10^3 , 1.2×10^4 , 5.1×10^4 , 2.5×10^5 and 9.7×10^7 cfu/cm², respectively, in the different units. Phenotypic identification of isolates revealed predominance of Gram-positive bacilli belonging to *Bacillus* and notably the *Bacillus cereus* group, at maximal levels of 72 and 21% respectively. The other Gram-positive microflora included *Staphylococcus* (30%) and *Micrococcus* (10%). In contrast, the incidence of the Gram-negative bacteria was relatively low. Two genera, identified as *Pseudomonas* (9%) and *Enterobacter* (6%), were found only in two dairies. Three dairies were Gram-negative bacteria-free. That should be the result of common contamination sources or highly environmental selective pressure. Further studies have to address these hypotheses. Treatment of experimental *Bacillus cereus sensu lato* strains biofilms with a 50, 100 and 150 ppm of quaternary ammonium disinfectant, showed a significant resistance of biofilms to this product even after long exposure time (15 min). This study emphasized the importance of aerobic spore-forming bacteria in dairy-processing equipment as they are able to built recalcitrant biofilms on the inside equipment surfaces with subsequent resistance to conventional CIP system and potential transfer to pasteurized milk. Therefore, in order to reduce the contamination levels of spore-forming bacteria and improve the quality and shelf life of the product, these dairies have, besides improvement in the hygienic status of the plant equipments, also to monitor either the pasteurization process or the contamination from raw material (that is, milk powder).

Key words: Milk contamination, pasteurization, biofilm, cleaning-in-place (CIP).

INTRODUCTION

In the dairy industry, equipment surfaces are recognized to be a major source of contamination of processed milk with both spoilage and pathogenic microflora. Adhered bacteria can detach and contaminate the product as it

passes the surfaces (Bagge-Ravn et al., 2003; Kusumaningrum et al., 2003; Brooks and Flint, 2008). In this case cross-contamination is a crucial economic and sanitary problem. Indeed, Biofilms are known to threaten

the quality and safety of dairy products and to significantly reduce their shelf-life (Austin and Bergeron, 1995; Chmielewski and Frank, 2003; Salustiano et al., 2009). Due to their resistance to heat treatments and to antimicrobial agents, biofilms developed on dairy processing lines are also difficult to remove even with acceptable cleaning and disinfecting procedures (Bore and Langsrud, 2005; Bremer et al., 2006; Brooks and Flint, 2008). In addition, bacterial re-contamination of food processing lines surfaces has been reported to occur again during cleaning-in-place procedures, due to the re-adhesion phenomenon (le Gentil et al., 2010). Several reviews in this field (Chmielewski and Frank, 2003; Shi and Zhu, 2009; Simoes et al., 2010; Vlkova et al., 2008) highlighted the significant emergence of resistant bacteria to conventional antimicrobial treatment and emphasize the need to develop new biofilm control strategies.

A recurrent problem in the dairy industry is the microbial quality of pasteurized milk. This product is exposed to middle heat treatments that do not ensure complete destruction of both spoilage and pathogenic bacteria. Despite improvement in the dairy technology, contamination of pasteurized milk especially with aerobic spore-forming bacteria remains a specific biological barrier that limits shelf life and quality of the product (Huck et al., 2007; Novak et al., 2005; Ranieri et al., 2009). Numerous studies were conducted throughout the world to solve this problem in order to extend pasteurized milk shelf life. However, the limiting factor varies from a country to another depending on the process conditions. Different potential contamination sources of pasteurized milk are reported: raw milk (Bartoszewicz et al., 2008; Lin et al., 1998; Ranieri and Boor, 2009), equipment surfaces (Salustiano et al., 2009; Sharma and Anand, 2002; Svensson et al., 2004) and packaging materials (Petrus et al., 2010; Simon and Hanson, 2001; Zygoura et al., 2004). Temperatures used for the pasteurization processes are also reported to affect processed milk shelf life (Aires et al., 2009; Hanson et al., 2005; Ranieri et al., 2009) as well as the somatic cell count of raw milk (Barbano et al., 2006).

Nevertheless, among these limiting factors, pasteurization process appears to be a key step with regard to spore-forming bacteria because the role of temperature on spore activation. Data from some reports indicated that temperature affects the microbial population of pasteurized milk in terms of the amount and type of microorganisms present following pasteurization, with higher bacterial number in milk processed at higher temperatures (Hanson et al., 2005; Ranieri et al., 2009).

The role of temperature on spore activation should be then stressed. In addition, when persisting on the dairy-processing equipment, the selective thermoresistant aerobic spore-forming microflora may develop biofilms that are difficult to remove and may compromise the quality and safety of the final product.

In Algeria, reconstituted pasteurized milk that is a widely consumed beverage is subject to high pasteurization at 85°C for 5 to 10 min. The level of bacterial contamination remains too high in the processed product, and consumers must boil milk again before any consumption.

Once post-pasteurization recontamination of processed milk is hypothesized, an approach to improve the quality of pasteurized milk and avoid this double heat treatment is to minimize contamination from biofilms on processing lines. However, in Algerian dairy manufacturing plants very little is known about the persistent microflora colonizing dairy equipment surfaces, and the development of biofilms. Therefore, until now, strategies for biofilm control rely mainly on the effectiveness of cleaning and disinfection procedures. Consequently, knowledge of the biofilm ecology is necessary to elaborate efficient cleaning and disinfection procedures that would target dominant species and successfully eliminate biofilms from the process equipment surfaces.

In the present study, identification, characterization of the dominant bacterial component in pasteurized milk lines and assessment of the effectiveness of a commonly used sanitizer on biofilm removal were the essential objectives.

MATERIALS AND METHODS

Collection of samples origin

Samples were collected from five (05) dairy plants located in the West of Algeria. All dairies produce pasteurized milk from medium heat skim milk powder imported from several countries. One of them uses also raw cow milk. The 5 plants adopt the same cleaning procedure: water pre-rinsing followed by, a caustic wash (2% NaOH at 70°C/5 min), and rinse with water. An acid wash (1% HNO₃ at 70°C/5 min). A final rinse with water completes the cleaning process. For the sanitization process, the dairies use chemical disinfection, especially with ammonium based products and occasionally with chlorine, or peracetic acid based products. A final rinse with water completes the process.

The samples were collected from different segments along the pasteurized milk production line, in the closed system. This includes essentially pre- and post-pasteurization sections of milk pipelines. The samples were taken either from cleaned and disinfected surfaces (after CIP) or from surfaces at the end of production (just before CIP), with sterile swabs (wooden applicator, cotton tipped, Batch M 20, Italy).

Dominant bacteria in pasteurized milk lines

After sampling, the swabs were transferred to 10 ml physiological

*Corresponding author. E-mail: b.moussaboudjemaa@gmail.com. Tel: +213 (0) 551 626 216. Fax: +213 (0) 43 38 27 17.

water (0.85% NaCl) with 0.1% peptone (Merck, Germany) and tenfold dilutions were performed and spread on Luria agar plates (LA): 10 g l⁻¹ tryptone, 5 g l⁻¹ yeast extract and 5 g l⁻¹ NaCl (Microbiology Fermentech Merck Germany). The agar plates were incubated at 30°C for 72 h. The number of colony-forming unit was counted and the colony morphology was noted. A representative number of colonies were isolated randomly from the agar plates and pure cultured on Luria-agar. They were then frozen-stored for further identification and characterization.

Identification and characterization of selected isolates

The identification of isolates was based on colony morphology, Gram's reaction and biochemical tests following standard procedures.

A screening for the *Bacillus cereus* group species was performed among the isolated aerobic spore forming bacteria, according to the AFNOR (1996) standard recommendations. Five colonies with the typical mannitol negative and lecithinase positive characteristic of *B. cereus* were then selected from MYEP plates. Identification of isolates to the *B. cereus* group was confirmed by growth on blood agar (Fluka Biochemica Spain) and microscopical observation of endospores.

Selected isolates were also characterized on their important characteristics with respect to biofilm formation and their physiological significance in the dairy industry (Pirttijarvi and al., 2000; Sharma and Anand, 2002). These include growth at 7 and 10°C for 10 days, at 37 and 55°C for 24 h and hydrolysis of food components: starch, casein, tested with skim milk and lipid, tested with tween 80 (Fluka UK).

Effect of a quaternary ammonium disinfectant on experimental biofilms

Preparation of biofilm

To investigate the effectiveness of the quaternary ammonium compound, 24 h Biofilms were formed on stainless steel chips by microorganism carrier-surface method of Maris (1992). Stainless steel chips (AISI 304 L, 2 x 2 cm) were treated according to the protocol proposed by Peng et al. (2002). Two *B. cereus* strains were used for this purpose: *B. cereus* ATCC11778 USA, (Bc R) and *B. cereus* (Bc 6) isolated from pasteurized milk processing line in one of the dairies studied.

Disinfection treatment

The disinfection test was performed according to the procedure described by Peng et al. (2002). 0.1 ml of planktonic cells or chips containing biofilms were exposed in 20 ml of the sanitizer Divosan® (Divosan® QC Johnson Diversey F), 50, 100 and 150 ppm, one chip per test tube, at room temperature. After time exposure (5, 10 and 15 min), the planktonic cells or chips were removed and immediately mixed with neutralizing buffer solution (Difco). Viable cells were then enumerated in plate count agar.

RESULTS AND DISCUSSION

Count of bacterial contaminants

The mean values before CIP system application were

high and ranged from 3.5×10^5 to 2.5×10^9 cfu/cm² (Table 1). Such high levels of bacteria suggested a wide contamination of milk lines that could be traced mainly to skim milk powder. After CIP we found also high numbers (1.0×10^7 and 5.7×10^7 ufc/cm²) in two dairies, respectively D3 and D5. This indicates that important microflora still colonizes the surfaces. Logarithmic reduction of the total count obtained after CIP system is thus very low, 0,039, 2,202, 2,398, 0,236 and 1,231 respectively in D1, to D5 respectively. The maximal value (2.398) was reached in D3 plant. In this plant a subsequent residual number of bacteria (1.0×10^7 cfu/cm²) was observed. These results show clearly that the cleaning and disinfection procedures were insufficient in all dairies and failed to adequately remove adhered bacteria from the process equipment.

The role played by initial contamination of milk on the microbial quality of the processed product is highlighted, and until now many studies focused on investigation of the microbial ecology of raw milk and its effects on the quality and shelf life of the heat treated milk (Huck et al., 2007; Martin et al., 2011; Ranieri and Boor, 2010). In the case of Algerian pasteurized milk the raw material is the medium-high heat milk powder imported from different countries. It is contaminated with spore-forming bacteria (unpublished data) and should be a possible secondary contamination source of recombinated pasteurized milk, while equipment surfaces should be a possible primary contamination source.

Indeed results show that bacterial contamination of the process equipment occurred at high levels. It may result in the development of thick and recalcitrant biofilms whose removal with conventional cleaning and disinfection procedures is more difficult. In another hand, density up to 10^8 cfu/cm³ has been reported to result on biofilms structures consisting of several layers (Gibson et al., 1999). These thick biofilms can then reduce the efficiency of heat transfer when they occur at location such as plate heat exchanger leading to lower the pasteurization treatment. To solve this problem, processors increase heat treatments. Such practice affects negatively nutritional and sensorial quality of processed milk without any improvement in the microbial quality. It has been showed that increasing heat treatments does not necessary lead to lower bacteria number in the final product. Inversely affect microbial numbers during storage of pasteurized milk (Hanson et al., 2005; Ranieri et al., 2009). The role of heat on selecting spore forming bacteria is well-known.

New strategies that permit the right management of these heat treatment processes are then required. Recently, non-thermal preservations methods of pasteurized milk such as pulsed electric fields and microfiltration (Sepulveda et al., 2009; Walking-Ribeiro et al., 2011) were investigated and should be an interesting alternative.

Table 1. Bacterial contamination of pasteurized milk processing lines in Five West Algerian dairy plants before and after cleaning and disinfection.

Dairies		Mesophilic aerobic flora (cfu/cm ²)		
		Before CIP	After CIP	Decimal reductions
Dairy 1	min	2.5×10^4	2.7×10^3	0.967
	Mean	3.5×10^5	3.2×10^5	0.039
	Max	2.4×10^6	2.1×10^4	0.058
Dairy 2	min	3.5×10^5	3.2×10^4	0.039
	Mean	3.5×10^6	2.2×10^4	2.202
	Max	9.7×10^8	6.7×10^7	1.161
Dairy 3	min	1.5×10^6	2.3×10^4	1.814
	Mean	2.5×10^9	1×10^7	2.398
	Max	4.5×10^9	1.1×10^7	2.612
Dairy 4	min	3.4×10^5	2.2×10^5	0.189
	Mean	4.3×10^5	2.5×10^4	0.236
	Max	3.5×10^6	2.1×10^4	1.222
Dairy 5	min	1.5×10^6	2.5×10^4	1.778
	Mean	9.7×10^8	5.7×10^7	1.231
	Max	3.5×10^9	2.1×10^7	1.113

Dominant microflora of pasteurized milk processing lines

One hundred and eight-six isolates were selected from different stainless steel segments of the five dairies. The distribution pattern of the isolates (Table 2 and Figure 1) reveals a large dominance of Gram-positive strains with emerging aerobic spore forming rods, belonging to the genus *Bacillus*. High numbers of bacilli were found at the five dairies. They were isolated before and after pasteurization segments of the processing lines. Levels ranged from 51 to 72%. These results are in agreement with those obtained by Sharma and Anand (2002) who respectively found 59 and 64% bacilli in two dairy plants investigated.

Bacilli are recognized to dominate on processes involving heat treatment. That may activate the spores and kill the competing non-sporeforming microflora. Consequently, these organisms are predominant contaminants of heat-treated milk and are incriminated in the deterioration and keeping quality of the product. Recently, the majority of aerobic spore-forming bacteria in pasteurized milk was, indeed, assigned to *Bacillus* and *Paenibacillus* genera (Ranieri and Boor, 2009) or *Bacillus* and among other representative of the genus, type strains of species belonging to the *Bacillus cereus* group (Coorevits et al., 2008; Zhou et al., 2008). The occurrence of potentially toxic members of the latter

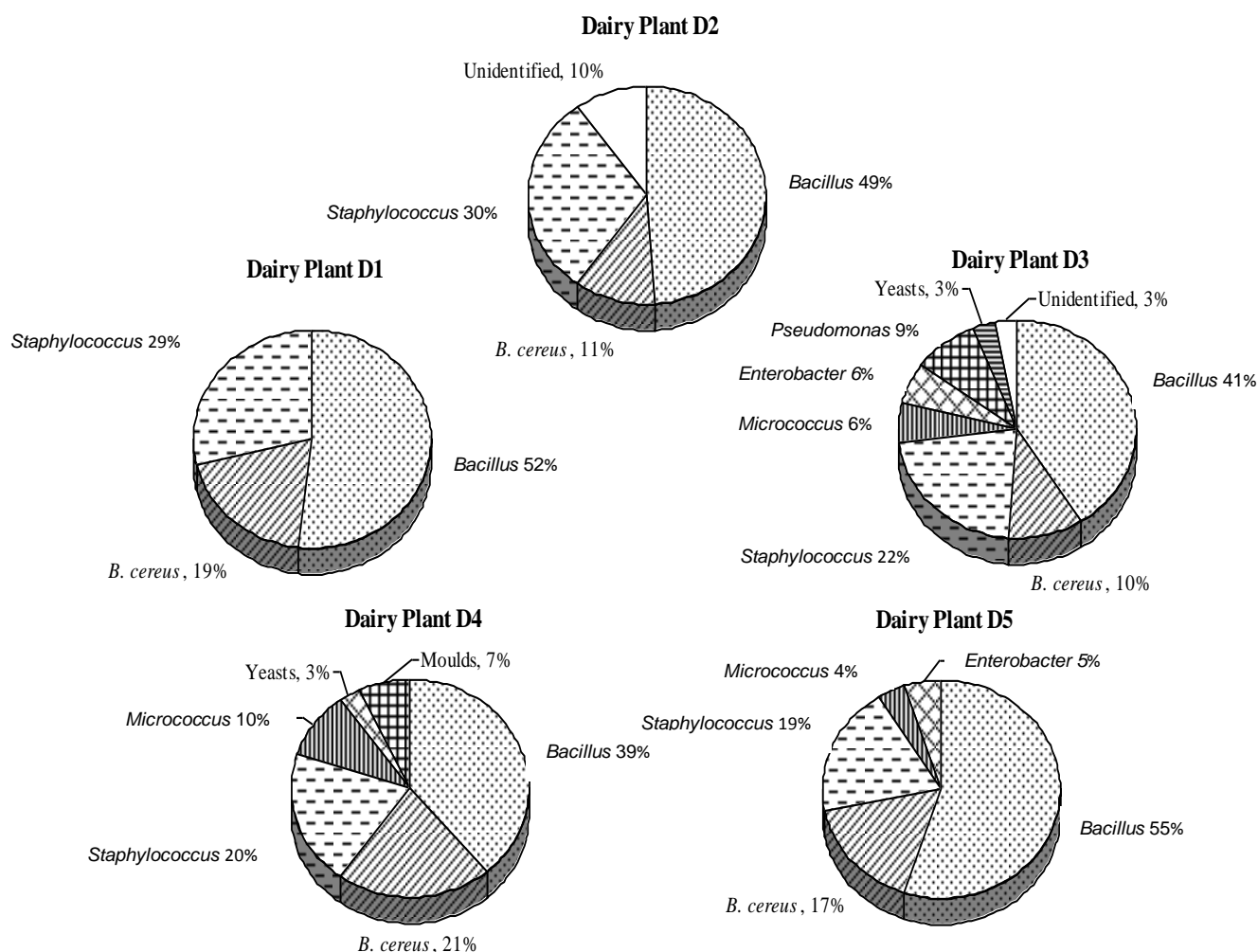
group in both raw and heat-treated milk was also reported (Bartoszewicz et al., 2008).

In the present study, members of the potentially pathogenic *Bacillus cereus* group were also found in all the investigated plants as well, levels varied between 10 and 21%. Data from literature showed the wide spread of *B. cereus* in the dairy environment. Several potential sites of contamination by these bacteria are identified along the entire milk production line. Indeed, the bacterium was isolated from milk silo tanks (Moussa et al., 2004; Svensson et al., 2004), pasteurizers (Svensson et al., 2000; Te Giffel et al., 1997), and the filling machine (Eneroth et al., 2001). Now, it is well known that post-pasteurization sections are reservoirs of *B. cereus* (Salustiano et al., 2009). Besides heat resistance, members of the *B. cereus* group are described to adhere easily to surfaces and to be excellent biofilm formers (Faille et al., 2001; Peng et al., 2002). Therefore, Wijman et al. (2007) observed that thick biofilms of *B. cereus* developed in industrial piping systems that are partly filled during operation or where residual liquid has remained after a production cycle. Shaheen et al. (2010) have even found that dairy silo tank isolates possessing hot-alkali resistant spores were capable of germinating and forming biofilm in whole milk, not previously reported for *B. cereus* at that time.

The other Gram-positive bacteria included *Staphylococcus* and *Micrococcus* genera, which are, with

Table 2. Distribution pattern of isolates based on primary identification

Type of organism	% total isolates				
	Dairy 1	Dairy 2	Dairy 3	Dairy 4	Dairy 5
Gram + rods	71	60	51	60	72
Gram - rods	00	00	15	00	5
Gram + cocci	29	35	28	30	23
Yeast	00	00	3	3	00
Moulds	00	00	00	7	00

**Figure 1.** Distribution pattern of isolates in five Algerian dairy plants.

Lactobacillus, *Listeria* and *Streptococcus*, the most commonly encountered bacteria in dairy environments (Sharma and Anand, 2002). *Staphylococcus* is well represented and account for 29, 30, 22, 20, and 19% in the five dairy plants respectively. It is the second genus after *Bacillus*. Both biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* (Schlegelova et al., 2008) and *Enterococcus*

especially *E. faecalis* and *E. faecium* (Necidova et al., 2009), were also isolated from dairy plants. Data from some reports indicated that a more various microflora compose biofilms formed on the surfaces of the processing equipment depending on the various food industries. *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and yeasts were found to be the dominant groups of microorganisms

in a caviar-processing plant (Bagge-Ravn et al., 2003). Moreover, as outlined by these authors every industry possesses its own in-house-flora reflecting the product produced. Food processing plants producing the same food product will also have different biofilms, as processes will never be 100% alike.

Our work showed that in the dairy plants investigated Gram-positive bacteria are well represented and constitute the in-house flora of the dairies. However the absence of lactic acid bacteria that is, *Lactobacillus*, from the pasteurized milk processing line should be noted. This may be due to the nature of the raw material that is processed, since high heat milk powder is used instead of cow's raw milk in most instances.

Similarly, the Gram-negative bacteria were found in two dairies only: D5 and D3, at levels of 5 and 15% respectively. They were identified as *Pseudomonas* and *Enterobacter* which are also wide spread in dairy facilities. In addition to these genera, Sharma and Anand (2002) described the presence of *Shigella* spp. and *E. coli*. In this study, three dairies were entirely Gram-negative bacteria free which firstly argues for a plant-specific microflora. Otherwise, these results support also the fact that predominance of Gram-positive bacteria may happen because a higher proportion of Gram-negative cells were not capable of surviving pasteurization (Carpentier et al., 1998). Moreover, It has also been reported that Gram-positive bacteria such as *Streptococcus thermophilus* and *Bacillus* spp organized in biofilms are more difficult to remove than Gram-negative bacteria by conventional cleaning and disinfection procedures in the dairy industry (Bremer et al., 2006). Single species of bacteria often dominate in biofilm (Flint et al., 1997). In contrast Bagge-Ravn et al., (2003) found that the Gram-positive flora was significantly reduced by cleaning and disinfection and Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and Neisseriaceae were the remaining microflora on the processing equipment of the fish plants investigated. According to these authors most of the microorganisms isolated are typical members of the normal fish microflora. These results strengthened the idea of the in-house-flora that will change from product to product and from processing unit to processing unit (Bagge-Ravn et al., 2003). However, the remaining bacteria may also be a reflection of cleaning and disinfection regimes adopted by these plants. According to Svensson et al. (2004) the in-house-flora also means that the cleaning system of the process equipment may not be satisfactory.

At last it is possible to note that general microflora of biofilm on pasteurized milk production lines in these dairy plants consists mainly of bacteria; yeast and moulds were found at low levels (from 3 to 7%), only in two plants (D3 and D4). Therefore the composition of this in-house-microflora little varied between the different plants. The dissemination of Gram-positive cocci and spore-forming

bacteria may suggest highly selective technological processes, notably inadequate pasteurization, and sanitizing treatments. Indeed bacteria are known to survive otherwise lethal stress treatments when they are inappropriate, and become more tolerant to them. Once in the five dairies it has been demonstrated that heavy contamination remains overall milk processing line, subsequent and recalcitrant biofilms may notably develop and resist the cleaning system. Biofilms may also affect adversely the efficiency of the pasteurization treatment. However, initial contamination of raw material (that is, milk powder) could not be neglected as well.

Distribution of selected isolates according to their properties related to food hygiene

Characterization of selected isolates indicated that most of the strains selected produced different enzymes (proteases, lipases and amylases), which is of concern in food hygiene because of their hydrolytic activities on food components. Several *Bacillus* species are known to be strongly proteolytic and producing lecithinase activity regarding the *B. cereus* group. It is well known that in pasteurized milk, these enzymes will cause protein and fat degradation during storage and produce off-flavors. Moreover such bacteria are considered as good biofilms producers (Carpentier et al., 1998).

Strains were also able to grow at a large range of temperature from 7 to 55°C (Table 3). The frequency of occurrence of the psychrotrophic microflora was relatively low in D3 (6%) and D4 (7%) and null in D5. While in the same plant about 32% of the isolates grew at 55°C, and 21% in D4. Whereas, none of the selected isolates obtained from D3 were able to grow at this temperature. Given that raw material of these dairy plants is milk powder, it is not surprising that isolates were mostly mesophilic or moderately thermotolerant and not psychrotrophic bacteria. In the case of *B. cereus*, Te Giffel (1997) showed the absence of psychrotrophic strains in milk powder and attributed that to the process used to make powder. Growth at 55°C should then be due to thermophilic *bacilli* belonging to the genus *Bacillus* as well as other genera that are also frequent contaminants in the dairy industry. We can cite *Geobacillus* and *Anosybacillus* which are recognized as commonly occurring during the production of milk powder (Rueckert et al., 2005).

Inactivation of *B. cereus* biofilms by sanitizer

B. cereus was found among the microflora of pasteurized milk production line, in the various units studied. This bacterium is described as an excellent biofilm former due to the pronounced ability to its spores to adhere to

Table 3. Distribution pattern of strains based on the growth temperatures.

Dairy plant	Psychrotrophic	Mesophilic (%)	Thermophilic
D3	7%	93	00
D4	6%	62	32%
D5	00	79	21%

Table 4. Inactivation of *B. cereus* biofilm by a quaternary ammonium sanitizer.

Strain	Bacterial live organisation	Disinfectant concentration (ppm)	Population reduction ^(a) after treatment with disinfectant			
			5 min	10 min	15 min	
Bc R	planktonic cells	50	3.16	3.69	3.84	
	Biofilms		1.27	1.29	1.39	
Bc 6	planktonic cells		3.37	3.50	3.80	
	Biofilms		1.10	1.16	1.24	
Bc R	planktonic cells		100	3.98	4.13	4.77
	Biofilms			1.36	1.42	1.56
Bc 6	planktonic cells	3.84		3.98	4.80	
	Biofilms	1.12		1.19	1.40	
Bc R	planktonic cells	150		5.61	5.64	5.92
	Biofilms			2.02	2.19	2.46
Bc 6	planktonic cells		4.23	5.02	5.35	
	Biofilms		1.47	1.55	1.69	

^aobtained by subtracting final population (log cfu/mL or cm²) after treatment from original population (log cfu/mL or cm²).

stainless steel surfaces (Peng et al., 2002), and it is also known for its resistance to chemical disinfectants (Faille et al., 2001; Peng et al., 2002).

For disinfection with the quaternary ammonium Divosan®, supplier recommended minimal concentration of 50 ppm and a contact time of 5 min. The present study has shown that *B. cereus* biofilms were resistant to disinfection in these conditions, maximal decimal reduction of biofilm cells did not exceed 1.4 log cfu/cm² (Table 4). Increasing the concentration of sanitizer to 100 and 150 ppm and exposure time to 10 and 15 min, did not result on any significant effect on biofilms of both Bc.

6 and Bc. R strains, compared to planktonic cells. It seems clear that quaternary ammonium based disinfectants have better effect on planktonic cells than on biofilms as outlined in the literature (Peng et al., 2002, Shi and Zhu, 2009).

Resistance of biofilm to antimicrobial is well documented. Several hypotheses are formulated to explain this phenomenon. In the food industry, dissemination of resistance has been attributed to inefficient biofilm control by conventional cleaning and disinfection regimens. Bacteria submitted to sublethal concentrations of sanitizer agents have been demonstrated to exhibit highly

adaptative responses (Simoes et al., 2009). Another reason for this is species association that occurs within biofilm. Protection of species one another are then assumed to increase biofilm resistance to chemical and mechanical treatment (Simoes et al., 2009; Vlkova et al., 2008). Nevertheless, according to Kim et al. (2008) the major reason for antimicrobial tolerance of biofilms is the presence of dormant cells. Indeed, physiological heterogeneity in biofilms has been reported (Stewart and Franklin, 2008). Bacteria that are in a wide range of physiological states result on variability of phenotypes with different patterns of resistance. Thus, within biofilms, spores which are inactive cells, may exhibit a double resistance in addition to their natural resistance to aggressive environments. Data from several reports showed that *B. cereus* spores are more difficult to remove from stainless steel surfaces than vegetative cells using CIP procedures (Faille et al., 2001; Peng et al., 2002).

The success of sanitizer effect also depends on the efficiency of the cleaning regimes which must lead to the removal of cells and organic debris as well as the elimination of viable cells (Parkar et al., 2004). Less than 0.85 cfu/cm² *B. cereus* adhesion was found by Salutiano et al. (2009) after treatment of *B. cereus* biofilms with sodium hypochlorite following an adequate cleaning regime. Guinebretière et al. (2003) also described in a zucchini purée processing line efficient cleaning procedures used for equipment surfaces which prevent the installation of *B. cereus*. These included three successive steps of washing with hot water and at the end of each processing day, surfaces were cleaned with disinfectant solutions containing, among other sanitizers, specifically one *B. cereus* sporocide. Sporocide products are then required in disinfectant formulations destined to sporeformer bacteria biofilms.

Another approach to kill spores inside biofilms is to activate them prior to their submission to any sanitizer agent in order to make easy their elimination as germinating cells. Different strategies are adopted for this purpose. These include spore sensitivity (Shaheen et al., 2010) and use of spore germination inducers (Hornstra et al., 2007), treatments before any sanitation process application. According to the latter, up to 80% of the germinated *B. cereus* spores could be removed from the surface tested with germination inducers, as germinating spores lose their resistance capacities instantaneously. This could be then a valuable strategy to improve the control of spore-forming bacteria biofilms.

Conclusion

Gram-positive bacteria mainly *Bacillus* spp. and members of the *B. cereus* group were shown to be dominant bacteria of the processing equipment in the dairy plants analyzed. As a consequence, potentially extensive and

recalcitrant biofilms may develop on these equipments and contribute to notably reduce the efficiency of the pasteurization and sanitation treatments as well as to potentially re-contaminate processed milk. Therefore this typical microflora which is partly a reflection of the raw material used and partly a reflection of highly selective technological processes requires a specific cleaning regime to both target the dominant species and suit the conditions of the plants. This means that sanitizer procedures must allow effectively reaching spores inside the biofilm. To achieve this goal disinfectant products have to be chosen for their sporocidal effect as well as for their activity against biofilms.

On the perspective of this study is it the molecular characterization of the selected isolates using a PCR-RAPD based method that should verify whether equipment surfaces are really the major source of pasteurized milk contamination?

REFERENCES

- Aires GS, Walter EH, Junqueira VC, Roig SM, Faria JA (2009). *Bacillus cereus* in refrigerated milk submitted to different heat treatments. J. Food Prot., 72(6): 1301-1305.
- Austin JW, Bergeron G (1995). Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. J. Dairy Res., 62: 509-519.
- Bagge-Ravn D, Hjelm M, Christansen JN, Johansen C, Gram L (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries - analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. Int. J. Food Microbiol., 2718 : 1-12.
- Barbano DM, Ma Y, Santos MV (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf-life. J. Dairy Sci., 89 (1): 15-29.
- Bartoszewicz M, Hansen BM, Swiecicka I (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. Food Microbiol., 25(4): 588-596.
- Bore E, Langsrud S (2005). Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. J. Appl. Microbiol., 98(1): 96-105.
- Bremer PJ, Fillery S, McQuillan AJ (2006). Laboratory scale clean in place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. Int. J. Food Microbiol., 106: 254-262.
- Brooks JD, Flint SH (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. Int. J. Food Sci. Tech., 43 (12): 2163-2176.
- Carpentier B, Wong ACL, Cerf O (1998). Biofilms on dairy plants surfaces: what's new. B. IDF 329.
- Coorevits A, De Jonghe V, Vandroemme J, Reekmans R, Heyman J, Messens W, De Vos P, Heyndrickx M (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional farms. Syst. Appl. Microbiol., 31(2): 126-40.
- Chmielewski RAN, Frank JF (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. Compr. Rev. Food Sci. Food Safety, 2: 23-32.
- Eneroth A, Svensson B, Moli G, Christiansson A (2001). Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. J. D. Res., 68: 189-196.
- Faille C, Fontaine F, Bénézech T (2001). Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. J. Appl. Microbiol., 90: 892-900.
- Flint SH, Bremer PJ, Brooks JD (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. Biofouling, 11(1): 81-97.
- Gibson H, Taylor JH, Hall KE, Holah JT (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in term of removal of

- bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 41-48.
- Guinebrière MH, Girardin H, Dargaignaratz C, Carlin F, Nguyen-the C (2003). Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line. *Int. J. Food Microbiol.*, 82: 223-232.
- Hanson ML, Wendorff WL, Houck KB (2005). Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. *J. Food Protect.*, 68(7): 1484-1486.
- Hornstra LM, De Leeuw PL, Moezelaar R, Wolbert EJ, De Vries YP, De Vos WM, Abee T (2007). Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.*, 116(3): 367-71.
- Huck JR, Hammond BH, Murphy SC, Woodcock NH, Boor KJ (2007). Tracking Spore-Forming Bacterial Contaminants in Fluid Milk-Processing Systems. *J. D. Sci.* 90(10): 4872-4883.
- Lin S, Schraft H, Odumeru JA, Griffiths MW (1998). Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 43(3): 159-171.
- Kim J, Hahn JS, Franklin MJ, Stewart PS, Yoon Y (2008). Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm to antimicrobial agents. *J. Antimicrobial Chemother.*, 63(1): 129-135.
- Kusumaningrum HD, Riboldi G, Hazeleger WC, Beumer RR (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 85: 227-236.
- Le Gentil C, Sylla Y, Faille C (2010). Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *J. Food Eng.*, 96: 37-42.
- Maris P (1992). Biofilm and disinfection of microorganism carrier-surface method. *Sci. Aliment.*, 12(4): 721-728.
- Martin NH, Ranieri ML, Murphy SC, Ralyea RD, Wiedmann M, Boor KJ (2011). Results from raw milk microbiological tests do not predict the shelf life performance of commercially fluid milk. *J. Dairy Sci.*, 94(3): 1211-1222.
- Moussa BB, Kihal M, Lopez M, Gonzalez J (2004). The incidence of *Bacillus cereus* spores in Algerian milk: a study on the chief sources of contamination. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 55: 73-96.
- Novak JS, Call J, Tomasula P, Luchansky JB (2005). An assessment of pasteurization treatment of water, media, and milk with respect to *Bacillus* spores. *J. Food Prot.*, 68(4): 751-7.
- Necidova L, Janstova B, Karpiskova S, Cupakova S, Duskova M, Karpiskova R (2009). Importance of *Enterococcus* spp. for forming a biofilm. *Czech J. Food Sci.*, 27(2): S354-S356.
- Parkar SG, Flint SH, Brooks JD (2004). Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 110-116.
- Peng JS, Tsai WC, Chou CC (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.*, 77: 11-18.
- Petrus RR, Loiola CG, Olivira CA (2010). Microbiological shelf life of pasteurized milk in bottle and pouch. *J. Food Sci.*, 75(1): 36-40.
- Pirttijarvi TSM, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS (2000). Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. *Int. J. Food Microbiol.*, 60: 231-239.
- Ranieri ML, Huck JR, Sonnen M, Barbano DM, Boor KJ (2009). High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 92(10): 4823-32.
- Ranieri ML, Boor KJ (2009). Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States. *J. Dairy Sci.*, 92(10): 4833-4840.
- Rueckert A, Ronimus RS, Morgan HW (2005). Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. *J. Microbiol. Meth.*, 60(2): 155-167.
- Salustiano JC, Andrade NJ, Soares NFF, Lima JC, Bernardes PC, Luiz LMP, Fernandes PE (2009). Contamination of milk with *B. cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control.*, 20(4): 439 - 442.
- Schlegelova J, Babak V, Holasova M, Dendis M (2008). The biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* isolates in raw materials, foodstuffs and on contact surfaces in processing plants. *Folia Microbiol.*, 53(6): 500-504.
- Sepulveda DR, Gongora-Nieto MM, Guerrero JA, Barbosa-Canovas GV (2009). Shelf life of whole milk processed with pulsed electric fields in combination with PEF-generated heat. *Food Sci. Technol.*, 42(3): 735-39.
- Shaheen R, Svensson B, Andersson MA, Christiansson A, Salkinoja-Salonen M (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol.*, 27(3): 347-55.
- Sharma M, Anand SK (2002). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol.*, 19: 627-636.
- Shi X, Zhu X (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Tech.*, 20: 407-413.
- Simon M, Hansen P (2001). Effect of various dairy packaging materials on the shelf life and flavor of pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 84(4): 767-73.
- Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ (2009). Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Res.*, 43: 229-237.
- Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Sci. Technol.*, 43: 573-583.
- Stewart PS, Franklin M (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6: 199-210.
- Svensson B, Enoroth A, Brendehaug J, Molin G, Christiansson A (2000). Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant. *J. Dairy Res.*, 67: 455-460.
- Svensson B, Ekelund K, Ogura H, Christiansson A (2004). Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *Int. Dairy J.*, 14: 17-27.
- Te Giffel M, Beumer RR, Langeveld LPM, Rombouts FM (1997). The role of heat exchangers in the contamination of milk with *B. cereus* in dairy processing plants. *Int. J. Dairy Technol.*, 50(2): 43-47.
- Vlkova H, Babak V, Seydlova R, Pavlik I, Schlegelova J (2008). Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and effectiveness on biofilms – a review. *Czech J. Food Sci.* 26(5): 309-323.
- Walking-Ribeiro M, Rodriguez-Gonzalez O, Jayaram S, Griffiths MW (2011). Microbial inactivation and shelf life comparison of 'cold' hurdle processing with pulsed electric field and microfiltration, and conventional pasteurization in skim milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 144(3): 379-386.
- Wijman JGE, De Leeuw PPLA, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T (2007). Air liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation and Dispersion. *Appl. Environ. Microb.*, 73(5): 1481-1488.
- Zhou G, Liu H, He J, Yuan Y, Yuan Z (2008). The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 121(2): 195-200.
- Zygoura P, Moyssiadi T, Badeka A, Kondyli E, Savvaidis I, Kontominas MG (2004). Shelf life of whole pasteurized milk in Greece: effect of packaging material. *Food Chem.*, 87(1): 1-9.

ملخص

يسبب تطور الببوفيلم على سطوح الأجهزة في معامل صناعة و تجهيز الأغذية، تلوث للمنتجات المصنعة، مما يؤدي الى الحد من مدة صلاحيتها ، وتشكيل المخاطر الصحية للمستهلكين. ومثل على ذلك هو النوعية غير المستقرة للحليب المبستر المنتج محليا. أظهر تقييم للأحياء الدقيقة على سطوح المعدات في بعض مصانع الألبان التي تقع في منطقة تلمسان مستويات تلوث عالية حتى بعد إجراء عمليات التنظيف والتطهير. تعتبر العصبيات النبوغية، ولاسيما أعضاء المجموعة *B. cereus* هي الغالبة في الأشرطة الحيوية. تختص هذه الأخيرة بضعف في تنوعها الوراثي (ثلاثة ملامح وراثية -M13-PCR، وانتمائها إلى المجموعات الوراثية الثالثة والرابعة المسببة للأمراض. مصدر التلوث الرئيسي للمعدات هو مسحوق الحليب على النحو الذي حدده النمط الجيني و هو مصدر انتشار و تواجد النمط الجيني (A) عبر أربع سنوات في مصنع الحليب.

وكشفت تجارب تقييم امكانيات السلالات على نمط التصاق خاص، يتميز بمعدلات عالية في متوسط الالتصاق على الفولاذ المقاوم للصدأ في حالة التعرية او التغطية بالمواد الغذائية. و لقد لوحظ ان الاغشية الغذائية المتكونة من سكر اللبن (اللاكتوز) و الكازين لها تأثير كبير على الالتصاق على الفولاذ المقاوم للصدأ من قبل السلالات المدروسة. و تأكدت هذه النتائج وفقا لخصائص سطح الاوبواغ خاصة العلاقة ما بين الهيدروفوبية و الالتصاق على الفولاذ المقاوم للصدأ بوجود ارتباط ايجابي كبير بين الهيدروفوبية و التصاق الاوبواغ على غشاء الكازين و وجود ارتباط سلبي كبير بين هذه الخاصة و التصاق الاوبواغ على غشاء اللاكتوز. و على النقيض من التنوع الوراثي المنخفض المسجل تعتبر الخصائص السطحية للسلالات متفاوتة كما اثبتت تجارب الالتصاق بالمذيبات العضوية و التي اظهرت ان السلالات تنقسم الى سلالات نافرة للماء (مسعورة) لا تتميز بأي خاصية معطية للإلكترون او قابلة للإلكترون و محبة للماء و هي ذات الطابع المانح للإلكترون و القابلة للإلكترون. هذه الخصائص الحمضية/القلوية الخاصة للأوبواغ زيادة على الميزة المحبة للماء تدل على تكيف هذه السلالات اللبينية للبيئة و نمط الحياة على شكل ببوفيلم.

ويلاحظ أيضا بعض التنوع في الهياكل وعمليات تكوين الببوفيلم في مراحل الانفصال/التشتت اثر المشاهدة للشكل المورفولوجي في المجهر الإلكتروني ذي المسح الضوئي. وأظهرت تجارب نمو الببوفيلم في ظروف مختلفة أن كمية اللقاح و سن الببوفيلم من العوامل الهامة التي أثرت على عدد الخلايا المتصقة ، على عكس النتائج المحصلة في الأوساط الغذائية. و يعتبر هذان العاملان نوا تأثير كبير على مقاومة الببوفيلم لمنتجات التنظيف والتطهير. و لقد اظهرت عملية التنظيف الحمضي /القلوي تأثير على حساسية الببوفيلم تجاه فاعلية مواد التطهير مما يؤكد اهمية التنظيف قبل التطهير في عملية القضاء على الببوفيلم و بالرغم من الطابع المتغير و متعدد العوامل الذي يختص به الببوفيلم الا ان هذه النتائج سمحت بتحديد المعايير التي تعتبر مهمة لعملية تشكيل الببوفيلم و لحذفه في مصانع الألبان. و هذا قد يساعد على تطوير استراتيجيات فعالة لمكافحة الببوفيلم ، وتحسين النوعية الميكروبية و مدة صلاحية الحليب المبستر.

الكلمات المفتاحية: غشاء حيوي، معدات مصانع اللبن، بكتيريا منتجة للأوبواغ، *Bacillus cereus*، لبن مبستر.

Résumé

En industrie agroalimentaire, le développement des biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments peut-être à l'origine de la contamination des produits transformés. Ce qui conduit à la réduction de leur durée de vie et à des risques potentiels pour la santé du consommateur. La qualité précaire du lait pasteurisé produit à l'échelle nationale illustre bien cette situation. L'évaluation de la microflore du biofilm formé à la surface des équipements laitiers dans quelques laiteries de la région de Tlemcen, a montré des taux de contamination relativement élevés même après l'application des procédures de nettoyage et désinfection. Les bacilles sporogènes notamment les membres du groupe *Bacillus cereus* constituent la flore dominante du biofilm. Ces derniers sont caractérisés par une faible diversité génétique (trois profils M13-PCR) et font partie des groupes phylogénétiques III et IV qui sont potentiellement pathogènes. La principale source de contamination des équipements telle qu'identifiée par la M13-PCR, est la poudre de lait. Celle-ci serait responsable de la dissémination du génotype A de *B. cereus* et de sa persistance dans la laiterie analysée pendant 4 années. Les expériences de détermination du potentiel d'adhésion des souches de *B. cereus* ont montré que ces souches adhèrent à l'acier inoxydable selon un modèle caractérisé par des taux d'adhésion élevés sur l'inox propre et conditionné par différents nutriments. Les effets les plus significatifs sont obtenus en présence de caséine et de lactose. Ces résultats sont confirmés par les propriétés de surfaces des spores, et leur relation à l'adhésion à l'acier inoxydable, la corrélation entre l'hydrophobicité et l'adhésion au film de caséine étant positive alors qu'elle est négative dans le cas du film de lactose. En contraste avec la faible diversité génétique enregistrée, est la variabilité des propriétés de surface des souches de *B. cereus*. Selon leurs affinités respectives aux solvants organiques utilisés, celles-ci se répartissent en souches hydrophobes moyennes n'ayant exprimé aucun caractère donneur d'électron ou accepteur d'électron, et souches hydrophiles avec un caractère donneur d'électron et accepteur d'électron. Ces propriétés acide-base particulières des spores de *B. cereus* associées au caractère hydrophile dominant traduisent une adaptation de ces isolats laitiers à la niche écologique et au mode de vie sessile. Une certaine diversité est également notée dans les structures des biofilms formés par les différentes souches et leurs modes de détachement/dispersion, tels que montrés par les morphotypes observés en microscopie électronique à balayage. Le développement de biofilms de *B. cereus* dans les différentes conditions de culture a montré que, contrairement à la composition des milieux de culture, la taille de l'inoculum et l'âge du biofilm sont des facteurs qui influent sur le nombre de cellules adhérentes. Ces deux paramètres sont également significatifs dans la tolérance des biofilms de *B. cereus* exposés à différents désinfectants. Une sensibilisation des biofilms à l'action de ces produits est obtenue par un nettoyage acido-alcalin simulant le CIP industriel, et soulignant l'importance du nettoyage en amont de la désinfection, dans l'élimination du biofilm. Malgré le caractère versatile et multifactoriel des biofilms, ces résultats ont permis d'identifier les paramètres importants pour la formation du biofilm par *B. cereus* et son élimination dans les entreprises de production du lait pasteurisé. Ce qui permettra de développer des stratégies efficaces de lutte contre ces biofilms, en vue de l'amélioration de la qualité microbiologique du lait pasteurisé et de sa durée de vie.

Mots clés : Biofilm, équipements laitiers, bactéries sporulées, *Bacillus cereus*, lait pasteurisé

Abstract

In the food-processing industry, the development of biofilms on equipment surfaces may be the cause of the contamination of processed products, which results in the reduction of their shelf-life and potential health risks for consumers. As an illustration, is the precarious quality of pasteurized milk nationally produced. The assessment of the microflora of biofilms formed on the surfaces of dairy equipment in some dairies located in Tlemcen, showed high contamination levels even after cleaning and disinfection procedures. Sporogenic bacilli, notably *B. cereus* group members, characterized by a low genetic diversity (three M13-PCR profiles), are predominant in biofilms and belong to the pathogenic phylogenetic groups III and IV. The main contamination source of equipments is milk powder as identified by M13-PCR genotyping. Milk powder is responsible of dissemination of *B. cereus* genotype A and its persistence in the dairy plant across four years. Experiments to determine the potential of *B. cereus* strains to form biofilms, revealed a particular adhesion pattern, characterized by high adhesion rates in stainless steel clean or covered with various nutrients. However, spore adhered strongly to the casein and lactose conditioning films, which seem to be significant parameters for the adhesion to stainless steel. In accordance with these results, are the spore surface properties notably hydrophobicity and its relationship to adhesion to stainless steel. Significant correlations between this property and adhesion to the casein and lactose conditioning films were found to be respectively positive and negative. Therefore, in contrast with the low genetic diversity recorded, some variability was found in the surface properties of strains. Based on their respective affinities to organic solvents, strains are either middle hydrophobic without expressing any electron donor or electron acceptor character, or hydrophilic exhibiting an electron donor and electron acceptor character. These particular acid/base properties of spore, associated to the important hydrophilic character found among them, argue for an adaptation of these dairy isolates to the ecological niche and a biofilm lifestyle. Some diversity is also noted in biofilm structures and processes of detachment/ dispersion as revealed by scanning electron microscopy micrographs. Growth of biofilms in different conditions showed that, in contrast with the composition of media, the size of inoculums and the age of biofilms are important factors that influenced adhered cells numbers. These two parameters were also significant for the tolerance of *B. cereus* biofilms submitted to different sanitizers. Biofilms became more sensitive to these products following exposition to an acid/base cleaning, mimicking industrial CIP, and highlighting the importance of cleaning before disinfection in biofilm removal. Despite the multifactorial and versatile nature of biofilms, these results allowed the identification of parameters that are important for biofilm formation by *B. cereus* in pasteurized milk processing plants. This may help to develop effective strategies against biofilms and to improve the microbial quality of pasteurized milk and its shelf life.

Key words: biofilm, dairy equipment, spore-forming bacteria, *Bacillus cereus*, pasteurized milk