



République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et
des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie
Appliquée à l'Agroalimentaire,
au Biomédical
et à l'Environnement

مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية
للاغذية للبيوطبي وللبيئة



THESE

Présentée par
Nassima DIDOUH

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Biologie Moléculaire et biochimie

Option : Maitrise du Développement Microbien

Thème

**Caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées d'équipements
laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux
procédés de nettoyage et de désinfection**

Soutenue le XX YY 2015

Devant le Jury composé de :

Pr Hafida HASSAINE	UAB. Tlemcen	Présidente
Pr Bouziane ABBOUNI	UDL. Sidi Bel-Abbès	Examineur
Pr Djamel Eddine ABDELOUAHID	UAB. Tlemcen	Examineur
Pr Mourad DRISSI	UAB. Tlemcen	Examineur
Dr Farida BENDALI	UAM. Béjaïa	Examinatrice
Pr Boumedine MOUSSA-BOUDJEMAA	UAB. Tlemcen	Directeur de thèse

Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements au Pr. Boumedine MOUSSA-BOUDJEMÂA, Directeur du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Je lui suis reconnaissante pour la confiance et le soutien permanent qu'il m'a témoignée ainsi que pour ses compétences scientifiques et pédagogiques qui m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Je remercie le Professeur Hafida.HASSAINE de l'UAB Tlemcen pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Je remercie également très sincèrement le Professeur Bouziane ABBOUNI de l'UDL Sidi BelAbbès, les Professeurs Djamel Eddine ABDELOUAHID et Mourad DRISSI de l'UAB Tlemcen et le Docteur Farida Bendali. De l'UAM de Béjaïa pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail et d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

J'adresse mes remerciements à Mme Christine FAILLE pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour ses conseils, ses critiques constructives et pour son soutien moral.

Toute ma reconnaissance va à l'ensemble du personnel de l'unité PIHM pour leur esprit d'ouverture, leur enthousiasme et leur disponibilité. Mes remerciements vont tout particulièrement à Mme Annette RONSE, M. Jules RONSE et Mme Martine CLARISSE pour leur disponibilité, leur sympathie et leurs conseils

Je souhaite exprimer mon amitié à Samia, Ibrahim, pour m'avoir écouté délirer pendant des heures sur mes travaux.

Aucun remerciement ne saurait rendre justice à mes parents pour leurs encouragements affectueux et leurs sacrifices pendant toutes ces années.

Enfin, je voudrai dédier ce travail à Choukri. Il a été d'une patience et d'une compréhension permanente pendant toute la durée de la thèse. Sans cela, ce travail n'aurait pas abouti

**TABLE
DES
MATIERES**

Tables des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
Partie I : Synthèse bibliographique	03
I. Biofilm de <i>Bacillus cereus</i> en industrie agroalimentaire	03
I. 1. Introduction	03
I. 2. Etapes de formation du biofilm	03
I. 2.1. Film de conditionnement	05
I. 2.2. Transport	06
I. 2.3. Adhérence réversible et adhérence irréversible	06
I. 2.4. Matrice extracellulaire et Quorum sensing	07
I. 2.5. Formation de microcolonies	08
I. 2.6. Détachement des cellules	09
I. 3. Facteurs influençant la formation de biofilm	09
I. 3.1. Facteurs liés aux microorganismes	09
I. 3.2. Facteurs liés à la surface	11
I. 3.3. Facteurs environnementaux	12
I. 4. Biofilm de <i>Bacillus cereus</i>	13
I. 5. Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières	14
I. 6. Prévention et élimination des biofilms	15
II. Nettoyage et désinfection en industrie agroalimentaire	19
II. 1. Introduction	19
II. 2. Nettoyage	19
II. 2.1. Température	19

II.	2.2. Action mécanique	20
II.	2.3. Action chimique	20
II.	2.4. Temps de contact	20
II.	3. Nettoyage en place	20
II.	4. Les agents de nettoyage	22
II.	4.1. Les agents de nettoyage alcalins	22
II.	4.1.1. Alcalins forts	22
II.	4.1.2. Alcalins moyens	22
II.	4.1.3. Alcalins doux	22
II.	4.1.4. Alcalins chlorés	22
II.	4.2. Les produits de nettoyage acides	23
II.	4.2.1. Acides minéraux	23
II.	4.2.2. Acides organiques	23
II.	5. Détergents enzymatiques	23
II.	6. La désinfection	24
II.	6.1. Définition	24
II.	6.2. Choix d'un désinfectant	24
II.	7. Les différentes classes de désinfectants	25
II.	7.1. Halogènes et dérivés	25
II.	7.2. Aldéhydes	26
II.	7.3. Les alcools	26
II.	7.4. Les oxydants	26
II.	7.5. Dérivés phénoliques	27
II.	7.6. Ammoniums quaternaires	27

Partie II. Matériel et méthodes	30
I : Caractérisation des souches isolées	30
I.1. Origine des prélèvements	30
I.2. Traitement des échantillons	31
I.3. Isolement et Conservation des souches	31
I.4. Identification des souches	32
I.4.1-Caractérisation morphologique des isolats	32
I.4.1.1-Aspect microscopique des isolats	32
I.4.1.2-Aspect macroscopique des cultures	32
I.4.2. Identification biochimique	32
I.4.2.1-Mise en évidence des enzymes respiratoires	32
I.4.2.2 Utilisation des galeries API 20E	33
I.4.2.3-Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires	33
I.4.3. Test d'Hémolyse	34
II : Caractérisation physico-chimique de la surface des spores bactériennes.	35
II.1. Préparation du stock de spores	35
II. 2. Affinité des spores pour l'hexadécane	36
II. 2.1. Ajustement de densité de la suspension de spores	36
II. 2.2. Mesure de l'affinité des spores pour l'hexadécane	37
II.3. Mesure de la charge d'une population de spores par zétamétrie	38
II.3.1.Préparation des suspensions de spores.	39
II.3.2.Mesure de la mobilité des spores	39
II.3.2.1. Détermination de la concentration optimale de spores.	39
II.3.2.2. Mesure de la mobilité des spores à chaque pH	39
II.4. Encrassement des coupons d'Inox	39

II.4.1. Nettoyage et désinfection des lames d'acier inoxydable	39
II.4.2.Préparation de la suspension sporale	40
II.4.3.Encrassement des coupons d'acier	41
II.4.4. Dénombrement de la suspension sporale avant et après adhésion aux coupons	41
II.5. Examen des spores au microscope électronique à transmission (MET)	43
III. Application des produits de nettoyage et de désinfection sur les spores de <i>B. cereus</i> adhérentes aux coupons d'Inox	44
III.1 Préparation et dénombrement des suspensions sporales.	45
III.2. Traitement des coupons encrassés	46
III.3. Dénombrement des spores adhérentes après nettoyage et désinfection	46
Partie III. Résultats et discussion	47
I : Caractérisation des souches isolées	47
II : Caractérisation physico-chimique de la surface des spores bactériennes.	67
III. Application des produits de nettoyage et de désinfection sur les spores de <i>B. cereus</i> adhérentes aux coupons d'Inox	83
Conclusion générale	97
Références bibliographiques	99
Annexes	

Liste des abréviations

AAF : aéro-anaérobie facultatif
ADH : Arginine dihydrolase
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
AHL: N-acyl homoserin lactone
AIP : auto inducer peptides
ARN : Acide ribonucleique
AS : aérobie stricte
CaCl₂: DiChlorure de Calcium
CaCO₃: Carbonate de Calcium
CAPP : Contact Avis Pharmacologique et Pharmaceutique
CAQ: composé d'ammonium quaternaire
CIP : cleaning in place = (NEP : nettoyage en place)
CLR: Collagen-Like-Region
DO: densité optique
EDS : Eau distillée stérile
EDTA-Na : Ethylène diamine tétra acétate de sodium
EPS : extracellular polymeric substances
g : accélération de la gravité=9,8 m.s⁻²
HCI : Hygiène et Chimie Industrielle
HNO₃: acide nitrique
HOCl : acide hypochlorique
HUG : Hôpitaux universitaires de Genève
IAA : industries agroalimentaires
KNO₃: Nitrate de Potassium
KOH : Hydroxyde de Potassium
LAMAABE : laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement
LDC : lysine décarboxylase
MATH : Microbial adhesion to hydrocarbons
MATS : Microbial adhesion to solvant
MET : Microscope Electronique à Transmission
MgSO₄: Sulfate de magnésium
MLEE : MultiLocus Enzyme Electrophoresis
MLST : MultiLocus Sequence Typing
NAC : N-Acetyl-L-Cysteine
NaCl : chlorure de sodium
NaOH : hydroxyde de sodium
ODC : Ornithine décarboxylase
ONPG : Orthonitrophenyl β galactoside
PIHM : Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux
PVC : Polychlorure de vinyle
QS : quorum-sensing

Ra : rugosité

rpm : rotation per minute

SAB : sérum albumine bovine

SSOP : Sanitation Standard Operating Procedures

TSB : Trypticase Soja Broth

TSE : tryptone-sel-eau

UFC : unité formant colonies

UHT : ultra haute température

VF : Viande-Foie

Liste des figures

- Figure 01 : Schéma présentant les étapes du développement du biofilm
- Figure 02: micrographe d'un biofilm de 6 jours formé par *B.cereus* sur une surface en inox
- Figure 03: Diagramme général de ligne de production du lait pasteurisé indiquant les sites de prélèvements
- Figure 04: Schéma de protocole de la préparation du stock de spores
- Figure 05 : Représentation schématique du test de MATH permettant la mesure d'affinité des spores bactériennes
- Figure 06 : Dispositif expérimental du zétamètre
- Figure 07 : Schéma du protocole de nettoyage des coupons d'acier inox
- Figure 08: Schéma du protocole d'encrassement des coupons d'acier
- Figure 09 : Schéma de protocole du dénombrement de la suspension encrassante
- Figure 10: Schéma de protocole du dénombrement des spores adhérentes
- Figure 11 : Colonies de morphotype 1. Aspect sur BP après 24h d'incubation à 30°C (a) sur milieu nutritif gélosé, (b) sur milieu gélosé de Mossel.
- Figure 12 : Colonies de morphotype 2. Aspect sur BP après 24h d'incubation à 30°C (a) sur milieu nutritif gélosé, (b) sur milieu gélosé de Mossel
- Figure 13 : Colonies de morphotype 3. Aspect sur BP après 24h d'incubation à 30°C (a) sur milieu nutritif gélosé, (b) sur milieu gélosé de Mossel
- Figure 14 : Colonies de morphotype 4. Aspect sur BP après 24h d'incubation à 30°C (a) sur milieu nutritif gélosé, (b) sur milieu gélosé de Mossel.
- Figure 15 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). Culture jeune révélant la couleur violette des Gram positifs (morphotype 1)
- Figure 16 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). Culture jeune révélant la couleur violette des Gram positifs (morphotype 2)
- Figure 17 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). culture jeune révélant la couleur violette des Gram positifs (morphotype 3)
- Figure 18 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). culture jeune révélant la couleur violette des Gram positifs (morphotype 4)
- Figure 19 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). culture âgée révélant la couleur verte des spores (morphotype 3)
- Figure 20 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). culture âgée révélant la couleur verte des spores (morphotype 4)
- Figure 21 : Résultats de la mise en évidence de catalase

Figure 22 : Résultats de la mise en évidence d'oxydase

Figure 23: Résultats de la mise en évidence de la réduction de nitrate en nitrite par les souches isolées (a) : témoin ; (b) : résultat positif

Figure 24: Résultats de la mise en évidence de type respiratoire (a) témoin ;(b) : résultat

Figure 25 : Résultats de la mise en évidence activités hydrolytiques extracellulaires. (a) : activité amylolytique, (b) : activité caséinolytique, (c) : activité lecithinolytique

Figure 26 : Résultats d'identification des isolats par la galerie API20E

Figure 27: Test d'hémolysine des isolats de *Bacillus cereus* sur gélose au sang

Figure 28 : Affinité pour l'hexadécane des spores de *B.cereus* suspendues en sérum

Figure 29: Affinité pour l'hexadécane des spores de *B.cereus* suspendues en sérum (MATH).

Figure 30 : potentiel zéta de 4 souches de *Bacillus cereus*

Figure 31 : potentiel zéta de 4 souches de *Bacillus cereus*

Figure 32 : potentiel zéta de 4 souches de *Bacillus cereus*

Figure 33 : potentiel zéta de 2 souches de *Bacillus cereus*

Figure 34: pI des spores des souches de *B.cereus*

Figure 35: Potentiel zéta à pH 7,0 des spores des souches de *B.cereus*

Figure 36 : Relation entre l'hydrophobicité et le potentiel zéta des spores de *B. cereus* isolées à partir d'une usine laitière en Algérie

Figure 37 : Images de spores de *Bacillus cereus* après coloration négative par microscopie électronique à Transmission. (A, B): *B. cereus* 82; (C, D) : *B.cereus* 109; (E, F) : *B.cereus* 110; (G, H) : *B.cereus* 123.

Figure 38: Relation entre l'adhésion et hydrophobicité de sept spores de *B. cereus* isolées à partir d'une laiterie algérienne

Figure 39: Relation entre l'adhésion et la mobilité électrophorétique de sept spores

Figure 40 : Relation entre l'adhésion entre quatre spores et la surface de leur d'exosporium

Figure 41 : Relation entre l'adhésion et la surface de quatre spores de *B. cereus*

Figure 42 : Relation entre l'adhésion le nombre d'appendices de quatre spores de *B. cereus*

Figure 43: Relation entre l'adhésion et la longueur des appendices de quatre spores de *B. cereus*

Figure 44 : Efficacité du protocole 1 appliqué par la laiterie Mansourah de Tlemcen sur des spores de *Bacillus cereus* adhérentes sur acier inoxydable. [Protocole sans étape de désinfection : 1) pré-rinçage à température ambiante, 2) NaOH à 2% 10min à 70°C, 3) rinçage intermédiaire à température ambiante, 4) HNO₃ à 1%, 10min à 70°C, 5) rinçage final à température ambiante]. Ce protocole a été testé en conditions statiques.

Figure 45 : Efficacité du protocole 2. sur des spores de *Bacillus cereus* adhérees sur acier inoxydable [Protocole sans étape de désinfection : 1)pré-rinçage à température ambiante, 2) NaOH à 2% 10min à 70°C, 3)rinçage intermédiaire à température ambiante, 4) OBA DETART AC [(a) 0,8, 2 et 5% / 5, 10 et 15 min / 60°C][(b) 0,8, 2 et 5% / 5, 10 et 15 min / 70°C][(c) 0,8, 2 et 5% / 5, 10 et 15 min / 80°C][(d) 0,8% / 5, 10 et 15 min / 60, 70, 80°C][(e) 2% / 5, 10 et 15 min / 60, 70, 80°C][(f) 5% / 5, 10 et 15 min / 60, 70, 80°C][(g) 0,8, 2 et 5% / 60°C,70°C,80°C / 5min][(h) 0,8, 2 et 5% / 60°C,70°C,80°C / 10min][(i) 0,8, 2 et 5% / 60°C,70°C,80°C /15min] ,5)/rinçage final à température ambiante].

Figure 46 : Efficacité du protocole 3 sur des spores de *Bacillus cereus* adhérees sur acier inoxydable [Protocole sans étape de désinfection : 1)pré-rinçage à température ambiante,2) OBA GEN CL à [(a)0,5 ; 1,0 et 1,5% / 5 ; 10 et 15min / 30°C][(b) 0,5 ; 1,0 et 1,5% / 5 ; 10 et 15min / 40°C][(c) 0,5 ; 1,0 et 1,5% / 5 ; 10 et 15min / 50°C][(d) 0,05 % / 5 ; 10 et 15min / 30, 40, 50°C][(e) 1% / 5 ; 10 et 15min / 30, 40, 50°C][(f) 1,5 % / 5 ; 10 et 15min / 30, 40, 50°C][(g) 0,05 % / 30, 40, 50°C/5min][(h) 1 % / 30, 40, 50°C/10min][(i) 1,5 % / 30, 40, 50°C/15min], 3)rinçage intermédiaire à température ambiante ,4)HNO₃ à 1%, 10min à 70°C, 5)rinçage final à température ambiante].

Figure 47 : Efficacité du Protocole 4 sur des spores de *Bacillus cereus* adhérees sur acier inoxydable. [Protocole avec étape de désinfection : 1)pré-rinçage à température ambiante,2) NaOH à 2% /10min / 70°C,3) rinçage intermédiaire 1 à température ambiante, 4) OBA DETART AC à 5% / 15min / 70°C, 5)rinçage intermédiaire 2 à température ambiante,6) OBA STERIL BC à [(a) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 5, 10 et 15min / 70°C][(b) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 5, 10 et 15min / 80°C][(c) 0,3%/ 5, 10 et 15min / ,70°C, 80°C][(d) 0,4%/ 5, 10 et 15min / ,70°C, 80°C][(e)0,5%/ 5, 10 et 15min / ,70°C, 80°C][(f)0,3%,0,4% et 0,5% /70°C,80°C/5min][(f) 0,3%,0,4% et 0,5% /70°C,80°C/10min][(h)0,3%,0,4% et 0,5% /70°C,80°C/15min], 7)rinçage final : eau à température ambiante].

Figure 48 : Efficacité du Protocole 5 sur des spores de *Bacillus cereus* adhérees sur acier inoxydable.[Protocole avec étape de désinfection 1) pré-rinçage à température ambiante,2) d'OBA GEN CL 0,1%, 15min, 50°C ,3)rinçage intermédiaire 1 à température ambiante,4) HNO₃ à 0,5% / 70°C / 10min,5) rinçage intermédiaire 2 à température ambiante,6)OBA STERIL BC à [(a) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 5, 10 et 15min / 70°C][(b) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 5, 10 et 15min / 80°C][(c) 0,3%/ 5, 10 et 15min / ,70°C, 80°C][(d) 0,4%/ 5, 10 et 15min / ,70°C, 80°C][(e)0,5%/ 5, 10 et 15min / ,70°C, 80°C][(f)0,3%,0,4% et 0,5% /70°C,80°C/5min][(f)0,3%,0,4% et 0,5% /70°C,80°C/10min][(h)0,3%,0,4% et 0,5% /70°C,80°C/15min],7)rinçage final à température ambiante].

Liste des tableaux

Tableau 01 : Mode d'action des principaux désinfectants

Tableau 02 : Agents antimicrobiens appliqués pour le contrôle du biofilm formé par les bactéries qui contaminent l'équipement d'une laiterie

Tableau 03: Répartition des isolats obtenus de différents sites de prélèvements au niveau de la laiterie Mansourah de Tlemcen

Tableau 04 : Résultats d'identification des isolats présumés comme *Bacillus cereus* isolés à partir de différents sites de prélèvements au niveau de la laiterie Mansourah de Tlemcen

Tableau 05 : Les sept groupes de *B. cereus*

Tableau 06 : Résultats expérimentaux d'hydrophobicité et zéta potentiel des spores *Bacillus cereus*

Tableau 07 : Propriétés de surfaces des spores de *Bacillus cereus* et capacité d'adhésion au coupons d'acier inoxydable. (*B. cereus* 82 et *B. cereus* 109 sont hydrophiles; *B. cereus* 110 et *B. cereus* 123 sont hydrophobes)

Tableau 08 : Tableau comparant les données relatives à l'affinité à l'hexadécane et au potentiel Zeta de ce travail avec des données de la littérature

Introduction générale

Introduction générale

L'hygiène des matériaux demeure une préoccupation constante des industriels de l'agroalimentaire (IAA). En effet, la contamination microbiologique des surfaces des équipements des IAA peut entraîner une altération de l'aliment traité par ces équipements causant ainsi d'importants problèmes économiques voire de problèmes de santé publique.

Actuellement et quelque soit le secteur impliqué, pour assurer l'hygiène des matériaux en contact avec l'aliment, des procédés de nettoyage et désinfection sont régulièrement mis en œuvre. L'efficacité de ces traitements reste toutefois variable d'une application à une autre. En effet, si près de 100% des cellules microbiennes se trouvant à l'état planctonique peuvent être éliminées, ce rendement est certainement moindre sur des cellules adhérentes ou en biofilms.

Parmi les microorganismes qui ont la capacité de former un biofilm sur les surfaces des équipements, *Bacillus cereus*: un pathogène alimentaire sporulé est régulièrement rencontré dans de très nombreux environnements, en particulier ceux de la chaîne alimentaire.

Dans les équipements utilisés en industrie laitière, *B. cereus* reste un problème récurrent avec des capacités d'adhérer à divers matériaux tels que les polymères plastiques, le téflon ou les aciers inoxydables couramment utilisés en industrie laitière.

L'élimination des spores de *Bacillus cereus* par les protocoles de nettoyage et désinfection n'est pas évidente. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette difficulté : cela peut être lié à des modifications physico-chimiques de la surface des cellules microbiennes elles mêmes dues à des changements physiologiques des cellules ou à leur historique.

La présente thèse entre dans ce contexte. Elle a pour principal objectif : l'optimisation des procédés de nettoyage et de désinfection dans l'industrie laitière. Le travail porte sur Caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection avec l'utilisation de méthodes permettant de tester l'activité détergente et désinfectante de produits commercialisés, dans des conditions proches de la réalité, et notamment sur des cellules adhérentes non déshydratées. La thèse comporte trois grandes parties :

1. Une mise au point bibliographique traitant du biofilm de *Bacillus cereus* en industrie agroalimentaire et des problèmes qu'il génère ainsi que des procédés de nettoyage et de désinfection en industrie agroalimentaire.

Introduction générale

2. Une partie expérimentale comprenant : La mise au point d'une collection de souches de *Bacillus cereus* isolées à partir des canalisations d'une usine laitière, la caractérisation des propriétés physico-chimiques des spores de *Bacillus cereus*, et enfin la mise au point d'un protocole de nettoyage et désinfection de surfaces contaminées afin d'optimiser le protocole de nettoyage et désinfection.

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

Partie I

Synthèse

bibliographique

Partie I : synthèse bibliographique

I Biofilm de *Bacillus cereus* en industrie agroalimentaire

I.1 Introduction

La formation de biofilm semble être un dispositif universel des microbes. (**Kolter et Greenberg, 2006**). Beaucoup d'espèces bactériennes peuvent coloniser une série de substrats. Les cellules adhérentes deviennent attachées, se développent et se divisent pour former des microcolonies, La croissance en microcolonies mène au développement des biofilms. (**Costerton *et al.*, 1995 ; Watnick et Kolter, 2000**). Ainsi, l'une des manières les plus communes pour la vie des bactéries est celle d'adhérer aux surfaces et de former des biofilms, où elles sont incluses dans une matrice (**Lasa, 2006**).

Les biofilms sont définis en tant que populations bactériennes adhérentes incluses dans une matrice (**Costerton *et al.*, 1995 ; Davey et O'Toole, 2000 ., Greenberg, 2003 ; Kolter et Greenberg, 2006**).

Les biofilms peuvent être également définis comme des micro-organismes qui sont trouvés dans un éventail d'écosystèmes en tant que communautés multi-espèces fortement structurées (**Stoodley *et al.*, 2002; Palmer *et al.*, 2007**).

I.2 Etapes de formation du biofilm

Les différentes étapes de contamination d'une surface sont régies par le quorum-sensing (QS) et d'autres régulateurs génétiques (**Ahmad *et al.*, 2013**). Au moins 15 familles différentes de signaux de quorum ont été décrites. Les signaux de quorum les plus étudiés sont les *N*-Acyl homoserine lactones (AHL ou *N*-AHL) produites par des bactéries à Gram-négatif, les peptides auto inducteurs (AIP) produits par des bactéries à Gram positif, et la "molécule de signalisation universelle" ou auto-inducteur (IA-2), produite par les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Les AHL sont synthétisées par LuxI dans *Vibrio fischeri* et ses homologues dans plusieurs autres espèces et genres. La plupart des AHL peuvent diffuser à travers les membranes bactériennes; bien que certaines soient libérées hors de la cellule par des pompes à efflux (**Poole, 2001**). Les récepteurs pour les AHL font généralement partie de la famille LuxR des régulateurs de transcription. Après la liaison d'AHL, ces régulateurs sont activés et se lient à des promoteurs de gènes spécifiques pour initier la transcription (**Bandara *et al.*, 2012**).

Partie I : synthèse bibliographique

Les AIP sont des oligopeptides (typiquement 5 à 17 aminoacides) utilisés par les bactéries à Gram-positif. Contrairement aux AHL, les AIP ne peuvent pas traverser les membranes bactériennes et requièrent la sécrétion dans l'environnement des transporteurs d'oligopeptides (**Bandara et al., 2012**). Au cours de QS, ils se lient à des capteurs histidine kinase membranaires et provoquent une cascade de phosphorylation qui culmine dans la régulation de gènes cibles. Enfin, l'AI-2, qui est produit par plus de 50 espèces à la fois des bactéries à Gram-positif et des bactéries à Gram-négatif, utilise le système de signalisation LuxS / LuxPQ pour réguler la production de facteurs de virulence dans *Vibrio cholerae*, et le système Lsr dans *E. coli* et *Salmonella typhimurium* (**Bandara et al., 2012**).

Cependant, dans d'autres espèces de *Vibrio*, tels que *V. vulnificus*, la virulence et la formation de biofilm sont positivement régulée par l'AI-2 (**Kim et al., 2003; Shin et al., 2004**). Des homologues de luxS ont été détectés dans certaines espèces bactériennes (**Rutherford et Bassler, 2012**) alors que de nombreuses espèces ne synthétisent pas l'AI-2 elles-mêmes, elles possèdent des mécanismes de détection exogènes dans l'environnement de l'AI-2 qui module les processus pathogènes dans un certain nombre d'espèces bactériennes (**Everett et Rambaugh, 2015**).

La formation des biofilms peut être schématisée en plusieurs étapes séquentielles qui sont représentées sur la Figure 1.

Partie I : synthèse bibliographique

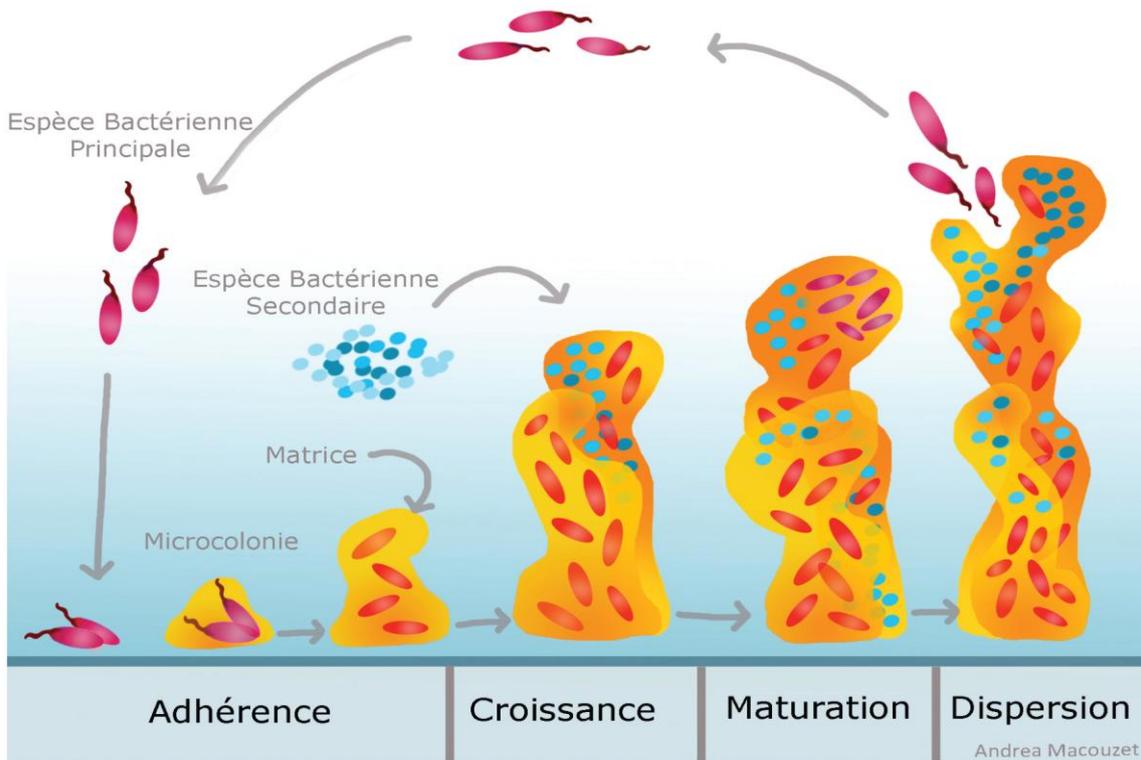


Figure 01 : Schéma présentant les étapes du développement du biofilm (Yannick *et al.*, 2014)

I.2.1 Film de conditionnement

En premier lieu, un film de conditionnement, est produit pendant l'immersion dans un liquide (Belmar-Beiny et Fryer, 1992 ; Boyd *et al.*, 2000). Le film de conditionnement peut être constitué par des composés chimiques inorganiques ou organiques ou des composés biologiques de l'environnement (Zottola et Sasahara, 1994). La nature du film de conditionnement sera affectée par la nature de la surface et la source du film de conditionnement (Pratt-Terpstra et Busscher, 1998 ; Boyd *et al.*, 2000).

Le rôle du film primaire n'est pas clairement élucidé, il modifierait les propriétés physicochimiques de surface influençant ainsi l'adhésion bactérienne. L'adsorption de certaines protéines comme la sérum-albumine bovine (SAB) influence l'adhésion de microorganismes marins (Fletcher, 1976; Rubio, 2002).

Partie I : synthèse bibliographique

I.2.2 Transport

La deuxième étape correspond au transport des microorganismes à proximité de la surface. Le transport des bactéries dépend de la nature du milieu dans lequel elles évoluent (viscosité, force ionique, etc..) ainsi que du mouvement de ce milieu (écoulement, flux, mouvement brownien, sédimentation, etc..). Les appendices (pili, flagelles) aident la bactérie à se déplacer dans un milieu. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la présence de gènes codant pour la formation du pili (**O'Toole et Kolter, 1998**) ainsi que pour la mobilité du flagelle (**Vallet et al., 2001**) est indispensable à la formation du biofilm. Chez *Escherichia coli*, la présence de flagelles est importante pour le mouvement de la bactérie le long de la surface et celle des pili pour les interactions initiales avec la surface (**Pratt et Kolter, 1998**).

Dans le cas de *B. cereus*, il a été montré que les flagelles étaient nécessaires pour l'initiation du biofilm dans des conditions statiques à l'interface air-liquide, mais pas à l'interface surface-liquide (**Houry et al., 2010**).

I.2.3 Adhérence réversible et adhérence irréversible

La troisième étape dans la formation des biofilms est l'attachement des microorganismes à la surface conditionnée. Ce processus dépend de la motilité des bactéries ou de leur transport par diffusion, par pesanteur ou par les forces dynamiques de la phase liquide.

Les propriétés physicochimiques de la surface bactérienne sont importantes en déterminant l'adhérence des cellules pendant ce premier attachement (**Van Loosdrecht et al., 1990**). L'adhérence bactérienne est également affectée par la disponibilité nutritive dans le milieu environnant et par le stade de croissance des bactéries elles-mêmes (**Baillif et al., 2010**). Cette adhérence des cellules a lieu principalement en deux étapes : une adhérence réversible suivie d'une adhérence irréversible. Les interactions initiales développées entre les cellules bactériennes et la surface sont désignées sous le nom d'adhérence réversible. Les diverses forces d'interaction influençant le procédé réversible d'adhérence sont les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques et les interactions hydrophobes. Pendant cette étape, les bactéries peuvent encore être facilement enlevées par les forces de cisaillement (**Marshall et al., 1971**).

L'attachement irréversible des cellules est l'étape cruciale dans le développement du biofilm. Les forces répulsives empêchent principalement les cellules bactériennes en

Partie I : synthèse bibliographique

établissant un contact direct avec la surface, cependant, le contact se produit toujours à travers des organites extérieurs des bactéries telles que les flagelles, les fimbriae, les pili ou les fibrilles de l'exopolysaccharide (**Jones et Isaacson, 1983 ; Hancock, 1991**). Les diverses forces d'interaction influençant le procédé d'adhérence irréversible sont les interactions dipôle-dipôle, les liaisons hydrogène, les liaisons ioniques et covalentes et les interactions hydrophobes.

Généralement l'attachement se produira plus aisément sur les surfaces qui sont plus rugueuses, plus hydrophobes, et enduits par les films de conditionnement de surface. (**Millsap et al., 1997 ; Donlan, 2002; Chae et al., 2006; Patel et al., 2007; Oulahal et al., 2008 ; Simões et al., 2008**).

I.2.4 Matrice extracellulaire et Quorum sensing

L'adhérence irréversible est liée à la production de substances polymériques extracellulaires (EPS). L'attachement de bactéries à la surface induit des changements physiologiques qui mènent à l'excrétion d'exopolymères (**Allison et Sutherland, 1987**).

Les substances polymériques extracellulaires bactériennes (EPS) comportent des protéines, des acides nucléiques, des lipides simples, des phospholipides, des substances humiques, des homopolysaccharides et des heteropolysaccharides, ces derniers sont en particulier à base de glucose, de fructose, de mannose, de galactose, de pyruvate, d'acide glucoronique et mannuronique (**Jorand et al., 1998; Sand et Gehrke, 1999; Flemming et al., 2007**).

Les protéines et les polysaccharides représentent 75 à 89% des produits composant les EPS, ce qui en fait les composants principaux (**Jahn et Nielsen, 1998 ; Wingender et al., 1999 ; Sutherland, 2001 ; Simões et al., 2010**).

La composition de L'EPS produit par les micro-organismes varie selon que le micro-organisme est à Gram + ou à Gram - (**Hawser et Douglas, 1995**). En outre, L'EPS dépend de l'état physiologique des micro-organismes (**Jorand et al., 1998**).

Les EPS sont responsables de la liaison entre les cellules et d'autres particules environnantes (cohésion) et avec la surface (adhérence) (**Characklis et Wilderer, 1990; Sutherland, 2001 ; Allison, 2003**). La fonction fréquemment attribuée aux EPS est leur effet protecteur des micro-organismes de biofilm contre des conditions défavorables. Les cellules

Partie I : synthèse bibliographique

de biofilm peuvent en effet tolérer des concentrations plus élevées des biocides que les cellules planctoniques (Foley et Gilbert, 1996; Mah et O'Toole, 2001; Simões *et al.*, 2005 ; Simões et Vieira, 2009). Les EPS jouent donc le rôle d'une barrière (Morton *et al.*, 1998; Simões *et al.* , 2005). Les EPS jouent un rôle important dans l'attachement et la colonisation des micro-organismes des surfaces des équipements de l'industrie agroalimentaire. (Kumar et Anand, 1998).

Le Quorum sensing (QS) est le système de communication cellules à cellules qui sont généralement à des dizaines voire à des centaines de micromètres les unes des autres. Il est connu pour réguler une variété de fonctions cellulaires en plus de la production d'EPS telles que la mobilité et la production de métabolites secondaires (Jayaraman et wood, 2008) ; Renner et Weibel, 2011). Le quorum sensing est considéré comme un facteur important dans la formation de biofilm (Davies *et al.*, 1998 ; De Kievit *et al.*, 2002 ; Valle *et al.*, 2004).

I.2.5 Formation de microcolonies

Durant cette phase, les cellules bactériennes irréversiblement attachées se développent et se divisent. Ceci mène à la formation des microcolonies (Characklis et Marshall, 1990). Il y aura alors une étape pendant laquelle la densité bactérienne atteint un niveau de seuil qui permet au quorum sensing de participer à la maturation du biofilm. L'étape de l'adhésion initiale semble donc inappropriée pour l'accumulation de signaux de quorum car les bactéries à cette étape « nagent » encore librement dans le milieu. Quand les bactéries se fixent, se divisent et forment des microcolonies dont la densité de la population arrive à un certain seuil, les signaux de quorum peuvent atteindre des niveaux suffisants pour activer la maturation du biofilm (Otto, 2013). Les biofilms matures ont besoin de 2 à 4 semaines pour se développer (Zottola et Sasahara, 1994).

Des études ont montré, que le biofilm a une structure poreuse avec des voies d'eau capillaires (Costerton *et al.*, 1995). Ces voies d'eau permettent la distribution de l'eau, des nutriments et de l'oxygène à l'intérieur du biofilm. Cependant des travaux ont montré qu'il y a une faible teneur en oxygène à l'intérieur du biofilm (Genigeorgis, 1995 ; Costerton *et al.* , 1995). Cette observation explique pourquoi les micro-organismes aérobies et anaérobies peuvent vivre ensemble dans un biofilm (Poulsen, 1999).

Comme les cellules se divisent et accumulent l'EPS, il se développe des structures tridimensionnelles. Dans un biofilm mature, l'EPS adhésif agit comme une « colle » entre les

Partie I : synthèse bibliographique

cellules bactériennes pour soutenir la structure tridimensionnelle du biofilm, permettant le transport des nutriments et l'élimination des déchets (Ma *et al.*, 2009).

I.2.6 Détachement des cellules

A partir d'un biofilm, des bactéries peuvent se détacher (Rupp *et al.*, 2005). Ce détachement permet aux bactéries d'adhérer à une nouvelle surface et former un nouveau biofilm ou retourner à l'écoulement en vrac (Ma *et al.*, 2009). Le détachement des cellules est déclenché par des facteurs intrinsèques, tels que le taux de mortalité et l'autolyse dans le biofilm (notamment chez *Pseudomonas aeruginosa*) et des facteurs extrinsèques incluant l'épaisseur du biofilm, la vitesse d'écoulement et les forces de cisaillement du liquide et la disponibilité nutritive (Lappin-Scott *et al.*, 1992).

La dispersion du biofilm est considérée comme cruciale pour la propagation et l'auto-renouvellement de la communauté bactérienne (Renner et weibel, 2011)

I.3 Facteurs influençant la formation de biofilm

Le conditionnement de la surface, le type du milieu de croissance, la température, le pH, les interactions électrostatiques et physiques entre les cellules bactériennes et la surface, la communication cellule-cellule et la signalisation, sont autant de facteurs qui peuvent influencer l'adhérence bactérienne et le développement ultérieur du biofilm (Davies *et al.*, 1998 ; Doyle, 2000 ; Gilbert *et al.*, 2002 ; Palmer *et al.*, 2007). La morphologie des cellules bactériennes joue également un rôle (Van Loosdrecht *et al.*, 1989 ; Wirtanen et Salo, 2005).

I.3.1 Facteurs liés aux microorganismes

L'adhérence des cellules bactériennes à des surfaces est une stratégie essentielle pour leur survie. Quand les biofilms sont formés dans un système aqueux, chaque membre du biofilm a été naturellement choisi par ses propriétés de surface de cellule comprenant la présence des capsules, des fimbriae, et de l'hydrophobicité de la cellule (Frank, 2001). L'hydrophobicité de la cellule est due à des composés liés à la membrane externe comprenant des lipopolysaccharides, des lipoprotéines, des acides lipotéichoïques et des lipomannanes. L'orientation de ces composés sur la membrane externe détermine l'hydrophobicité de la cellule (Neu, 1996).

La plupart des bactéries à Gram négatif ont de longues chaînes de polysaccharides de leur lipopolysaccharides orientées vers l'extérieur de la cellule, donnant une surface

Partie I : synthèse bibliographique

hydrophile tandis que les bactéries à Gram positif ont la partie lipidique des acides lipotéichoïques qui se prolonge à l'extérieur de la cellule donnant une surface hydrophobe (**Frank, 2001**).

Quelques bactéries peuvent excréter les substances comprenant les EPS, avant ou après l'attachement, ces EPS affectent l'hydrophobicité de la surface de la cellule. L'excrétion d'un slime de polysaccharide avant l'attachement peut augmenter ou empêcher le procédé d'attachement selon l'hydrophobicité de la surface de cellules après l'excrétion (**Rosenberg et al., 1983**). L'hydrophobicité de la surface des cellules microbiennes peut être évaluée par la chromatographie d'interaction hydrophobe (**Stenstrom, 1989**), l'adhésion microbienne aux hydrocarbures (**Rosenberg et al., 1980**) et la mesure d'angle de contact (**Absolom et al., 1983 ; Busscher et al., 1984**).

L'hydrophobicité varie également avec la température et le stade de croissance (**Chavant et al., 2002**). En 1998 **Smoot et Pierson** ont montré que l'hydrophobicité augmentait quand la température de croissance diminuait. L'hydrophobicité dépend également du mode de croissance de la bactérie (**Gilbert et al., 1991**) et des conditions de culture (**Spenceley et al., 1992**). Selon **Allion (2004)** Les résultats du test MATS montrent également un impact non négligeable de l'état physique (solide ou liquide) du milieu de culture utilisé sur les propriétés physico-chimiques de surface des souches à Gram positif testées. En accord avec **Ljungh et al. (1985)**, elle a pu noter qu'une croissance en bouillon augmentait significativement le caractère hydrophile des micro-organismes (en comparaison avec les données obtenues après culture sur gélose). La composition chimique des milieux de culture étant proche, les différences de propriétés physico-chimiques de surface observées pourraient donc être attribuées au seul mode de culture utilisé, gélose ou bouillon nutritif. L'hydrophobicité peut également être modifiée par des traitements mécaniques ou enzymatiques (**Rosenberg et Kjelleberg, 1986**).

Le rôle des caractères cellulaires dans la formation de biofilm a été étudié, mais leur importance relative n'est pas toujours connue. **Meng-Ying et al., (2009)** ont étudié les caractéristiques cellulaires de 18 isolats comprenant le flagelle, la mobilité, la nature de l'EPS et les molécules de signalisation (AHL). Les résultats ont montré que la capacité à former le biofilm était étroitement liée aux flagelles, aux exopolysaccharides et aux protéines extracellulaires. L'importance relative des cinq caractéristiques cellulaires étudiées pour la formation de biofilm était, dans l'ordre de la plus grande à la plus petite : les

Partie I : synthèse bibliographique

exopolysaccharides, les flagelles, les N-acyl-homosérines (AHL), les protéines extracellulaires et enfin la motilité.

Beaucoup d'études (**Davies *et al.*, 1998 ; Sauer et Camper, 2001; Donlan, 2002; Allison, 2003 ; Parsek et Greenberg, 2005**) ont montré l'importance de la présence des appendices, les interactions impliquées dans la communication de cellule-cellule et la production d'EPS pour la formation et le développement de biofilm. En effet, beaucoup de bactéries ont des flagelles. Il est possible que le flagelle puisse former un lien adhésif avec la surface d'adhérence (**Harbron et Kent, 1988**). On assume que la fonction primaire des flagelles dans la formation de biofilm est dans le transport et dans des interactions initiales de cellule-surface (**Sauer et Campeur, 2001**). Les bactéries avec pili peuvent adhérer fortement à d'autres cellules bactériennes et à des particules inorganiques (**Harbron et Kent, 1988**). Néanmoins, elles ne sont pas toujours impliquées dans le procédé d'attachement même si elles sont présentes (**Characklis et Cooksey, 1983**). Selon **Sauer et Camper (2001)**, il est avéré que le pili est important pour l'adhérence et la colonisation des surfaces.

Pour *B. cereus*, le comportement multicellulaire est contrôlé par le régulateur CodY qui induit la formation de biofilms dans des conditions de privation de nutriments, mais améliore l'expression de facteurs de virulence et de la mobilité lorsque les nutriments sont abondants (**Lindback *et al.*, 2012**).

I.3.2 Facteurs liés à la surface

Les avis varient sur l'effet des caractéristiques des surfaces sur l'adhérence bactériennes. Des chercheurs ont rapporté une corrélation positive entre l'adhérence et l'augmentation de la rugosité de la surface (**Hoffman, 1983; Pedersen, 1990; Leclercq-Perlat et Lalande, 1994; Wirtanen *et al.*, 1995**). Généralement l'augmentation de la rugosité de la surface affecte la rétention des micro-organismes sur cette surface (**Whithead et Verran, 2006**).

D'autres auteurs ne rapportent aucune corrélation entre les irrégularités ou la rugosité extérieures et la capacité des bactéries à adhérer. **Hilbert *et al.*, (2003)** ont montré que la rugosité n'avait pas affecté de manière significative l'attachement à la surface d'acier inoxydable dans la gamme de la valeur R_a (rugosité moyenne arithétique) de 0.01 à 0.9 μm /pour des espèces de *Pseudomonas*, de *Listeria monocytogenes* et de *Candida. lipolytica*. **Boulangé-Petermann *et al.*,(1997)** n'ont trouvé aucun rapport clair entre le paramètre de rugosité et le nombre de *Streptococcus thermophilus* adhérees à des surfaces d'acier

Partie I : synthèse bibliographique

inoxydable ayant des valeurs de R_a entre 0.015 et 1.04 μm . L'adhérence microbienne sur la surface d'acier inoxydable est probablement régie par divers facteurs physiques, chimiques, et biochimiques (Ortega *et al.*, 2010).

I.3.3 Facteurs environnementaux

L'attachement des bactéries à une surface est également affecté par la disponibilité et la concentration des nutriments, le pH et la température du milieu (Lappin-Scott *et al.*, 1992).

Les micronutriments peuvent fortement influencer le développement du biofilm. Pour des espèces de *Pseudomonas*, le phosphore, l'azote, et le fer peuvent exercer un effet crucial sur la structure de biofilm. (Singh *et al.*, 2002 ; Banin *et al.*, 2005 ; Thompson *et al.*, 2005 ; Monds *et al.*, 2007). Une augmentation de vitesse d'écoulement ou de concentration en éléments nutritifs peut augmenter l'attachement, si ces facteurs ne dépassent pas les niveaux critiques (Vieira *et al.*, 1993 ; Stoodley *et al.*, 1999 ; Simões *et al.*, 2007).

Le pH et la température du milieu ont également une influence sur le degré d'adhérence des micro-organismes. *Pseudomonas fragi* a montré une adhérence maximale sur des surfaces d'acier inoxydable à la gamme de pH optimale pour son métabolisme c'est-à-dire des pH de 7 à 8, (Stanley, 1983). De même, l'effet du pH et de la température sur l'attachement de *Yersinia enterocolitica* et *Listeria monocytogenes* a été également montré par Herald et Zottola, (1988a) et Herald et Zottola, (1988b) qui ont signalé que *Y. enterocolitica* adhère mieux à l'acier inoxydable à 21°C par rapport à 35°C ou à 10°C et pour *L. monocytogenes* cultivé dans TSB à un pH de 8 à 21 °C présentaient des cellules attachées aux copeaux d'acier inoxydable avec un matériau fibrillaire entre les cellules et se étendant à la surface d'acier inoxydable. A pH 8, 35 °C, moins de cellules étaient attaché à l'acier inoxydable, et aucune matrice de fixation n'est apparue. Peu de cellules ont été observées attaché aux puces à pH 5, 21 °C, et même moins de cellules pourraient être trouvées à pH 5,35 °C. Dans le cas d'une bactérie marine *Deleya Marianna*, on a observé une adhérence maximale à une surface hydrophile à 25°C c'est-à-dire à la température optimale de la croissance, alors que l'adhérence était plus faible à 19°C et à 37°C (Shea *et al.*, 1991).

Partie I : synthèse bibliographique

I.4 Biofilm de *Bacillus cereus*

La contamination persistante des équipements de l'industrie agroalimentaire par *Bacillus cereus* est due aux spores qui peuvent survivre à la plupart des traitements thermiques et à l'irradiation aux rayons gamma (**Kamat et al., 1989 ; Larsen et al., 1999 ; Kotiranta et al., 2000**), et des biofilms, qui se sont avérés hautement résistants aux procédures de nettoyage (**Peng et al., 2002**).

Dans l'industrie laitière, *Bacillus cereus* représente plus de 12% de la flore microbienne constitutive de biofilms (**Sharma et Anand, 2002**). Les biofilms de *B. cereus* sont formés quand les spores sont présentes dans le lait cru et survivent à la pasteurisation. Elles adhèrent alors aux surfaces d'acier inoxydable, et germent quand et où les conditions sont favorables (**Flint et al., 2001**).

Les caractéristiques hydrophobes des spores de *B. cereus* ont comme conséquence l'adhérence sur des surfaces des matériaux fréquemment utilisés en industrie agroalimentaire comme l'acier inoxydable (**Faille et al., 2001 ; Lelievre et al., 2001; Peng et al., 2001; Faille et al., 2002 ; Tauveron et al., 2006**). Les spores adhérentes peuvent déclencher le processus de formation de biofilm (**Ryu et Beuchat, 2005**), ce qui peut être une source de contamination de produit (**Flint et al., 2001**). Le nombre des spores adhérentes détermine d'ailleurs la durée de conservation du produit (**Andersson et al., 1995; Te Giffel et al., 2002**).

Flint et al., (2001) ont trouvé que les surfaces d'acier inoxydable souillées avec du lait attirent 10 à 100 fois plus de cellules végétatives et de spores de *Bacillus stearothermophilus* par rapport à l'acier inoxydable propre.

L'exposition des suspensions de spores à un traitement thermique peut être la cause d'une augmentation de l'hydrophobicité de la spore jouant ainsi un rôle dans l'adhérence de ces spores sur des surfaces (**Wienczek et al., 1990**).

La figure 02 montre la micrographie d'un biofilm de 6 jours formé par *B.cereus* sur une surface en acier inoxydable (**Simões et al., 2010**).

Partie I : synthèse bibliographique

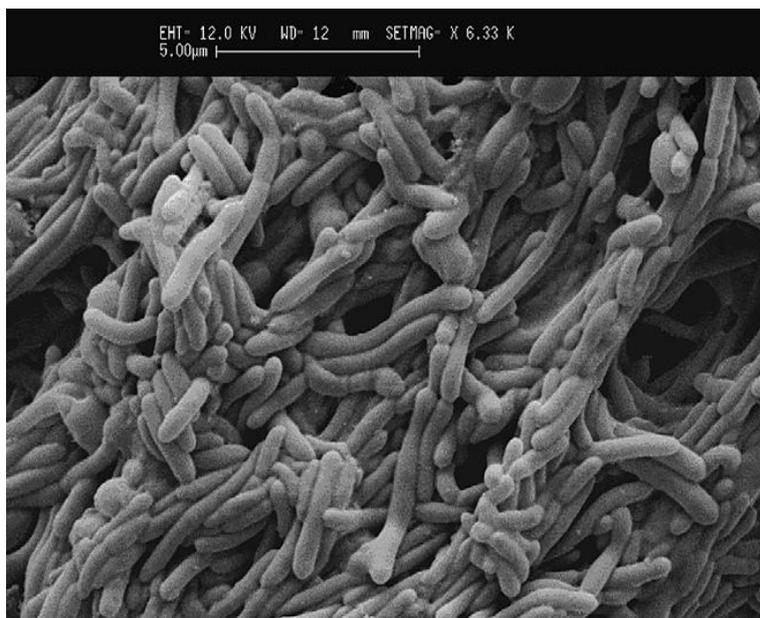


Fig 02: micrographie d'un biofilm de 6 jours formé par *B.cereus* sur une surface en inox (Simões *et al.*, 2010)

I.5 Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières

La formation de biofilm pose des problèmes dans beaucoup de branches de l'industrie alimentaire (Poulsen ,1999). En industrie laitière, les biofilms se forment habituellement sur les surfaces qui sont en contact avec des fluides, et peuvent être une source de contamination bactérienne responsable de la réduction de la durée de conservation des produits et de la transmission de maladies (Carpentier et Cerf, 1993 ; Zottola et Sasahara, 1994 ; Dunne, 2002 ; Agarwal *et al.*, 2006). Ils peuvent en effet servir de niche à des espèces pathogènes comme *Listeria monocytogenes* (Wong, 1998) et causent alors de sévères problèmes de santé publique (Cerf, 2002). La formation des biofilms sur les équipements d'industrie laitière peut mener à des problèmes d'hygiène et à des pertes économiques (Bremer *et al.*, 2006; Zhao et Liu,2006 ;Gram *et al.*, 2007).

Les biofilms sont plus résistants aux agents antimicrobiens comparés aux cellules planctoniques ce qui fait de leur élimination à partir des équipements de traitement des denrées alimentaires un défi important (Simões *et al.*, 2006 ; Simões et Vieira, 2009). Des études ont montré que les micro-organismes organisés en biofilm sur une surface sont plus résistants aux antibiotiques et aux désinfectants, que les cellules planctoniques, cette résistance dépend de leur activité métabolique et augmente avec l'âge du biofilm (Mattila-Sandholm et Wirtanen, 1992 ; Lechevallier *et al.*, 1998 ; Zottola et Sasahara ,1994 ;

Partie I : synthèse bibliographique

Costerton *et al.*, 1995), l'état de la matrice d'exopolymères, la surface et les conditions de croissance (**Muatapha et Liewen, 1989 ; Frank et Koffi, 1990**).

Généralement, les micro-organismes vivant dans les biofilms sont beaucoup plus résistants aux désinfectants que des micro-organismes dans une culture planctonique. La résistance accrue est provoquée par plusieurs facteurs. Le glycocalyx limite la diffusion et peut causer la désactivation des désinfectants. La densité de la suspension bactérienne à l'intérieur du biofilm et l'état physiologique de cellules affectant la production des enzymes dégradantes sont également impliqués (**Vidal *et al.*, 1997 ; Wirthlin *et al.*, 2005**).

Les micro-organismes dans les biofilms peuvent catalyser des réactions chimiques et biologiques (sulfate-réductases ou les bactéries productrices d'acide) causant ainsi la corrosion des canalisations et des tanks de stockage. Ils peuvent également réduire l'efficacité de transfert de chaleur si les biofilms deviennent suffisamment épais (**Costerton et Lappin-Scott, 1989 ; Mittelman, 1998 ; Vieira *et al.*, 1993**).

Dans les biofilms, la concurrence pour les nutriments a comme conséquence une insuffisance nutritive, a également un rôle important dans la plus grande résistance des biofilms aux traitements antimicrobiens (**Berg *et al.*, 1982 ; Jones et Pickup, 1989**). Certaines études ont montré que les bactéries portées par les aliments étaient plus résistantes aux divers désinfectants. Cette résistance est encore plus grande dans des biofilms âgées (plus de 24 h) que dans des biofilms jeunes (**Anwar *et al.*, 1990 ; Frank et Koffi, 1990 ; Lee et Frank, 1991 ; Wirtanen et Mattila-Sandholm, 1992**).

Compte tenu des différents facteurs décrits précédemment, les micro-organismes adhérents et/ou en biofilms sont très difficiles à éliminer et sont donc une source récurrente de contamination des aliments dans le secteur agro-alimentaire et les biofilms formés sur les canalisations ou d'autres surfaces dans l'environnement de traitement des denrées alimentaires sont identifiées comme source potentielle pour l'intoxication alimentaire (**Allion, 2004**). La résistance des biofilms aux traitements conventionnels augmente la nécessité de développer de nouvelles stratégies de prévention (**Singh *et al.*, 2002 ; Simoes *et al.*, 2009**).

I.6 Prévention et élimination des biofilms

Beaucoup de travaux ont cherché à améliorer l'efficacité du nettoyage en place (NEP) en étudiant le rôle des produits chimiques (**Peng *et al.*, 2002**), de la température (**Wilson, 2005**), du temps de contact (**Lelièvre *et al.*, 2002**), des propriétés des matériaux (**Jullien *et***

Partie I : synthèse bibliographique

al., 2003 ; Speranza *et al.*, 2004; Zhao, 2004 ; Whitehead et Verran, 2006 ; Hadjiev *et al.*, 2007; Sheng *et al.*, 2007).

Palmer *et al.*,(2007) ont également souligné l'importance de la conception des installations sur la facilité du nettoyage des surfaces d'équipement. En effet, l'hydrodynamique est un paramètre principal dans le nettoyage.

Cependant, relativement peu d'études (Lelièvre *et al.*, 2002 ;Herrera *et al.*, 2007) ont rendu compte de la cinétique de détachement des bactéries adhérentes (Faïlle *et al.*, 2013).

Une stratégie pour empêcher la formation du biofilm est de désinfecter régulièrement, avant la formation d'un nouveau biofilm (Das *et al.*, 1998). L'implémentation d'une étape de germination avant le NEP peut réduire le nombre de spores dans la chaîne de fabrication (Hornstra *et al.* , 2007).

L'inhibition de la formation de biofilm peut être la meilleure manière pour les contrôler dans les équipements de transformation alimentaire. Furukawa et ses collaborateurs (2009) ont montré que les esters d'acide gras et de sucre (additifs utilisés comme émulsifiants dans les aliments traités) sont des agents prometteurs pour l'inhibition de la formation de biofilm par des bactéries d'intoxication alimentaire. Les mécanismes inhibiteurs et les modalités pratiques d'utilisation de ces esters dans la transformation alimentaire devraient être étudiés.

Les biosurfactants ont plusieurs propriétés qui pourraient être utiles dans beaucoup de domaines de l'industrie alimentaire, leur activité antiadhésive a attiré l'attention comme nouvel outil pour empêcher et perturber les biofilms formés dans des surfaces de contact alimentaire (Nitschke et Costa, 2007).

L'argent est utilisé pour retarder ou empêcher la formation des biofilms (Cicalini *et al.*, 2004 ; Gentry et Cope, 2005 ; Ashraf *et al.*, 2014). La formation de biofilm sur les appareils médicaux implantés est une cause fréquente de rejet d'implant. Plusieurs auteurs rapportent l'inhibition de la formation de biofilm sur de tels dispositifs in vitro en les enduisant d'argent (Klueh *et al.*, 2000 ; Hashimoto, 2001).

Des matériaux hydrophiles tels que le verre sont connus pour ne pas faciliter l'adhésion bactérienne (Fletcher et loeb, 1979). Ces matériaux sont d'ailleurs fréquemment employés pour les récipients en contact avec les aliments. Rönner et ses collaborateurs (1990), ont étudié l'adhérence des spores de Bacillus au verre et à l'acier inoxydable par rapport à l'hydrophobicité des spores. Les spores se sont avérées hydrophobes, et ont adhéré

Partie I : synthèse bibliographique

sur les deux surfaces plus aisément que les cellules végétatives. Les surfaces d'acier inoxydable peuvent montrer des régions tout à fait hydrophobes, quand elles sont employées en industrie laitière. On pourrait recommander que l'acier inoxydable soit traité pour le rendre plus hydrophile : on peut réduire au minimum de ce fait le risque de colonisation par des spores de *Bacillus*. Par exemple, l'albumine du lait a été testée avec succès pour empêcher l'adhésion bactérienne sur des plastiques (Muller *et al.*, 2009).

L'acier inoxydable traité avec des agents tensio-actifs non ioniques a empêché l'adhérence microbienne dans beaucoup de cas par rapport à l'acier non traité. Les composés anioniques n'ont pas empêché l'adhérence par contre, les composés cationiques, tels que les sels d'ammonium quaternaire, ont permis une inhibition de l'adhérence (Whitekettle, 1991). Le NAC (*N*-Acetyl-L-Cysteine) a pu diminuer l'adhérence initiale et augmenter le détachement des cellules et des spores adhérentes. (Olofsson *et al.*, 2005), ces auteurs ont montré que le NAC affecte plusieurs processus qui sont importants pour la formation bactérienne de biofilm sur des surfaces d'acier inoxydable y compris une réduction importante de production extracellulaire de polysaccharides agissant ainsi comme un antibiofilm (Olofsson *et al.*, 2003).

Les enzymes et les bactériocines sont aussi considérés en tant qu'agents améliorant l'efficacité de nettoyage et de désinfection, cependant, plus d'études devraient être effectuées pour affirmer leur efficacité contre des biofilms.

Eviter la formation de biofilm par l'incorporation des produits antimicrobiens dans les matériaux extérieurs (Weng *et al.*, 1999 ; Park *et al.*, 2004), ou en modifiant les propriétés physico-chimiques de surfaces (Whitehead *et al.*, 2004, 2005 ; Rosmaninho *et al.*, 2007) est également une voie de progrès. Dans une étude sur le contrôle du biofilm, des microparticules (CaCO_3) revêtues de benzyl diméthyl dodécyl ammonium chlorure ont été testées pour inactiver efficacement la formation de biofilm (Ferreira *et al.*, 2011).

Le pré-conditionnement de la surface avec un agent tensio-actif a également été rapporté pour empêcher l'adhérence bactérienne (Cloete et Jacobs, 2001 ; Choi *et al.*, 2011 ; Chen, 2012). Des agents tensio-actifs non ioniques et anioniques ont diminué de plus de 90% l'adhérence de *Pseudomonas aeruginosa* sur des surfaces d'acier inoxydable et en verre (Cloete et Jacobs, 2001). Par ailleurs, Splendiani et ces collaborateurs (2006) ont montré que des agents tensio-actifs ont affecté le développement des flagelles, induisant une diminution de la capacité d'attachement de bactéries aux surfaces.

Partie I : synthèse bibliographique

L'étude de **Zeraik et Nitschke (2010)** montre que, après conditionnement avec un agent tensio-actif, la surface devient plus hydrophile. Ce qui induit une diminution de l'adhésion des bactéries.

Houry et ses collaborateurs (2010), ont testé la perforation de la matrice des biofilms par des bactéries mobiles pour faciliter la pénétration de substances antimicrobiennes. Ces chercheurs ont ainsi montré l'effet sensibilisant d'une pré-exposition de biofilms indésirables à un mélange de bactéries nageuses vis-à-vis de l'efficacité d'un désinfectant utilisé en hygiène industrielle. Cette étude a également montré la possibilité d'utiliser des bactéries nageuses et productrices de composés antimicrobiens pour infiltrer la matrice de biofilms indésirables, inactiver les agents pathogènes installés et occuper le nouvel espace libéré sur la surface.

Depuis plus de vingt ans, la communauté scientifique internationale a concentré ses efforts sur le développement de traitements des biofilms. Dans ce contexte, en tenant compte de plus en plus des impacts environnementaux, l'exploration de biocides générés sur place, tels que l'ozone ou de l'eau acide électrolysée considérés comme biocides verts est à encourager (**Ashraf *et al.*, 2014**).

Les huiles essentielles, y compris le thymol, le carvacrol et l'eugénol et leurs combinaisons, ont été trouvées également actives contre les biofilms industriels papetiers (**Neyret *et al.*, 2014**).

Partie I : synthèse bibliographique

II Nettoyage et désinfection en industrie agroalimentaire

II.1 Introduction

Il est important de choisir les bonnes méthodes de nettoyage et de désinfection. Dans plusieurs cas, il est préférable d'utiliser deux méthodes ou plus pour le nettoyage des surfaces de processus parce que les micro-organismes doivent s'adapter à toutes les techniques pour survivre (**Mattila et Wirtanen, 1992**).

Si le nettoyage et la désinfection sont insuffisants, les cellules microbiennes sur la surface d'équipement pourraient survivre et se développer en biofilm et causer la contamination transversale qui mène à la diminution de la durée de conservation, à la détérioration de l'aliment et à la transmission de la maladie (**Allison et Gilbert, 1992; Carpentier et Cerf, 1993; Sharma et Anand, 2002; Stepanovic et al., 2003**).

II.2 Nettoyage

Le nettoyage a pour objectif d'éliminer toutes traces de salissure sur toutes les parties du matériel en contact avec l'aliment, si possible sans démontage ni nettoyage manuel.

L'efficacité du nettoyage est conditionnée par quatre facteurs principaux : (1) l'action chimique, (2) l'action mécanique, (3) la température, et (4) le temps de contact, qui forment ensemble le cercle de Sinner (**Wirtanen et Salo, 2003**). Le cercle de Sinner a décrit un processus économiquement idéal de nettoyage utilisant les interactions optimales entre ces facteurs de base. La réduction de l'un des facteurs doit être compensée en renforçant les autres facteurs.

II.2.1 Température

La température de l'eau joue un rôle important sur l'efficacité des produits. La température recommandée par le fabricant doit être respectée pour maximiser l'efficacité du produit. À défaut de spécifications du fabricant, la température de l'eau permettant de rendre efficace l'effet de détergence et de désinfection doit généralement être tiède (les mains doivent tolérer la température de l'eau). Le glutaraldéhyde et les composés d'ammonium quaternaire, par exemple, sont complètement inefficaces à des températures de 4°C ou moins. Le passage d'une température de l'eau basse (de 4 à 20°C) à une température plus élevée (de 37 à 50°C) peut réduire de 5 à 60 fois la concentration nécessaire du produit utilisé pour

Partie I : synthèse bibliographique

désinfecter une surface d'acier inoxydable. On peut citer également en exemple l'eau de Javel qui perd de son efficacité lorsqu'elle est diluée dans l'eau chaude car le chlore s'évapore rapidement. Une étude réalisée dans le milieu alimentaire, permet de constater l'influence de la température sur les concentrations nécessaires pour assainir une surface contaminée avec *Listeria monocytogenes* (Mafu *et al.*, 1990).

II.2.2 Action mécanique

L'action mécanique (frottage) vise essentiellement à remettre en suspension les salissures et à les éliminer. Cette action a donc pour objectif d'améliorer l'efficacité des produits détergents en éliminant mécaniquement une partie importante de matières organiques collées à la surface.

II.2.3 Action chimique

La méthode et le produit à employer dépendent de la nature de la souillure et de la fragilité de la surface à traiter (Massicotte, 2009).

II.2.4 Temps de contact

Lorsqu'un détergent est appliqué sur une surface. Il est nécessaire de lui donner le temps de réagir avec les salissures afin de pouvoir les déloger (Massicotte, 2009).

Pour un désinfectant, le temps de contact se définit comme étant la durée nécessaire pour qu'il inactive un microorganisme. On évalue ce temps en laboratoire. Lorsqu'un désinfectant est appliqué sur une surface, on doit donc suivre les recommandations du manufacturier. Souvent, le temps de contact lors des désinfections n'est pas respecté en raison de l'ignorance de l'importance de ce paramètre.

II.3 Nettoyage en place

Des procédures de nettoyage en place (NEP) sont largement utilisées pour nettoyer et désinfecter la surface des lignes de traitement des denrées alimentaires, cependant, ces procédures sont généralement paramétrées pour la lutte contre les cellules végétatives : les spores ne sont que légèrement affectées (Bremer *et al.*, 2006).

Partie I : synthèse bibliographique

Le contrôle de Biofilm dans les laiteries comporte généralement un processus de nettoyage en place (NEP ou CIP en anglais pour Cleaning in place). Le NEP est défini comme le nettoyage des circuits d'usine ou de canalisation sans démonter ou ouvrir l'équipement et avec peu ou pas de participation manuelle de la part de l'opérateur (**Romney, 1990**).

D'après certains auteurs (**Austin et Bergeron, 1995 ; Faille et al., 2001; Dufour et al., 2004**), le NEP permet d'éliminer les bactéries adhérentes. Cette efficacité dépend d'un grand nombre de facteurs : la nature et l'âge de la couche d'encrassement ; la composition et la concentration en produits de nettoyage ; le temps de nettoyage ; la température de produit de nettoyage ; le degré de turbulence de la solution de nettoyage ; et les caractéristiques de la surface à nettoyer (**Stewart et Seiberling, 1996; Changani et al., 1997; Lelievre et al., 2001, Lelievre et al., 2002 ; Boulange-Petermann et al., 2004**).

L'efficacité des régimes de NEP dans l'élimination des bactéries à Gram positif connues par leur capacité à former des biofilms dans les installations laitières, telles que les *streptocoques thermophiles* et les espèces de *Bacillus* (**Flint et al., 1999 ; Lindsay et al., 2002; Parkar et al., 2004**).

Dans l'industrie laitière, l'efficacité avec laquelle les opérations de nettoyage et de désinfection sont effectuées affecte considérablement la qualité des produits finis (**Bremer et al., 2006; Sharma et Anand, 2002**). Généralement, le procédé standard inclut les étapes suivantes :

- Rinçage du système avec de l'eau à la température ambiante propre pendant 5 à 20 minutes. Ce rinçage assure l'élimination des restes de la matière première produite ou traitée

- Nettoyage avec une solution alcaline (la concentration appropriée de NaOH par exemple est habituellement 1.0 à 1.5%) à une température de 75 - 80°C pendant 6 à 45 minutes. La solution alcaline enlève les contaminants organiques (protéines, polysaccharides) collées à la surface

- Rinçage avec de l'eau chaude

- Nettoyage avec un agent acide (la concentration appropriée de l'acide est généralement de 0.5 à 1%) pendant 5 à 45 minutes à une température entre 60°C et 90°C. L'acide assure l'élimination des sédiments inorganiques ; il n'est pas nécessaire de l'appliquer à chaque traitement ; une fois par semaine est suffisante. La fréquence est conditionnée par la dureté de l'eau et le degré de contamination inorganique.

Partie I : synthèse bibliographique

-Rinçage final avec de l'eau à la température ambiante pendant 5 à 20 minutes. (**Bylund, 1995; Tamine et Robinson 1999**).

II.4 Les agents de nettoyage

II.4.1 Les agents de nettoyage alcalins

Le rôle des produits de nettoyage alcalins est d'enlever la croûte organique collée par les traitements de chaleur, de saponifier les lipides saponifiables, de dissoudre les matières grasses et de dégrader les protéines en acides aminés et de les ioniser, puis les solubiliser .Il y a quatre classes d'agents alcalins: (**Dupuis et al., 2003**). Les détergents alcalins peuvent présenter des effets indésirables notamment une mauvaise rinçabilité et une corrosion des surfaces (excepté les silicates qui sont même de bons protecteurs des surfaces). Par ailleurs, l'alcalinité favorise la formation de tartre, source de corrosion des matériaux, d'où la nécessité de l'ajout d'antitartre (**Khamisse, 2013**).

II.4.1.1 Alcalins forts

Les alcalins forts ont une action très puissante sur les résidus organiques, mais il faut limiter leur utilisation sur les métaux mous et le caoutchouc, car ils sont corrosifs. (**Dupuis et al., 2003**).

II.4.1.2 Alcalins moyens

Cette classe contient principalement les phosphates, mais leur utilisation est de plus en plus limitée à cause de leur effet néfastes sur l'environnement.les polyphosphates ont un bon pouvoir adoucissant sur l'eau. (**Dupuis et al., 2003**).

II.4.1.3 Alcalins doux

Comme alcalins doux, on retrouve principalement les carbonates. on utilise les alcalins doux pour le nettoyage d'équipements en aluminium ou tout autre métal mou et pour le nettoyage manuel demandant un brossage. (**Dupuis et al., 2003**).

II.4.1.4 Alcalins chlorés

On a recours le plus souvent aux alcalins chlorés pour aider à décoller les résidus protéiques. L'inconvénient majeur de ces produits est qu'avec le temps, ils endommagent les équipements en attaquant la couche de passivation, surtout si on ne respecte pas les concentrations. (**Dupuis et al., 2003**).

Partie I : synthèse bibliographique

II.4.2 Les produits de nettoyage acides

Les produits de nettoyage acides ont pour but de dissoudre les résidus minéraux résultant des aliments, de l'eau ou des réactions chimiques eau + aliments ou eau + aliments + produits de lavage alcalin. Il y a deux classes parmi les produits de nettoyage acides : les acides minéraux et les acides organiques. (Dupuis *et al.*, 2003).

II.4.2.1 Acides minéraux

Les acides minéraux sont les ingrédients les plus utilisés dans la formulation des produits de nettoyage. L'acide phosphorique, l'acide nitrique et sulfamique, ou un mélange d'acides nitrique et phosphorique sont les plus courants. Par exemple l'acide nitrique sert pour passiver les équipements d'acier inoxydable à une concentration pouvant varier de 20% à 50%. (Dupuis *et al.*, 2003).

II.4.2.2 Acides organiques

Les acides organiques sont moins dangereux et moins corrosifs que les acides minéraux (Vincent, 1999), car ce sont des acides faibles. Ils possèdent un pouvoir séquestrant sur certains minéraux.

En raison de leur plus faible corrosivité, on peut les utiliser sur les métaux mous tel l'aluminium. Les acides citrique, gluconique, lactique et hydroxyacétique sont les plus utilisés. La structure des acides faibles réduit de façon marquée la tension de surface des solutions de nettoyage, ce qui améliore leur pénétration dans le résidu. (Dupuis *et al.*, 2003).

II.5 Détergents enzymatiques

L'utilisation des détergents à base d'enzyme peut servir d'option viable pour surmonter le problème de biofilm dans l'industrie alimentaire. En raison de l'hétérogénéité d'EPS, un mélange des enzymes peut être nécessaire pour la dégradation suffisante de biofilm (Simoes *et al.*, 2010). Les formulations contenant plusieurs différentes enzymes semblent être fondamentales pour une stratégie réussie de contrôle de biofilm. Fondamentalement, les protéases et les enzymes d'hydrolyse de polysaccharide peuvent être utiles (Meyer, 2003).

D'après Parkar *et al.* (2004), une combinaison d'enzymes protéolytiques avec des agents tensio-actifs a augmenté la mouillabilité des biofilms constitués par une espèce de *Bacillus thermophile* et a augmenté, en conséquence, l'efficacité de nettoyage.

Partie I : synthèse bibliographique

Jacquelin *et al.* (1994) ont également rapporté l'effet synergique des enzymes en combinaison avec des agents tensio-actifs et des agents antimicrobiens de nature phénolique.

Oulahal-Lagsir *et al.* (2003) ont trouvé des résultats intéressants en appliquant en synergie les ondes ultrasoniques et les enzymes protéolytiques et glycolytiques contre des biofilms formés sur l'acier inoxydable d'*Escherichia coli* développés avec du lait. Un traitement de 10 s a éliminé entre 61 et 96% de biofilm.

II.6 La désinfection

II.6.1 Définition

La désinfection est l'utilisation des produits antimicrobiens pour inactiver des micro-organismes. Le but de la désinfection est de réduire les cellules viables laissées après le nettoyage et d'empêcher la croissance microbienne sur des surfaces avant la production. Les désinfectants sont plus efficaces en absence de matière organique (graisse, sucres, et matières protéiques).

Outre les substances organiques, le pH, la température, la dureté de l'eau, la concentration et le temps de contact influent sur l'efficacité des désinfectants (**Cloete *et al.*, 1998 ;Kuda, 2008**).

Aux États-Unis le mot "désinfection" est habituellement employé en décrivant la destruction ou la réduction du nombre de microbes pathogènes associés aux objets ou aux matériaux, de sorte que ces derniers ne constituent pas un danger sanitaire (**Black, 1993**).

Le but de la désinfection dans l'industrie alimentaire est la réduction du nombre de micro-organismes à un niveau tel qu'il ne peut pas affecter la qualité et la sûreté des produits alimentaires (**Vlokova *et al.*, 2008**). Le désinfectant empêche en même temps la croissance des microorganismes restant (**Wirtanen *et al.*, 2002**).

II.6.2 Choix d'un désinfectant

Le choix de l'agent de désinfection est important : avant son choix, les questions suivantes le concernant devraient être posées : la gamme de pH à laquelle il est efficace, sa stabilité dans une solution, son évaporation, sa toxicité, son caractère irritant, son efficacité par rapport à la température, son action corrosive sur les surfaces, sa valeur tensio-active, enfin son prix (**Sequiera *et al.*, 1988; Larson et Morton, 1991; Troller, 1993; Wirtanen, 1995**).

Partie I : synthèse bibliographique

Les produits chimiques actuellement utilisés dans des procédés de désinfection appartiennent aux types suivants : composés acides, aldéhydes, produits caustiques ; chlore, peroxyde d'hydrogène, iode, isothiazolinones, ozone, acide peracétique, composés phénoliques, biguanidines, agents tensio-actifs (**Rossmore, 1995 ; Wirtanen et al., 2000 Dosti et al., 2005 ; Bremer et al ., 2006 ; Simoes et al., 2006**).

II.7 Les différentes classes de désinfectants

II.7.1 Halogènes et dérivés

L'un des composés les plus couramment utilisés comme désinfectant en milieu industriel est l'hypochlorite de sodium. Il possède une puissante activité désodorisante ainsi qu'un large spectre d'activité sur les microorganismes (**Trueman, 1971**). Son activité bactéricide est liée à la libération de l'acide hypochlorique (HOCl) lors de sa dissociation dans l'eau. Cet agent antimicrobien pénètre facilement à travers les parois et les membranes de cellules microbiennes. Il agit par un mécanisme rapide d'oxydation générale entraînant la dénaturation des protéines provoquant ainsi l'arrêt des réactions du métabolisme et la mort cellulaire (**Trueman, 1971 ; Maris, 1995**).

Les produits chlorés ne coûtent pas cher. Ils sont efficaces à basse température et, en général, ils ne laissent pas de résidus sur les surfaces. En raison de ces qualités intéressantes, l'industrie développe de nouvelles formes de produits chlorés qui pallient leurs inconvénients et principalement leur instabilité. Ces nouveaux produits, par contre, ont des coûts plus élevés (**Massicotte, 2009**).

L'hypochlorite de sodium contient de l'hydroxyde de sodium qui retarde l'évaporation du chlore gazeux au cours de son entreposage. Cette composition en fait à la fois un oxydant et un corrosif qui peut attaquer de nombreux types de surfaces (**Massicotte, 2009**).

II.7.2 Aldéhydes

Les principaux produits désinfectants qui font partie de cette catégorie sont : le formaldéhyde, le glutaraldéhyde et l'aldéhyde succinique. Ces produits sont bactéricides à des concentrations élevées sur les bactéries à Gram-. On leur attribue également des qualités de fongicide, de virucide, de mycobactéricide et de sporicide (**Massicotte ,2009**). Ils provoquent une dénaturation des acides nucléiques et des protéines des micro-organismes. Leur activité

Partie I : synthèse bibliographique

diminue en présence d'une solution alcaline. Le formaldéhyde n'est actuellement plus utilisé dans les industries car il est suspecté cancérigène. Le glutaraldéhyde présente un spectre d'activité large. En industries, il est utilisé en association avec des ammoniums quaternaires (**Khamisse, 2013**).

II.7.3 Les alcools

Parmi les alcools les plus utilisés, on trouve les l'éthanol et l'isopropanol. Les alcools sont actifs sur les bactéries à Gram+ et à Gram- et agissent rapidement (environ 30 secondes).

L'alcool est surtout utilisé en association avec d'autres substances, comme les dérivés du phénol, ce qui permet d'en améliorer les capacités bactéricides. L'alcool est inefficace contre les spores, peu efficace sur les virus et s'évapore rapidement. Il est inactivé par les matières organiques et a tendance à faire coller les débris organiques (**Massicotte, 2009**).

II.7.4 Les oxydants

Les produits oxydants à base d'oxygène possèdent des atomes qui travaillent généralement par paires. On parle alors de peroxyde, d'acide peracétique, de peroxyphthalate, de perglutarate et de peroxymonosulfate. L'acide peracétique qui possède un large spectre d'action à faible concentration. Il agit sur les micro-organismes en modifiant la perméabilité de la membrane cellulaire. La vapeur de l'acide peracétique est caractérisée par sa faible stabilité avec une demi-vie d'environ 20 minutes, donc peu de risque de bioaccumulation. Ce composé est de plus en plus utilisé en entreprises car il est compatible avec beaucoup de matériaux (acier inoxydable, Polychlorure de vinyle PVC, polyéthylène) et a l'avantage d'être peu toxique (**Khamisse, 2013**). Plus il comprend un nombre élevé de paires d'atomes d'oxygène, plus le produit est puissant et fortement chargé négativement. Les produits à base de peroxyde d'hydrogène réagissent très rapidement avec la matière (de quelques secondes à quelques minutes) et endommagent peu les surfaces inertes sauf les surfaces composées de fer qui sont facilement oxydables. En général, ils ne génèrent pas de résidus ou de gaz toxiques, sauf s'ils sont mélangés avec d'autres produits comme l'acide acétique tels certains produits appelés acides peroxyacétiques (**Massicotte, 2009**).

Partie I : synthèse bibliographique

II.7.5 Dérivés phénoliques

Les composés phénoliques possèdent une action bactéricide et fongicide. À faible concentration, ils sont bactériostatiques (0,2 %) et bactéricides à partir de 1 %. Les dérivés phénoliques dissous dans l'eau ont une excellente activité contre les mycobactéries et les virus. Il existe sur le marché de nouvelles formules combinant plusieurs phénols capables de détruire les virus hydrophiles. Ces composés sont surtout utilisés pour le nettoyage des surfaces souillées par les matières organiques (**Massicotte, 2009**).

Ces produits sont inactivés par les détergents, les matières organiques et l'eau dure. En augmentant le pH de la solution, on augmente leur solubilité mais leur activité se trouve réduite. De plus, ils sont incompatibles avec le fer, l'hypochlorite et les ammoniums quaternaires. À forte concentration, les phénols sont corrosifs pour les métaux et de nombreux autres matériaux (**Massicotte, 2009**).

II.7.6 Ammoniums quaternaires

En raison de leur pouvoir détergent, les ammoniums quaternaires entrent dans la composition de nombreux produits détergents-désinfectants pour sols, surfaces et mobilier et en combinaison avec des détergents non ioniques (**Massicotte, 2009**).

Leur spectre d'activités se décline ainsi :

- Bactériostatiques sur les bactéries à Gram - et bactéricides sur les bactéries à Gram + ;
- Activité variable sur les virus enveloppés, nulle sur les virus nus ;
- Fongistatiques ;
- Aucune action sporicide.

Pour compenser ce manque, leur association synergique avec des aldéhydes et/ou des phénols est souvent pratiquée. Les souillures protéiques ainsi que la dureté de l'eau réduisent fortement l'efficacité de ces composés (**Khamisse, 2013**).

Les ammoniums quaternaires sont tensio-actifs et possèdent donc aussi une action détergente. En les combinant avec des agents non ioniques, on obtient des produits à la fois nettoyant et désinfectant. La plupart des ammoniums quaternaires sont peu toxiques. Leur structure moléculaire permet la création de produits neutres. Comme ce ne sont pas des agents

Partie I : synthèse bibliographique

oxydants, ils s'attaquent peu aux surfaces. Selon leur concentration, on peut obtenir un effet bactériostatique (rémanence) avec une faible concentration et un effet bactéricide avec une forte concentration. Malgré un manque d'eau, ils demeurent sur les surfaces et y exercent une activité résiduelle qui peut durer plusieurs heures. Ils sont stables dans l'eau chaude (Massicotte, 2009).

Le tableau N°1 résume le mode d'action des principaux désinfectants et dans le tableau N°2, nous avons résumé les agents antimicrobiens appliqués pour le contrôle du biofilm formé par les bactéries qui contaminent les équipements des laiteries.

Tableau 01 : Mode d'action des principaux désinfectants

(D'après CAPP-Info, 2007).

Classes	Cible et mode d'action
Alcools	Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines
Aldéhydes	Altération de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines
Ammoniums quaternaires	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires et lyse de la cellule
Biguanides	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires, coagulation du cytosol
Halogènes chlorés et iodes	Destruction des protéines membranaires et chromosomiques (halogénéation)
Oxydants	Production de radicaux libres qui interagissent avec les lipides, protéines et ADN

Partie I : synthèse bibliographique

Tableau 02 : Agents antimicrobiens appliqués pour le contrôle du biofilm formé par les bactéries contaminant les équipements des laiteries (Simões *et al.*, 2010)

Traitement	Type de biofilm	Référence
L'ozone, détergent chloré commercial	<i>P.fluorescens/Alcaligenes faecalis</i>	Green <i>et al</i> (1993)
Chlorure de Benzalkonium, bromure de triméthylammonium de hexadecyl, hypochlorite de sodium, acide peracétique, peroxyde d'hydrogène, o-crésol, phénol	<i>E. coli</i>	Ntsama-Essomba <i>et al</i> (1997).
Chlore, acide peracétique, acide peroctanoïque	<i>L. monocytogenes</i> et <i>Pseudomonas sp.</i> Biofilm mixte	Fatemi et frank (1999)
détergents contenant des bioxydes de chlore	<i>B. cereus/P. fluorescens</i> .Biofilm formé par une espèce ou par les deux espèces	Lindsay <i>et al</i> (2002).
Chlore	<i>E. coli</i>	Lomander <i>et al</i> (2004)
solution Chlorer-alkaline ; détergent de solution tampon de bas-phosphate ; solution duelle de peracide ; solution alcaline ; hypochlorite	<i>L. monocytogenes</i>	Somers et Wong(2004)
Hydroxyde de sodium ; décapant alcalin commercial	<i>P. putida</i>	Antoniou et Frank (2005)
Chlore ; l'ozone	<i>P. fluorescens, P. fragi et P. putida</i>	Dosti <i>et al</i> (2005)
Chlore, peroxyde d'hydrogène, l'ozone	<i>L. monocytogenes</i>	Robbins <i>et al</i> (2005)
Glutaraldéhyde, ortho--phtalaldehyde, bromure de triméthylammonium de hexadecyl, sulfate dodécylque de sodium, hydroxyde de sodium de solution de chlore	<i>P. fluorescens</i>	Simoes <i>et al</i> (2005)
Hydroxyde de sodium ; acide nitrique	Espèces mélangées	Bremer <i>et al</i> (2006)
Chlore ; bioxyde de chlore ; détergent commercial	<i>B. cereus et Pseudomonas spp</i>	Kreske, <i>et al</i> (2006)
Hypochlorite de sodium	<i>S. typhimurium</i>	Lapidot <i>et al</i> (2006)
Peroxydes ; composés d'ammonium quaternaire ; chlore	<i>L. monocytogenes</i>	Pan,Breidt,et Kathariou(2006)
Peroxyde d'hydrogène ; dichloroisocyanurate de sodium ; acide peracétique	<i>Staphylococcus. Aureus</i>	Marques <i>et al</i> (2007)

Partie II
Materiel
et
méthodes

Partie II : materiel et méthodes

I : Caractérisation des souches isolées

Cette partie a été réalisée au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen,

I.1. Origine des prélèvements

Plusieurs campagnes de prélèvement ont été effectuées au niveau de la laiterie Mansourah (groupe GIPLAIT) de Tlemcen durant l'année 2010.

Au total 160 prélèvements ont été réalisés à partir des sites suivants :

1. -cuves de collecte de lait cru
2. -tanks de stockage du lait de vache pasteurisé et non pasteurisé
3. -tanks de stockage du lait recombinaé pasteurisé et non pasteurisé
4. -canalisations du lait de vache et lait recombinaé pré-pasteurisation et post-pasteurisation
5. –conditionneuses (prélèvements effectués sans gabarit).

Les prélèvements ont été effectués par écouvillonnage. Une surface de l'équipement de 1cm² est délimitée aseptiquement à l'aide d'un gabarit en aluminium. Un écouvillon humidifié à l'eau distillée stérile additionnée de tween 80 à 3% sert à racler minutieusement le carré ainsi délimité pour assurer une récupération maximale des germes présents sur la surface de l'équipement. L'écouvillon chargé de germes raclés est mis dans un tube à essai contenant une solution de dilution : le tryptone-sel-eau (TSE) (voir annexe 01). Après avoir brisé et jeté la partie l'écouvillon qui est entrée en contact avec les mains, le tube est fermé.

Pour les segments de canalisations ou coudes, l'écouvillonnage a été effectué après CIP. Les prélèvements sont transportés dans une glacière jusqu'au laboratoire et analysés généralement le jour même. Si le traitement de l'échantillon est différé au lendemain, il est conservé à une température voisine de 4°C.

L'ensemble des prélèvements est schématisé dans la figure 03

Partie II : materiel et méthodes

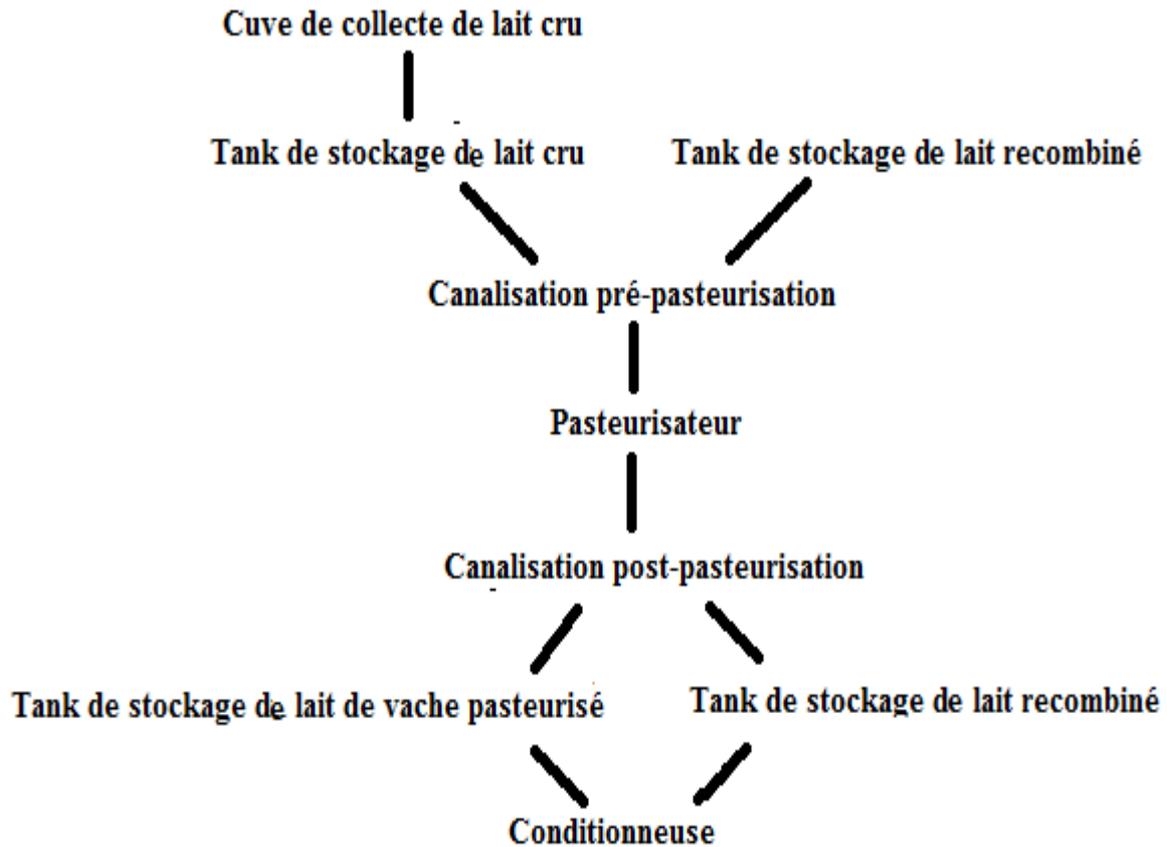


Figure 03: Diagramme général de ligne de production du lait pasteurisé indiquant les sites de prélèvements

I.2. Traitement des échantillons

Les tubes de TSE contenant les écouvillons sont agités pendant au moins une minute au vortex pour détacher les germes. Un traitement thermique de 80°C pendant 10 min est appliqué aux échantillons. Les ensemencements se font en profondeur dans le milieu gélosé de Luria-Bertani et l'incubation dure 24 à 48 h à 30°C.

I.3. Isolement et Conservation des souches

La purification des souches a été réalisée par passages alternés sur le bouillon nutritif et sur le milieu gélosé de Mossel incubé 24h à 30°C. Généralement trois passages alternés sont effectués.

Les souches ont été conservées à -18°C dans du TSB additionné de glycérol à 30% (v/v). (Peng, 2001) et à 4°C dans des tubes de gélose nutritive inclinée

Partie II : matériel et méthodes

I.4. Identification des souches

Après vérification de leur pureté, les souches sont soumises à un processus d'identification.

I.4.1-Caractérisation morphologique des isolats

I.4.1.1-Aspect microscopique des isolats

L'examen consiste à vérifier la morphologie, l'arrangement cellulaire et la réponse à la coloration de Gram de l'isolat ainsi que sa mobilité. Les spores sont mises en évidence dans le corps bactérien sur des cultures âgées en faisant une coloration négative par application, après fixation, d'une solution au vert de malachite pendant 5 minutes.

I.4.1.2-Aspect macroscopique des cultures

La forme, la taille et la pigmentation des colonies ont été déterminées après croissance sur milieu **Mossel** solide additionné de solution de jaune d'œuf et de polymixine B après une incubation 24h à 30°C.

I.4.2. Identification biochimique

I.4.2.1-Mise en évidence des enzymes respiratoires

La catalase, la cytochrome-oxydase, le type respiratoire et la réduction du nitrate ont été mis en évidence

Sur une lame propre contenant une partie de la colonie, l'eau oxygénée a été déposée. Si la bactérie possède la catalase, alors un dégagement gazeux est observé (**Leyral et Vierling, 2007**).

La recherche de la cytochrome-oxydase a été effectuée à l'aide de disques «Oxydase» dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine-dichlorure. A partir d'un milieu solide et à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée une partie de la colonie a été déposée sur un disque oxydase placé sur une lame. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet foncé (**Joffin et Leyral, 2006**).

Le test du type respiratoire a été effectué selon les recommandations de Guiraud (1998). Le milieu gélosé Viande-Foie (VF) réparti en tubes longs et fins est ensemencé après régénération et refroidissement à l'aide d'un ensemenceur en inox en forme d'aiguille. L'ensemenceur est plongé au fond du tube, puis remonté en décrivant une spirale. Le milieu

Partie II : matériel et méthodes

est mis en incubation à 30 °C pendant 24 à 48 heures. La présence de la culture sur toute la hauteur indique un type respiratoire de type aéro-anaérobie facultatif (AAF). Si la culture a lieu seulement en haut du tube elle indique que la bactérie est aérobie stricte (AS). Si la culture est observée à 1 à 1,5 cm environ de la surface, l'isolat est considéré microaérophile. Si la culture est manifeste seulement au fond du tube cela suggère que la bactérie peut être anaérobie stricte

La révélation de la réduction des nitrates a été faite par ajout de 5 gouttes de réactif A et 5 gouttes de réactif B dans le tube test qui est agité pour mélanger les réactifs avec le milieu. Si une couleur rouge ou rose se développe en quelques minutes cela indique la réduction des nitrates en nitrites.

I.4.2.2 Utilisation des galeries API 20E

La recherche de la β -galactosidase (ONPG), de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), la production d' H_2S , l'utilisation du citrate, la production d'indole et la réaction de Voges-Proskauer, la liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres ont été réalisés en utilisant la plaque API 20E. ((voir annexe 02).

I.4.2.3-Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Les activités amylolytique, caséinolytique et lecithinolytique ont été recherchées.

Le test de la recherche d'amylase a été réalisé en cultivant la souche en une strie droite de 3 à 4 cm de long sur une gélose nutritive contenant 1% d'amidon natif de maïs (voir annexe 1). Après avoir obtenu une bonne culture bactérienne, le milieu a été recouvert d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la strie. Un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (**De Vos et al., 2009**).

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% de caséine. Après 48 heures d'incubation à 30°C, la présence de cette activité est détectée par une zone translucide autour de la strie indiquant l'hydrolyse de la caséine.

Le test de la lecithinase a été réalisé par l'ensemencement de la souche en strie sur la gélose Mossel complet. Après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, l'apparition d'un halo de précipité blanchâtre (produits d'hydrolyse insolubles de lécithine) prouve que la souche possède la lecithinase.

Partie II : materiel et méthodes

I.4.3. Test d'Hémolyse

Une gélose à base de sang est coulée puisensemencée en stries par la souche à tester. Après 24 heures d'incubation à 30°C, les colonies sont entourées par une zone blanchâtre correspondant à la libération de l'hémoglobine par les hémolysines de types β .

Partie II : materiel et méthodes

II : Caractérisation physico-chimique de la surface des spores bactériennes.

Pour cette partie de notre travail, 14 souches de *Bacillus cereus* ont été sélectionnées représentant quatre biotypes différents et issus des différents sites de prélèvement. L'expérimentation s'est déroulée à l'Unité de Recherche : Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux (PIHM), Lille, France.

II.1. Préparation du stock de spores

Les suspensions sporales ont été préparées selon la technique de **Mazas *et al.* ,(1995)**.

Les souches ont d'abord été revivifiées sur bouillon nutritif pendant 24h à 30°C. Un ensemencement est ensuite effectué sur la gélose nutritive fortifiée [contenant du MgSO₄ (40 ppm w/v) et du CaCl₂ (100 ppm w/v) pour favoriser la sporulation]. Les boîtes sont incubées pendant au moins 5 jours jusqu'à ce qu'un tapis dense se forme.

La formation de spores est vérifiée par un examen microscopique après une coloration au vert malachite. Quand le taux de sporulation dépasse 90%, de l'eau distillée stérile est versée sur les boîtes. La couche de spores formée est raclée avec une pipette Pasteur sous forme de râteau et récupérée dans un bécher stérile. La suspension ainsi obtenue est transférée dans un tube à hémolyse pour subir une première centrifugation à 500 g pendant 5 minutes, le culot est jeté. Le surnageant subit une deuxième centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes. Le surnageant de cette centrifugation est jeté et remplacé par de l'EDS au même volume et une troisième centrifugation est effectuée à 3000 g pendant 20 minutes, son surnageant est également jeté, de l'EDS est ajoutée au culot au même volume.

Le protocole de cette manipulation est schématisé sur la figure 04

Partie II : matériel et méthodes

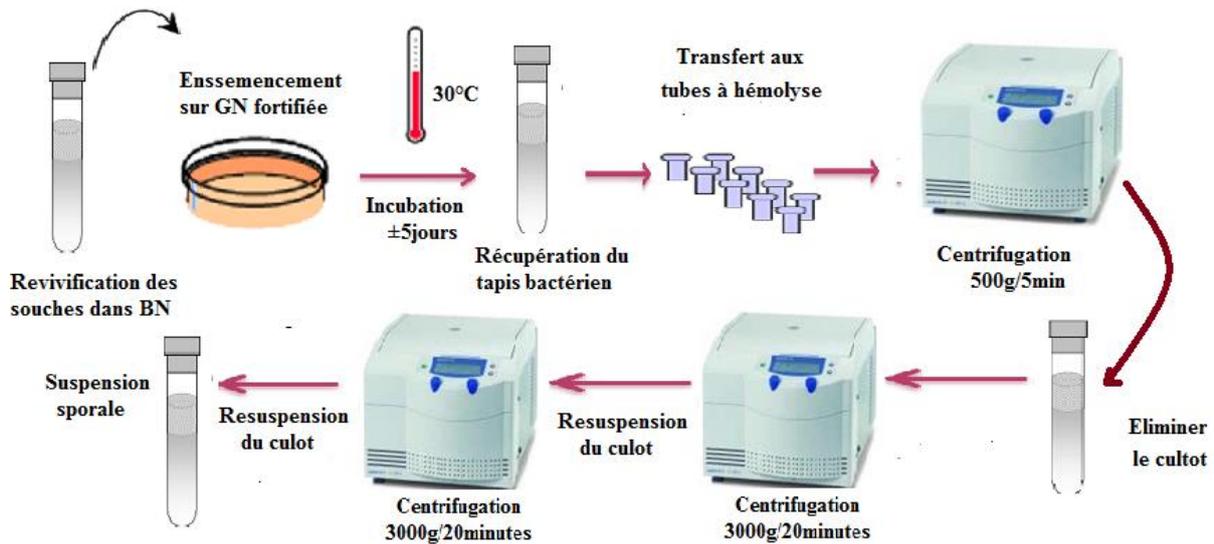


Figure 04: Schéma de protocole de la préparation du stock de spores

II. 2. Affinité des spores pour l'hexadécane

Plusieurs travaux rapportent que le caractère hydrophobe de la surface des cellules bactériennes a été déterminé par plusieurs méthodes. Des méthodes fondées sur la précipitation des cellules par les sels (Lindahl *et al.*, 1981), des méthodes utilisant la Chromatographie d'interaction hydrophobe (Smyth *et al.*, 1978 ; Doyle *et al.*, 1984) et des méthodes mettant en évidence l'adhérence à divers hydrocarbures liquides, y compris l'hexadécane (Rosenberg *et al.*, 1980 ; Doyle *et al.*, 1984 ; Craven et Blankenship, 1987 ; Kutima et Foegeding, 1987).

L'utilisation de la méthode MATH –pour Microbial adhesion to hydrocarbons- est une des méthodes les plus simples et les plus rapides. Cette méthode est basée sur l'affinité d'une spore pour l'hexadécane.

II. 2.1. Ajustement de densité de la suspension de spores

On prélève 2 à 5 ml d'un stock dense de spores (10^8 - 10^9 spores/ml). Le volume a été complété avec l'eau mQ stérile (± 45 ml) et centrifugé sous froid (à 4°C) à 1500 g pendant 15 min. Un deuxième lavage est effectué en reprenant le culot par ± 45 ml d'eau mQ stérile suivi d'une centrifugation dans les mêmes conditions. Les culots ont été remis en suspension dans ± 40 ml de sérum physiologique (à 8,5g NaCl /L de solution) à température ambiante. Grâce à un spectrophotomètre de paillasse (Biochrom Libra S11), la Densité Optique initiale des

Partie II : materiel et méthodes

suspensions (DO_i) à 600 nm est ajustée à une valeur proche de 0,600 par addition de sérum physiologique dans les tubes à hémolyse (*Bos et al., 1999*).

II. 2.2. Mesure de l'affinité des spores pour l'hexadécane

La mesure de l'affinité pour l'hexadécane a été réalisée par le mélange dans des tubes à hémolyse de 3 ml de suspension de spores avec 0,5 ml d'hexadécane. Une émulsion fine entre les deux phases est obtenue par agitation au Vortex pendant les durées requises : 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 120 et 150 secondes. Après un repos de 30 min à la température ambiante, la DO de la phase aqueuse est lue à 600 nm ($DO_{eq} = DO$ après chaque t secondes d'agitation). L'affinité des spores pour l'hexadécane est déduite de la pente à l'origine de la courbe suivante :

$$f(t) = (DO_{eq}(t)/DO_i) \times 100$$

avec $DO_i = DO$ initiale et $DO_{eq} = DO$ à l'équilibre.

Elle est mesurée à partir de la valeur obtenue après 5 s d'agitation.

L'énergie d'affinité pour l'hexadécane est donnée par l'équation suivante :

$$\Delta G == LN(K)$$

$$K = [6 \times (DO_i - DO_{eq}) / DO_{eq}]$$

et $6 = 3 \text{ ml de suspension} / 0,5 \text{ ml de solvant}$.

Le protocole de cette manipulation est schématisé sur la figure 05

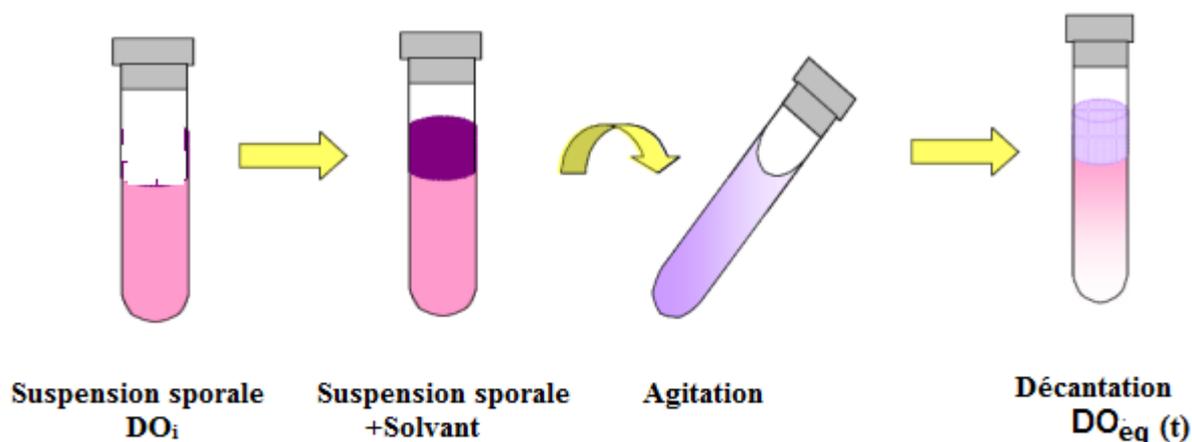


Figure 05 : Représentation schématique du test de MATH permettant la mesure d'affinité des spores bactériennes.

I1.3. Mesure de la charge d'une population de spores par zétamétrie

Les propriétés électriques des spores ont été évaluées par des mesures de leur mobilité électrophorétique dans une solution de KNO_3 1mM stérile sur une gamme de pH allant de 2,85 à 9. Le pH étant ajusté par ajout de KOH 1mM ou de HNO_3 1mM. Les mesures étaient réalisées sous un champ électrique de 50 Volts à l'aide d'un Zétamètre laser (CAD Instrumentation, France) et à un système d'analyse d'images (Figure 06).

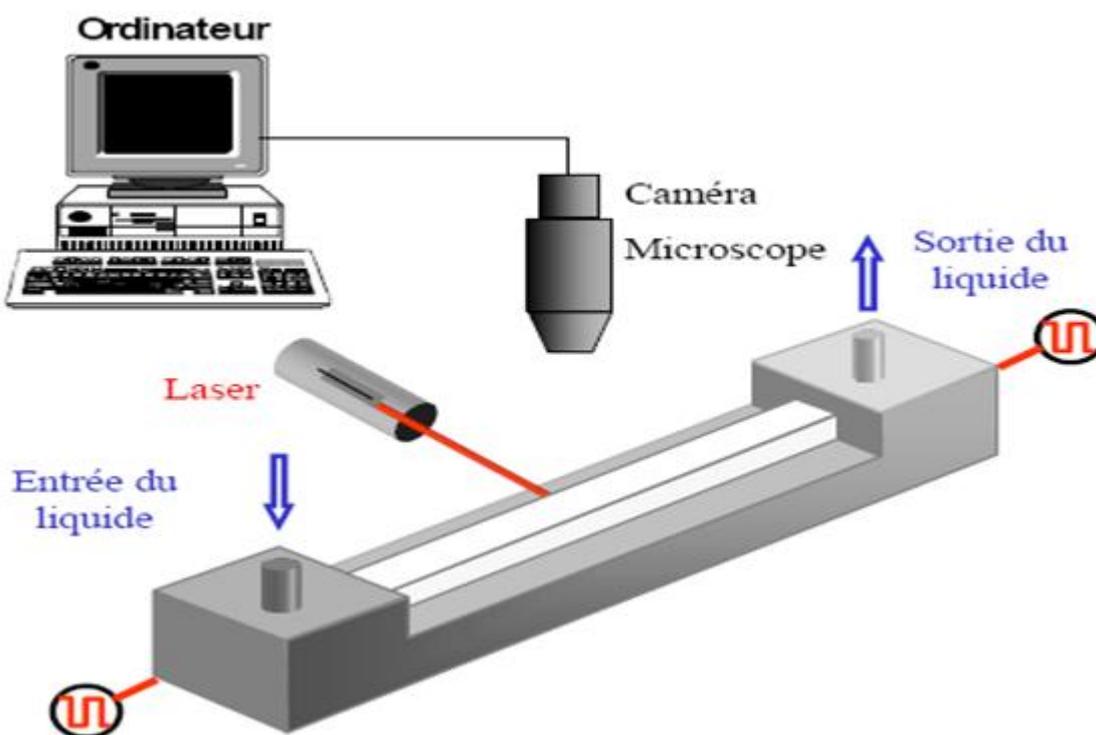


Figure 06 : Dispositif expérimental du zétamètre

Le sens du déplacement des micro-organismes permet de déterminer le signe de leur charge globale de surface.

La gamme étalon de pH 2,8, 3, 4, 5, 6. en partant de 500 ml de KNO_3 et ajouter progressivement du KOH pour augmenter le pH ou du HNO_3 pour diminuer le pH, et les stocker à 4°C . Le pH des solutions à pH 7, 8 et 9 n'est pas stable dans le temps, il faut les faire les jours même et vérifier le pH et l'ajuster avant de resuspendre les spores. Les solutions doivent être à température ambiante avant utilisation.

Partie II : materiel et méthodes

II.3.1. Préparation des suspensions de spores.

On prend 1 ml de suspension de spores concentrée (10^8 à 10^9 spores/ml) et on le met dans 20 ml d'eau mQ stérile dans un tube conique de 50 ml, pour être centrifugé à 2500 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et on remet en suspension les spores dans 1ml avec une pipette. La même pipette est utilisée pour désagréger le culot. Le culot est alors dilué dans 9 ml d'eau mQ stérile. On passe dans l'appareil à ultrasons 2,5 min puis on laisse reposer 30 s et on repasse dans l'appareil à ultrasons 2,5 min (47 kHz, 70 W).

La suspension est utilisée immédiatement ou mise à 4°C pour quelques heures.

II.3.2. Mesure de la mobilité des spores

II.3.2.1. Détermination de la concentration optimale de spores.

On met 0.2 ml de la suspension de spores dans 49 ml de la solution à pH 9 afin de faire un test avec le Zétamètre pour obtenir entre 40 et 50 spores par mesure. On ajoute de la suspension de spores en fonction des mesures précédentes (0.8 ml maximum en plus des 0.2 ml initiaux). Il faut vérifier qu'il y a entre 40 et 50 spores par mesure. Ce volume de spores sera utilisé pour chaque solution de pH.

II.3.2.2. Mesure de la mobilité des spores à chaque pH

Le volume déterminé ci-dessus est mis dans 49 ml de la solution au pH à tester et on passe dans l'appareil à ultrasons 2,5 min, on laisse reposer pendant 5 min sur la paillasse. On remplit alors la cellule du zétamètre avec la suspension de spores à l'aide de la seringue (on aspire délicatement 10 ml pour éviter la formation des bulles d'air. On vérifie bien qu'il n'y a plus de bulles dans la cellule) (Boonaert et Rouxhet, 2000).

II.4. Encrassement des coupons d'Inox

II.4.1. Nettoyage et désinfection des lames d'acier inoxydable

Les coupons d'acier de 1,5 cm*4,5 cm sont soumis à un protocole de nettoyage. Ils sont d'abord mélangés à un détergent alcalin fort de la gamme RBS (Chemical Products R. Borghraef s. a. Belgique) et frottés un à un et à température ambiante entre les deux mains munies de gants abrasifs (de type Mappa[®]) puis rincés rapidement en frottant sous l'eau dure. Ils sont alors suspendus à une tige métallique et séparés les uns des autres par des rondelles en Téflon (figure 07). La tige elle-même est suspendue aux bords d'un bécher de 400 mL. Le bécher est alors rempli de détergent RBS à 5% à 60°C pendant 10 min. Le premier rinçage se fait sous eau dure courante par débordement pendant 5 min, suivi d'un deuxième rinçage sous

Partie II : materiel et méthodes

eau osmosée courante par débordement pendant 5 min également. La veille de l'essai, on place les coupons sur tiges dans un bécher propre et sec. On recouvre de papier d'aluminium. Les coupons sont stérilisés au four Pasteur pendant 1 h à 180°C (2 h à partir de la T° ambiante). A partir de ce moment, Les coupons sont manipulés à l'aide de pinces stériles pour les essais d'adhésion (Faille *et al.*, 2001).

Le protocole de cette expérience est schématisé sur la figure 07

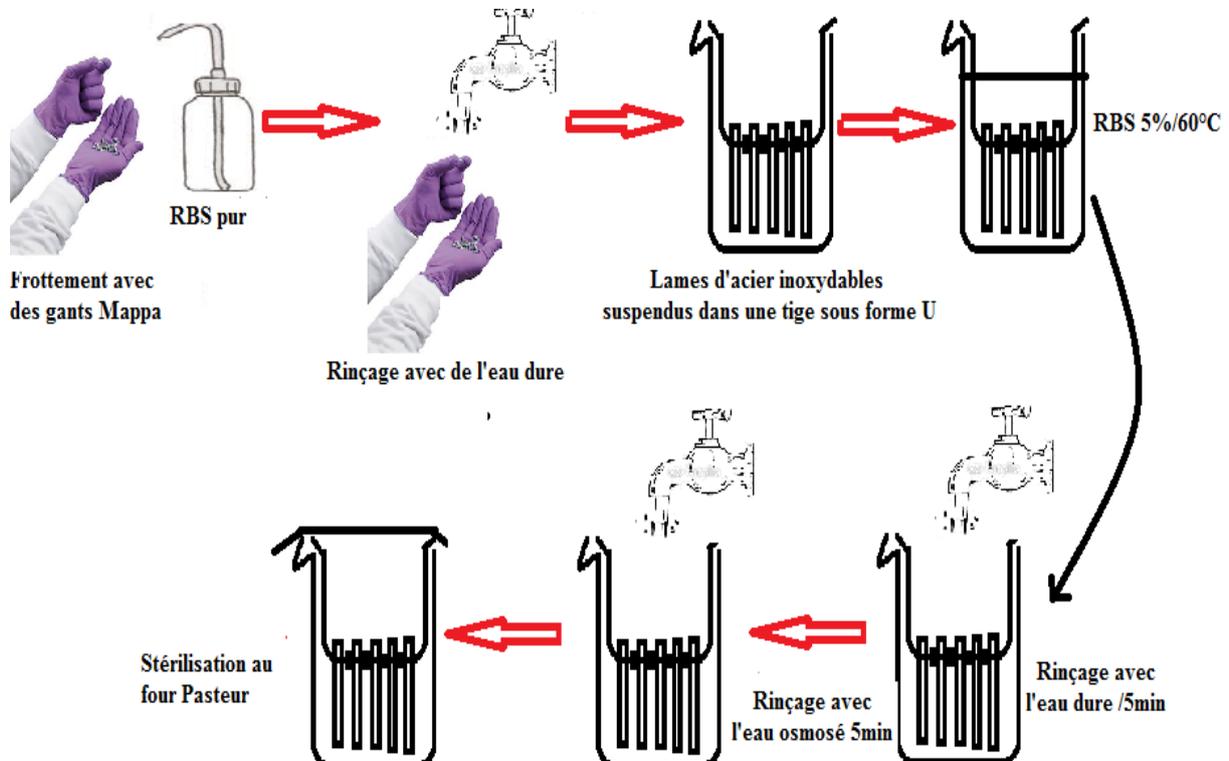


Figure 07 : Schéma du protocole de nettoyage des coupons d'acier inox

II.4.2.Préparation de la suspension sporale

Un mL de suspension sporale de *Bacillus cereus* conservée à 4°C dans de l'eau mQ stérile ($\sim 10^8$ - 10^9 spores/mL), a été dilué dans 9 ml d'eau mQ stérile, puis soniqué 2 min 30 pour dissocier les agrégats. Ce volume est ensuite dilué dans 390 mL (dilution finale 1/400) dans un Erlen de 1 L, agité énergiquement pour homogénéiser la suspension, puis versé dans un bécher (rempli à ras bord) pour la contamination des coupons (Faille *et al.*, 2001).

Partie II : matériel et méthodes

II.4.3. Encrassement des coupons d'acier

Les coupons d'acier (suspendus sur une barre d'acier en forme de U) sont totalement immergés dans la suspension aqueuse de spores ($\sim 2,5 \cdot 10^5 - 2,5 \cdot 10^6$ spores/mL) pendant 4 heures à température ambiante pour une adhésion simple (Faille *et al.*, 2001).

Le protocole de cette expérience est schématisé sur la figure 08

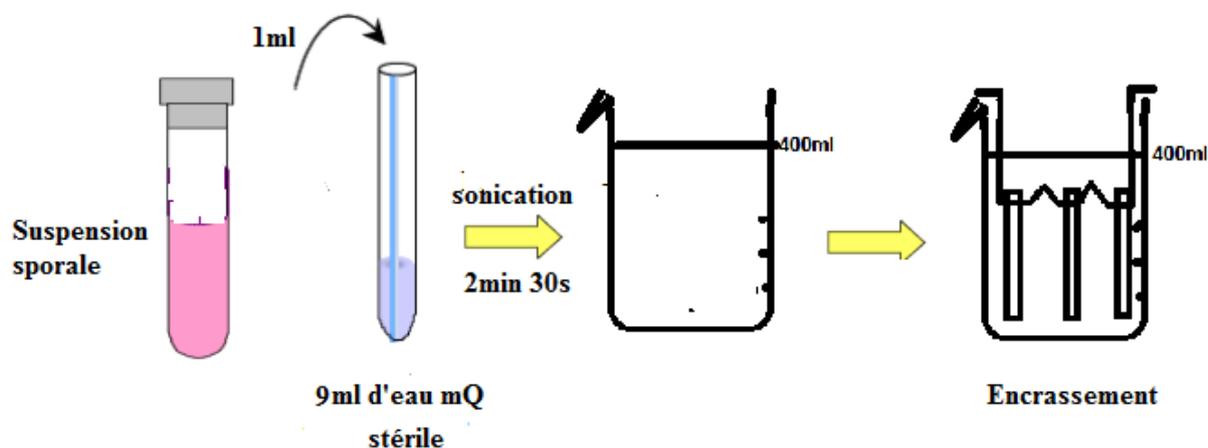


Figure 08: Schéma du protocole d'encrassement des coupons d'acier

II.4.4. Dénombrement de la suspension sporale avant et après adhésion aux coupons

Afin de dénombrer les spores pendant la phase d'adhésion, des dilutions décimales successives (généralement jusqu'à 10^{-3}) ont été effectuées dans de l'eau peptonée exempte d'indole à 0,1%. 200 μ l de chaque dilution sont répartis stérilement et à l'aide de billes de verre dans chaque boîte de Pétri. Celles-ci sont incubées pendant 48 heures à 30°C. On tient compte des boîtes ayant donné entre 30 et 300 colonies. Les résultats sont exprimés en UFC par mL de suspension encrassante (Faille *et al.*, 2001). Le protocole de cette expérience est schématisé par la figure 09

Partie II : matériel et méthodes

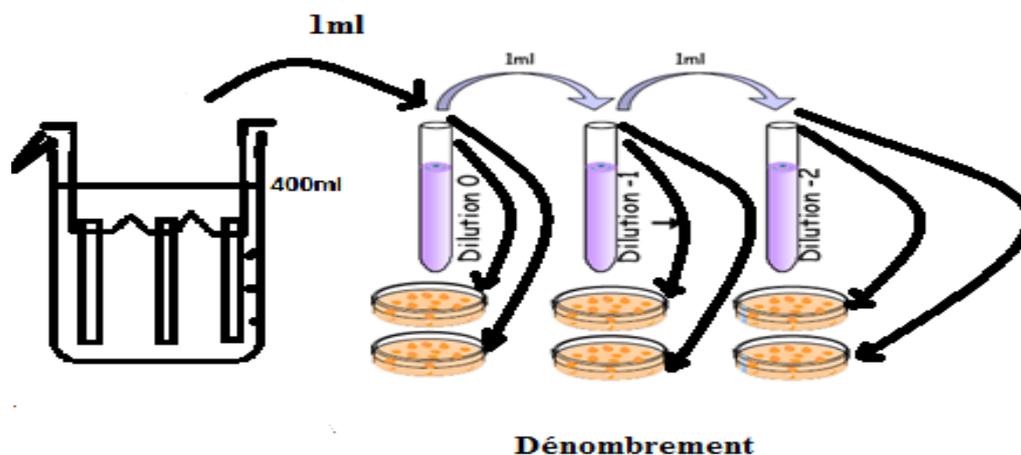


Figure 09 : Schéma de protocole du dénombrement de la suspension encrassante

Après l'étape d'encrassement, les coupons ont été rincés rapidement dans un Becher d'eau osmosée pour éliminer l'excédent de la suspension bactérienne, et égouttés sur papier absorbant de type Kim Wipes®. Chaque coupon est alors mis dans un tube contenant 10 ml d'eau peptonée exempte d'indole à 0,1% P/V + Tween 80 à 2% V/V. Les tubes sont ensuite placés dans le bain à ultrasons pendant 2,5 min, puis agités pendant 30 s au Vortex à la vitesse maximale. La même opération est réalisée deux fois. Pour éviter toute redéposition des spores décrochées, les coupons ont été retirés immédiatement. Les spores détachées des lames sont dénombrées en double (suspension pure, 10^{-1} , 10^{-2} etc.) (Faille *et al.*, 2001). La procédure est la même pour le dénombrement de la suspension d'encrassement (figure 09).

La concentration de la suspension (N_{susp} en spores/mL) est calculée à partir du nombre de colonies n dénombrées à partir de la dilution au 10^{-X}

$$N_{susp} = n * 5 * 10^X$$

La quantité de spores décrochées du coupon après la phase d'adhésion (N_{adh}) est calculée à partir du nombre de colonies n dénombrées à partir de la dilution au 10^{-X}

$$N_{adh} = n * 50 * 10^X$$

Le protocole de cette manipulation est schématisé sur la figure 10

Partie II : materiel et méthodes

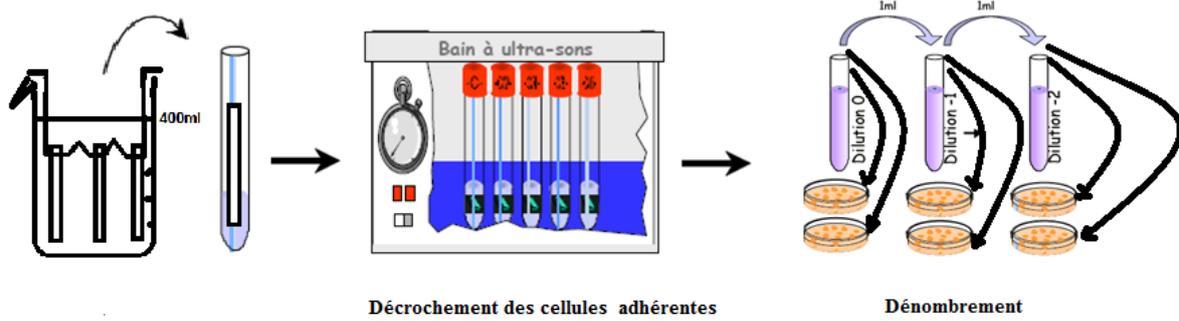


Figure 10: Schéma de protocole du dénombrement des spores adhérentes

II.5. Examen des spores au microscope électronique à transmission (MET)

Les spores entières ont été adsorbées sur des grilles Formvar revêtues (EMS, 22400) et examinées après coloration négative avec de l'acétate d'uranyle à 2% p/v (SME, G100H-Cu) sur un microscope électronique Hitachi H7500 à une tension accélérée de 80 kV. Plusieurs images au MET ont été prises.

Partie II : materiel et méthodes

III. Application des produits de nettoyage et de désinfection sur les spores de *B. cereus* adhérentes aux coupons d'Inox

Cinq agents détergents et désinfectants ont été utilisés pour cette partie de notre travail. Ils nous ont été fournis par la société HCI Algérie Il s'agit de NaOH, HNO₃, OBA DETART AC, OBAGEN CL et OBA STERIL BC (voire annexe 03).

OBA DETART AC est un détergent détartrant liquide peu moussant à base d'acide phosphorique, destiné à un grand nombre d'applications dans les industries agroalimentaires.

OBA GEN CL est un détergent liquide chloré (pH à 1% = 12,2) pour circuits et matériels dans les industries alimentaires.

OBA STERIL BC est un désinfectant à base de biguanide conçu pour une utilisation couplée avec la phase acide dans un système de nettoyage en place (C.I.P). Il est utilisable à faible dose pour la désinfection de tout matériel, circuit et surface en industrie laitière, fromagère et beurrière.

Les dilutions sont préparées selon les instructions du fabricant

Cinq protocoles différents ont été testés sur deux souches de *Bacillus cereus* : la souche BC 89 moyennement hydrophile et la souche BC110 moyennement hydrophobe.

1) Protocole 1. Sans étape de désinfection

- [1] Pré-rinçage : eau à température ambiante
- [2] **Application de NaOH à 2% 10min à 70°C**
- [3] Rinçage intermédiaire : eau à température ambiante
- [4] **Application HNO₃ à 1%, 10min à 70°C**
- [5] Rinçage final : eau à température ambiante

2) Protocole 2. sans étape de désinfection

- [1]Pré-rinçage : eau à température ambiante
- [2]**Application de NaOH à 2% 10min à 70°C**
- [3]Rinçage intermédiaire : eau à température ambiante
- [4]**Application OBA DETART AC : 0,8, 2 et 5% / 5, 10 et 15 min / 60, 70 et 80°C.**
- [5]Rinçage final : eau à température ambiante

3) Protocole 3. sans désinfection

- [1] Pré-rinçage : eau à température ambiante

Partie II : materiel et méthodes

[2] **Application de OBA GEN CL à 0,5 ; 1,0 et 1,5% / 5 ; 10 et 15min / 30, 40 et 50°C.**

[3] Rinçage intermédiaire : eau à température ambiante

[4] **Application HNO₃ à 1%, 10min à 70°C**

[5] Rinçage final : eau à température ambiante

4) **Protocole 4. Avec désinfection**

[1] Pré-rinçage : eau à température ambiante

[2] **NaOH à 2% /10min / 70°C.**

[3] Rinçage intermédiaire 1 : eau à température ambiante

[4] **Application OBA DETART AC à 5% / 15min / 70°C**

[5] Rinçage intermédiaire 2 : eau à température ambiante

[6] **Désinfection avec OBA STERIL BC à 0,3%, 0,4% et 0,5% / 5, 10 et 15min / 60°C et 70°C).**

[7] Rinçage final : eau à température ambiante

5) **Protocole 5. Avec désinfection**

[1]Pré-rinçage : eau à température ambiante

[2]**Application d'OBA GEN CL 0,1%, 15min, 50°C**

[3]Rinçage intermédiaire 1 : eau à température ambiante

[4]**Application HNO₃ à 0,5% / 70°C / 10min**

[5]Rinçage intermédiaire 2 : eau à température ambiante

[6]**OBA STERIL BC à 0,3%, 0,4% et 0,5% / 5, 10 et 15min / 60 et 70°C.**

[7]Rinçage final : eau à température ambiante

III.1 Préparation et dénombrement des suspensions sporales.

Avant leur traitement, les suspensions sporales ont été préparées selon le protocole décrit dans le chapitre II.4.2 de la partie matériel et méthodes. Les coupons ont été encrassés par les spores selon le protocole décrit dans le chapitre II.4.3 de la partie matériel et méthodes.

La suspension et des spores adhérentes aux coupons ont été dénombrées selon le protocole décrit dans le chapitre II.4.4 de la partie matériel et méthodes.

Partie II : materiel et méthodes

III.2. Traitement des coupons encrassés

Le traitement des coupons encrassés de spores adhérentes avec les détergents et désinfectants selon les 5 protocoles décrits ci-dessus est effectué de manière à ce que tous les coupons soient entièrement couverts par la solution préparée de détergent ou désinfectant. A la fin du protocole, les lames sont retirées puis plongées dans de l'eau de robinet à une température ambiante.

III.3. Dénombrement des spores adhérentes après nettoyage et désinfection

Après le traitement selon les protocoles décrits ci-dessus, les coupons ont été rincés rapidement dans un Becher d'eau, et égouttés sur du papier absorbant de type Kim Wipes® puis chaque coupon est mis dans un tube contenant 10 ml d'eau peptonée à 0,1% + Tween 80 (à 2% v/v). et les spores sont dénombrées selon la méthode décrite dans le chapitre **II.4.4** de la partie matériel et méthodes.

Partie III
Résultats et
discussion

Partie III : résultats et discussion

I. Caractérisation des souches isolées

155 isolats ont été obtenus à partir de 160 prélèvements réalisés au niveau de la laiterie GIPLAIT de Tlemcen. La répartition des isolats en fonction des sites de prélèvements est donnée par le tableau 03.

Tableau 03: Répartition des isolats obtenus de différents sites de prélèvements au niveau de la laiterie Mansourah de Tlemcen

Sites de prélèvement	Nombre de prélèvements	Morphotypes observés	Nombre d'isolats
Cuves de collecte de lait cru	16	MP1	4
		MP2	1
		MP3	0
		MP4	0
Tanks de stockage du lait de vache avant et après pasteurisation	32	MP1	6
		MP2	7
		MP3	5
		MP4	0
Tanks de stockage du lait recombinaé avant et après pasteurisation	32	MP1	10
		MP2	5
		MP3	8
		MP4	6
Canalisations du lait de vache et lait recombinaé pré-pasteurisation et post-pasteurisation	64	MP1	25
		MP2	34
		MP3	26
		MP4	15
Conditionneuse	16	MP1	2
		MP2	0
		MP3	1
Total	160		155

La recherche des bactéries sporulées est facilitée par un traitement thermique des échantillons qui favorise la sélection des spores. Pour la détection et le dénombrement des spores et formes végétatives de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires, le milieu généralement utilisé est le milieu gélosé de Mossel dont le principe de fonctionnement est fondé sur les trois éléments suivants (Afnor, 2005):

- L'absence de fermentation du mannitol par *Bacillus cereus*.
- La présence d'une lecithinase chez la majorité des souches de *Bacillus cereus*.
- La présence de polymixine B à 10 mg/L, permet une sélectivité satisfaisante.

Lors de l'isolement, nous avons essayé de respecter le ratio isolat/morphotype. En effet le nombre de colonies sélectionnées dépendait du nombre total des colonies du type

Partie III : résultats et discussion

morphologique en question présentes dans la boîte de Pétri. Dans tous les cas nous avons prélevé au maximum 5 colonies par boîte de Pétri.

I. 1. Aspect macroscopique (Morphotypes) des isolats

L'aspect macroscopique des 155 isolats s'est décliné en quatre morphotypes différents

✓ Le Morphotype 1:

Sur le milieu Mossel à 30°C et après 24H d'incubation, la colonie apparaît de grande taille (5-7 mm de diamètre) plate, sèche et avec un centre plus opaque que la bordure. Cette dernière étant régulière. Enfin la colonie est de couleur rose.

Sur le milieu nutritif gélosé à 30°C et après 24H d'incubation, la colonie apparaît de grande taille (6-8 mm de diamètre) plate, sèche et avec un centre plus opaque que la bordure. Cette dernière étant régulière. Enfin la colonie est de couleur beige-citron-soie. (cf figure 11)

✓ Morphotype 2 :

Sur le milieu Mossel à 30°C et après 24H d'incubation, la colonie apparaît de taille moyenne (1-5 mm) plate, sèche et avec un centre plus opaque que la bordure. Cette dernière étant régulière. Enfin la colonie est de couleur rose-brumeux.

Sur le milieu nutritif gélosé à 30°C et après 24H d'incubation: la colonie est opaque de 7 à 12 mm de diamètre, plate, sèche avec une bordure régulière. Elle est de couleur beige, (cf figure 12)

✓ Morphotype 3 :

Sur le milieu Mossel à 30°C et après 24H d'incubation, la colonie apparaît de petite taille (1-2 mm) bombée, visqueuse et avec une bordure régulière. Enfin la colonie est de couleur rose passion.

Sur le milieu nutritif gélosé à 30°C et après 24H d'incubation. Les colonies apparaissent bombées, visqueuses, brillantes avec un centre opaque et une bordure translucide et régulière, de couleur jaune-blanc-Navarro. Enfin ces colonies présentent un grand diamètre qui peut aller jusqu'à 9 mm. (cf figure 13)

Partie III : résultats et discussion

Morphotype 4 :

Sur le milieu Mossel à 30°C et après 24H d'incubation, la colonie apparait de taille moyenne (1-5 mm) plate, sèche et avec un centre visqueux et bombé. La bordure étant sèche, plate et irrégulière. Enfin la colonie est de couleur rose.

Sur le milieu nutritif gélosé à 30°C et après 24H d'incubation. Les colonies sont également sèches et plates mais totalement opaques et avec une bordure irrégulière. Elles sont blanchâtres et de grand diamètre qui varie entre 6-10 mm, avec parfois un caractère envahissant. (cf figure 14)

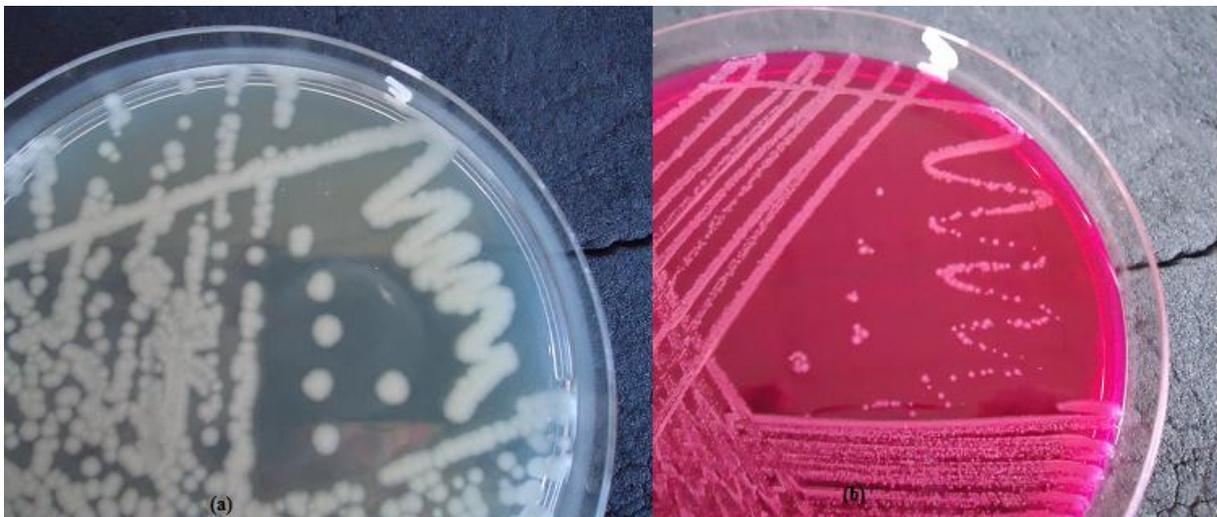


Figure 11 : Colonies de morphotype 1. Aspect sur BP après 24h d'incubation à 30°C (a) sur milieu nutritif gélosé, (b) sur milieu gélosé de Mossel.

Partie III : résultats et discussion



**Figure 12 : Colonies de morphotype 2. Aspect sur BP après 24h d'incubation à 30°C
(a) sur milieu nutritif gélosé, (b) sur milieu gélosé de Mossel.**



**Figure 13 : Colonies de morphotype 3. Aspect sur BP après 24h d'incubation à 30°C
(a) sur milieu nutritif gélosé, (b) sur milieu gélosé de Mossel.**

Partie III : résultats et discussion



Figure 14 : Colonies de morphotype 4. Aspect sur BP après 24h d'incubation à 30°C

(a) sur milieu nutritif gélosé, (b) sur milieu gélosé de Mossel.

Aspect microscopique

La détermination de la morphologie, l'arrangement cellulaire, la mobilité et la coloration de Gram ont été réalisés sur des souches de 24 heures cultivées à 30°C sur le milieu de Mossel.

La formation des spores a été observée sur des cultures âgées de 5 à 7 jours.

L'examen des isolats à l'état frais a révélé des cellules en forme de petits bâtonnets réguliers et mobiles.

La coloration de Gram des cultures jeune a révélé que : bacille à Gram positif aux extrémités arrondies en chaînette tandis que la coloration au vert de malachite réalisée sur une culture âgée a montré la formation de spore non déformante (cf figure 15, 16, 17, 18, 19, 20).

Partie III : résultats et discussion

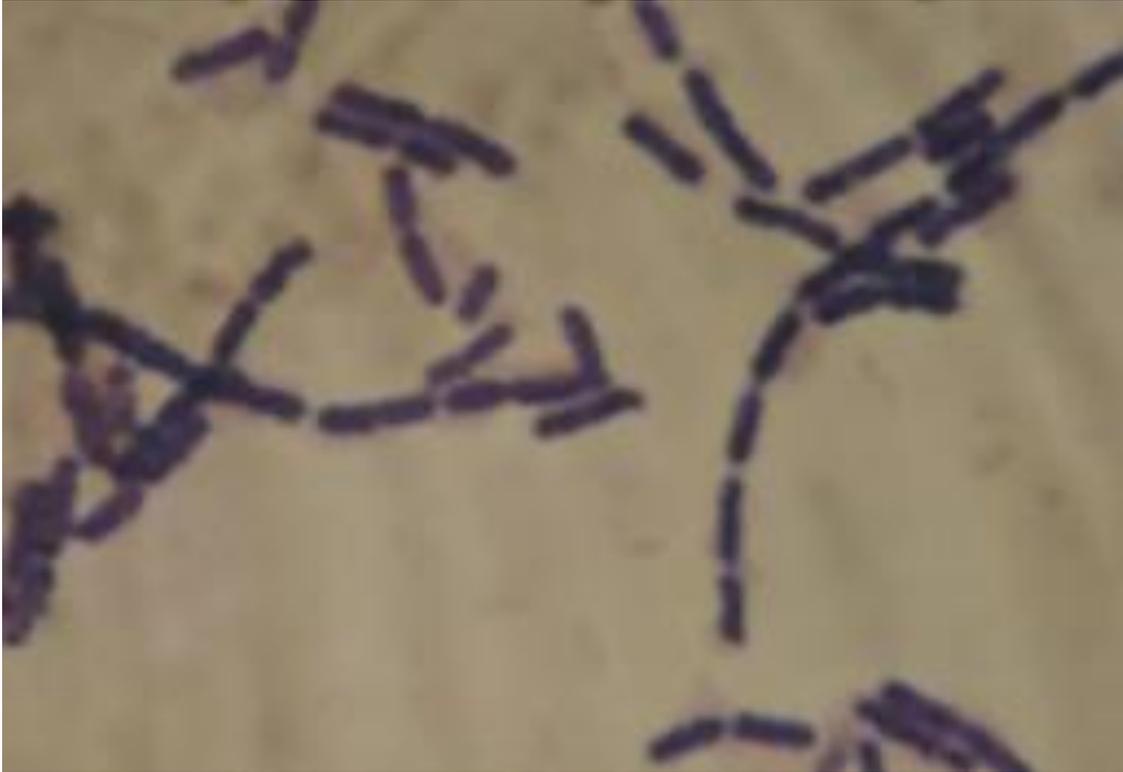


Figure 15 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). culture jeune révélant la couleur violette des Gram positifs (morphotype 1)

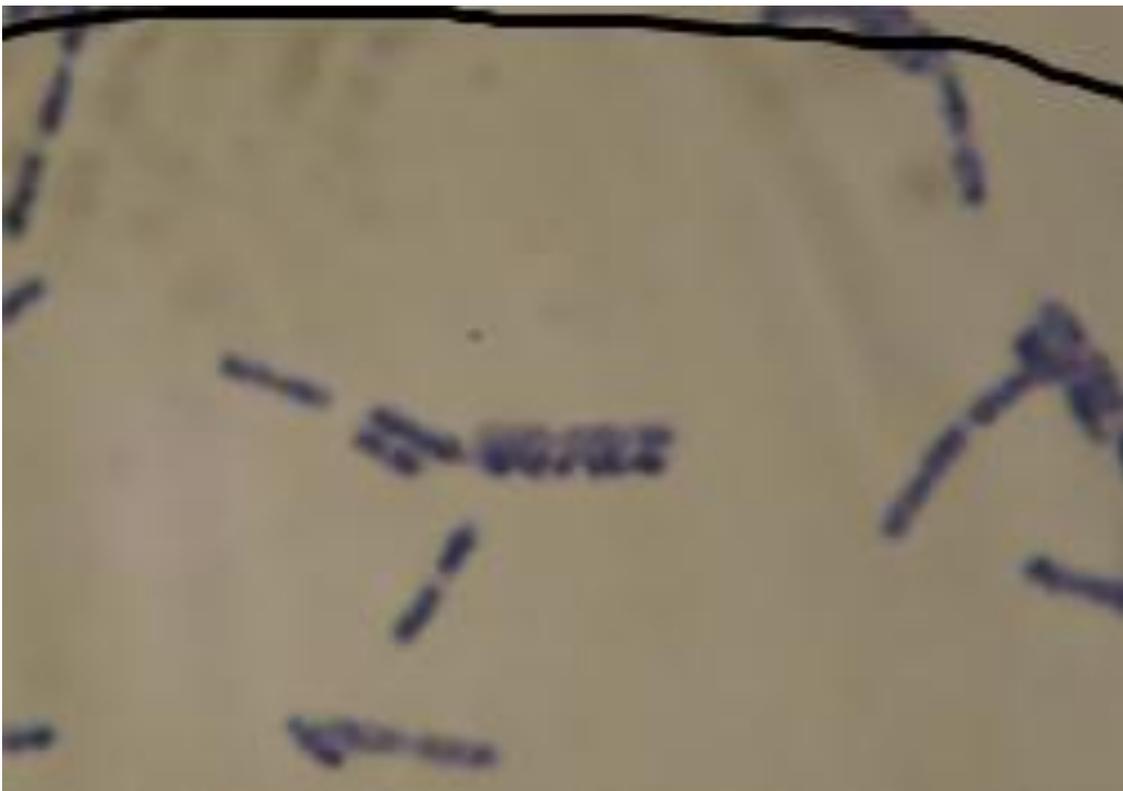


Figure 16 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). culture jeune révélant la couleur violette des Gram positifs (morphotype 2)

Partie III : résultats et discussion

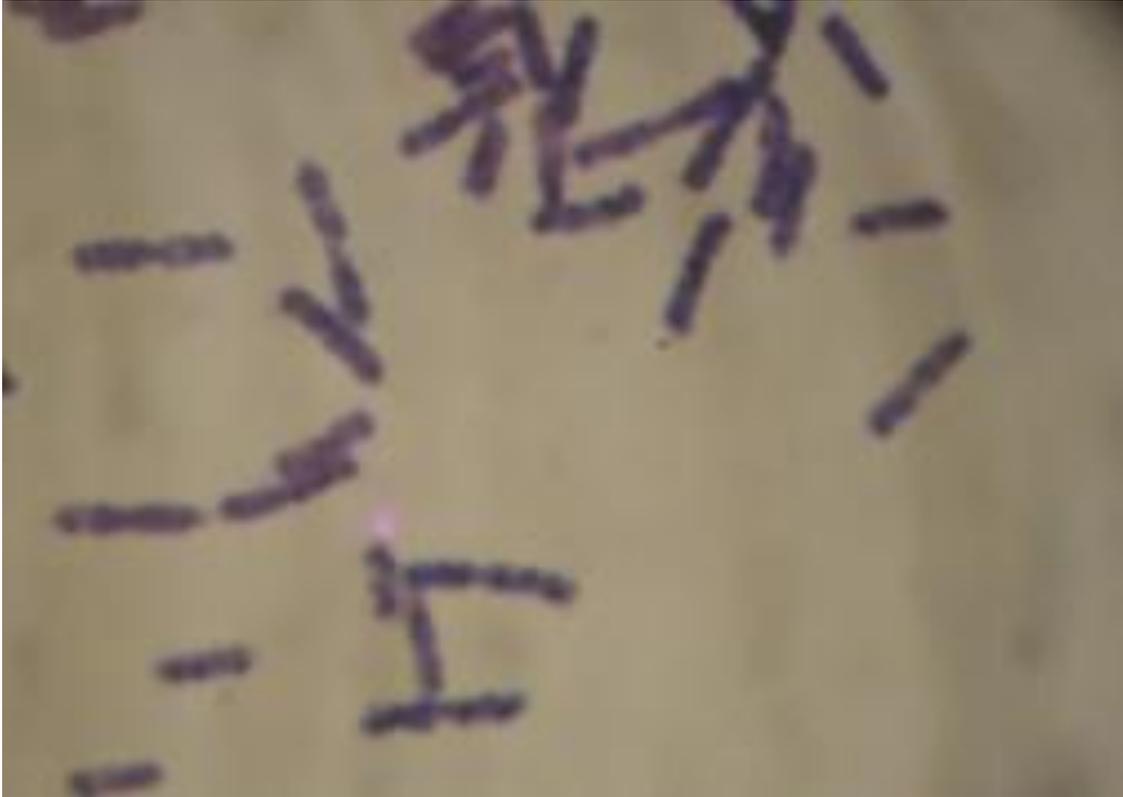


Figure 17 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). culture jeune révélant la couleur violette des Gram positifs (morphotype 3)

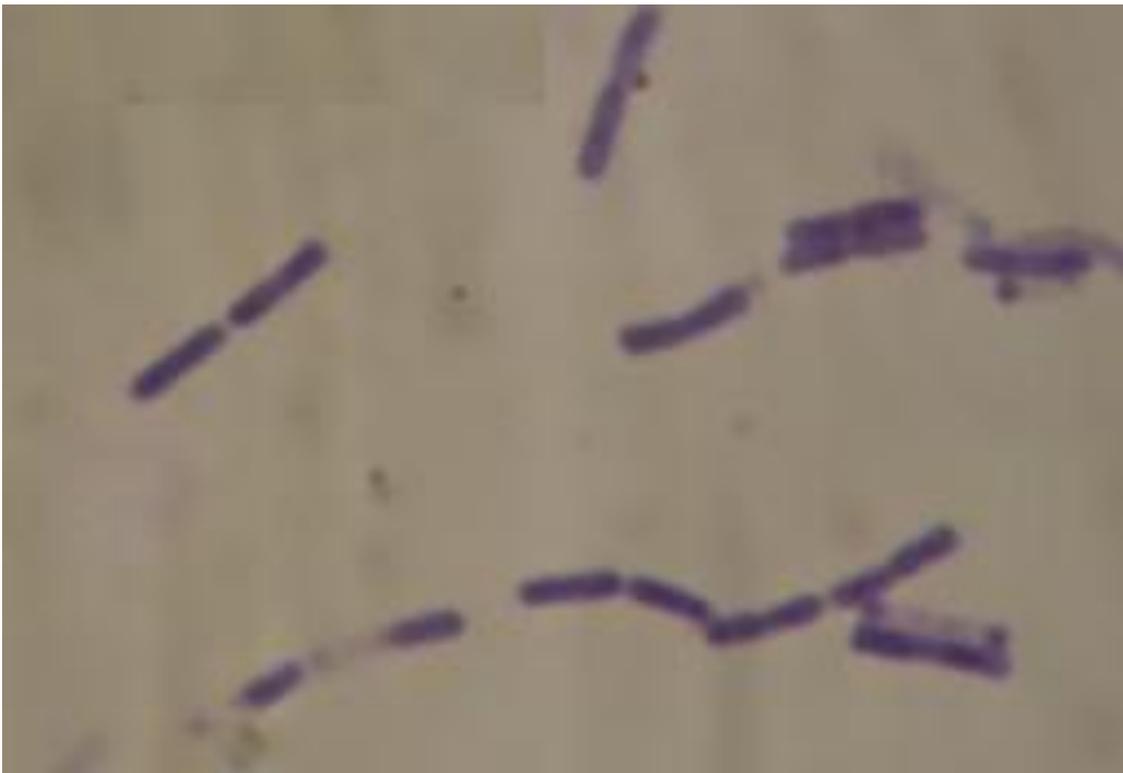


Figure 18 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). culture jeune révélant la couleur violette des Gram positifs (morphotype 4).

Partie III : résultats et discussion

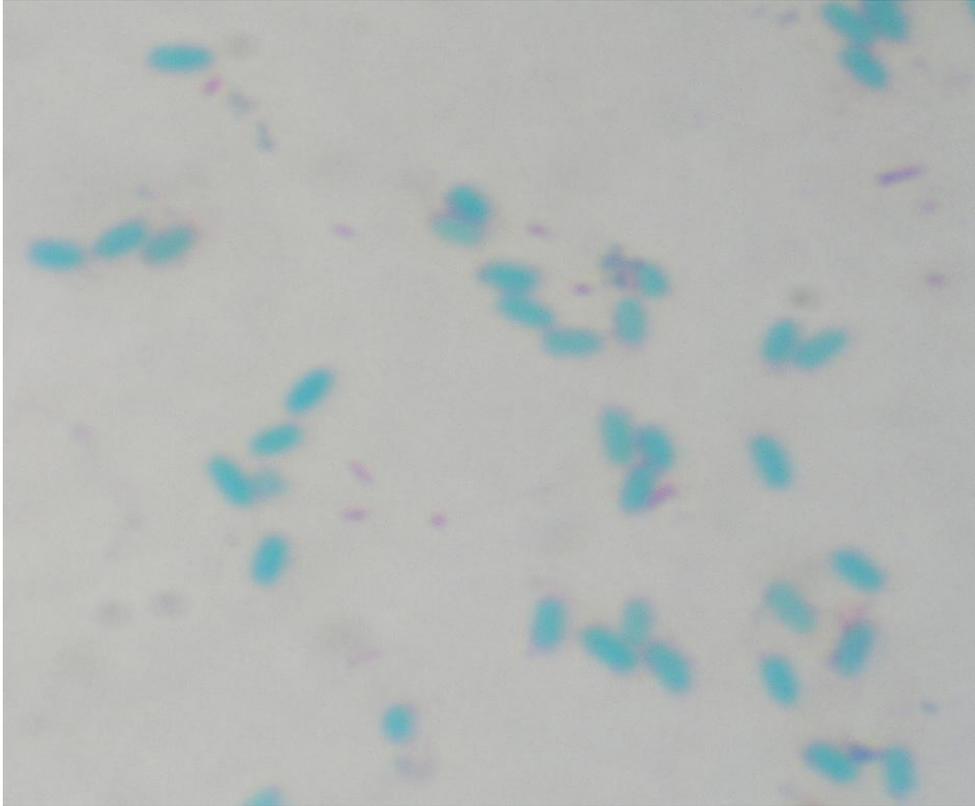


Figure 19 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). Culture âgée révélant la couleur verte des spores (morphotype).

Partie III : résultats et discussion

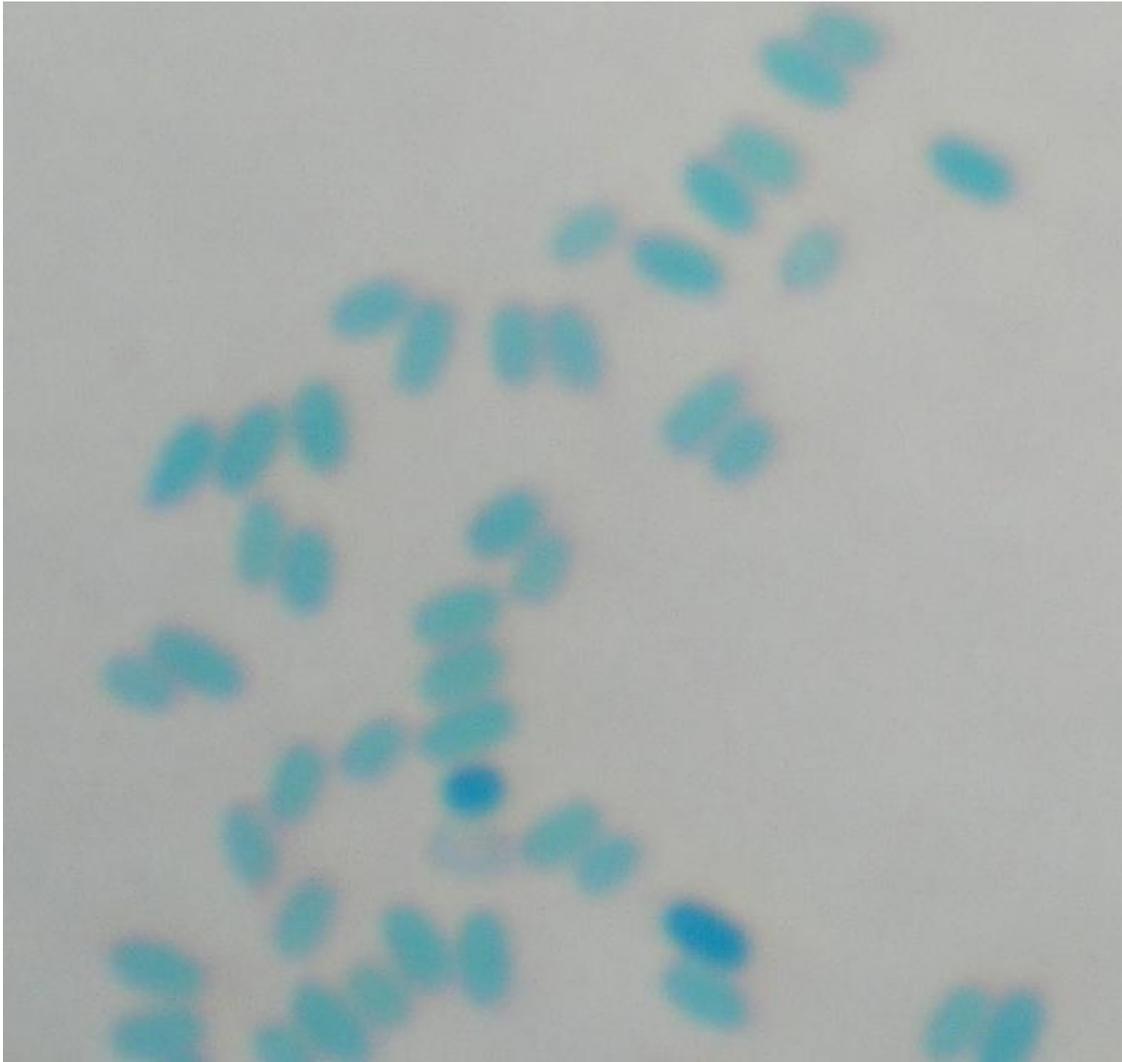


Figure 20 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100). culture agée révélant la couleur verte des spores (morphotype 4)

Partie III : résultats et discussion

Identification biochimique

La mise en évidence des enzymes respiratoires et les activités hydrolytiques extracellulaires a révélé que celles-ci sont présentes chez les souches testées. Ces activités sont variables et reflètent les potentialités propres à chaque souche (voire annexe 4).



Figure 21 : Résultats de la mise en évidence de catalase



Figure 22 : Résultats de la mise en évidence d'oxydase

Partie III : résultats et discussion



Figure 23: Résultats de la mise en évidence de la réduction de nitrate en nitrite par les souches isolées a : témoin ; b : résultat positif



Figure 24: Résultats de la mise en évidence de type respiratoire (a) témoin ;(b) : résultat.

Partie III : résultats et discussion

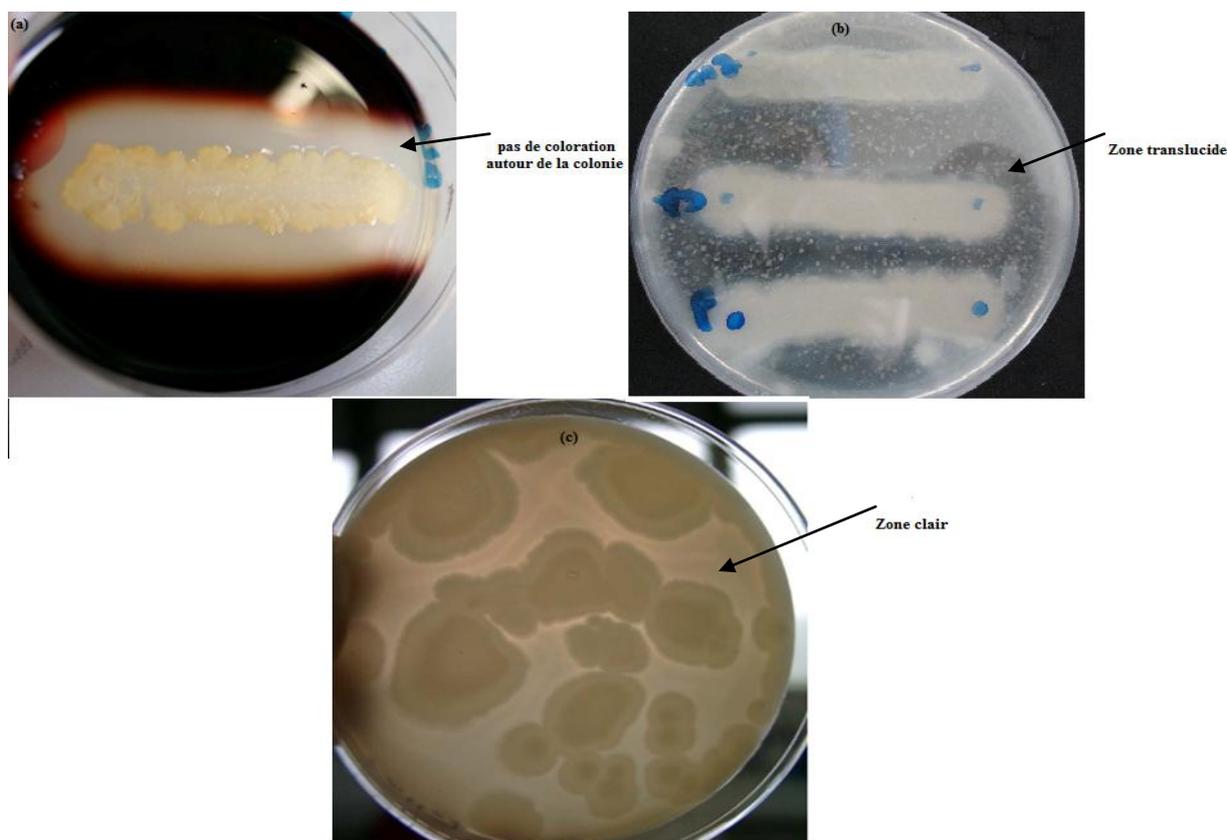


Figure 25: Résultats de la mise en évidence activités hydrolytiques extracellulaires. (a) l'activité amylolytique, (b) l'activité caséinolytique, (c) l'activité lecithinolytique.

Identification des isolats par les galeries API 20^E

Après l'identification selon la norme AFNOR, L'identification par la galerie API 20E des 126 isolats suspectés *Bacillus cereus* a permis de caractériser 4 profils numériques différents : 0006000 (n=31), 0006001 (n=58), 2006001 (n=21), 2006021 (n=16).

La caractérisation biochimique des isolats de *B. cereus* avec les galeries Api 20 E, a montré que les quatre profils numériques trouvés ont les caractères communs suivants : ne possèdent pas a β -galactosidase, ni la Lysine décarboxylase, ni l'Ornithine décarboxylase, ni l'urease ni la Tryptophane désaminase. *B. cereus* n'utilisent pas le citrate comme source de Carbone, ne produisent ni le H₂S ni l'indole, ni l'actyl methyl carbinol. et n'assimilent pas le mannitol, l'inositol, le sorbitol, le rhamnose, le melibiose, et l'arabinose.

Le profil 0006000 est caractérisé par la non utilisation de l'amygladine.

Les souches du profil 0006001 sont caractérisées par l'utilisation uniquement du glucose comme source de carbone.

Les souches du profil 2006021 sont caractérisées par la non utilisation du saccharase.

Partie III : résultats et discussion



Figure 26 :Résultats d'identifications des isolats par la galerie API20E.

B. cereus est normalement fortement bêta-hémolytique.

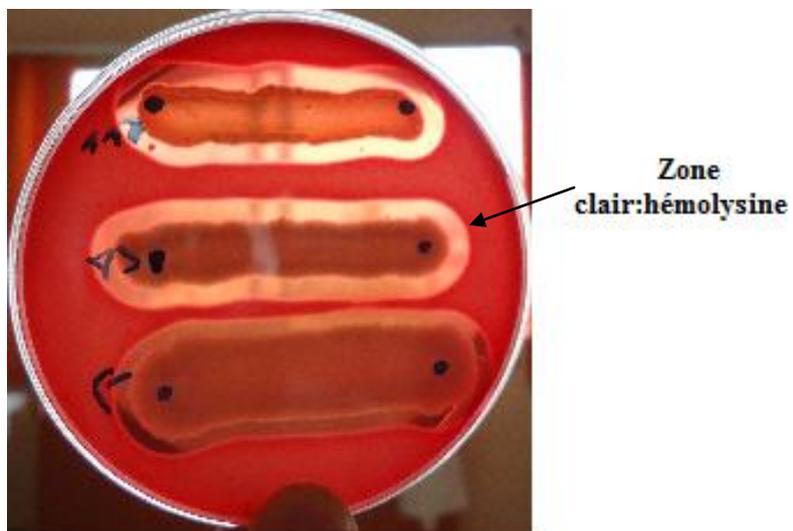


Figure 27: Test d'hémolysine des isolats de *Bacillus cereus* sur gélose au sang

Partie III : résultats et discussion

Tableau 04 : Résultats d'identification des isolats présumés comme *Bacillus cereus* isolés à partir de différents sites de prélèvements au niveau de la laiterie Mansourah de Tlemcen

Sites de prélèvement	Nombre de prélèvements	Morphotypes observés	Nombre d'isolats	Nombre d'isolats identifiés comme <i>Bacillus cereus</i>
Cuves de collecte de lait cru	16	MP1	4	3
		MP2	1	0
		MP3	0	0
		MP4	0	0
Tanks de stockage du lait de vache avant et après pasteurisation	32	MP1	6	5
		MP2	7	4
		MP3	5	4
		MP4	0	0
Tanks de stockage du lait recombinaé avant et après pasteurisation	32	MP1	10	7
		MP2	5	3
		MP3	8	5
		MP4	6	4
Canalisations du lait de vache et lait recombinaé pré-pasteurisation et post-pasteurisation	64	MP1	25	24
		MP2	34	31
		MP3	26	22
		MP4	15	12
Conditionneuse	16	MP1	2	1
		MP2	0	0
		MP3	1	1
		MP4	0	0
Total	160		155	126

Parmi les 155 isolats, 126 se sont révélés des souches appartenant au groupe *Bacillus cereus* (voir annexe 02 pour les résultats détaillés).

Le groupe *B. cereus* comprend six espèces génétiquement très proches. Ces espèces, regroupées sous le nom de *Bacillus cereus sensu lato* sont : *B. cereus sensu stricto* : un pathogène opportuniste pour les humains et les animaux ; *Bacillus anthracis* : responsable de l'anthrax également chez les humains et les animaux ; *Bacillus thuringiensis* : un pathogène des insectes ; *Bacillus weihenstephanensis* qui est un psychrotolérant ; *Bacillus mycoïdes* et *Bacillus pseudomycoïdes*, des espèces non pathogènes et qui se distinguent des autres membres du groupe par l'aspect particulier de leurs colonies rhizoïdes sur milieu nutritif solide. La distinction entre ces deux dernières espèces est basée sur la composition en acide gras de leur membrane cellulaire.

Partie III : résultats et discussion

Malgré leur proximité génétique, les relations phylogénétiques et taxonomiques précises des membres du groupe *B. cereus*, restent encore controversées (**McIntyre et al., 2008**).

La classification des bactéries de ce groupe était initialement basée sur des caractères phénotypiques tels que la formation d'inclusions cristallines parasporales composées de protéines insecticides chez *B. thuringiensis* et la présence de capsule chez *B. anthracis*. Cependant, malgré ces différences phénotypiques, la comparaison des séquences nucléotidiques de leurs ARN ribosomaux 16S a montré moins de 1 % de divergence (**Ash et al., 1991**).

Les différences entre *B. cereus s.s.*, *B. anthracis*, et *B. thuringiensis* concernent essentiellement leurs facteurs de virulence, codés par des gènes portés par des plasmides. En outre, certains de ces plasmides peuvent être échangés entre les membres du groupe *B. cereus* (**Thomas et al., 2000 ; Van Der Auwera et al., 2007**). Si une souche de *B. thuringiensis* perd ses plasmides, elle devient indiscernable de *B. cereus sensu stricto*. Cependant, Il est à noter que la pathogénicité de *B. anthracis* et l'utilisation de *B. thuringiensis* comme agent de lutte biologique en agriculture ont pris le dessus sur les considérations taxonomiques (**Lambert, 2010**).

Plusieurs méthodes d'analyses décrites dans la littérature visent à distinguer les membres du groupe *B. cereus sensu lato* : MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis) (**Carlson et al., 1994; Helgason et al., 1998; Helgason et al., 2000**), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (**Keim et al., 1997; Ticknor et al., 2001 ; Hill et al., 2004**), rep-PCR (**Kim et al., 2001; Cherif et al., 2003; Reyes-Ramirez et Ibarra, 2005**) et MLST (MultiLocus Sequence Typing) (**Helgason et al., 2004; Sorokin et al., 2006**). Cependant, aucune de ces méthodes ne permet de séparer clairement ces espèces.

Les espèces du groupe *B. cereus sensu lato* sont par conséquent toujours considérées comme séparées. **Guinebertière et al (2008)** ont proposé une division du groupe *B. cereus sensu lato* en sept grand groupes phylogéniques (I à VII) basés sur des critères génétiques et phénotypiques principalement la température de croissance.

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. Aussi, des capacités de virulence peuvent être associées à chaque groupe.

Partie III : résultats et discussion

Tableau 05 : Les sept groupes de *B. cereus* (Guinebretière *et al.*, 2008)

Groupes espèces	Espèces	Association à des toxi-infections alimentaires	Température (°C) de croissance	Résistance des spores ^a	Observations ^b
I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	Non	10-40	Nd	Mésophile ; colonies rhizoïdes sur agar
II	<i>B. cereus</i> II, <i>B. thuringiensis</i> II	Oui	7-40	++	La plupart des souches sont psychrotolérantes. Le variant psychrotolérant du gène <i>cspA</i> est absent
III	Souches émétiques <i>B. cereus</i> III, <i>B. thuringiensis</i> III <i>B. anthracis</i>	Oui	15-45	+++	Mésophile
IV	<i>B. cereus</i> IV, <i>B. thuringiensis</i> IV	Oui	10-45	++	Mésophile
V	<i>B. cereus</i> V, <i>B. thuringiensis</i> V	Oui	8-40	++	Mésophile
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycoïdes</i> <i>B. thuringiensis</i> VI	Non	5-37	+	Toutes les souches sont psychrotolérantes. Le variant psychrotolérant du gène <i>cspA</i> est présent
VII	<i>B. cytotoxicus</i>	Oui	20-50	+++	Thermotolérant; très peu de souches de ce groupe ont été trouvées, mais très souvent associées à des toxi-infections alimentaires

nd, non déterminé

^a Classement établi par Afchain *et al.* (2008); Carlin *et al.* (2006, 2009).

^b *CspA* : Major Cold Shock Protein A

Selon cette classification, les bactéries du groupe VII qui se développent à des températures atteignant 50°C constituent, selon **Guinebretière *et al.* (2013)** une nouvelle espèce appelée *B. cytotoxicus*.

B. cereus est omniprésent dans la nature, il se propage facilement par le biais des systèmes de production alimentaire, et la contamination par cette espèce est presque inévitable. En effet, *B. cereus* a été isolée à partir de riz, de produits céréaliers, de laits et produits laitiers, de viandes, d'épices et d'oeufs (**Kramer et Gilbert, 1989 ; Ziane *et al.*, 2014**).

En relation avec les résultats de notre travail, nous pouvons dire que *Bacillus cereus* représente également une partie significative de la contamination de l'environnement laitier. Cet état a déjà été signalé par **Hornstra *et al.* (2007)** et **Ankolekar et Labbé(2010)**.

Déjà à la ferme, l'encrassement des mamelles des vaches représente une source importante de contamination du lait par *B. cereus* (**Van Heddeghem et Vlaemynck, 1992**). Le transport et le stockage supplémentaire du lait cru au niveau des laiteries peut entraîner une contamination supplémentaire par des spores de *B. cereus* déjà présentes dans les tanks et lactoducs. Une autre source possible de contamination dans l'industrie laitière, à travers les

Partie III : résultats et discussion

conditionneuses à partir desquelles les spores de *B. cereus* ont été isolées (**Van Heddeghem et Vlaemynck, 1992; Waak et al., 2002 ; Dogan et Boor, 2003**) et enfin à partir de poudre de lait (**Reyes et al., 2007**).

Dans une usine laitière, **Sharma et Anand (2002)**, ont trouvé que *B. cereus* représentait plus de 12% de la microflore constitutive des biofilms. Les spores de *B. cereus* sont résistantes à un grand nombre de stress et de contraintes. Elles sont parfois hydrophobes, ce qui facilite leur adhésion aux surfaces des équipements de transformation des aliments (**Lindsay et al., 2006**).

Dans les industries laitières, les spores de *B. cereus*, présentes dans le lait cru avant traitement peuvent rester sur certaines parties des équipements, ce qui favorise leur germination et leur développement sous forme de biofilms et ainsi contaminer le produit fini.

Les travaux de **Scott et al., (2007)** situent l'origine de la contamination du lait en poudre par des bactéries sporulées au niveau des échangeurs de préchauffage du lait et de l'évaporateur.

Il a été montré que des enzymes extracellulaires de *Bacillus cereus* peuvent avoir des activités d'altération des aliments. Parmi ces dernières il existe des protéases, et des lipases comme les lecithinase. Ces enzymes vont respectivement hydrolyser les protéines et les lipides (**Burgess et al., 2010**).

Comme dit précédemment, les spores de *B. cereus* sont capables de résister à de fortes températures et donc aux principaux traitements thermiques appliqués en industrie agroalimentaire. Il a été montré que dans le cas du lait UHT (ultra haute température), les spores présentes sont alors activées par le choc thermique. Les spores vont ainsi germer et peuvent alors produire des enzymes extracellulaires. Ces enzymes sont produites lors de la fin de la croissance exponentielle ainsi que pendant le début de la phase stationnaire (**Chen et al., 2003**). **Chen et al (2004)** ont d'ailleurs montré que la production de ces enzymes extracellulaires est associée à la sporulation. Ces dernières donnent au lait une saveur anormale et des défauts de structure (**De Jonghe et al., 2010**).

Dans le lait, les protéinases vont provoquer un clivage des caséines provoquant une désorganisation des micelles de caséine (**Chen et al., 2003**) avec comme conséquence un défaut nommé le caillage doux du lait, le « sweet curdling » (**De Jonghe et al., 2010**). L'activité des protéinases est maximale lorsque le pH est alcalin (**Chen et al., 2004**).

Les enzymes lipolytiques produites par *B. cereus* agissent sur les lipides, notamment les acides gras du lait. Leur action d'hydrolyse est plus efficace sur des acides gras à courte

Partie III : résultats et discussion

chaîne (**Chen et al., 2004**). Cette action est d'autant plus importante que ce sont ces mêmes acides gras à courtes chaînes qui contribuent le plus à la saveur du lait. Ainsi, cette dégradation donne une saveur rance et fruitée au lait, tout comme les lecithinases peuvent donner au lait un aspect de crème caillée en raison de l'agrégation des globules gras (**De Jonghe et al., 2010**). Il a été montré que l'activité des lipases est maximale lorsque le pH est de 7 à 9.

Enfin il est à noter que les lipases produites par une souche de *B. cereus* sont plus stables que les protéases produites par cette même souche (**Chen et al., 2004**).

Les biofilms qui peuvent se développer sur les joints d'étanchéité constituent également une source de contamination des produits laitiers par *B. cereus* (**Austin et Bergeron, 1995**).

Schlegelová et al (2010) ont étudié la présence de *Bacillus cereus*, et d'autres espèces bactériennes dans des matières premières et produits alimentaires, et sur des surfaces de contact alimentaire après nettoyage au cours de la période 2005 - 2006 dans trois fermes laitières (120 échantillons), des laiteries (124 échantillons), et deux usines de transformation de la viande (160 échantillons). 1 409 isolats ont été identifiés. Parmi les souches de *B. cereus* isolées des surfaces internes d'équipement et des produits traités thermiquement, 76% étaient productrices d'entérotoxine diarrhéique.

Par ailleurs, **Jan et al (2011)** ont mené une étude pour identifier, par des méthodes génotypiques et phénotypiques, une collection de bactéries psychrotrophes appartenant au groupe *Bacillus cereus* isolées dans une ferme et dans 6 usines de fabrication d'ovo produits sur une période couvrant une saison chaude et une saison froide. Tous les isolats étaient en mesure d'adhérer à l'acier inoxydable et plus de 80% se sont révélés fortement adhérents et pourraient conduire à la formation de biofilms sur les équipements industriels.

Magnusson et al (2007) ont étudié la contamination du lait cru avec des spores de *Bacillus cereus* dans une étable avec des bovins laitiers en stabulation entravée. La présence de spores dans des échantillons d'air, d'aliments, de matières fécales et d'eau de rinçage de l'équipement de traite a été comparée avec le niveau de spores dans le lait de citerne dans deux fermes. Le nombre de spores présents dans l'alimentation, les matières fécales, et de l'air est trop faible pour être d'une importance pour la contamination du lait. Le nombre de spores était élevé dans l'eau de rinçage de l'équipement de traite (jusqu'à 322 spores/L). La comparaison génétique des isolats de *B. cereus* dans les différentes sources ont indiqué que la

Partie III : résultats et discussion

litière utilisée était la principale source de contamination. Une expérience d'alimentation séparée au cours de laquelle les vaches ont été nourries expérimentalement par des aliments contaminés par des spores de *Bacillus cereus* a montré que les aliments contaminés pouvaient être une source importante de contamination du lait par les spores de *B. cereus*.

La contamination bactérienne du lait cru peut provenir de différentes sources : l'air, le matériel de traite, l'alimentation, le sol, les matières fécales et l'herbe (**Huck et al., 2007a ; Huck et al., 2007b ; Huck et al., 2008 ; Ranieri et Boor, 2010 ; Ranieri et Boor, 2009**).

Valérie et al (2008) supposent que les modes d'alimentation et de logement des vaches influent sur la flore aérobie sporulée du lait. La majorité des sporulés aérobies dans le lait appartenait au genre *Bacillus* (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*) et de souches types d'espèces appartenant au groupe *Bacillus cereus*. Environ 7% des isolats seraient de nouveaux taxons sporulés.

Fromm et Boor (2006) ont analysé des échantillons de lait de 3 usines laitières. Les micro-organismes prédominants identifiés ont été des bacilles Gram-positif, y compris *Paenibacillus*, *Bacillus*, et *Microbacterium*.

Les produits laitiers en poudre (par exemple, le lactosérum doux, poudre de lait écrémé, lactosérum acide, et de poudre de concentré protéines de lactosérum) sont d'un intérêt économique à l'industrie laitière. Selon le US Dairy Export Council, les clients ont exigé des tolérances strictes (< 500 à < 1 000 /g) pour les spores thermophiles et mésophiles dans les produits laitiers en poudre. Des échantillons de matières premières, produits semi finis, et de produits finis ont été collectés à partir de 4 installations de traitement des produits laitiers en poudre dans le nord des États-Unis sur une période d'un an. Deux traitements distincts de spores : (1) 80 °C pendant 12 min (pour détecter les bactéries sporulées) et (2) à 100 °C pendant 30 min (pour détecter les bactéries sporulées hautement thermorésistantes) ont été appliqués aux échantillons avant les analyses microbiologiques. Des échantillons de matières premières, produits semi finis, et de produits finis ont été analysés pour les sporulés thermophiles, mésophiles, et psychrotolerant, 77,5, 71,0 et 4,6 % des échantillons étant positifs pour ces organismes respectivement. Ils ont également analysé des échantillons de produits finis et produit semi-finis pour les spores thermophiles et mésophiles hautement thermorésistantes avec 63,7 et 42,6 % des échantillons positifs, respectivement.

Partie III : résultats et discussion

La prévalence et le nombre des formes sporulées variaient considérablement selon le produit et l'usine : le lactosérum doux et le lait écrémé en poudre ont montré une prévalence plus élevée de bactéries sporulées thermophiles et mésophiles par rapport au lactosérum acide et concentré protéique de lactosérum. Contrairement aux études précédentes, ces auteurs ont trouvé une relation peu évidente entre l'augmentation du nombre de spores et l'avancement dans le processus de traitement. les sporulés thermophiles sont l'organisme principal de préoccupation dans les poudres de lait (**Watterson *et al.*, 2014**).

Partie III : résultats et discussion

II. Caractérisation physico-chimique de la surface des spores bactériennes

Les propriétés physico-chimiques de surface de 14 spores de *B. cereus* et la capacité d'adhésion de 4 isolats sur une surface en acier inoxydable ont été évaluées.

Les résultats de l'hydrophobicité et du potentiel zêta des spores sont donnés dans le tableau 06.

Tableau 06 : Résultats expérimentaux d'hydrophobicité et zêta potentiel des spores *Bacillus cereus*.

Souches	Affinité (en s ⁻¹)	Zeta potentiel (en mV)
<i>B.cereus</i> 14	2,34±0,58	-26,630±1,99
<i>B.cereus</i> 44	2,16±0,70	-19,360±3,96
<i>B.cereus</i> 82	2,72±0,59	-20,910±3,74
<i>B.cereus</i> 89	2,85±1,02	-27,065±4,49
<i>B.cereus</i> 100	2,10±0,38	-37,055±1,067
<i>B.cereus</i> 107	1,79±0,95	-32,300±1,51
<i>B.cereus</i> 109	0,107±0,20	-20,806±0,42
<i>B.cereus</i> 110	5,32±1,07	-28,085±10,38
<i>B.cereus</i> 120	1,34±1,28	-31,225±3,32
<i>B.cereus</i> 123	4,34±0,83	-26,590±4,46
<i>B.cereus</i> 18	3,53±0,08	-26,990±2,47
<i>B.cereus</i> 80	1,17±0,67	-19,315±0,091
<i>B.cereus</i> 103	2,05±0,1	-12,285±1,18
<i>B.cereus</i> 126	0,250±1,58	-44,510±7,28

Le caractère hydrophobe/hydrophile des spores a été estimé par la méthode MATH (Microbial Adhésion to Hydrocarbons). L'affinité des spores de *Bacillus cereus* pour l'hexadécane pendant les durées allant de 5s à 150s est présentée dans la figure 28.

Partie III : résultats et discussion

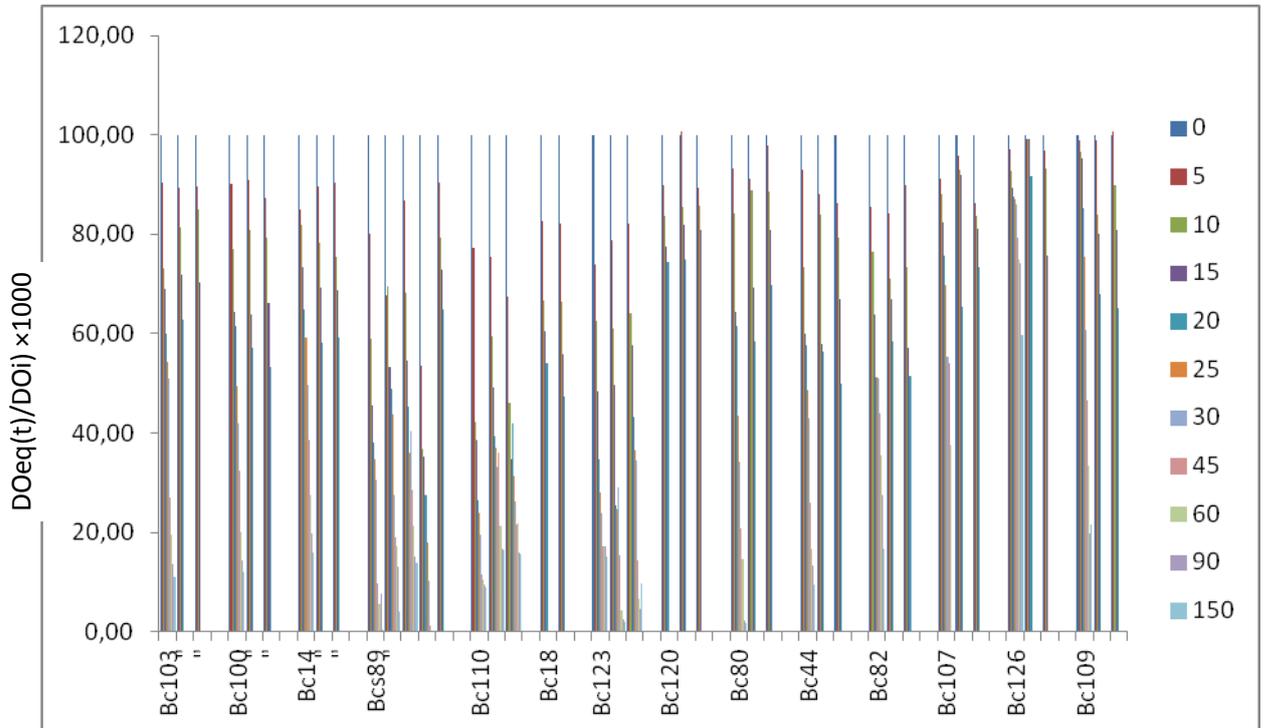


Figure 28 : Affinité pour l'hexadécane des spores de *B.cereus* suspendues en sérum

L'affinité des spores de *Bacillus cereus* pour l'hexadécane est donnée dans la figure 29.

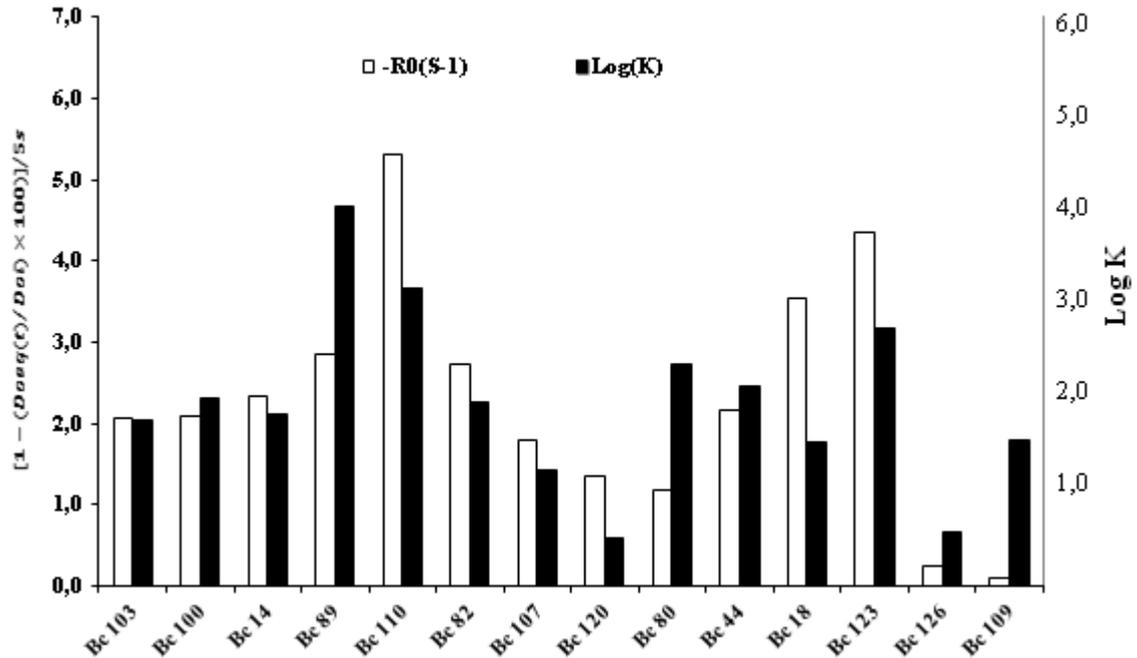


Figure 29: Affinité pour l'hexadécane des spores de *B.cereus* suspendues en sérum (MATH).

Partie III : résultats et discussion

A partir des valeurs obtenues, les isolats peuvent être classés en trois groupes.

Groupe 1: spores très hydrophiles comprenant 2 isolats soit 14,29% des isolats avec un taux d'affinité initial de $-0,107 \text{ s}^{-1}$ pour la souche *B. cereus* 109 et $-0,25 \text{ s}^{-1}$ pour la souche *B. cereus* 126

Groupe 2: spores moyennement hydrophiles comprend 9 spores soit 64,29% du total des isolats. Le taux d'affinité initial varie de $-2,05 \text{ s}^{-1}$ pour *B. cereus* 103 à $-2,85 \text{ s}^{-1}$ pour *B. cereus* 89.

Groupe 3: spores moyennement hydrophobe comprend trois spores soit 21,43% du total, comme indiqué par le taux d'affinité initial allant de $-3,53 \text{ s}^{-1}$ (*B. cereus* 18) à $-5,32 \text{ s}^{-1}$ (*B. cereus* 110).

La mobilité électrophorétique (M.E.) sur une gamme de pH allant de 2,85 à 9 pour chacune des 14 souches étudiées se présente dans les figures N°30,31, 32 et 33.

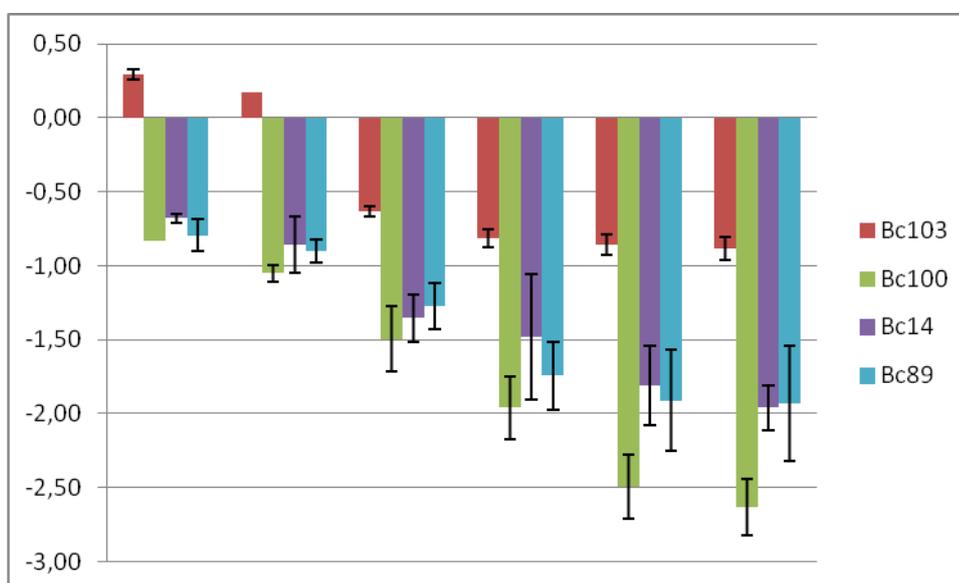


Figure 30 : potentiel zéta de 4 souches de *Bacillus cereus*

Partie III : résultats et discussion

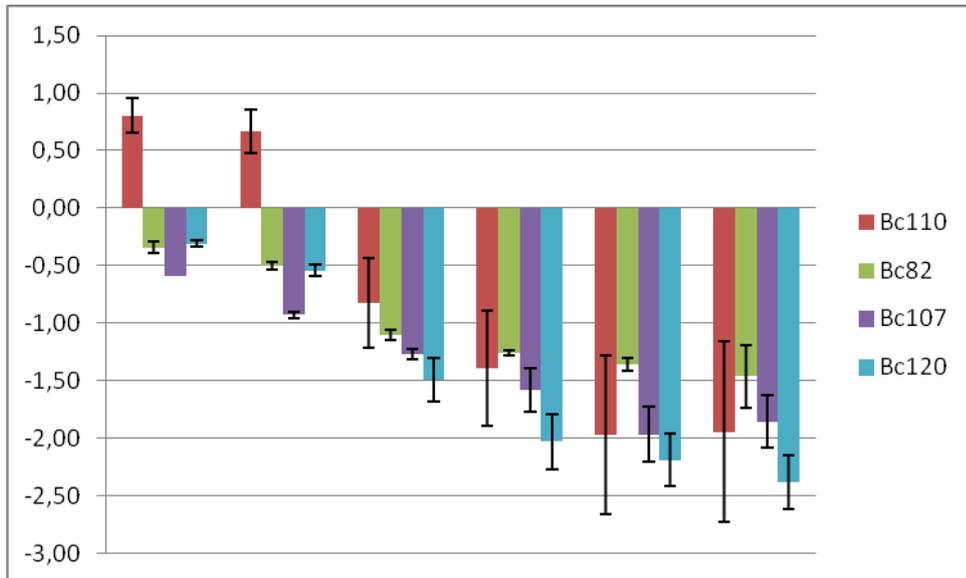


Figure 31 : potentiel zéta de 4 souches de *Bacillus cereus*

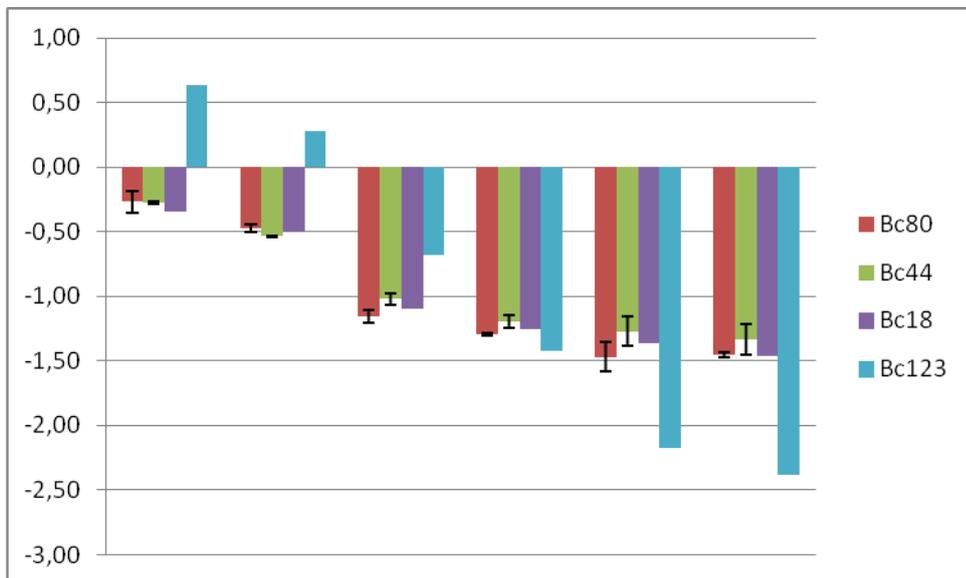


Figure 32 : potentiel zéta de 4 souches de *Bacillus cereus*

Partie III : résultats et discussion

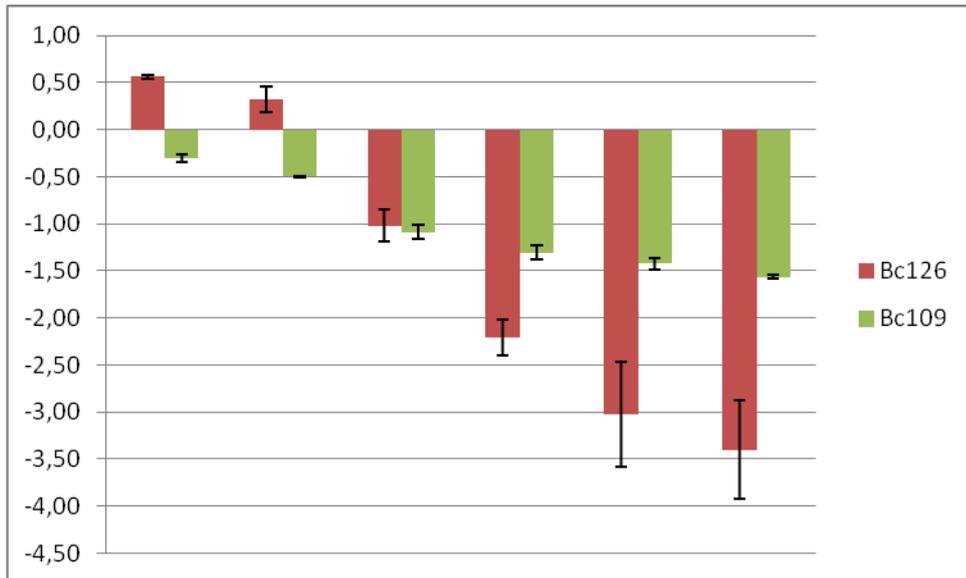


Figure 33 : potentiel zéta de 2 souches de *Bacillus cereus*

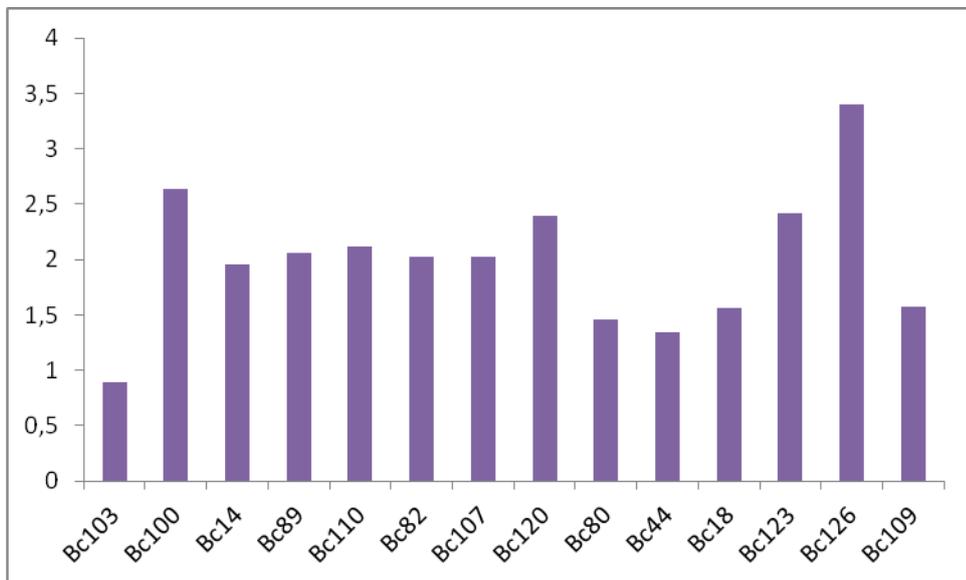


Figure 34: pI des spores des souches de *B.cereus*

Partie III : résultats et discussion

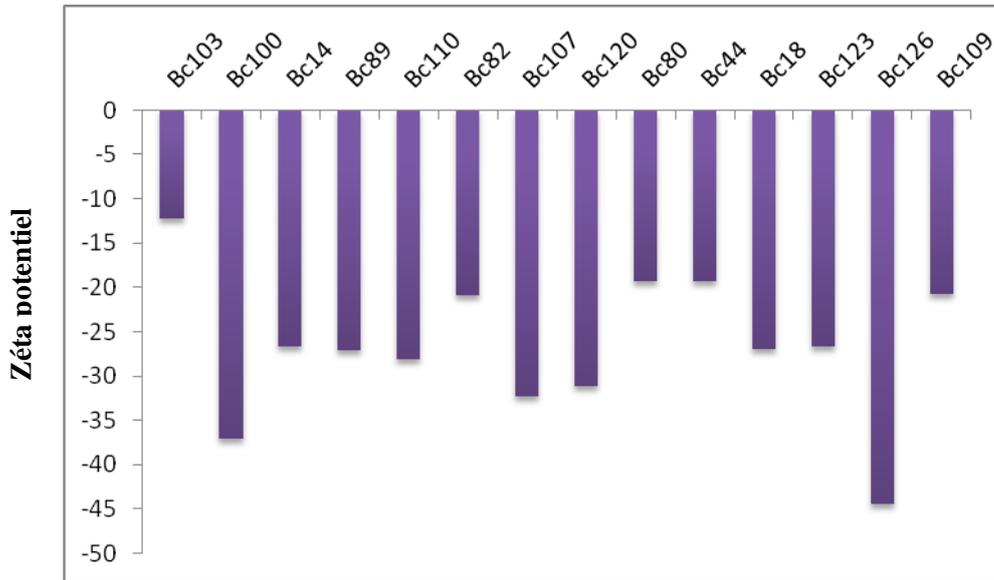


Figure 35: Potentiel zéta à pH 7,0 des spores des souches de *B.cereus*

La charge électrique des spores caractérisée par le potentiel zéta indique un caractère électro-négatif clair de toutes les souches à pH 7,0. Toutefois de grandes variations ont été observées entre les souches (potentiel zéta allant de -12,28 à -44, 51 mV). La spore Bc126 était la plus chargée négativement.

Ces données ne nous permettent pas de conclure qu'il existe une corrélation entre le caractère d'hydrophobie et le potentiel Zeta (cf figure N° 36, R = 0, 11).

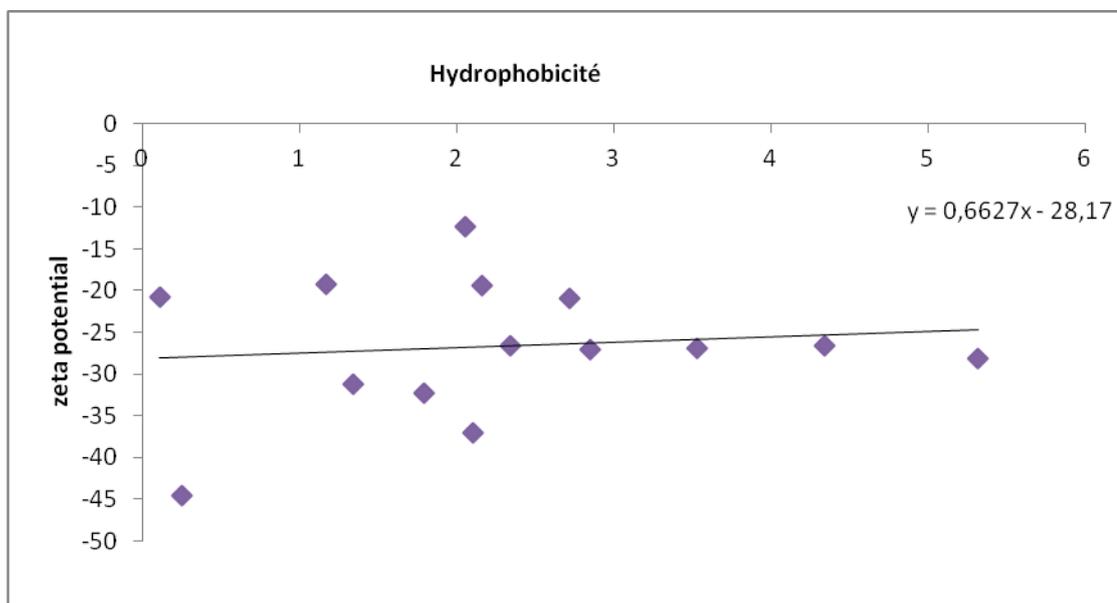
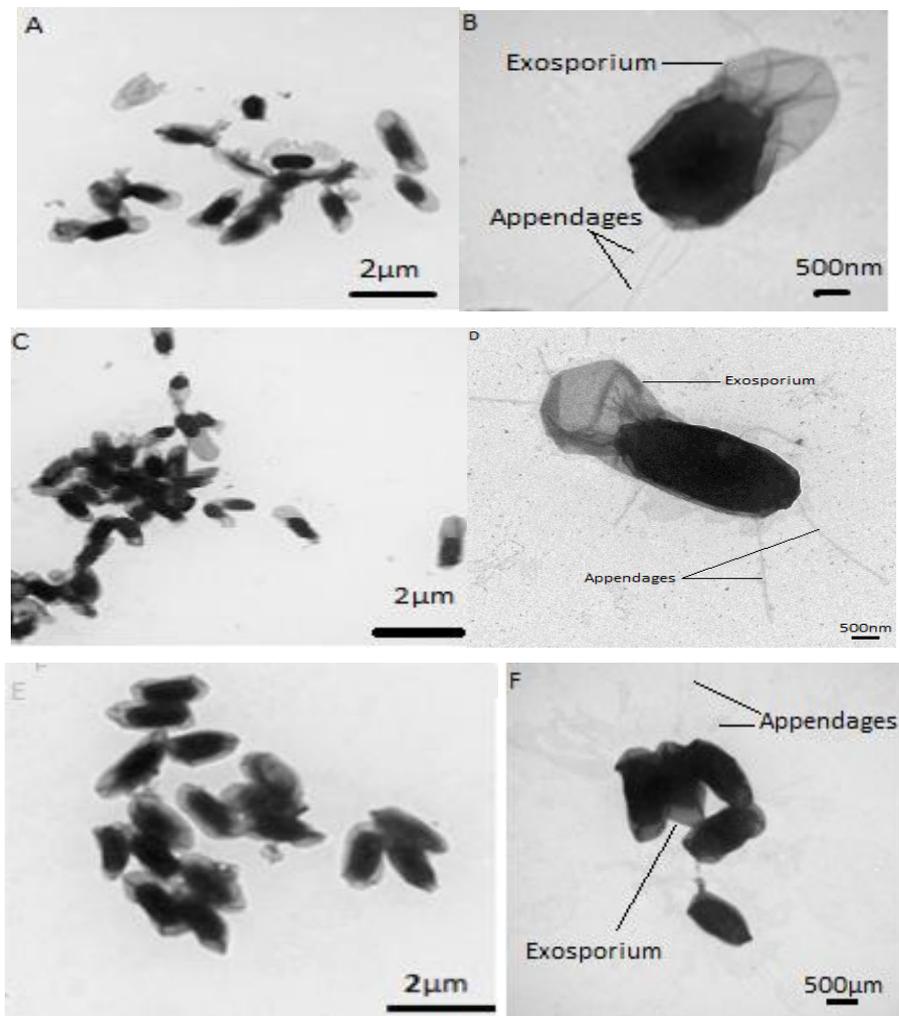


Figure 36 : Relation entre l'hydrophobicité et le potentiel zéta des spores de *B. cereus* isolées à partir d'une usine laitière en Algérie

Partie III : résultats et discussion

La caractérisation de la surface des spores montre que la majorité de nos spores sont moyennement hydrophiles. La charge électrique des spores caractérisée par le potentiel zêta indique un caractère électro-négatif clair à pH 7 de toutes les souches, cependant, d'énormes variations sont observées. Nos résultats, nous permettent de conclure qu'aucune corrélation n'a été trouvée entre les caractères d'hydrophobicité et le potentiel Zeta.

Dans notre travail, quatre spores de *B. cereus* ont été examinées par microscopie électronique à transmission après coloration négative. Deux spores: *B. cereus* 123 et *B. cereus* 110 sont hydrophobes et deux spores: *B. cereus* 82 et *B. cereus* 109 sont hydrophiles. Les images de ces observations sont présentées dans la figure 37. Ces images permettent l'observation claire d'un exosporium entourant les spores. La présence d'appendices sur les spores a également été examinée.



Partie III : résultats et discussion

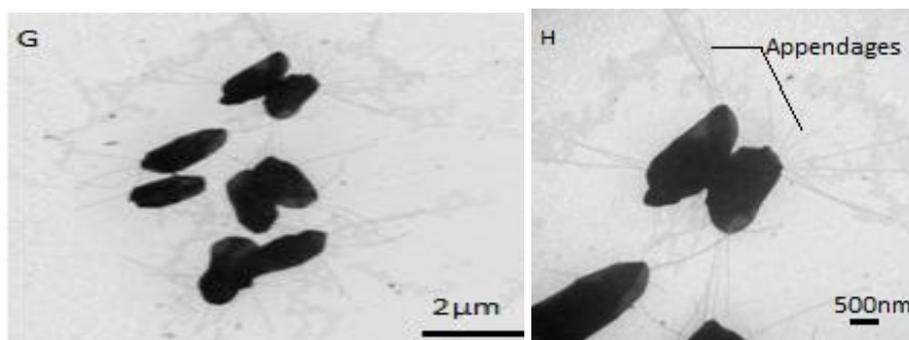


Figure 37 : Images de spores de *Bacillus cereus* après coloration négative par microscopie électronique à Transmission. (A, B): *B. cereus* 82; (C, D); *B. cereus* 109; (E, F) : *B. cereus* 110; (G, H); *B. cereus* 123.

Dans le cadre de ce travail, nous avons observé ces appendices sur la surface de chaque spore. Pour chaque souche examinée les appendices étaient pérित्रiches.

Le nombre des appendices -estimé sur 50 images pour chaque souche par le logiciel Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) - varie selon les souches de $4,24 \pm 7,81$ à $5,32 \pm 2,76$.

La longueur des appendices également déterminée par le logiciel Image J sur 50 images pour chaque souche varie de $0,50 \pm 0,342$ à $3,74 \pm 5,490$ μm. Des valeurs semblables ont été rapportées par **Ankolekar et Labbé (2010)** et **Faille et al (2010b)**.

La corrélation entre l'hydrophobicité de la surface et la capacité d'adhésion des spores est donnée dans la figure 38. D'après les résultats trouvés, Il y a une corrélation entre l'hydrophobicité et l'adhésion des spores ($R = 0,63$)

Partie III : résultats et discussion

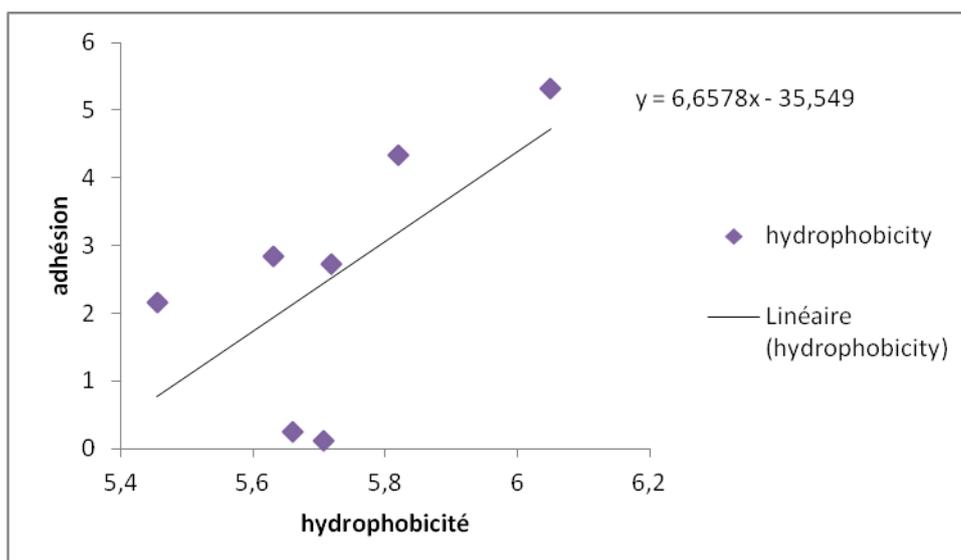


Figure 38: Relation entre l'adhésion et hydrophobicité de sept spores de *B. cereus* isolées à partir d'une laiterie algérienne.

La relation entre la mobilité électrophorétique et l'adhésion des spores bactériennes est donnée dans la figure 39. D'après les résultats Il n'y a pas de corrélation entre le potentiel zéta et l'adhésion des spores bactériennes ($R = -0,14$).

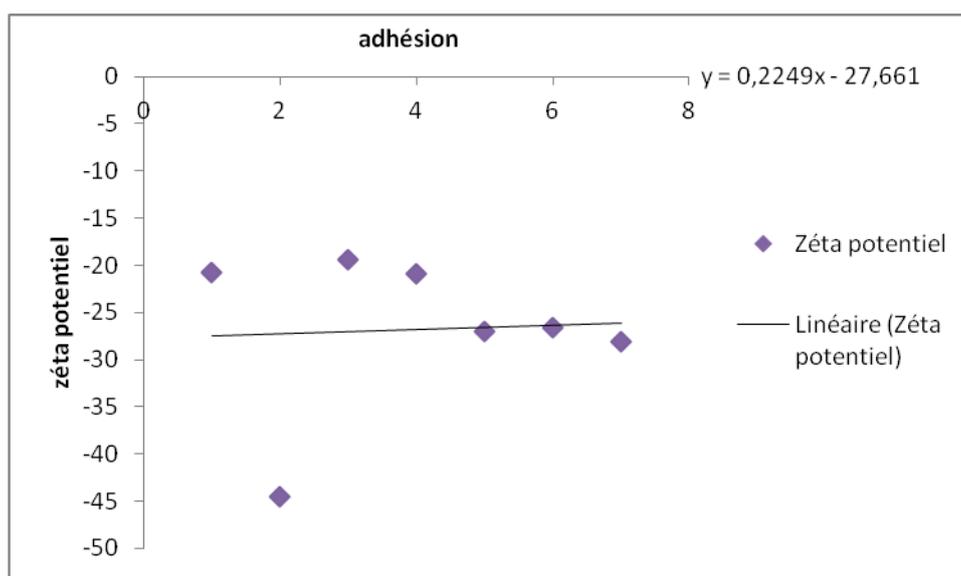


Figure 39: Relation entre l'adhésion et la mobilité électrophorétique de sept spores de *B. cereus* isolées à partir d'une usine laitière algérienne

Il y a une corrélation entre l'hydrophobicité des spores bactériennes et l'adhésion, mais il n'y en a pas entre le potentiel zéta et l'adhésion des spores bactériennes.

Partie III : résultats et discussion

La relation entre les propriétés de surfaces des spores de *Bacillus cereus* et la capacité d'adhésion à l'acier inoxydable a été déterminée. Les résultats figurent sur le tableau 07.

Tableau 07 : Propriétés de surfaces des spores de *Bacillus cereus* et capacité d'adhésion au coupons d'acier inoxydable. (*B. cereus* 82 et *B. cereus* 109 sont hydrophiles; *B. cereus* 110 et *B. cereus* 123 sont hydrophobes)

Souches	Surface d'exosporium (μm^2)	Surface de la spore (μm^2)	Nombre d'appendices	Longueur des appendices (μm)	Adhésion N/cm^2
<i>B.cereus</i> 82	0,53	0,41	7 ± 2	3,74	5.23×10^5
<i>B.cereus</i> 109	0,56	0,43	8 ± 4	0,50	5.1×10^5
<i>B.cereus</i> 110	0,48	0,39	6 ± 3	0,58	1.12×10^6
<i>B.cereus</i> 123	0,43	0,36	5 ± 2	0,53	6.60×10^5

La relation entre l'adhésion des spores bactériennes et la surface d'exosporium est donnée dans la figure 40. Il y a pas une corrélation inverse entre l'adhésion et la surface d'exosporium ($R = -0,57$).

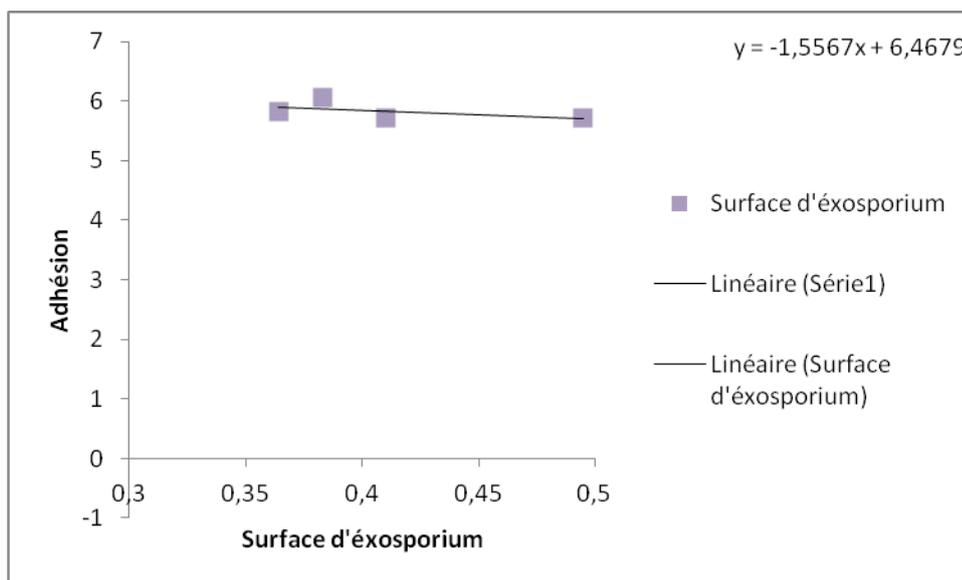


Figure 40 : Relation entre l'adhésion entre quatre spores et la surface de leur d'exosporium

La relation entre l'adhésion des spores bactériennes et la surface de la spore est donné dans la figure 41. Il y a une corrélation inverse entre l'adhésion et la surface de la spore ($R = -0,57$).

Partie III : résultats et discussion

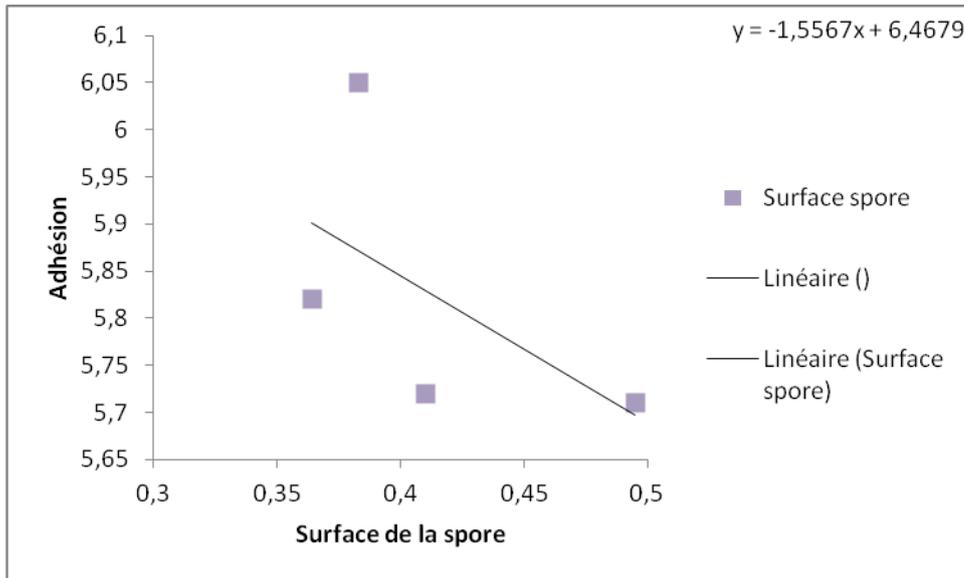


Figure 41 : Relation entre l'adhésion et la surface de quatre spores de *B. cereus*

La relation entre l'adhésion des spores bactériennes et le nombre d'appendices est donnée dans la figure 42. Il y a une corrélation inverse entre l'adhésion et le nombre d'appendices ($R = -0,54$).

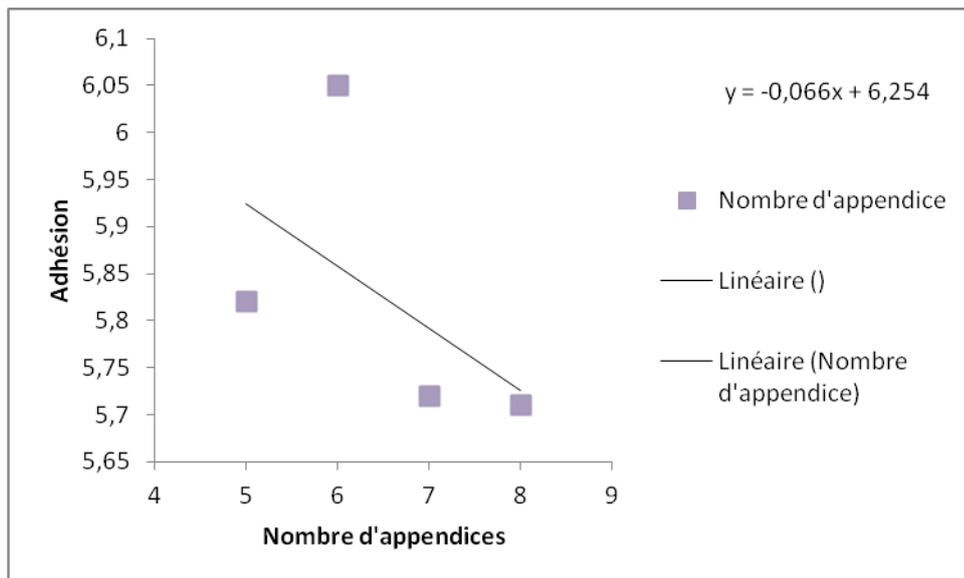


Figure 42 : Relation entre l'adhésion le nombre d'appendices de quatre spores de *B. cereus*

La relation entre l'adhésion des spores bactériennes et la longueur d'appendices est donnée dans la figure 43. Il n'y a pas une corrélation entre l'adhésion et la longueur d'appendices ($R = -0,42$).

Partie III : résultats et discussion

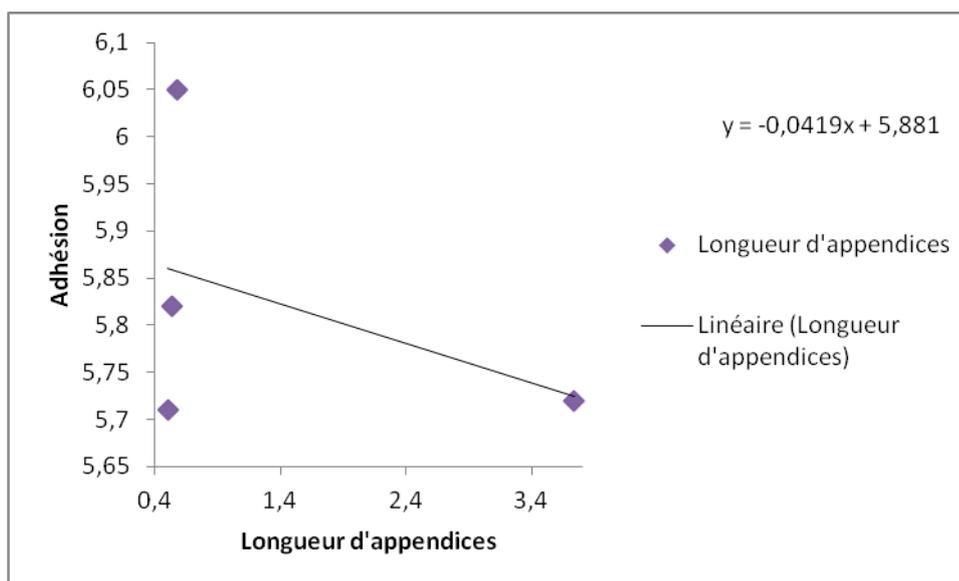


Figure 43: Relation entre l'adhésion et la longueur des appendices de quatre spores de *B. cereus*

Nos résultats indiquent que l'adhésion est affectée par la longueur d'appendices, par leurs nombres, par la surface d'exosporium, et par la surface de la spore.

Les résultats obtenus dans cette étude sur l'affinité pour l'hexadécane de la surface et les propriétés électriques des spores de *B. cereus* montrent que nos isolats présentent des valeurs similaires ou légèrement plus faibles que celles citées dans des travaux antérieurs. En effet **Ankolekar et Labbé (2010)** ont trouvé que les valeurs d'affinité varient entre 55,6% - et 14,1% et pour le potentiel Zéta de -8,18 à -12,8. **Faille et al (2010b)** ont trouvé des valeurs de l'hydrophobicité variant entre -9 s^{-1} ($\approx 45\%$) à $0,5 \text{ s}^{-1}$ ($\approx 2,5\%$) et pour le potentiel Zéta de -17,61 à -46,81, enfin, **Buhr et al (2008)** ont constaté que les valeurs de l'affinité à l'hexadécane se situaient entre 92,2% et 12,7% (**Buhr et al., 2008 ; Ankolekar et Labbé, 2010 ; Faille et al., 2010b**).

Partie III : résultats et discussion

Tableau 08 : Tableau comparant les données relatives à l'affinité à l'hexadécane et au potentiel Zeta de ce travail avec des données de la littérature

	Affinité à l'hexadécane	Potentiel Zéta
Faille <i>et al.</i>(2010b)	45% -2,5%	-17,61 à -46,81
Ankolekar et Labbé,(2010)	55,6% - 14,1%	-8,18 à -12,8
Buhr <i>et al.</i>,(2008)	92,2% - 12,7%	Nd
Bailey-Smith <i>et al.</i>(2005)	75%-65%	Nd
Seale <i>et al.</i>, (2007)	45%-10%	-12 à -21
Nos résultats	26.6%-0.5%	-12.285 à-44.51

Nd : non déterminé

Il a été suggéré que l'augmentation de l'hydrophobicité des spores bactériennes est due à l'abondance relative des protéines dans les couches extérieures et l'exosporium par rapport au peptidoglycane des cellules végétatives à Gram positif (**Matz *et al.*,1970 ; Takumi *et al.*,1979 ; Doyle *et al.*, 1984**).

Kozuka et Tochikubo (1985) qui ont rapporté les propriétés chimiques de l'élément principal d'appendices de *B. cereus* IAM1110 ont suggéré que les appendices pouvaient ne pas avoir des propriétés hydrophobes fortes en comparaison avec l'exosporium (**Kozuka et Tochikubo, 1985**).

Nos résultats indiquent également que les caractéristiques physico-chimiques de *B. cereus* sont indépendantes de la source d'échantillonnage. En effet nous avons trouvé des spores hydrophobes dans les équipements avant et après pasteurisation ce qui explique que le traitement thermique (pasteurisation) n'a apparemment pas d'effet sur le caractère hydrophobe des spores bactériennes. Il en est de même pour le caractère hydrophile.

Toutes les spores de *B. cereus* partagent une architecture commune comme la présence d'un exosporium (**Henriques et Moran, 2007**). Pour les deux souches (*B. cereus* 110, *B. cereus* 123), le caractère hydrophobe a été trouvé lié à la présence d'un exosporium. **Koshikawa *et al* (1989)** ont examiné la relation entre l'hydrophobicité et la présence d'un exosporium. Ils ont constaté que la propriété hydrophobe des spores est principalement due à l'exosporium, tandis que le manteau des spores a une propriété hydrophobe plus faible.

Partie III : résultats et discussion

L'hydrophobicité peut être due à la composition protéique et lipidique de l'exosporium (**Koshikawa et al., 1989**). Cependant, nos résultats indiquent que la spore de *B. cereus* 109 et la spore de *B. cereus* 82 bien qu'entourées d'un exosporium se sont avérées hydrophile (Voir les images A, B, C et D de TEM Figure 40, Bc109 avec $-Ro=0.107$ et Bc82 avec $-Ro=-2.72$).

Les appendices sont des structures en spirale (**Faile et al., 2010a**) et sont une caractéristique commune, mais pas universelle chez les spores du groupe de *B. cereus*. Le nombre et la longueur des appendices de spores du groupe *B. cereus* et espèces associées peuvent être très variables. **Wijman et al (2007)** mentionnent que les appendices de spores peuvent être soit perdus soit altérés au cours des opérations de préparation en raison de leur fragilité (**Wijman et al., 2007**).

Les spores de *B. cereus* présentent une remarquable capacité d'adhérer à divers matériaux inertes (**Hüsmark et Rönner, 1992 ; Galopin et al., 2009**).

Selon des travaux antérieurs, les spores de charge inférieure ont une capacité plus élevée d'adhérer aux surfaces (**Hüsmark et Rönner, 1992 ; Giarouris et al., 2009**). L'adhésion des cellules a lieu principalement dans deux étapes : une adhérence réversible a suivi d'une adhérence irréversible.

Les interactions initiales sont développées entre les cellules bactériennes et la surface désignées sous le nom de l'adhérence réversible. Les diverses forces d'interaction influençant le procédé réversible d'adhérence sont les forces d'attraction de Van der Waals, les forces électrostatique et les interactions hydrophobes. Pendant cette étape, les bactéries peuvent toujours facilement être enlevées par les forces de cisaillement (**Marshall et al., 1971**). L'attachement irréversible des cellules représente l'étape cruciale dans le développement de biofilm. Les diverses forces d'interaction influençant le procédé d'adhérence irréversible sont les interactions de dipôle-dipôle, l'hydrogène, la liaison ionique et covalente et les interactions hydrophobes (**Jones et Isaacson, 1983 ; Hancock, 1991**).

L'hydrophobie joue un rôle majeur dans l'adhésion des spores (**Faile et al., 2013**). En raison de leur hydrophobicité, l'adhésion des spores est particulièrement élevée pour les matériaux hydrophobes tels que l'acier inoxydable qui est couramment utilisé dans les équipements de transformation des produits laitiers.

Les spores sont recouvertes par des longs appendices qui favorisent l'adhérence (**Smirnova et al., 1989 ; Stalheim et Granum, 2001**). **Hüsmark et Rönner (1992)** ont

Partie III : résultats et discussion

montré que l'adhésion des spores de *B. cereus* IAM110 après sonication a été environ 2,5 fois moins que celle des spores entières pour la même souche.

En comparaison avec les résultats en conditions statiques, les conditions dynamiques ont donné des résultats plutôt inattendus (**Klavenes et al., 2002**). Une explication possible pourrait être que les appendices vont promouvoir l'adhésion initiale des spores, mais une fois celles-ci adhérentes à la surface les appendices ne servent plus et d'autres mécanismes d'adhésion dominent.

Une autre explication pourrait être que les spores avec appendices se regroupent plus facilement grâce à l'enchevêtrement des appendices, ces groupes de spores sont ainsi plus facilement éliminés de la surface dans des conditions dynamiques (**Koshikawa et al., 1989**).

Il y a une certaine controverse concernant leur rôle dans l'adhésion (**Seale et al., 2008**). Les agents de nettoyage qui dégradent les appendices existent déjà et pourraient éventuellement être développés si les appendices sont jugés essentiels dans le phénomène d'adhésion (**Stalheim et Granum, 2001**).

Faille et al (2010b) trouvent que l'adhésion des spores de *Bacillus* dépend essentiellement de l'hydrophobicité et du nombre d'appendices. Concernant les 9 spores de *B. cereus* que ces auteurs ont étudié, les différences d'adhésion observées seraient liées au nombre d'appendices, de la taille de l'exosporium et à un degré moindre le potentiel Zeta.

Selon les travaux de **Rönner et al (1990)** les spores les plus hydrophobes, -estimée par la méthode de chromatographie d'interaction hydrophobique- adhèrent beaucoup plus aux surfaces hydrophobes.

Faille et al (2002) ont montré, que le nombre de spores hydrophobes de *Bacillus cereus* adhérentes sur différents supports (PVC, verre, acier inoxydable) était dix fois plus élevés que celui des spores hydrophiles de *Bacillus subtilis* (**Faille et al., 2002**). De plus, les spores de *B.cereus* étaient plus résistantes que les spores de *B.subtilis* aux procédures de nettoyage.

Lequette et al (2011) ont montré que les spores de *Bacillus cereus* adhèrent sélectivement sur des nanofils de silice super-hydrophobes en présence d'eau.

En utilisant des surfaces modifiées dans leur structure et leurs propriétés : les motifs super-hydrophiles gravés sur les nanofils (SiNW) de silice super-hydrophobes Ces surfaces

Partie III : résultats et discussion

ont été inoculés par une suspension de spores de *B. cereus*. Les résultats ont montré une adsorption spécifique des spores sur les zones super-hydrophobes.

L'exosporium est constitué d'une couche paracrystalline recouverte d'une structure en brosse. Cette brosse est formée principalement de glycoprotéines. Trois gènes, *bclA*, *exsH* et *exsI* ont été identifiés dans le génome de *B. cereus*. Les gènes *bclA* et *exsH* codant pour des protéines ont été inactivés pour déterminer leur rôle dans l'adhésion des spores. Les résultats ont montré que la glycoprotéine BclA élément majeur de la brosse augmente l'adhésion des spores sur l'acier et module les propriétés physico-chimiques de la spore. La glycosylation des deux protéines BclA et ExsH semble identique. La protéine ExsH ne semble pas influencer l'adhésion des spores sur l'acier. La protéine BclA est constituée de 3 domaines : un domaine N-terminal (Nt) impliqué dans l'encrage de la protéine dans l'exosporium, un domaine CLR (Collagen-Like-Region) de longueur variable et un domaine C-terminale (Ct) formé de feuilletts beta relié par des boucles.

Afin de mieux comprendre le rôle de la protéine BclA dans l'adhésion des spores, des délétions des domaines Ct et CLR ont été effectuées. Les résultats montrent que plus la région CLR augmente, plus le point isoélectrique et l'hydrophobicité de la spore augmentent ce qui peut expliquer l'accroissement des forces adhésion de la spore avec l'accroissement de la longueur de la région CLR.

L'absence de la région Ct diminue l'adhésion des spores. La délétion de cette région augmente l'hydrophobicité et diminue le point isoélectrique des spores.

Faille et al (2010b) ont étudié l'influence des propriétés des spores comme la présence de l'exosporium sur la capacité d'adhésion des spores. 17 souches appartenant à différentes espèces du genre *Bacillus*. La capacité des spores appartenant au groupe *B. cereus* sont généralement les plus adhérentes.

La présence d'un exosporium n'explique pas à elle seule leur capacité à adhérer à des surfaces inertes. En effet, sur 17 souches appartenant au genre *Bacillus*, l'hydrophobicité et le nombre d'appendices sont corrélés statistiquement à la capacité d'adhésion. A l'intérieur du groupe *B. cereus*, les différences dans le nombre d'appendices, la longueur de l'exosporium et à moindre mesure le potentiel zéta est reliés à la capacité d'adhésion.

Partie III : résultats et discussion

III. Application des produits de nettoyage et de désinfection sur les spores de *B. cereus* adhérentes aux coupons d'Inox

Dans cette partie, nous avons essayé de déterminer l'effet des conditions de nettoyage et de désinfection sur l'élimination des spores de *Bacillus cereus* adhérentes à des coupons d'acier inoxydable.

Dans ce cadre nous avons étudié l'influence de trois des quatre facteurs interdépendants, du cercle de Sinner : la température, la concentration des produits chimiques et la durée de contact. Les résultats ont été rapportés sur les figures 44, 45, 46, 47, et 48.

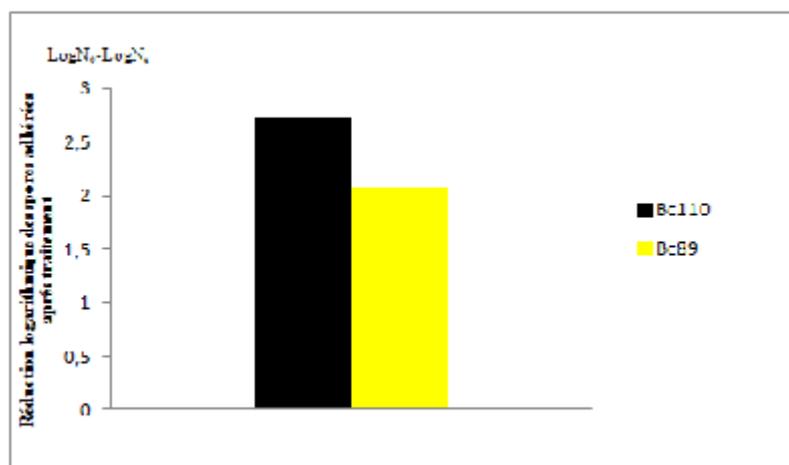


Fig 44 : Efficacité du protocole 1 appliqué par la laiterie Mansourah de Tlemcen sur des spores de *Bacillus cereus* adhérentes sur acier inoxydable. [Protocole sans étape de désinfection : 1) pré-rinçage à température ambiante, 2) NaOH à 2% 10min à 70°C, 3) rinçage intermédiaire à température ambiante, 4) HNO₃ à 1%, 10min à 70°C, 5) rinçage final à température ambiante]. Ce protocole a été testé en conditions statiques.

Partie III : résultats et discussion

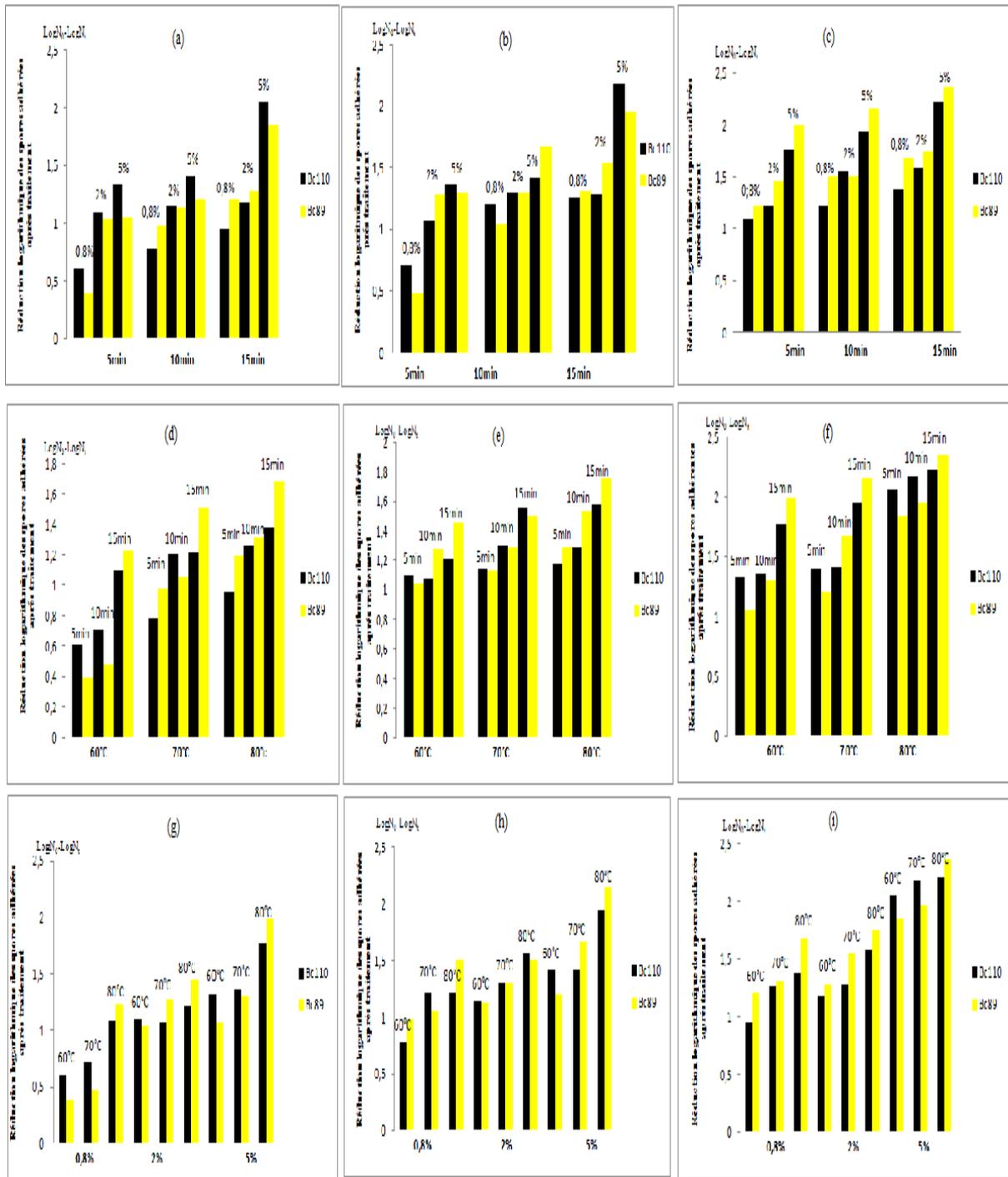


Figure 45 : Efficacité du protocole 2. sur des spores de *Bacillus cereus* adhérentes sur acier inoxydable [Protocole sans étape de désinfection : 1)pré-rinçage à température ambiante, 2) NaOH à 2% 10min à 70°C, 3)rinçage intermédiaire à température ambiante, 4) OBA DETART AC [(a) 0,8, 2 et 5% / 5, 10 et 15 min / 60°C][(b) 0,8, 2 et 5% / 5, 10 et 15 min / 70°C][(c) 0,8, 2 et 5% / 5, 10 et 15 min / 80°C][(d) 0,8% / 5, 10 et 15 min / 60, 70, 80°C][(e) 2% / 5, 10 et 15 min / 60, 70, 80°C][(f) 5% / 5, 10 et 15 min / 60, 70, 80°C][(g) 0,8, 2 et 5% / 60°C,70°C,80°C / 5min][(h) 0,8, 2 et 5% / 60°C,70°C,80°C / 10min][(i) 0,8, 2 et 5% / 60°C,70°C,80°C /15min] ,5)/rinçage final à température ambiante].

Partie III : résultats et discussion

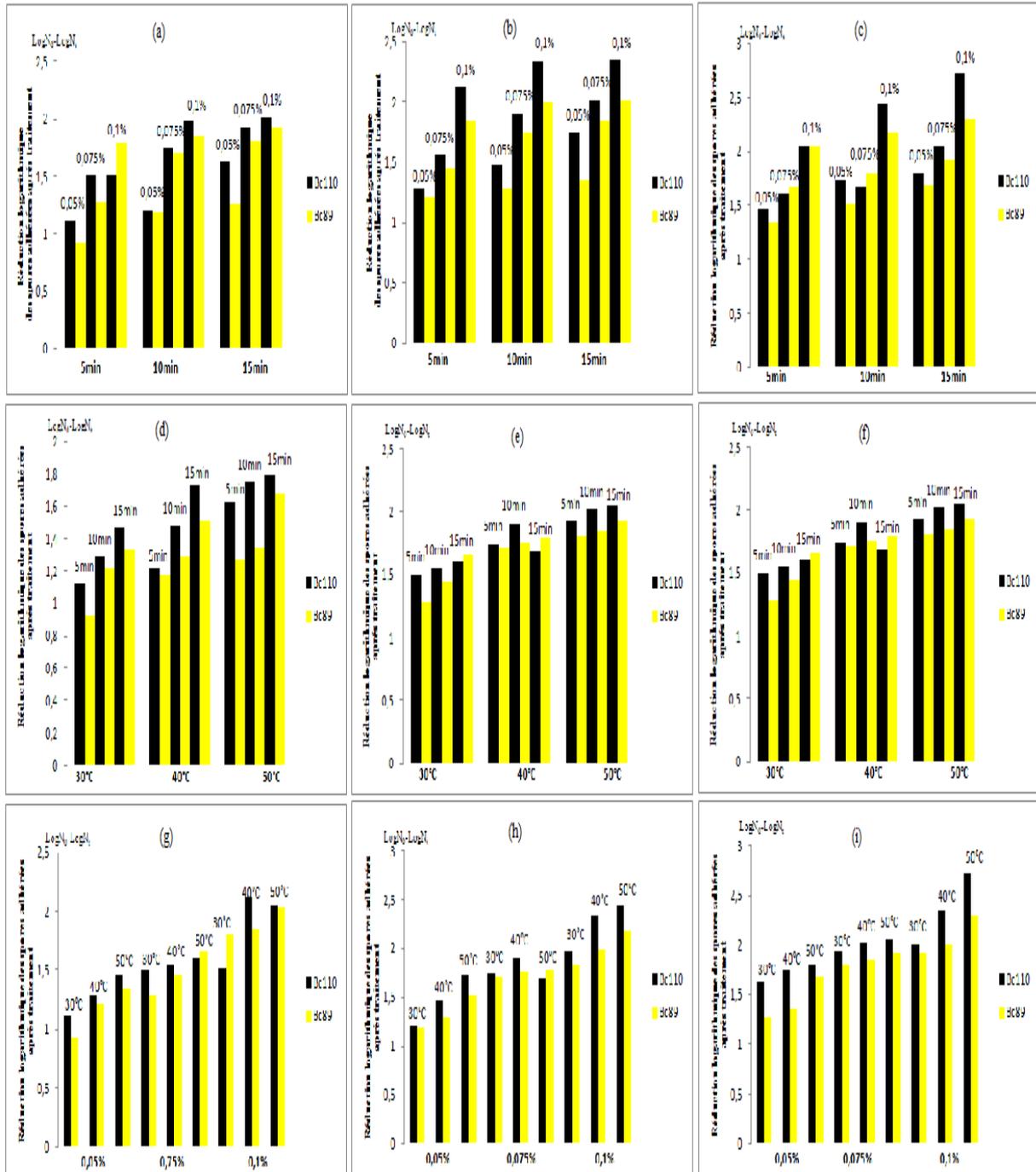


Figure 46 : Efficacité du protocole 3 sur des spores de *Bacillus cereus* adhérentes sur acier inoxydable [Protocole sans étape de désinfection :1)pré-rinçage à température ambiante,2) OBA GEN CL à [(a)0,5 ; 1,0 et 1,5% / 5 ; 10 et 15min / 30°C][(b) 0,5 ; 1,0 et 1,5% / 5 ; 10 et 15min / 40°C][(c) 0,5 ; 1,0 et 1,5% / 5 ; 10 et 15min / 50°C][(d) 0,05 % / 5 ; 10 et 15min / 30, 40, 50°C][(e) 1% / 5 ; 10 et 15min / 30, 40, 50°C][(f) 1,5 % / 5 ; 10 et 15min / 30, 40, 50°C][(g) 0,05 % / 30, 40, 50°C/5min][(h) 1 % / 30, 40, 50°C/10min][(i) 1,5 % / 30, 40, 50°C/15min], 3)rinçage intermédiaire à température ambiante ,4)HNO₃ à 1%, 10min à 70°C, 5)rinçage final à température ambiante].

Partie III : résultats et discussion

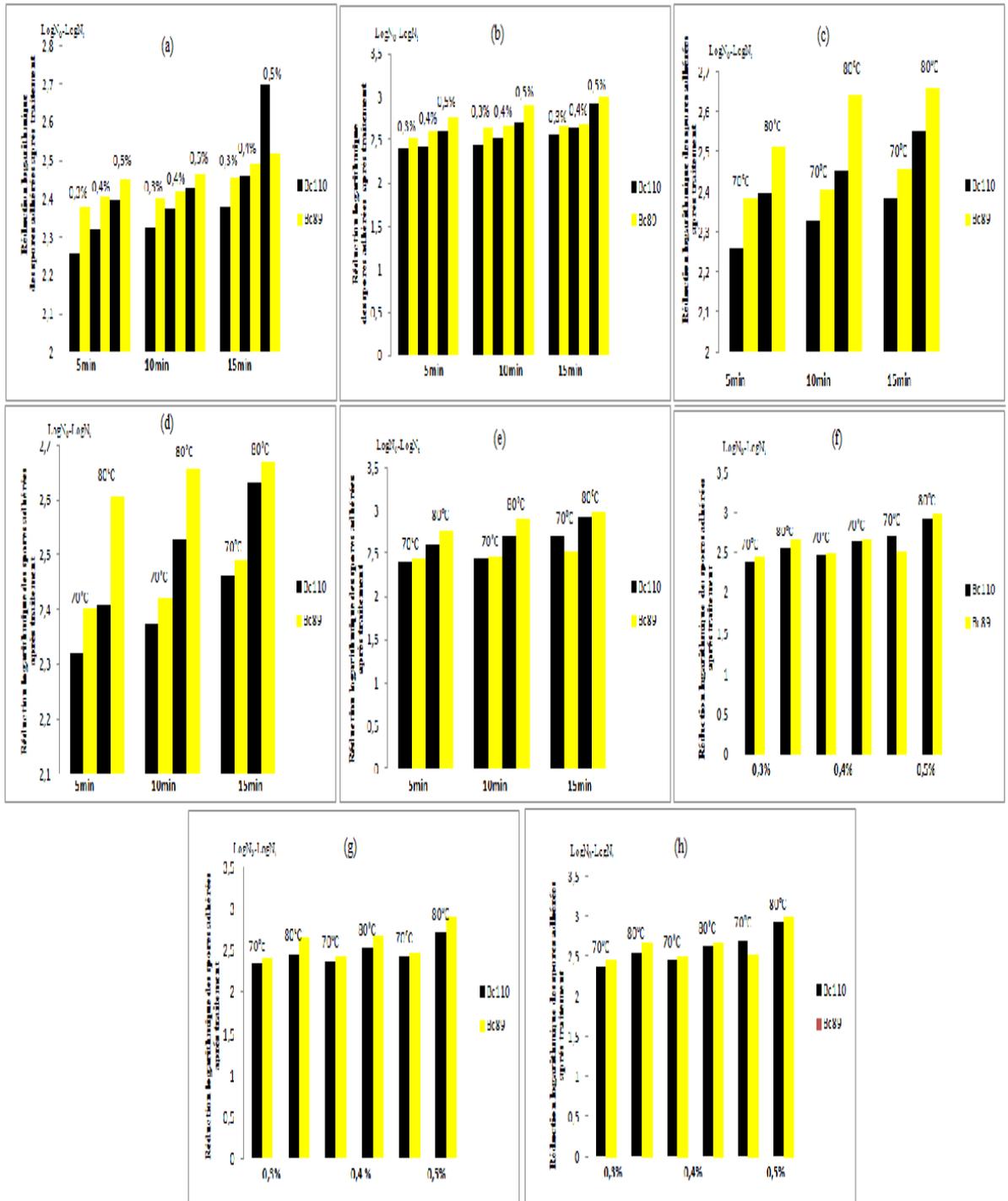


Figure 47 : Efficacité du Protocole 4 sur des spores de *Bacillus cereus* adhérentes sur acier inoxydable. [Protocole avec étape de désinfection : 1)pré-rinçage à température ambiante,2) NaOH à 2% /10min / 70°C,3) rinçage intermédiaire 1 à température ambiante, 4) OBA DETART AC à 5% / 15min / 70°C, 5)rinçage intermédiaire 2 à température ambiante,6) OBA STERIL BC à[(a) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 5, 10 et 15min / 70°C[(b) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 5, 10 et 15min / 80°C][(c) 0,3%/ 5, 10 et 15min / ,70°C, 80°C][(d) 0,4%/ 5, 10 et 15min / ,70°C, 80°C][(e)0,5%/ 5, 10 et 15min / ,70°C, 80°C][(f)0,3%,0,4% et 0,5% /70°C,80°C/5min][(f) 0,3%,0,4% et 0,5% /70°C,80°C/10min][(h)0,3%,0,4% et 0,5% /70°C,80°C/15min], 7)rinçage final : eau à température ambiante].

Partie III : résultats et discussion

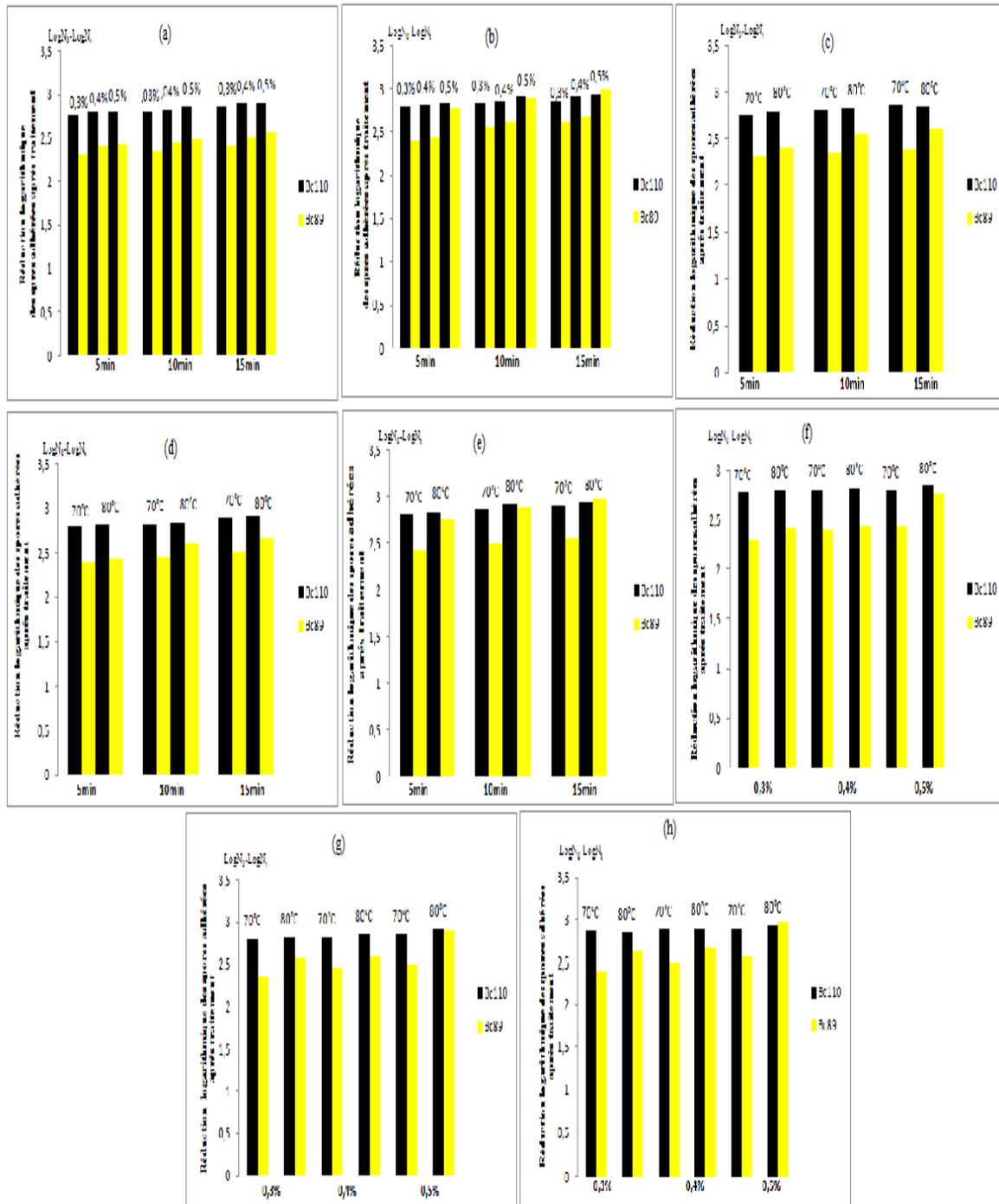


Figure 48 : Efficacité du Protocole 5 sur des spores de *Bacillus cereus* adhérentes sur acier inoxydable. [Protocole avec étape de désinfection 1) pré-rinçage à température ambiante, 2) d'OBA GEN CL 0,1%, 15min, 50°C, 3) rinçage intermédiaire 1 à température ambiante, 4) HNO₃ à 0,5% / 70°C / 10min, 5) rinçage intermédiaire 2 à température ambiante, 6) OBA STERIL BC à [(a) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 5, 10 et 15min / 70°C [(b) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 5, 10 et 15min / 80°C [(c) 0,3% / 5, 10 et 15min / 70°C, 80°C [(d) 0,4% / 5, 10 et 15min / 70°C, 80°C [(e) 0,5% / 5, 10 et 15min / 70°C, 80°C [(f) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 70°C, 80°C / 5min [(g) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 70°C, 80°C / 10min [(h) 0,3%, 0,4% et 0,5% / 70°C, 80°C / 15min], 7) rinçage final à température ambiante].

Partie III : résultats et discussion

En adhérant aux surfaces, les microorganismes constituent un problème dans la transformation des aliments. En effet, les surfaces du matériel utilisé pour la transformation des aliments sont reconnues comme des sources de contamination et de recontamination microbienne et si le nettoyage est insuffisant, les cellules restantes se développeront et contamineront le produit (**Hood et Zottola, 1995**).

Les biofilms affectent également l'efficacité des équipements : débit réduit par des tubes encrassés, de la corrosion de l'acier inoxydable, et le transfert de chaleur est réduit. Les bactéries adhérentes semblent moins sensibles aux opérations de nettoyage et de désinfection par rapport aux bactéries en suspension (**Gelinas et Goulet, 1983 ; Eginton *et al.*, 1998 ; Gilbert *et al.*, 1998 ; Briandet *et al.*, 1999 ; Norwood et Gilmour, 2000**). Ces tolérances élevées peuvent être causées par la diffusion lente à travers les matrices de substances polymériques extracellulaires. Les cellules persistantes, conduisent au développement de phénotypes résistants (**Spoering *et al.*, 2001**).

L'efficacité de nettoyage est liée à divers paramètres tels que la rugosité de surface (**Jullien *et al.*, 2003**) ou la physico-chimie de l'équipement (**Jullien *et al.*, 2008**), ainsi que les conditions et procédures de nettoyage.

Bien que les propriétés physico-chimiques de la solution de nettoyage et de désinfection et leur concentration jouent un rôle majeur (**Eide *et al.*, 2003**), les forces mécaniques, les durées et les températures de traitement jouent également un rôle important dans l'efficacité de ces agents chimiques contre les spores adhérentes (**Faille *et al.*, 1999 ; Simoes *et al.*, 2005**).

Les traitements des supports contaminés suivant les 5 protocoles, ont permis des diminutions de la population bactérienne viable quelle que soit la souche considérée.

A travers nos résultats : les réductions logarithmiques varient de 0,60 à 2,92 log pour la souche Bc110 et de 0,39 à 2,98 pour la souche Bc89. Les réductions logarithmiques des spores adhérentes après traitement montrent que la plus faible activité sporocidale est celle observée avec le protocole 2 comparativement aux autres protocoles.

La comparaison des 3 protocoles de nettoyage sans étape de désinfection montre que le protocole 2 est moins efficace par rapport au protocole 3 suivi par le protocole 1 pour la

Partie III : résultats et discussion

souche Bc110, pour la souche Bc89 les 2 protocoles 1 et 3 sont moins efficace que le protocole 2.

Le remplacement du NaOH avec OBAGEN CL et HNO₃ avec OBA DETART AC n'pas trop augmenté l'efficacité du nettoyage.

La comparaison des 2 protocoles de nettoyage avec étapes de désinfection montre que les 2 protocoles ont le même effet sur les deux souches.

Les résultats de réductions logarithmiques des deux souches montrent que il n'y pas de différences entre la résistance d'une spore avec caractère hydrophobes par rapport à une spore avec caractère hydrophile.

Pour les differents protocoles appliqués, l'observation des résultats montre que :

✓ -Pour le protocole 2, la réduction logarithmique se multiplie approximativement par 3,5 entre la combinaison [nettoyage avec NaOH 2%/10 min/70°C/OBA DETART 0,8%/5 min/60°C] et la combinaison [nettoyage avec NaOH 2%/10 min/70°C/OBA DETART 5% /15 min/80°C].

✓ -Pour le protocole 3, la réduction logarithmique se multiplie par 2,5 entre la combinaison [nettoyage avec OBAGEN CL 0,05%/5 min/30°C/HNO₃ 0,5%/10 nettoyage avec NaOH 2%/10 min/70°C/OBA DETART 5% /15 min/80°C min/70°C] et la combinaison [nettoyage avec OBAGEN CL 0,1%/15 min/50°C/HNO₃ 0,5%/10 min/70°C].

✓ -Pour le protocole 4, la réduction logarithmique se multiplie par 1,5 entre la combinaison [nettoyage avec NaOH 2%/5 min/70°C/OBA DETART AC 5%/15 min/80°C/OBASCAL BC 0,3%/5 min/70°C] et la combinaison [nettoyage avec NaOH 2%/5 min/70°C/OBA DETART AC 5%/15 min/80°C/OBASCAL BC 0,5%/15 min/80°C].

✓ -Pour le protocole 5, la réduction logarithmique se multiplie par (×1,5) entre la combinaison [nettoyage avec OBAGEN CL 0,1%/15 min/50°C/HNO₃ 0,5%/10 min/70°C/OBASCAL BC 0,3%/5 min/70°C] et la combinaison [nettoyage avec OBAGEN CL 0,1%/15 min/50°C/HNO₃ 0,5%/10 min/70°C/OBASCAL BC 0,5%/15 min/80°C].

✓ -l'ajout d'une étape de désinfection [OBASCAL BC 0,5%/15 min/80°C] pour la dernière combinaison du protocole 2[nettoyage avec NaOH 2%/10 min/70°C/OBA DETART 5%/15 min/80°C] la réduction logarithmique se multiplie par (×1,5).

✓ l'ajout d'une étape de désinfection [OBASCAL BC 0,5%/15 min/80°C] pour la dernière combinaison du protocole 3[nettoyage avec OBAGEN CL 0,5%/15 min/50°C/ HNO₃ 0,5%/10 min/70°C] les réductions logarithmiques n'ont pas trop changé.

✓ D'après les valeurs des réductions logarithmiques l'étape de désinfection n'a pas augmenté d'une façon significative l'effet de nettoyage.

Partie III : résultats et discussion

A effet égal, en raison du cout d'énergie et d'efficacité le protocole 2 est recommandé parce qu'on utilise des concentrations et des températures faibles par rapport aux autres protocoles.

Aux différentes étapes nécessaires à la réalisation des dénombrements des spores. En effet, ces dénombrements sont réalisés après décrochage des spores des coupons d'acier inoxydables sous l'action des ultra-sons, agent pouvant dans certains cas améliorer l'efficacité de molécules antimicrobiennes (**Pitt et al., 1994**). De plus, la multiplication du nombre d'étapes intermédiaires (dilutions...) avant les ensemencements en gélose nutritive peut augmenter la perte des micro-organismes viables cultivables.

L'amélioration de l'efficacité des produits détergents et désinfectants nécessite le développement de méthodes tests permettant d'évaluer rapidement leur activité sporocide sur des spores adhérentes aux surfaces inertes.

L'efficacité du nettoyage a également été liée à des propriétés de surface des bactéries. Dans le cas de *Bacillus cereus* par exemple, des études macroscopiques (de quantification de spores adhérentes) ont permis la détermination des rôles joués par leur nature hydrophobe (**Tauveron et al., 2006**), ainsi que celle de la présence d'appendices (**Klavenes et al., 2002**) et la taille des spores (Tauveron et al., 2006). Toutefois, des divergences existent toujours et les mécanismes sous-jacents restent flous (**Faille et al., 2013**).

Les spores de *Bacillus cereus* ont une préoccupation dans l'industrie alimentaire en tant que spores très résistantes à la plupart des conditions rencontrées au cours de la transformation des aliments (**Faille et al., 2001**) et dans le cadre de procédures de nettoyage et de désinfection (**Peng et al., 2002**). Les spores de *B. cereus* sont souvent isolées à partir des surfaces de l'équipement de l'usine alimentaire en raison de leur capacité à adhérer fermement à une grande variété de matériaux rencontrés lors de la transformation des aliments (**Faille et al., 2002**).

La clé d'efficacité de nettoyage et de la désinfection dans l'industrie alimentaire est la compréhension de la nature des souillures (sucre, matières grasses, protéines, sels minéraux, etc). Une procédure de nettoyage et de désinfection efficace consiste en une séquence de rinçage utilisant de l'eau de bonne qualité avec application de détergents et de désinfectants.

La désinfection est nécessaire dans les opérations des équipements alimentaires, où les surfaces humides offrent des conditions favorables à la croissance des microbes. L'efficacité

Partie III : résultats et discussion

de désinfectants est généralement déterminée dans des suspensions, qui ne reproduisent pas les conditions de croissance sur les surfaces où les agents sont nécessaires pour inactiver les microbes (**Wirtanen et Salo, 2003**).

Dans l'industrie alimentaire, il y a une tendance à l'allongement des cycles de production avec de courts intervalles pour le nettoyage et la désinfection. Les programmes de nettoyage doivent être effectués en tant que coût-efficacité et de sécurité possible, ce qui signifie aussi rarement que possible, dans les plus brefs délais, avec une faible concentration chimique, de l'énergie et des coûts du travail, produisant le moins de déchets possible et sans dommages à l'équipement (**Lelieveld, 1985; Holah, 1992**). L'effet de l'action mécanique et chimique, de la température et de temps de contact dans le régime de nettoyage doit être soigneusement choisi pour obtenir un effet de nettoyage adéquat (**Czechowski et Banner, 1990; Mosteller et Bishop, 1993**).

Les procédures de nettoyage impliquent l'utilisation de détergents, qui ne sont pas conçus comme des agents antimicrobiens, mais à éliminer les salissures alimentaires et éliminer la contamination de surface, suivi par les applications de désinfectants qui réduisent la viabilité des organismes restants (**Walton et al., 2008**)

Une procédure de nettoyage et de désinfection efficace consiste des applications dans différentes combinaisons de température et de concentration (**Frank et Koffi, 1990; Holah, 1992; Troller, 1993; Gould, 1994; Wirtanen, 1995**).

La sélection des détergents et des désinfectants dans l'industrie alimentaire dépend de l'efficacité, la sécurité et aptitude au rinçage de l'agent ainsi que là où il est corrosif ou affecte les valeurs sensorielles des produits (**Wirtanen et Salo, 2003**).

L'hydroxyde de sodium (NaOH), qui est typiquement utilisé dans des concentrations de 1 à 5 % pour des échangeurs de chaleur tubulaires et les surfaces très sales et 1-2 % pour l'usage général (**Flint et al., 1997**). C'est parce qu'il a été prouvé efficace pour dissoudre les deux souillures protéiques et grasses, ainsi comme ayant des propriétés émulsifiantes. A l'inverse, son efficacité dans l'élimination des bactéries adhérentes est très controversé, à la fois pour les biofilms (**Bremer et al., 2006; Salustiano et al., 2010**), ou les spores bactériennes adhérentes (**Sundberg et al., 2011**).

Le rôle principal de l'étape de lavage caustique est l'élimination des protéines et des glucides (**Chisti, 1999**). L'augmentation de l'efficacité de l'étape caustique peut réduire la

Partie III : résultats et discussion

quantité d'acide nitrique nécessaire et la nécessité d'utiliser un désinfectant. Pour améliorer l'efficacité de nettoyage des mélanges caustiques et des additifs caustiques ont été développés (contiennent des agents tensioactifs, des agents émulsifiants, agents chélatants). Le rôle principal de l'étape acide est d'enlever la matière minérale après l'exposition au produit chimique de nettoyage caustique. L'étape acide contribue également à l'élimination des traces de produit alcalin sur les surfaces de l'équipement, améliore le drainage et le séchage et fournit des conditions bactériostatiques qui retardent la croissance de microorganismes restants (**Stewart et Seiberling, 1996**). L'acide le plus couramment utilisé dans l'industrie laitière est l'acide nitrique et comme avec des produits chimiques caustiques, acides mélanges ont été formulé qui peut contenir d'autres acides ou des agents tensioactifs.

De nombreux résultats sont disponibles sur la résistance des bactéries adhérentes au CIP, qui dépend de la composition de l'agent de nettoyage (**Bremer et al., 2006; Salustiano et al., 2010**).

Les systèmes de nettoyage de l'industrie laitière impliquent généralement l'utilisation séquentielle de soude caustique (hydroxyde de sodium) et de l'acide nitrique, et des étapes de lavage, les produits chimiques à l'origine choisis pour leur capacité à éliminer les salissures organiques (protéines et graisses) et inorganique (phosphate de calcium et autres minéraux), dans certains cas, une étape de désinfectant est également appliquée (**Chisti, 1999**). Dans le nettoyage des processus fermés, un pré-rinçage à l'eau froide est effectué pour enlever la saleté. Le traitement CIP est normalement effectué en utilisant des solutions de nettoyage à chaud, mais la solution froide peut également être utilisée dans le traitement des produits sans gras (**Czechowski et Banner, 1990; Brackett, 1992; Chisti et Moo-Young, 1994; Zottola et Sasahara, 1994; Wirtanen et al., 1997**).

Une étude a été menée par **Peng et ses collaborateurs (2002)** pour comparer la sensibilité des cellules planctoniques, des cellules adhérentes et des cellules en biofilm de *Bacillus cereus* à l'hypochlorite de sodium et SPARTEC, un composé d'ammonium quaternaire (CAQ). L'élimination de *B. cereus* en biofilm par un nettoyage en place (NEP) par l'utilisation 1,5% Spec - Tak 1000, un détergent alcalin ; 0,65% Dilac, un détergent acide et 1,5% Diverform Plus, une solution d'hypochlorite de sodium contenant du détergent alcalin est également examiné. Les résultats montrent que les cellules de *B. cereus* dans un biofilm sont plus résistantes à des désinfectants chimiques suivies par les cellules adhérentes suivies par l'état planctonique. Lorsque les cellules de *B. cereus* étaient dans un état planctonique, 25

Partie III : résultats et discussion

ppm d'hypochlorite ou 100 ppm CAQ donne une réduction plus de 5,0 log UFC / ml dans les 15 s. Cependant, les mêmes désinfectants utilisés dans cette étude ont montré peu d'effet sur les cellules dans un biofilm, même lorsque le temps d'exposition a été étendu à 5 min. Les désinfectants testés ont été moins efficaces contre les cellules en biofilm formé sur copeaux d'acier inoxydable pré-souillées avec du lait que sur les lames d'acier inoxydable non souillées. Il a également été noté que Spec - Tak 1000 un traitement à 70 °C pendant 10 minutes et rincer à l'eau chaude dans la première étape de la procédure de CIP permet d'éliminer efficacement les cellules de *B.cereus* en biofilm sur des surfaces d'acier inoxydables pré-souillées avec du lait (**Peng *et al.*, 2002**).

Les problèmes causés par les constructions de l'équipement et des matériaux ne peuvent pas être éliminés avec CIP, parce que le traitement CIP n'a pas été conçu pour éliminer les biofilms (**Czechoski et banner, 1990; Brackett. 1992; Chisti et Moo-Young, 1994; Zottola et Sasahara, 1994; Wirtanen *et al.*, 1997**).

En 2013 une étude été menée par Faille et ses collaborateurs pour évaluer comment les conditions rencontrées pendant le nettoyage en place (NEP) influent sur les spores, et comment les procédures affectent leurs propriétés de surface, leur viabilité et leur capacité à contaminer les matériaux. Les spores provenant de cinq souches de *Bacillus cereus* ont été traitées avec du NaOH à haute température. Les résultats ont révélé que les températures élevées (supérieures à 60°C) et les concentrations de NaOH (plus de 0,5 %) ont été nécessaires pour réduire de manière significative la viabilité des spores. Dans ces conditions, des modifications ont également été clairement observées en microscopie à diverses structures de spores (appendices, exosporium). Par conséquent, la capacité des spores viables à adhérer a diminué pour la majorité des souches testées. Ensuite les spores en suspension dans NaOH pourraient adhérer à des surfaces du pilote du CIP et que le niveau de contamination a été contrôlé par modèle d'écoulement. Par conséquent, la ré-adhérence le long de la ligne de traitement peut se produire au cours des procédures CIP et ce phénomène doit être pris en compte lors de la définition des stratégies de nettoyage il n'a pas été possible de lier de manière significative les différences observées concernant la résistance des spores au cisaillement à leurs propriétés morphologiques ou physico-chimiques de surface (**Faille *et al.*, 2013**).

L'incorporation d'une étape de désinfectant dans le CIP ne semble pas améliorer l'élimination du biofilm. Cette étude a montré que l'efficacité d'un CIP standard peut

Partie III : résultats et discussion

éventuellement être renforcée par l'essai et l'utilisation de mélanges caustiques et acides. Il existe de nombreuses implications de ces résultats, y compris : l'augmentation des régimes de nettoyage permet l'amélioration de la qualité des produits, la performance de l'usine, et le rendement économique (**Philip et al., 2006**). .

Selon Tauveron et ses collaborateurs(2006) l'utilisation de NaOH 1% à 75°C dans des conditions dynamiques a induit le détachement de l'ordre de 99% des spores adhérentes et suggèrent un rôle principal de la taille des spores : les plus grandes spores sont les moins résistantes au nettoyage (**Tauveron et al., 2006**).

Faille et ses collaborateurs, 2013 supposent que les différences dans les propriétés physico-chimiques de spores ne sont pas suffisantes dans les espèces de *B. cereus*, mais suffisantes entre des espèces de *Bacillus* (par exemple entre *B. cereus* et *B. subtilis*) pour conduire à une résistance différente de nettoyage.

Faille et ces collaborateurs, 2013 émettent l'hypothèse que NaOH modifierait la surface des spores, soit en dissolvant les protéines ou la solubilisation des polysaccharides, affectant ainsi l'interaction entre la spore et le substrat. Ces modifications de la surface conduisent à l'affaiblissement de l'adhérence des spores au substrat.

Des travaux ont montré la possible ré-adhérence des spores détachés pendant le CIP (**Le Gentil et al., 2010**), et que les modifications de la surface de spores induites par les conditions environnementales peuvent affecter leurs propriétés d'adhérence (**Faille et al., 2007**) .

Selon Faille et ces collaborateurs (2010b) la température seule ne peut endommager les spores de *B. cereus*. En effet, un traitement de 10 min à 85°C n'a pas réussi à affecter les propriétés de surface ou de l'adhérence d'une spore *B. cereus*.

Un traitement avec la soude à 0,5% à 60°C a induit des appendices constamment endommagés: des appendices minces n'étaient plus détectables et des appendices de 10 nm sont devenus frisés. En augmentant la concentration de NaOH (2%) et la température (80°C) les spores ont été endommagées : tous les appendices ont été perdus, et l'exosporium parut froissé mais pas perturbé (**Faille et al., 2010b**).

Partie III : résultats et discussion

NaOH chaude peut également modifier les propriétés physico-chimiques telles que l'hydrophobie, qui joue un rôle majeur dans l'adhésion des spores (**Rönner *et al.*, 1990; Wiencek *et al.*, 1991 ; Faille *et al.*, 2002**).

Les spores de *Bacillus cereus* adhérentes représentent une partie significative de la contamination de surface de l'équipement de traitement utilisé dans l'industrie laitière. Comme les spores germées perdent leurs capacités de résistance instantanément, une étape de germination efficace avant un nettoyage dans le traitement pourrait augmenter l'effet de la désinfection. Des spores de *B. cereus* ont été évaluées pour leur comportement de germination lorsqu'elles sont adhérentes à une surface en acier inoxydable. Un mélange de l-alanine et l'inosine a initié la germination des spores adhérentes de manière efficace. Cette étape de germination avant un nettoyage permet de réduire le nombre de survivants avec plus de 3 log, tandis qu'un traitement alcalin seul, dans le cadre du nettoyage n'a pas montré d'effet sur la viabilité des spores de *B. cereus*. Ces résultats montrent que la mise en œuvre d'une étape de germination augmente l'effet de désinfection et de nettoyage en place (**Honstra *et al.*, 2007**).

Lequette et ses collaborateurs, (2010) ont utilisé sept protéases et polysaccharidases pour éliminer les isolats des biofilms bactériens de 16 espèces provenant de l'industrie alimentaire. Les enzymes protéolytiques ont montré un effet de réduction plus élevé pour un grand nombre d'espèces bactériennes que les polysaccharidases.

Les protéases font partie de la composition des détergents commercialisés. En outre, les amylases sont largement utilisées dans la formulation des détergents enzymatiques, principalement pour éliminer les résidus alimentaires des aliments riches en amidon. La protéase de *Bacillus licheniformis* a la capacité d'éliminer le biofilm formé par *B. cereus* et *P. aeruginosa* (**Morvay *et al.*, 2011**).

Lequette et ces collaborateurs. (2010), dans une étude sur l'élimination enzymatique du biofilm formé par 25 espèces bactériennes, y compris *B. cereus* et *P. fluorescens*, ont trouvé que l'efficacité des enzymes dépend de l'espèce bactérienne: les protéases étaient plus efficaces que les polysaccharidases contre le biofilm de *Bacillus*, tandis que les enzymes dégradant les polysaccharides sont plus efficaces dans l'élimination des biofilms de *P. fluorescens*. Cette différence peut être due à des variations dans la composition des polymères extracellulaires dans le biofilm.

Partie III : résultats et discussion

Il est, cependant difficile de trouver le mélange d'enzymes idéal qui soit efficace contre tous les types de biofilms. Les formulations contenant plusieurs enzymes différentes peuvent être nécessaires pour réussir (**Meyer, 2003**).

Les causes probables d'inefficacité des procédés de nettoyage sont les suivantes:

a) la faible concentration des solutions alcalines, b) la solution alcaline sans l'addition d'agents complexant ou des agents actifs caustiques, c) l'absence de lavage à l'acide, et d) le pH élevé de la solution de chlore.

L'industrie laitière doit soigneusement évaluer son SSOP (Sanitation Standard Operating Procedures), en se concentrant sur les étapes du pré-rinçage avec de l'eau, l'utilisation des détergents (alcalins et acides), le post-rinçage avec de l'eau, et l'utilisation de désinfectants. Le SSOP doit inclure les informations adéquates sur la concentration, l'heure et la température des applications de nettoyage et de désinfection (**Salustiano et al., 2010**).

Pour lutter contre les biofilms à *Bacillus*, l'industrie laitière doit mettre l'accent sur la façon de mener des procédures de nettoyage et de désinfection, tel que le contrôle du pH, les concentrations de réactifs à utiliser, les températures et les temps d'exposition des solutions. En outre, il est important d'établir un processus de suivi pour évaluer les mesures correctives qui peuvent être réalisées si nécessaire (**Salustiano et al., 2010**).

Bien que facile à mettre en œuvre et permettant d'avoir une reproductibilité des résultats, ce protocole repose sur l'utilisation de méthodes classiques de microbiologie lourdes et ayant des délais de réponse plus ou moins longs. Nous avons donc cherché dans la suite de l'étude à optimiser ce protocole, notamment dans le caractère in situ ainsi que dans les délais d'attente des résultats.

Conclusion générale

Conclusion générale

La production d'aliments sains destinés à la consommation humaine est un enjeu majeur pour les industriels. Cette production fait appel à des processus plus ou moins complexes : collecte des matières premières, processing, distribution, stockage, vente au détail, etc. Chaque étape de ce processus est capitale et doit être maîtrisée afin d'éviter toute forme de contamination. Dans ce contexte, la contamination microbienne des surfaces reste un problème d'actualité dans de nombreux secteurs d'industries agro-alimentaires. Pour réduire ou éliminer les germes pathogènes ou d'altération, des actions correctives basées sur les bonnes pratiques de nettoyage qui doivent assurer l'élimination des souillures micro et macroscopiques des surfaces. L'utilisation d'agents antimicrobiens est régulièrement pratiquée avec plus ou moins d'efficacité.

Le nettoyage des surfaces peut s'avérer complexe. Il dépend de plusieurs paramètres liés à la conception des équipements, au produit alimentaire traité et à la nature des contaminations qui régissent notamment le comportement des microorganismes au contact des surfaces. Le contrôle et la validation des procédés de nettoyage et désinfection (nature et concentration du détergent, durée de contact, températures, action mécanique) ont donc une importance capitale.

Dans le cadre de cette thèse les résultats obtenus montrent que la caractérisation physicochimique par la méthode MATS et par la mesure du potentiel zéta des spores de *Bacillus cereus* a révélé la présence des spores avec des caractères d'affinité au solvant très différent. Certaines sont très hydrophile, d'autres moyennement hydrophile et d'autres encore moyennement hydrophobes. Les spores ont été trouvées chargées négativement à pH 7.

D'autre part, l'observation des spores au microscope électronique à transmission et la détermination du nombre et de la longueur des appendices ainsi que la surface de la spore et de l'exosporium par le logiciel Image J montrent que l'adhésion des spores est affectée par la présence d'un exosporium, par le nombre et la taille des appendices. La surface de la spore et de l'exosporium influent également sur l'adhésion des spores étudiées

L'étude de l'effet de cinq protocoles de nettoyage et désinfection sur les deux spores de *Bacillus cereus* étudiées adhérentes à l'acier inoxydable (une spore hydrophobe et l'autre hydrophile) a montré l'influence marquée de la température et du temps de contact. L'augmentation de la concentration de l'agent chimique n'entraîne qu'un léger effet. Une variante du protocole 2 (*Pré-rinçage à température ambiante. Application de NaOH à 2% 10min/70°C, Rinçage intermédiaire. Application produit commercial : 0,8%, 2% et 5% / 5,10 et 15 min / 60, 70 et 80°C. Rinçage final : eau à température ambiante*) peut être recommandée: en utilisant des concentrations

Conclusion générale

et des températures faibles par rapport aux autres protocoles, l'action sur les spores reste la même. Par ailleurs et d'après les valeurs des réductions logarithmiques, il a été observé que l'étape de désinfection n'a pas augmenté de façon significative l'effet du nettoyage.

Pour être accompli, ce travail mérite d'être poursuivi par une identification des souches par les techniques de biologie moléculaires telles que : PanC, M13 RAPD, REP PCR et PFGE, et la validation des résultats sur une plate-forme pilote en conditions dynamiques.

Afin de minimiser l'impact sur l'environnement, il serait intéressant d'explorer des techniques alternatives permettant de limiter les quantités des détergents utilisés, et de proposer des détergents moins polluants. Le couplage avec des techniques physiques serait également une voie à prospecter.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Absolom D. R., Lamberti F. V., Policova Z., Zingg W., van Oss C. J., Neu A. W. 1983.** Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 90–97.
2. **Afchain A. L., Carlin F., Nguyen-The C., Albert I. 2008.** Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurized and chilled foods. *Int. J. Food Microbiol.* **128**: 165-173.
3. **Afnor. 2005.** Norme NF/EN/ISO 7932 [Version 2004] : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présumptifs - Technique par comptage des colonies à 30 °C.
4. **Agarwal S., Sharma K., Swanson B. G., Yuksel G. U., Clark S. 2006.** Nonstarter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **89**:1452-1466.
5. **Ahmad I., Wigren E., Le Guyon S., Vekkei S., Blanka A., El Mouali Y., Anwar N., Chuah M.L., Lunsdorf H., Frank R., Rhen M., Liang Z. X., Lindqvist Y., Romling U. 2013.** The EAL-like protein STM1697 regulates virulence phenotypes, motility and biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **90**: 1216-1232.
6. **Allion A.2004.** Mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens. Thèse de Doctorat l'ENSA sciences alimentaires.
7. **Allison D. G. 2003.** The biofilm matrix. *Biofouling.* **19**: 139–150.
8. **Allison D. G., Gilbert P. 1992.** Bacterial biofilms. *Science Progress.* **76**: 305–321.
9. **Allison D.G., Sutherland I.W. 1987.** The role of exopolysaccharides in adhesion of fresh water bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1319-1327.
10. **Andersson A., Ronner U., Granum P.E. 1995.** What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.* **28**: 145–155.
11. **Ankolekar C., Labbe´ R.G. 2010.** Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 982-984.
12. **Antoniou A., Frank J. F. 2005.** Removal of *Pseudomonas putida* and associated extracellular polymeric substances from stainless steel by alkali cleaning. *J. Food Prot.* **68**: 277–281.

Références bibliographiques

13. **Anwar H., Dasgupta M., Costerton J. W. 1990.** Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2043–2046.
14. **Ash C., Farrow J. A. E., Dorsh M., Stackebrandt E., Collins M.D. 1991.** Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst Bacteriol.* **41**: 343-346.
15. **Ashraf M. A., Ullah S., Ahmad I., Qureshi A. K., Balkhair K. S., Abdur Rehman M. 2014.** Green biocides, a promising technology: current and future applications to industry and industrial processes. *J. Sci. Food Agric.* **94**:388-403.
16. **Austin J .W., Bergeron G.1995.** Development of bacterial biofilms in dairy processing plants. *J. Dairy.Res.* **62**: 509–519.
17. **Baillif S., Hartmann D., Freney J., Kodjikian L.2010.**Implant intraoculaire et adhésion bactérienne: influence des conditions environnementale, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal français d’ophtalmologie.***33**:210-221.
18. **Bandara H. M., Lam O.L., Jin L.J., Samaranayake L.2012.** Microbial chemical signaling: a current perspective. *Crit Rev Microbiol* .**38**: 217-49.
19. **Banin E., Vasil M. L., Greenberg E. P. 2005.** Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:11076-11081.
20. **Belmar-Beney M .T., Fryer P J. 1992.** Bulk and surface effects on the initial stages of whey fouling. *Food and Bioproducts Processing.* **70**: 193-199.
21. **Berg J.D., Matin A., Roberts P. V. 1982.** Effect of the antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 814–818.
22. **Black J. G. 1993** .*Microbiology, Principles and Applications*, 2nd Edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
23. **Boonaert C. J., Rouxhet P. G. 2000.** Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2548-2554.
24. **Bos R., Mei H. C., Busscher H. J. 1999.**Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions–its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 179-230.

Références bibliographiques

25. **Boulangé-Petermann L., Jullien C., Dubois P. E., Benezech T., Faille C. 2004.** Influence of surface chemistry on the hygienic status of industrial stainless steel. *Biofouling*. **20**:25–33.
26. **Boulangé-Petermann L., Rault J., Bellon-Fontaine M. N. 1997.** Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling*. **11**: 201–216.
27. **Boyd R. D., Cole D., Rowe D., Verran J., Coultas S. J., Paul A. J., West R. H., Goddard D. T. 2000.** *J Adhes Sci Technol*. **14**: 1195–1201.
28. **Brackett R. E. 1992.** Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. *J. Food Prot*. **55**: 808–814.
29. **Bremer P. J., Fillery S., McQuillan A. J. 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.
30. **Briandet R., Leriche V., Carpentier B., Bellon-Fontaine M. N. 1999.** Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *J. Food Prot*. **62**: 994–998.
31. **Buhr T. L., McPherson D.C., Gutting B. W. 2008.** Analysis of broth-cultured *Bacillus atrophaeus* and *Bacillus cereus* spores. *J. Appl. Microbiol.* **105**: 1604–1613.
32. **Burgess S.A., Lindsay D., Steve H., Flint. 2010.** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *Int. J. Food Microbiol*. **144**: 215–225.
33. **Busscher H. J., Weerkamp A. H., van der Mei H. C., van Pelt A. W. J., De Jong H. P., Arends J. 1984.** Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol*. **48**: 980–983.
34. **Bylund G. 1995.** Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund: 436.
35. **CAPP-INFO, Bulletin d’information du CAPP (Contact Avis Pharmacologique et Pharmaceutique), HUG (Hôpitaux universitaires de Genève) .2007.** n°46, juin. <http://www.hug-ge.ch/Pharmacie/infomedic/cappinfo/cappinfo46.pdf>.
36. **Carlin F., Fricker M., Pielaat A., Heisterkamp S., Shaheen R., Salkinoja-Salonen M. S. 2006.** Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol*. **109**: 132-138.
37. **Carlin F., Brillard J., Broussole V., Clavel T., Dupont C., Jobin M., Guinebretière M. H., Auger S., Sorokine A., Nguyen-Thé C. 2009.** Adaptation of *Bacillus cereus*,

Références bibliographiques

- an ubiquitous world wide distributed food borne pathogen, to a changing environment. *Food Res Inter.* **43**: 1885-1894.
38. **Carlson C. R., Caugant D. A., Kolsto A. B. 1994.** Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Appl Environ Microbiol.* **60**:1719-1725.
 39. **Carpentier B., Cerf O. 1993.** A review: Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 499–511.
 40. **Cerf O. 2002.** Risques bactériens liés aux produits laitiers. *Revue Française des Laboratoires.* 2002:67-69.
 41. **Chae M. S., Schraft H., Truelstrup L., Mackereth R. 2006.** Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiol.* **23**: 250–259.
 42. **Changani S. D., Belmar-Beiny M. T., Fryer P. J. 1997.** Engineering and chemical factors associated with fouling and cleaning in milk processing. *Exp. Therm. Fluid Sci.* **14**: 392– 406.
 43. **Characklis W. G., Cooksey K. E. 1983.** Biofilms and microbial fouling. *Adv. Appl Microbiol.* **29**: 93–138.
 44. **Characklis W. G., Marshall K. C. 1990.** Biofilms. John Wiley, New York, USA.
 45. **Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M. N., Hebraud M. 2002.** *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. *Appl. Environ. Microbiol.* P: 728–737.
 46. **Chen G. 2012.** Escherichia coli adhesion to abiotic surfaces in the presence of nonionic surfactants. *Journal of Adhesion Science and Technology.* **17**:2131-2139.
 47. **Chen L., Coolbear T., Daniel R. 2004.** Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *Int. Dairy J.* **14**: 495–504.
 48. **Chen L., Daniel R. M., Coolbear T. 2003.** Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int Dairy J.* **13**: 255–275.
 49. **Cherif A., Brusetti L., Borin S., Rizzi A., Boudabous A., Khyami-Horani H., Daffonchio D. 2003.** Genetic relationship in the *Bacillus cereus* group by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J Appl Microbiol.* **94**:1108-1119.

Références bibliographiques

50. **Chisti Y., Moo-Young M. 1994.** Cleaning-in-place systems for industrial bioreactors: design, validation and operations. *J. Ind. Microbiol.* **13**: 201–207.
51. **Chisti Y. 1999.** Modern systems of plant cleaning. In: Robinson, R., Batt, C., Patel, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, London. pp: 1086–1815.
52. **Choi N.C., Park S. J., Lee C. G., Park J. A., Kim S. B. 2011.** Influence of surfactants on bacterial adhesion to metal oxide-coated surfaces. *Environmental Engineering Research.* **16**:219-225.
53. **Cicalini S., Palmieri F., Petrosillo N. 2004.** Clinical review: new technologies for prevention of intravascular catheter-related infections. *Crit. Care* .**8**:157–162.
54. **Cloete T. E., Jacobs L., Brozel V. S. 1998.** The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation.* **9**: 23–37.
55. **Cloete, T. E., Jacobs L. 2001.** Surfactants and the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to 3CR12 stainless steel and glass. *Water SA.* **27**: 21–26.
56. **Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. 1995.** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.
57. **Costerton J. W., Lappin-Scott H. M. 1989.** Behavior of bacteria in biofilms. *Am. Soc. Microbiol. News.* **55**: 650–654.
58. **Craven S. E., Blankenship L. 1987.** Changes in the hydrophobic characteristics of *Clostridium perfringens* spores and spore coats by heat. *Can. J. Microbiol.* **33**: 773-776.
59. **Czechowski M. H., Banner M. 1990.** Control of biofilms in breweries through cleaning and sanitizing. *Techn. Quart. Mast. Brew. Ass. Am.* **293**: 86–88.
60. **Das J. R., Bhakoo M., Jones M.V., Gilbert P. 1998.** Changes in the biocide susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* cells associated with rapid attachment to plastic surfaces. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 852–858.
61. **Davey M.E., O'Toole G. A. 2000.** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**: 847–867.
62. **Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W., Greenberg E. P. 1998.** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* **280**: 295–298.
63. **De Jonghe V., Coorevits A., De Block J., Van Coillie E., Grijspeerdt K., Herman L., Heyndrickx M. 2010.** Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* **136**: 318-325.

Références bibliographiques

64. **de Kievit T. R., Kakai Y., Register J. K., Pesci E. C., Iglewski B. H. 2002.** Role of the *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in rhlI regulation. *FEMS Microbiol Lett.* **212**: 101-6.
65. **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. 2009.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition., Volume Three, The Firmicutes.* Springer, New York, USA.
66. **Dogan B., Boor K .J. 2003.** Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 130–138.
67. **Donlan R. M. 2002.** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases.* **8**: 881–890.
68. **Dosti B., Guzel-Seydim Z., Greene A. K. 2005.** Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. *Int. J. Dairy Technol.* **58**: 19–24.
69. **Doyle R. J. 2000.** Contribution of the hydrophobic effect to microbial adhesion. *Microbes Infect.* **2**:391–400.
70. **Doyle R. J., Nedjat-Haiem F., Singh J. S. 1984.** Hydrophobic characteristics of *Bacillus* spores. *Curr. Microbiol.* **10**: 329-332.
71. **Dufour M., Simmonds R. S., Bremer P. J. 2004.** Development of a laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of “natural” antimicrobials against dairy biofilms. *J. Food Prot.* **67**: 1438–1443.
72. **Dunne W. M. 2002.** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 155–166.
73. **Dupuis C., Tardif R., Verge J., Drapeau R., Hébert J.2003.** Ouvrage : Sciences et technologie du lait.
74. **Eginton P. J., Holah J., Allison D. G., Handley P. S., Gilbert P. 1998.** Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. *Lett. Appl. Microbio.* **27**: 101–105.
75. **Eide M. H., Homleid J. P., Mattsson B. 2003.** Life cycle assessment (LCA) of cleaning in- place processes in dairies. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie- .Food. Sci. Technol.* **36**: 303-314.
76. **Everett J. A., Rumbaugh K. P. 2015.** Biofilms, Qorum Sensing and Crosstalk in Medically important Microbes. *Molecular Medical Microbiology.*

Références bibliographiques

77. **Faille C., Bénézech T., Blé W., Ronse A., Ronse G., Clarisse M., Slomianny C. 2013.** Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. *Food. Microbiol.* **33**: 149-157.
78. **Faille C., Dennin L., Bellon-Fontaine M. N., Bénézech T. 1999.** Cleanability of stainless steel surfaces soiled by *Bacillus thuringiensis* spores under various flow conditions. *Biofouling.* **14**: 143-151.
79. **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.
80. **Faille C., Jullien C., Fontaine F., Bellon-Fontaine M.N., Slomianny C., Bénézech T. 2002.** Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can. J. Microbiol.* **48**: 728-738.
81. **Faille C., Lequette Y., Ronse A., Slomianny C., Garénaux E., Guerardel Y. 2010b.** Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* **143**:125–135.
82. **Faille C., Sylla Y., Le Gentil C., Bénézech T., Slomianny C., Lequette Y. 2010a.** Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure. Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. *Food. Microbiol.* **27**:769–776.
83. **Faille C., Tauveron G., Le Gentil-Lelièvre C., Slomianny C. 2007.** Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *J. Food Prot.* **70**: 2346-2353.
84. **Fatemi P., Frank J. F. 1999.** Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas fluorescens* biofilms by peracid sanitizers. *J. Food Prot.* **62**: 761–765.
85. **Ferreira C., Pereira A. M., Pereira M. C. 2011.** Biofilm control with new microparticles with new immobilized biocide. In M. R. Malayeri, H. Müller-Steinhagen, & A. P. Watkinson (Eds.). Proceedings of international conference on heat exchanger fouling and cleaning Crete Island, Greece. Vol. (pp. 174-179).
86. **Flemming H. C., Neu T. R., Wozniak D. J. 2007.** The EPS matrix: the “house of biofilm cells.” *J. Bacteriol.* **189**:7945–7947.
87. **Fletcher M. 1976.** The effects of proteins on bacterial attachment to polystyrene. *J. Gen. Microbiol.* **94**: 400-404.
88. **Fletcher M., Loeb G. 1979.** *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:67–72.

Références bibliographiques

89. **Flint S., Palmer J., Bloemen K., Brooks J., Crawford R. 2001.** The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *J. Appl. Microbiol.* **90**:151–157.
90. **Flint S. H., Bremer P. J., Brooks J.D. 1997.** Biofilms in dairy manufacturing plant—description, current concerns and methods of control. *Biofouling* .**11**: 81– 97.
91. **Flint S. H., van den Elzen H., Brooks J.D., Bremer P. J. 1999.** Removal and inactivation of thermo-resistant streptococci colonising stainless steel. *Int. Dairy J.* **9**: 429–436.
92. **Foley I., Gilbert P. 1996.** Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling*. **10**: 331–346.
93. **Frank J. F., Koffi R. A. 1990.** Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* **53**: 550-554.
94. **Frank J. F. 2001.** Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Adv. Food. Nutr. Res.* **43**: 319-369.
95. **Fromm H. I., Boor K. J. 2006.** Characterization of Pasteurized Fluid Milk Shelf-life Attributes. *J. Food Sci.* **69**: 207-214.
96. **Furukawa S., Akiyoshi Y., O'Toole G .A., Ogihara H., Morinaga Y. 2009.** Sugar fatty acid esters inhibit biofilm formation by food-borne pathogenic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **138**: 179-180.
97. **Galopin E., Piret G., Szunerits S., Lequette Y., Faille C., Boukherroub R. 2009.** Selective adhesion of bacillus cereus spores on heterogeneously wetted silicon nanowires. *Langmuir.* **26**: 3479-3484.
98. **Gelinas P., Goulet J. 1983.** Effectiveness of 8 disinfectants on 3 types of contaminated surfaces in *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **29**:1715–1730.
99. **Genigeorgis C. 1995.** Biofilm: Their significance to cleaning in the meat sector. In: BURT, S. A. AND BAUER, F. (Eds), *New Challenges in Meat Hygiene: Specific problems in cleaning and disinfection*, Ecceamst, European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and technology. pp. 29-47
100. **Gentry H., Cope S. 2005.** Using silver to reduce catheter-associated urinary tract infections. *Nurs. Stand.* **19**:51–54.
101. **Giarouris E., Chapot-Chartier M. P., Briandet R .2009.** Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus Lactis* strains reveals the existence of hydrophobic

Références bibliographiques

- and low charged strains with altered adhesive properties. *Int. J. Food Microbiol.* **131**:2-9.
102. **Gilbert P., Evans D. J., Brown M. R. W. 1991.** Surface properties of Gram-negative bacteria in relation to growth and dispersal of biofilm (Abstr.). *Biofouling.* **4**: 238–238.
103. **Gilbert P., Jones M. V., Allison D. G., Heys S., Maira T., Wood P. 1998.** The use of poloxamer hydrogels for the assessment of biofilm susceptibility towards biocide treatments. *J. Appl Microbiol.* **85**:985–990.
104. **Gilbert P., Maira-Litran T., McBain A.J., Rickard A.H., Whyte F.W. 2002.** The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol.* **46**:202–256.
105. **Gould W. A. 1994.** Current good manufacturing practices: Food Plant Sanitation. 2nd edn CTI Publications, Inc., Baltimore. pp: 189–215.
106. **Gram L., Bagge-Ravn D., Ng Y. Y., Gyomai P., Vogel B. F. 2007.** Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* **18**: 1165–1171.
107. **Green P. N. 1993.** Efficacy of biocides on laboratory generated *Legionella* biofilms. *Lett Appl. Microbiol.* **17**: 158–161.
108. **Greenberg E. P. 2003.** Bacterial communication: tiny teamwork. *Nature.* **424**: 134.
109. **Guinebretière M.H., Thompson F.L., 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**: 851-65.
110. **Guinebretière M. H., Auger S., Galleron N., Contzen M., De Sarrau B., De Buyser M. L., Lamberet G., Fagerlund A., Granum P. E., Lereclus D., De Vos P., Nguyen-The C., Sorokin A. 2013.** *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol.* **63**:31-40.
111. **Hadjiev D., Dimitrov D., Martinov M., Sire O. 2007.** Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning. *Enzyme . Microbial Technol.* **40**: 840–848.
112. **Hancock I. C. 1991.** Microbial cell surface architecture. In: *Microbial Cell Surface Analysis.* VCH Publishers, Weinheim Federal Republic of Germany. Pp: 23–59.

Références bibliographiques

113. **Harbron R. S., Kent C. A. 1988.** Aspects of cell adhesion. In L. F. Melo, T. R. Bott, & C. A. Bernardo (Eds.), NATO ASI series, Vol. **145** : 125–140.
114. **Hashimoto H. 2001.** Evaluation of the anti-biofilm effect of a new antibacterial silver citrate/lecithin coating in an in-vitro experimental system using a modified robins device. *J. Jp. Assoc. Inf. Dis* .**75**: 678–685.
115. **Hawser S. P., Douglas L. J. 1995.** Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 2128 – 2131.
116. **Helgason E., Caugant D., Lecadet M. M., Chen Y., Mahillon J., Lovgren A., Hegna I., Kvaloy K., Kolsto A. B. 1998.** Genetic diversity of *Bacillus cereus* / *B. thuringiensis* isolates from natural sources. *Curr Microbiol.* **37**: 80-87.
117. **Helgason E., Okstad O. A., Caugant D. A., Johansen H. A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A. B. 2000.** *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2627-2630.
118. **Helgason E., Tourasse N. J., Meistal R., Caugnant D. A., Kolstø A. B. 2004.** Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 191-201.
119. **Henriques A. O., Moran C. P. 2007.** Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 555–588.
120. **Herald P. J., Zottola E. A. 1988 a.** Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. *J. Food Prot.* **51**:445–448.
121. **Herald P. J., Zottola E. A. 1988 b.** Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J. Food Prot.* **53**: 1549–1552, 1562.
122. **Herrera J. J. R., Cabo M. L., Gonzalez A., Pazos I., Pastoriza L. 2007.** Adhesion and detachment kinetics of several strains of strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food. Microbiol.* **24**: 585–591.
123. **Hilbert L. R., Bagge-Ravn D., Kold J., Gram L. 2003.** Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *Int. Biodeter. Biodegrad.* **52**: 175–185.
124. **Hill K. K., Ticknor L. O., Okinaka R. T. 2004.** Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1068-1080.

Références bibliographiques

125. **Hoffman W. 1983.** CIP of straight pipes as a function of surface roughness and other factors. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaftlichen Fakultät der Christian- Albrechts-Universität, Keil.
126. **Holah J. T .1992.** Industrial monitoring: Hygiene in food processing. In: Melo LF, Bott TR, Fletcher M & Capdeville B (Eds) Biofilms – Science and Technology .Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp: 645–659.
127. **Hood S. K., Zottola E. A. 1995 .**Biofilms in food processing. Food Control. **6**: 9–18.
128. **Hornstra L. M., Leeuw P. L. A., Moezelaar R., Wolbert E. J., de Vries Y. P., de Vos Abee T. 2007.** Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. Int. J. Food Microbiol. **116**: 367–371.
129. **Houry A., Briandet R., Aymerich S., Gohar M. 2010.** Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. Microbiol .**156**:1009-1018.
130. **Huck J. R., Sonnen M., Boor K. J. 2008.** Tracking heat-resistant, coldthriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product J. Dairy Sci. **91**:1218 –1228.
131. **Huck J. R., Woodcock N. H., Ralyea R. D., Boor K. J. 2007.** Molecular subtyping and characterization of psychrotolerant endospore-forming bacteria in two New York State fluid milk processing systems. J. Food Prot. **70**: 2354–2364.
132. **Hüsmark U., Rönner U. 1992.** The influence of hydrophobic, electrostatic and 183 morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. Biofouling. **5**:330-334.
133. **Jacquelin L. F., Le Magrex E., Brisset L., Carquin J., Berthet A., Choisy C. 1994.** Synergy effect of enzymes or surfactants in association with a phenolic disinfectant on a bacterial biofilm. Pathol. Biol. **42**: 425–431.
134. **Jahn A., Nielsen P. H. 1998.** Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. Water Sci.Technol. **37**: 17–24.
135. **Jan S. N., Brunet C., Techer C., Le Maréchal A. Z., Koné N., Grosset M. F., Cochet A., Gillard M., Gautier J., Puterflam F., Baron. 2011.** Biodiversity of psychrotrophic bacteria of the *Bacillus cereus* group collected on farm and in egg product industry. Dairy processing. Int. J. Food Microbiol. **144**: 215-225.
136. **Jayaraman A., Wood T. K. 2008.** Bacterial quorum sensing: Signals, circuits, and implications for biofilms and disease. Ann. Rev. Biomed .Eng. **10**: 145–167.
137. **Joffin J. N., Leyral G. 2006.** Microbiologie Technique. Tome 1, dictionnaire des techniques. Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine, France.
138. **Jones G. W., Isaacson R. E. 1983.** Proteinaceous bacterial adhesions and their receptors. CRC Crit. Rev. Microbiol. **10**:229–260.

Références bibliographiques

139. **Jones J. G., Pickup R.W. 1989.** The effect of organic carbon supply in water on the antibiotic resistance of bacteria. *Aqua*. **33**: 131–135.
140. **Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J. C., Bottero J. Y., Villemin G. 1998.** Chemical and structural (20) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Res.* **29**:1639-47.
141. **Jullien C., Bénézech T., Carpentier B., Lebret V., Faille C. 2003.** Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *J. Food. Eng.* **56**: 77-87.
142. **Jullien C., Bénézech T., Le Gentil C., Boulangé-Petermann L., Dubois P., Tissier J., Traisnel M., Faille C. 2008.** Physico-chemical and hygienic properties modifications of stainless steel surfaces induced by conditioning with food and detergent. *Biofouling* .**24**:163-172.
143. **Kamat A. S., Nerkar D. P., Nair P. M. 1989.** *Bacillus cereus* in some Indian foods, incidence and antibiotics, heat and radiation resistance. *J. Food Saf.* **10**:31–41.
144. **Keim P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S. E., Richmond K., Jackson P. 1997.** Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J. bacteriol.***179**: 818-824.
145. **Khamisse E.2013.** Etude du microbiote susceptible de persister sur les surfaces d'un atelier de la filière viande bovine. *Bacteriol. Agro Paris Tech.*
146. **Kim B. S., Lee C. S., Yun C. Y., Yeo S. M., Park W. M., Kim H. R. 2001.** Characterization and immunological analysis of ferritin from the hemolymph of *Galleria mellonella*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **129**: 501-509.
147. **Kim S. Y., Lee S. E., Kim Y. R., Kim C. M., Ryu P. Y., Choy H. E. 2003.** Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum sensing system. *Mol Microbiol* .**48**:1647-64.
148. **Klavenes A., Stalheim T., Sjøvold O., Kosefsen K., Granum P.E. 2002.** Attachment of *Bacillus cereus* spores with and without appendages to stainless steel surfaces. *Transactions IChemE, Part C Food and Bioproducts Processing* .**80**:312-318.
149. **Klueh U., Wagner V., Kelly S., Johnson A., Bryers J. D. 2000.** Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *J. Biomed. Mater Res* .**53**: 621–631.
150. **Kolter R., Greenberg E. P. 2006.** Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature*. **441**: 300–302.

Références bibliographiques

151. **Koshikawa T., Yamazaki M ., Yoshimi M ., Ogawa S ., Yamada A ., Watabe K ., Torii M . 1989.** Surface hydrophobicity of spores of *Bacillus* spp. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2717–2722.
152. **Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. 2000.** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* **2**:189–198.
153. **Kozuka S., Tochikubo K. 1985.** Properties and origin of filamentous appendages on spores of *Bacillus cereus*. *Microbiol. Immunol.* **29**: 21-37.
154. **Kramer J. M., Gilbert R. J. 1989.** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: M.P. Doyle (editor) *Foodborne Bacterial Pathogens*, Marcel Dekker, New York and Basel, pp. 21-70.
155. **Kreske A. C., Ryu J. H., Pettigrew C. A., Beuchat L. R. 2006.** Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial produce sanitizer to *Bacillus cereus* and *Pseudomonas* in a liquid detergent, on stainless steel, and in biofilm. *J. Food Prot.***14**: 2621–2634.
156. **Kuda T., Yano T., Kuda M. T. 2008.** Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. *LWT – Food. Sci.Technol.* **41**: 988–993.
157. **Kumar C.G., Anand S. K. 1998.** Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **42**:9–27.
158. **Kutima P.M., Foegeding P.M. 1987.** Involvement of the spore coat in germination of *Bacillus cereus* T spores. *Appl. Environ. Microbiol.***53**: 47-52.
159. **Lambert N.2010.**Lutte biologique aux ravageurs : applicacité au Québec.
160. **Lapidot A., Romling U., Yaron S. 2006.** Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. *Int. J. Food Microbiol.* **109**: 229–233.
161. **Lappin-Scott H. M., Costerton J. W., Marrie T.J. 1992.** Biofilms and biofouling. *In* J. Lederberg (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego. p:277-284.
162. **Larsen H. D., Jorgensen K. 1999.** Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. *Int. J. Food Microbiol.* **46**:173–176.
163. **Larson E. L., Morton H. E. 1991.** Alcohols. In: Block S.S. (ed.): *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 4th Ed. Lea & Febiger, London: 204–224.
164. **Lasa I. 2006.** Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int. Microbiol.* **9**: 21–28.

Références bibliographiques

165. **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.
166. **Lechevallier M. W., Cawathon C. D., Lee R. G.1998.** Factors Promoting Survival of Bacteria in Chlorinated Water Supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:649-654.
167. **Leclercq-Perlat M. N., Lalande M. 1994.** Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. *J. Food. Eng.* **23**: 501±517.
168. **Lee S. H., Frank J. F. 1991.** Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes*. Hypochlorite and heat. *J. Food Prot.* **54**: 4–6.
169. **Lelieveld H.L.M.1985.**Hygienic design and test methods. *J. Soc. Dairy Technol.* **38**: 14–16.
170. **Lelievre C., Antonini G., Faille C., Benezech T. 2002.** Cleaning-in-place—modelling of cleaning kinetics of pipes soiled by bacillus spores assuming a process combining removal and deposition. *Food Bioprod. Process.* **80**: 305– 311.
171. **Lelievre C., Faille C., Benezech T. 2001.** Removal kinetics of *Bacillus cereus* spores from stainless steel pipes under CIP procedure: influence of soiling and cleaning conditions. *J. Food Process Eng.* **24**: 359– 379.
172. **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 – 431.
173. **Lequette Y., Garénaux E., Combrouse T., Lima Dias T. D., Ronse A., Slomianny C., Faille C. 2011.** Domains of BclA, the major surface glycoprotein of the *B. cereus* exosporium: glycosylation patterns and role in spore surface properties. *Biofouling.***27**: 751-761.
174. **Leyral G., Vierling E. 2007.**Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire ; Biosciences et techniques. Wolters Kluwer , France.
175. **Lindahl M., Faris A., Wadström T., Hjertèn S .1981.** A new test based on ‘salting out’ to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochimica et biophysica acta .* **667**:471-476.
176. **Lindback T., Mols M., Basset C., Granum P. E., Kuipers O. P., Kovacs A. T. 2012.** CodY, a pleiotropic regulator, influences multicellular behaviour and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*. *Environ. Microbiol.* **14**: 2233-2246.

Références bibliographiques

177. **Lindsay D., Brözel V. S., Mostert J. F., Von Holy A. 2002.** Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single and binary biofilms of a dairy associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 352–361.
178. **Lindsay D., Brözel V. S., von Holy A. 2006.** Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation. *J. Food Prot.* **69**: 1168–1172.
179. **Ljungh A., Hjerten S., Wadström T. 1985.** High surface hydrophobicity of autoaggregating *Staphylococcus aureus* strains isolated from human infections studied with the salt aggregation test. *Infect. Immun.* **47**: 522-526.
180. **Lomander A., Schreuders P., Russek-Cohen E., Ali L. 2004.** Evaluation of chlorines impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. *Bioresour. Technol.* **94**: 275–283.
181. **Ma L., Conover M., Lu H., Parsek M. R., Bayles K., Wozniak D. J. 2009.** Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* **5**: e1000354.
182. **Mafu A.A., Roy D., Goulet J., Savoie L., Roy R. 1990.** « Efficiency of Sanitizing Agents for Destroying *Listeria monocytogenes* on Contaminated Surfaces ». *J. Dairy Sci.* **73**: 3428- 3432.
183. **Magnusson M.A., Christiansson B., Svensson. 2007.** *Bacillus cereus* Spores during Housing of Dairy Cows: Factors Affecting Contamination of Raw Milk. *J. Dairy Sci.* 2745–27.
184. **Mah T.F., O'Toole G. A. 2001.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends. Microbiol.* **9**: 34–39.
185. **Maris P. 1995.** Modes of action of disinfectants. In : *Disinfectants : actions and applications.*
186. **Marques S. C., Rezende J. G. O. S., Alves L. A. F., Silva B. C., Alves E., Abreu L. R. 2007.** Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian J. Microbiol.* **38**: 538–543.
187. **Marshall K. C., Stout R., Mitchell R. 1971.** Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **68**: 337–348.
188. **Massicotte R .2009.** Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes fondamentaux. Édition : La Direction des communications du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec.

Références bibliographiques

189. **Mattila-Sandholm T., Wirtanen G. 1992.** Biofilm formation in the industry: A Review. *Food Rev. Inter.* **8**: 573-603.
190. **Matz L. L., Beaman T. C., Gerhardt P. 1970.** Chemical composition of exosporium from spores *Bacillus cereus*. *J.Microbiol.* **10**: 329-332.
191. **Mazas M., Gonzalez I., Lopez M., Gonzalez J., Sarmiento R. 1995.** Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *Inter. J. food Sci. technol.* **30**:71-78.
192. **McIntyre L., Bernard K., Beniac D., Judith L., Renton I., Naseby D.C. 2008.** Identification of *Bacillus cereus* Group Species Associated with Food Poisoning Outbreaks in British Columbia, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7451–7453.
193. **Meng-Ying L., Zhang Ji1 L. U., Peng Z. J. L., XU Jing-Liang X., Shun-Peng L.2009.** Evaluation of Biological Characteristics of Bacteria Contributing to Biofilm Formation. *Pedosphere.* **19**: 554–561.
194. **Meyer B. 2003.** Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Inter. Biodeterior. Biodegrad.* **51**: 249 – 253.
195. **Millsap K. W., Reid G., van der Mei H. C., Busscher H. J. 1997.** Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow. *Biomater.* **18**: 87–91.
196. **Monds R. D., Newell P. D., Gross R. H., O'Toole G. A. 2007.** Phosphate dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol.* **63**:656-679.
197. **Morton L. H. G., Greenway D. L. A., Gaylarde C. C., Surman S. B. 1998.** Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Inter Biodeterior. Biodegrad.* **41**: 247–259.
198. **Morvay A. A., Decun M., Sala C., Morar A., Galbenu-Morvay P .L. 2011.** The Ability of *Bacillus licheniformis* Protease to Remove *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine.* **68**.
199. **Mosteller T. M., Bishop J. R. 1993.** Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *J. Food Prot.* **56**: 34– 41.
200. **Muatapha A., Liewen M. B. 1989.** Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers. *J. Food Prot.* **52**: 306-311.
201. **Muller R., Eidt A., Hiller K.A., Katzur V., Subat M., Schweikl H., Imazato S., Ruhl S., Schamlz G. 2009.** Influences of protein films on antibacterial or bacteria-

Références bibliographiques

- repellent surface coatings in a model system using silicon wafers. *Biomater.* **30**: 4921-4929.
202. **Neu T. R. 1996.** Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* **60**: 151-166.
203. **Neyret C., Herry J .M., Meylheuc T., Dubois-Brissonnet F. 2014.** Plant-derived compounds as natural antimicrobials to control paper mill biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 87-96.
204. **Nitschke M.,Costa S.G.V.A.O.2007.**Biosurfactants in food industry. *Food science and Technologie.* **18**: 225-259.
205. **Norwood D. E., Gilmour A. 2000.** The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 512–520.
206. **Ntsama-Essomba C., Boutier S., Ramaldes M., Dubois-Brissonnet F., Fourniat J. 1997.** Resistance of *Escherichia coli* growing as biofilms to disinfectants. *Veterinary. Res.* **28**: 353–363.
207. **Olofsson A. C., Hermansson M., Elwing H. 2003.** *N*-Acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4814–4822.
208. **Olofsson A. C., Hermansson M., Elwing H. 2005.** Use of a Quartz Crystal Microbalance to Investigate the Antiadhesive Potential of *N*-Acetyl-L-Cysteine. *Appl. Environ. Microbiol.* P: 2705–2712.
209. **Ortega M. P., Hagiwara T., Watanabe H., Sakiyama T. 2010.** Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. *Food Control.* **21**:573–578.
210. **O'Toole G., Kaplan H. B., Kolter R. 2000.** Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev . Microbiol.* **54**: 49-79.
211. **O'Toole G. A., Kolter R. 1998.** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**: 295-304.
212. **Otto M. 2013.** Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* **64**:175-88.
213. **Oulahal N., Brice W., Martial A., Degraeve P. 2008.** Quantitative analysis of survival *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: propylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control.* **19**: 178–185.

Références bibliographiques

214. **Oulahal-Lagsir N., Martial-Gros A., Bonneau M., Blum L. J. 2003.** “*Escherichia coli*-milk” biofilm removal from stainless steel surfaces: synergism between ultrasonic waves and enzymes. *Biofouling*. 19: 159–168.
215. **Palmer J., Flint S., Brooks J. 2007.** Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 577–588.
216. **Pan Y., Breidt F., Kathariou S. 2006.** Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7711–7717.
217. **Park A. I., Daeschel M. A., Zhao Y. 2004.** Functional properties of antimicrobial lysozyme–chitosan composite films. *J. Food. Saf.* **69**: 215–221.
218. **Parsek M. R., Greenberg E. P. 2005.** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends. Microbiol.* **13**: 27–33.
219. **Patel J. D., Ebert M., Ward R., Anderson J. M. 2007.** *S. epidermidis* biofilm formation: effects of biomaterial surface chemistry and serum proteins. *J. Biomed. Mater. Res A.* **80**: 742–751.
220. **Pedersen K. 1990.** Biofilm development of stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Water. Res.* **24**: 239-243.
221. **Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C. 2001.** Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* **65**: 105–111.
222. **Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C. 2002.** Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* **77**: 11–18.
223. **Philip J., Bremer A., Suzanne Fillery A., McQuillan J. 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.
224. **Pitt W. G., McBride M. O., Lunceford J. K., Roper R. J. Sagers R. 1994.** Ultrasonic enhancement of Antibiotic Action on Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents . Chemother.* **38**: 2577- 2582.
225. **Poole K. 2001.** Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:255-264.
226. **Poulsen L. V. 1999.** Microbial Biofilm in Food Processing. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **32**: 321-326.
227. **Pratt L. A., Kolter R. 1998.** Genetic analysis of *Escherichia Coli* biofilm formation : roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**: 285-293.

Références bibliographiques

228. **Ranieri M. L., Boor K. J. 2009.** Bacterial ecology of high-temperature, shorttime pasteurized milk processed in the United States. *J. Dairy Sci.* **92**: 4833–4840.
229. **Ranieri M. L., Boor K. J. 2010.** Tracking and eliminating spore formers in dairy systems. *Aust. J. Dairy Technol.* **65**:74–80.
230. **Renner L. D., Weibel D .B. 2011.** Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS bulletin/Mater. Res. Society.* **365**: 347–355.
231. **Renner L.D., Weibel D B. 2011.** Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS bull/Mater Research Soc.* **36**: 347–355.
232. **Reyes J. E., Bastías J. M.,Gutiérrez M. R., Rodríguez M. L. 2007.** Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiol.* **24**:1-6.
233. **Reyes-Ramirez A., Ibarra J. E. 2005.** Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequencebased PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1346-1355.
234. **Robbins J. B., Fisher C. W., Moltz A. G., Martin S. E. 2005.** Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms with ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *J. Food Prot.* **68**: 494–498.
235. **Romney A. J. D. 1990.** *Cip: Cleaning in Place.* The Society for Dairy Technology, Cambridge shire, UK.
236. **Rönner U., Hüsmark U., Henriksson A. 1990.** Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 550-556.
237. **Rosenberg E., Gottlieb A., Rosenberg E. 1983.** Inhibition of bacteria adherence to hydrocarbons and epithelial cells by emulsan. *Infect. Immun.* **39**: 1024-1028.
238. **Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. 1980.** Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 29–33.
239. **Rosenberg M., Kjelleberg S. 1986.** Hydrophobic interactions role in bacterial adhesion. *Adv. Microbiol. Ecol.* **9**: 353–393.
240. **Rosmaninho R., Santos O., Nylander T., Paulsson M., Muller-Steinhagen H., Melo L. 2007.** Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling – evaluation of fouling by milk components. *J. Food. Eng.* **80**: 1176–1187.
241. **Rossmore H. W. 1995.** Introduction to biocide use. In H. W. Rossmore (Ed.), *Handbook of biocide and preservative use* .pp: 1–18.

Références bibliographiques

242. **Rubio C. 2002.** Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Thèse, Université Paris 6. 213 p.
243. **Rupp C. J., Fux C. A., Stoodley P. 2005.** Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2175– 2178.
244. **Rutherford S.T., Bassler B. L. 2012.** Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* .2:a012427.
245. **Ryu J. H., Beuchat L. R. 2005.** Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J. Food Prot.* **68**: 2614–2622.
246. **Salustiano V. C., Andrade N.J., Ribeiro J. I., Fernandes P. E., Lopes J. P., Bernardes P. C., Portugal J. G. 2010.** Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedures used in dairy plants. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia.* **62**:1478-1483.
247. **Sand W., Gehrke T. 1999.** Analysis and function of the EPS from the strong acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. In: Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C.(eds) *Microbial extracellular polymeric substances.* Springer-Verlag, Berlin. 127-141.
248. **Sauer K., Camper A. K. 2001.** Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* **183**: 6579–6589.
249. **Schlegelová J., Babák V., Holasová M., Konstantinová L., Necidová L., Šišák F., Vlková H., Roubal P., Jaglic Z. 2010.** Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech J. Food Sci.* **28**: 450–461.
250. **Scott S. A., Brooks J. D., Rakonjac J., Walker K. M. R., Flint S. H. 2007.** Formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder". *Inter. J. Dairy Technol:* **60**: 109–117.
251. **Seale R. B., Flint S. H., McQuillan A. J., Bremer P. J. 2008.** Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 731–737.

Références bibliographiques

252. **Sequiera C. A. C., Carrasquinho P. M. N. A., Cebola C. M. 1988** Control of microbial corrosion in cooling water systems by the use of biocides. In: Sequiera C.A.C., Tiller A.K. (eds): Microbial Corrosion 1. Elsevier Appl.Sci. Essex: 240–255.
253. **Sharma M., Anand S. K. 2002.** Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy industry – a case. Food Control. **13**: 469–477.
254. **Shea C., Nunley J. W., Williamson J. C., Smith-Sommerville H. E. 1991.** Comparison of the adhesion properties of *Deleya marina* and the exopolysaccharide-defective mutant strain DMR. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 3107–3113.
255. **Sheng X. X., Ting Y. P., Pehkonen S. O. 2007.** Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. J. Colloid. Interface. Sci. **310**: 661–669.
256. **Shin N. R., Lee D. Y., Shin S. J., Kim K. S., Yoo H. S. 2004.** Regulation of proinflammatory mediator production in RAW264.7 macrophage by *Vibrio vulnificus* luxS and smcR. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **41**:169-76.
257. **Simões M., Bennett R. N., Rosa E. A. S. 2009.** Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. Natural Product Reports. **26**: 746–757.
258. **Simões M., Pereira M. O., Vieira M. J. 2005.** Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. Water Res. **39**: 5142–5152.
259. **Simões M., Sillankorva S., Pereira M. O., Azeredo J., Vieira M. J. 2007.** The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. Biofouling. **24**: 249–258.
260. **Simões M., Simões L. C., Cleto S., Pereira M. O., Vieira M. J. 2008.** The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. Int. J. Food Microbiol. **121**: 335–341.
261. **Simões M., Simões L. C., Machado I., Pereira M. O., Vieira M. J. 2006.** Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. Food and Bioproducts Processing. **84**: 338–345.
262. **Simões M., Simões L.C., Vieira M.J.2010.** A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT - Food Sci. Technol. **43**:573–583.
263. **Singh P. K., Parsek M. R., Greenberg E. P., Welsh M. J. 2002.** A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature. **417**:552-555.
264. **Smirnova T. A., Kulinich L., Gal’perin I., Yu M., Azizbekyan P. P. 1989.** *Mikrobiologiya*. **58**: 835–840.

Références bibliographiques

265. **Smoot L. M., Pierson M. D. 1998.** Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to Buna-N rubber and stainless steel. *J. Food Prot.* **61**:1286–1292.
266. **Smyth C. J., Jonsson P., Olsson E., Söderlind O., Rosengren J., Hjertèn S., Wadström T. 1978.** Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with or without K 88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography. *Infection and Immunity.* **22**:462-472.
267. **Somers E. B., Wong A. C. 2004.** Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue. *J. Food Prot.* **67**:2218–2229.
268. **Sorokin A., Candelon B., Guilloux K., Galleron N., Wackerow-Kouzova N., Ehrlich S .D., Bourguet D, 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. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 1569-1578.
269. **Spenceley H., Dow C. S., Holah J. T. 1992.** Development of mixed culture biofilms on stainless steel. In: Melo, L.F., Bott T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. (Eds.), *Biofilms-Science and Technology.* Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. pp: 395–402.
270. **Speranza G., Gottardi G., Pederzoli C., Lunelli L., Canteri R., Pasquardini L., Carli E., Lui A., Maniglio D., Brugnara M., Anderle M. 2004.** Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomater.* **25**: 2029– 2037.
271. **Splendiani A., Livingston A. G., Nicolella C. 2006.** Control membrane-attached biofilms using surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* **94**: 15–23.
272. **Spoering A. S., Lewis K. 2001.** Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* **183**: 6746–6751.
273. **Stalheim T., Granum P. E. 2001.** *J Appl Microbiol.* **91**: 839–845.
274. **Stanley P.M. 1983.** Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. J. Microbiol.* **29**:1493–1499.
275. **Stenström A. T. 1989.** Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 142–147.

Références bibliographiques

276. **Stepanovic S., Circovic I., Mijac V., Švabic´-Vlahovic´ M. 2003.** Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol.* **20**: 339–343.
277. **Stewart J.C., Seiberling D. A. 1996.** The secrets out: clean in place. *Chem. Eng.* **103**:72–79.
278. **Stoodley P., Lewandowski Z., Boyle J. D., Lappin-Scott H. M. 1999.** Influence of hydrodynamic conditions and nutrients on biofilm structure. *J. Appl Microbiol.* **85**: 19S–28S.
279. **Stoodley P., Sauer K., Davies D. G., Costerton J. W. 2002.** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* **56**:187–209.
280. **Sundberg M., Christiansson A., Lindahl C., Wahlund L., Birgersson C. 2011.** Cleaning effectiveness of chlorine-free detergents for use on dairy farms. *J. Dairy. Res.* **78**: 105-110.
281. **Sutherland I. W. 2001.** The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends. Microbiol.* **9**: 222–227.
282. **Takumi K., Kinouchi T., Kawata T. 1979.** Isolation and partial characterization of exosporium from spores of a highly sporogenic mutant of *Clostridium botulinum* type A. *Microbiol. Immunol.* **28**:443-454.
283. **Tamine A. Y., Robinson R. K. 1999.** *Yoghurt: Science and Technology.* Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.
284. **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.
285. **te Giffel M. C., Wagendorp A., Herrewegh A., Driehuis F. 2002.** Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81**:625–630.
286. **Thomas D. J., Morgan J. A, Whipps J. M., Saunders J. R. 2000.** Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 118-124.
287. **Thompson L. S., Webb J .S., Rice S. A., Kjelleberg S. 2005.** The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene *rhlI* in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* **220**:187-195.
288. **Ticknor L. O., Kolsto A. B., Hill K. K., Keim P., Laker M. T., Tonks M., Jackson P. J. 2001.** Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of

Références bibliographiques

- Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Soil Isolates. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 4863-4873.
289. **Troller J. A. 1993.** Sanitation in food Processing. Academic Press, San Diego: 30: 263–286.
290. **Trueman J. R. 1971.** The Halogens. In : Inhibition and Destruction of the Microbial Cell. Hugo W.B.ed Academic press, London. pp: 137-183.
291. **Valerie A. C., De Jonghe., 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 dairy farms. Syst. Appl. Microbiol . **31**: 126–140.
292. **Valle A., Bailey M .J., Whiteley A. S., Manefield. 2004.** “N-Acyl-l-Homoserine Lactones (AHLs) Affect Microbial Community Composition and Function in Activated Sludge”. Environ. Biol. **6**: 424-433.
293. **Van Heddeghem A., Vlaemyneck G. 1992.** Sources of contamination of milk with *Bacillus cereus* on the farm and in the factory. Bull. Int. Dairy Fed. **275**: 19-22.
294. **Van Loosdrecht M. C .M., Norde W., Zehnder A. J. B. 1990.** Physical and chemical description of bacterial adhesion. J. Biomaterial Appl. **5**: 91–106.
295. **Vander Auwera G. A., Timmery S., Hoton F., Mahillon J. 2007.** Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. Int. J. Food Microbiol. **113**:164-172.
296. **Vidal D. R., Ragot C., Thibault F. 1997.** Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. Annales Pharmaceutiques Françaises. **55**: 49–54.
297. **Vieira M. J., Melo L., Pinheiro M. M. 1993.** Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. Biofouling. **7**: 67–80.
298. **Vincent J. 1999.** La chimie du nettoyage. In: Leveau, J.Y., Bouix, M., (Eds.), Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries (Collection STAA), Paris.
299. **Vlokova H., Barak V., Seydlova R., Pavlik I., Schlegelova J.2008.** Biofilms and Hygiene on Dairy Farms and in the Dairy Industry: Sanitation Chemical Products and their Effectiveness on Biofilms – a Review. **26**: 309–323.
300. **Waak E., Tham W., Danielsson-Tham M. L. 2002.** Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm tanks and in dairy plant receiving tanks. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 3366–3370.

Références bibliographiques

301. **Walencka E., Rozalska S., Sadowska B., Rozalska B. 2008.** The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiologica*. **53**: 61–66.
302. **Walton J. T., Hill D. J., Protheroe R. G., Nevill A., Gibson H. 2008.** Investigation into the effect of detergents on disinfectant susceptibility of attached *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **105**: 309-315.
303. **Watterson M. J., Kent D. J., Boor K. J., Wiedmann M., Martin N. H. 2014.** Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *J. Dairy Sci.* **97**: 2487–2497.
304. **Weng Y. M., Chen M. J., Chen W. 1999.** Antimicrobial food packing materials from poly(ethylene-co-methacrylic acid). *LWT – Food. Sci. Technol.* **32**: 191–195.
305. **Whitehead K. A., Collington J. S., Verran J. 2004.** The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies, using ion beam sputtering technology. *Inter. Biodeterior. Biodegrad.* **54**: 143–151.
306. **Whitehead K. A., Collington J., Verran J. 2005.** Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **41**: 129–138.
307. **Whitehead K. A., Verran J. 2006.** The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food Bioproducts Processing* **84**: 253–259.
308. **Whitekettle W. K. 1991.** Effects of surface-active chemicals on microbial adhesion. *J. ind. Microbiol.* **7**: 105-116.
309. **Wiencek K. M., Klapes N. A., Foegeding P. M. 1990.** Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* Spores. *Appl. Environ. Microbiol.* P: 2600-2605.
310. **Wiencek K. M., Klapes N. A., Foegeding P. M. 1991.** Adhesion of *Bacillus* spores to inanimate materials: effects of substratum and spore hydrophobicity. *Biofouling.* **3**: 139-149.
311. **Wijman J., De Leeuw P., Moezelaar R., Zwietering M., Abee T. 2007.** Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1481-1488.
312. **Wilson D. I. 2005.** Challenges in cleaning: recent developments and future prospects. *Heat Transfer Engineering.* **26**: 51–59.
313. **Wingender J., Neu T. R., Flemming H. C. 1999.** What are bacterial extracellular polymeric substances? In J. Wingender, T. R. Neu, & H.-C. Flemming (Eds.),

Références bibliographiques

- Microbial extracellular polymeric substances – Characterization, structure and function.pp: 1–19.
314. **Wirtanen G. 1995.** Biofilm Formation and its Elimination from Food Processing Equipment. VTT Publications 251, Espoo: 106.
315. **Wirtanen G., Ahola H., Mattila-Sandholm T. 1995.** Evaluation of cleaning procedures in elimination of biofilm from stainless steel surfaces in open process equipment. Transactions in International Chemical Engineering. **73:** 1-9.
316. **Wirtanen G., Juvonen R. 2002:** Disinfectant efficacy on spoilage yeasts isolated from various food processes. In: Wilson D.I., Fryer P.J., Hastings A.P.M. (eds.): Fouling, Cleaning and Disinfection in Food Processing. City Services Design and Print, Cambridge: 189–196.
317. **Wirtanen G., Mattila-Sandholm T. 1992.** Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. Part II. Lebensm.-Wiss. Technol. **25:** 50–54.
318. **Wirtanen G., Saarela M., Mattila-Sandholm T. 2000.** Biofilms – impact on hygiene in food industries. In J. D. Bryers (Ed.), Biofilms II: Process analysis and applications .pp: 327–372.
319. **Wirtanen G., Salo S. 2003.** Disinfection in food processing efficacy testing of disinfectants. Rev. Environ. Sci. Bio/Technol. **2:** 293–306.
320. **Wirtanen G., Salo S. 2005.** Improper dairy hygiene – Case studies on poor microbial ecology in the Nordic DairyNET project. In: 36th R3 – Nordic Symposium and 5th European Parenteral Conference of ESPC, 23–25, Linköping: 171–182.
321. **Wirtanen G., Salo S., Maukonen J., Bredholt S., Mattila- Sandholm T. 1997** NordFood Sanitation in dairies, VTT Publications 309. Espoo, VTT Offsetpaino.47 pp.
322. **Wirthlin M. R., Chen P. K., Hoover C. I. 2005.** A laboratory model biofilm fermenter: design and initial trial on a single species biofilm. J. Periodontology. **9:** 1443–1449.
323. **Wong A. C. L. 1998.** Biofilms in food processing environments. J. Dairy Sci. **81:** 2765-2770.
324. **Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H.2014.** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. Can. J. Veterinary. Res. **78:**110-116.

Références bibliographiques

325. **Zeraik A. E., Nitschke M. 2010.** Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogeni bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. *Curr. Microbiol.* **61**:554-559.
326. **Zhao Q., Liu Y.2006.** Modification of stainless steel surfaces by electroless Ni-P and small amount of PTFE to minimize bacterial adhesion. *J. Food. Eng.* **72**: 266–272.
327. **Zhao T., Doyle M. P., Zhao P. 2004.** Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3996–4003.
328. **Ziane M., Desriac N., Le Chevalier P., Couvert O., Moussa-Boudjemaa B., Leguerinel I .2014.** Identification, heat resistance and growth potential of mesophilic spore-forming bacteria isolated from Algerian retail packaged couscous. *Food Control.* **45**: 16-21.
329. **Zottola A. E., Sasahara K. C. 1994.** Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern?. *Int. J. Food Microbiol.* **23**:125-148.

ANNEXES

Annexes

Annexe 01 :

Annexe 01 : Préparation des milieux de cultures utilisés et de quelques réactifs

Milieux gélosés

Gélose nutritive :	
Peptone	15
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	02g
Chlorure de sodium	05g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

pH =6,8-7,4

Luria –Bertani agar

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu Mossel de base	
Extrait de viande	01g
Peptone	10g
D-Mannitol	10g
Chlorure de sodium	10g
Rouge phénol.....	0.025g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH =7,2-/+0.2

Annexes

Emulsion de jaune d'œuf

Dans un flacon stérile, récupérez le jaune d'œuf- après avoir flambée la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes- ensuite ajoutez 4 fois le volume en eau distillée stérile ,mélangez rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C ensuite au réfrigérateur pendant 24 heure.

Le milieu Mossel au jaune d'œuf
Milieu Mossel de base 90 ml
Emulsion de jaune d'œuf 10ml

Gélose viande-foie
Extrait de viande 10 g
Peptone 20 g
Extrait de levure 10 g
Glucose 05 g
Agar 15 g
Eau distillée 1000 ml

pH = 7,6

Gélose à la caséine
Caséine 05g
Agar 01,5g
Eau distillée 100ml

Gélose à amidon
Gélose nutritive 100ml
Amidon 01g

Gélose au sang
Caséine 05g
Agar 01,5g
Eau distillée 100ml

Annexes

Milieux liquides

Bouillon nutritif	
Peptone	15,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Chlorure de sodium	6,0 g
D(-) glucose.....	1,0g
Eau distillée	1000ml

pH = 7,2 ± 0,2.

Bouillon nitraté.....	
Nitrate de sodium NaNO ₃	10 g
Infusion cœur cervelle	25 g
Eau distillée	1000ml

pH =7,2

Bouillon TSE (tryptone sel eau).....	
Tryptone	1 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée	1000ml

Bouillon TSB

Tryptone	17,0 g.
Peptone papainique de soja	3,0 g.
Glucose	2,5g.
Sels biliaires	1,5g.
Chlorure de sodium	5,0g.
Phosphate dipotassique	4,0g.
Novobiocine	0,020g.
Eau distillée	1000 ml

pH =7,4 ± 0,2.

Annexes

Les réactifs

Réactif A : Solution d'acide sulfanilique

Acide sulfanilique 8 g

Acide acétique 5N 1000ml

Conserver le réactif A à température ambiante pendant 3 mois, dans l'obscurité.....

Réactif B : Solution α -naphtylamine

N, N-diméthyl-1-naphtylamine 6 g

Acide acétique 5N 1000ml

Réactif B Conserver entre 2 et 8 ° C pendant 3 mois, dans l'obscurité

Annexes

Annexe 02 :

Principe

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Composition de la galerie

La composition de la galerie API 20 E est reportée dans le Tableau de Lecture.

Réactifs et matériel

- API NaCl 0,85 % Medium, 5 ml (Réf. 20 230) ou API Suspension Medium, 5 ml (Réf. 20 150)
- API 20 E coffret de réactifs (Réf. 20 120) ou réactifs individuels : TDA (Réf. 70 402) JAMES (Réf. 70 542) ; VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422) ; NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
- Réactif Zn (Réf. 70 380) ; - Oxydase (Réf. 55 635) ; - Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Catalogue Analytique API 20 E (Réf. 20 190) ou logiciel d'identification **apiweb TM** (Réf. 40 011)

Tableau des Caractères de la Galerie API20E

Caractère	Substrat	Enzyme	Produit(s) formé(s)	indicateur	Réactif(s) ajouté(s)	Lecture +	Lecture -
ONPG	ONPG	ONPG-hydrolase β-galactosidase	ONP (jaune) galactose	/	/	Jaune	Incolore (1)
ADH	Arginine	Arginine Dihydrolase (ADH)	Ornithine NH ₃ CO ₂	RP	/	Rouge - orange	Jaune (2)
LDC	Lysine	Lysine Décarboxylase (LDC)	Cadavérine CO ₂	RP	/	Rouge - orange	Jaune (2)
ODC	Ornithine	Ornithine Décarboxylase (ODC)	Putréscine CO ₂	RP	/	Rouge - orange	Jaune (2)
CIT	Citrate	/	CO ₂ H ₂ O	BBT	/	Bleu	Vert (3)
H₂S	S ₂ O ₃ ²⁻	(Thiosulfate Réductase)	S ²⁻ (H ₂ S)	Fer III	/	Noir	Incolore (jaune pâle)
URE	Urée	Uréase	NH ₄ ⁺ (HCO ₃ ⁻)	RP	/	Rouge	Jaune

Annexes

TDA	Tryptophane	Tryptophane Désaminase (TDA)	Acide indole pyruvique NH ₃	/	TDA / immédiat (Fer III)	Marron Brun	<i>Jaune</i>
IND	Tryptophane	Tryptophanase	Indole A. pyruvique NH ₃	/	James / immédiat ou Kovacs / 2min	Rouge	Incolore Jaune
VP	Pyruvate	/	Acétoïne	/	VP1 (KOH) + VP2 (α -naphтол) / 10min	Rouge	<i>Incolore</i> (5)
GEL	Gélatine	Gélatinase	Acides Aminés	/	/	Noir	Incolore (+particules intactes)
GLU	Glucose	/	Acides	BBT	/	Jaune	Bleu ou bleu-vert (4)
SUCRES (AUXAN.)	Man, Ino, Sor, Rha, Sac, Mel, Amy, Ara	/	Acides	BBT	/	Jaune	Bleu ou bleu vert (4)
NO₂⁻ / N₂	NO ₃ ⁻ (cupule GLU)	Nitrate Réductase	NO ₂ ----- N ₂	/	Nit1 + Nit2 / 2min ----- (Zinc)	Rouge ----- Incolore	Incolore ----- Rouge

Annexes

Annexe 03 :

OBA DETARTE AC

Détergent détartrant acide

Description :

OBA DETART AC est un détergent détartrant liquide peu moussant à base d'acide phosphorique, destiné à un grand nombre d'applications dans les industries agroalimentaires.

Propriétés principales :

- **OBA DETART AC** est peu moussant et compatible pour le lavage en NEP et par aspersion.
- **OBA DETART AC** est fortement acide et efficace pour éliminer les souillures minérales.
- **OBA DETART AC** est un détergent liquide qui peut être dosé et contrôlé automatiquement par conductimétrie.

Avantages :

- Très actif pour l'élimination de la plupart des dépôts minéraux, en particulier le carbonate de calcium et le phosphate de calcium, il améliore l'efficacité du nettoyage.
- Ses propriétés antimoussantes permettent son utilisation sous hautes pressions et fortes turbulences, augmentant les performances de nettoyage.
- Adapté à un dosage automatique et un contrôle conductimétrique, pour une distribution uniforme du produit.

Mode d'emploi :

- Utiliser **OBA DETART AC** à des concentrations comprises entre 1 et 6% p/p (0,8 à 5% v/v) et à température allant de 20 à 120°C, en fonction du type d'applications, de la quantité et de la nature du tartre.
- **OBA DETART AC** doit être rincé complètement après utilisation afin d'éliminer tout résidu des surfaces au contact des denrées alimentaires.

Données techniques :

- | | |
|-------------------------------------|------------------------|
| · Aspect | Liquide clair incolore |
| · Densité relative à 20°C | 1,18 |
| · pH à 1% (solution à 20°C) | 2 |
| · Demande Chimique en Oxygène (DCO) | 5 g O ₂ /Kg |

Annexes

· Teneur en Azote (N)	0
· Teneur en Phosphore (P)	88 g/Kg
· OBA DETART AC (% p/p)	Conductivité spécifique à 25°C (mS/cm)
o 1	4,5
o 2	7,0
o 3	9,5
o 4	11,6
o 5	13,3

Les données ci-dessus sont les caractéristiques d'une production moyenne et ne doivent pas être prises comme spécifications.

Annexes

Méthode de dosage :

- Sur une prise d'essai de 10ml de solution d'**OBAGEN CL** à titrer, ajout de 2ml de thiosulfate de sodium 0,1N, puis 3 gouttes de phénolphtaléine.
- Titrer par HCl 0,1N jusqu'au virage.
- Concentration en **OBAGEN CL** (en g/L) = V HCl 0,1N x 6,9

Propriétés désinfectantes :

- Bactéricide à 0,1% selon T72301 en 5mn à 20°C en eau dure à 30°F.
 - Efficace sur *Listeria monocytogenes* à 0,1% selon NFT 72151.
 - Efficace sur *Salmonella typhi* à 0,05% selon NFT 72151.
 - Activité levuricide vis-à-vis de *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bailli*, *Turoloopsis dattila* à 0,2% selon NFT 72200 (10mn à 20°C).
 - Efficace sur *Candida parapsilosis* à 2,5% en 5mn à 20°C en eau dure à 25°F.
- Activité fongicide à 3% selon NFT 72200 (15mn à 20°C)
- Activité virucide à 0,75% vis-à-vis des bactériophages.

Annexes

OBASTERIL BC

Désinfectant acide pour les circuits en industries agroalimentaires

DESCRIPTION

OBASTERIL BC est un désinfectant conçu spécialement pour une utilisation couplée avec la phase acide dans un système de nettoyage en place (C.I.P) entraînant ainsi des économies de temps et d'eau de rinçage.

OBASTERIL BC est un désinfectant puissant à base d'un composé du biguanide utilisable à faible dose, remarquablement efficace pour la désinfection de tout matériel, circuit et surface en industrie laitière, fromagerie, beurrerie ...etc

CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

- Aspect : liquide incolore
- Densité : $1,006 \pm 0,005$
- pH du produit pur à 20°C : $3,3 \pm 0,5$
- Aisément miscible à l'eau
- Non moussant, il peut être utilisé à chaud jusqu'à une température de 80°C
- Facilement rinçable
- Bonne stabilité dans les conditions normale de stockage
- **OBASTERIL BC** s'utilise en solution dans l'eau ou en mélange avec un détartrant acide

EFFICACITE BACTERIOLOGIQUE

A une concentration de 0,1 à 0,5%,

OBASTERIL BC est efficace sur les souches suivantes :

Bactéries gram+ et gram – tels que :

Staphylococcus Aureus ; Escherichia Coli ; Pseudomonas Aéruginosa, Sarcina luteae

Moisissures tel que :

Penicillium ; Aspergillus sp

Levures tels que

Candida tropicalis ; Candida albicans

APPLICATIONS

OBASTERIL BC s'utilise en solution aqueuse par pulvérisation, trempage, circulation

Il peut être utilisé de deux manières différentes :

Annexes

En désinfection

Selon les séquences suivantes

- 1 - Nettoyage alcalin / acide
- 2 - Rinçage à l'eau
- 3 – Désinfection avec **OBASTERIL BC**
- 4 – Rinçage final à l'eau potable

En désinfection couplée avec nettoyage acide :

Dans ce cas, après le rinçage de la séquence basique, **OBASTERIL BC** peut être associé à la séquence acide en suivant le mode opératoire suivant :

- 1 - Charger l'eau froide dans la cuve de lancement
- 2 - Mettre l'agitation en route
- 3 – Charger le détartrant acide
- 4 – Ajouter **OBASTERIL BC**
- 5 – Laisser sous agitation un certain temps pour obtenir un mélange homogène (Appliquer impérativement cet ordre pour éviter de provoquer des projections d'acide)

PARAMETRES D'UTILISATION

- Concentration :
 - 3 à 5 g/l en désinfection
 - 1 à 3 g/l en désinfection couplée avec nettoyage acide
- Température : jusqu'à 80°C
- Temps de contact : 5 à 15 minutes

Annexes

Annexe 04

Souches	Morphotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Résultats d'identification
S1	MP1	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S2	MP3	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S3	MP2	+	+	+	±	+	+	+	A	+	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S4	MP2	-	+	-	-	+	-	+	A	+	+						
S5	MP3	-	+	-	-	+	-	+	A	+	+						
S6	MP3	-	+	+	-	+	-	-	A	-	+						
S7	MP1	-	+	-	-	+	+	-	A	-	+						
S8	MP2	+	+	+	+	+++	+	-	A	++	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S9	MP4	+	+	+	+	+	+	-	A	-	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S10	MP1	++	+	+	±	+++	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus</i>

Annexes

																	<i>Bacillus cereus</i>
S11	MP3	++	+	+	+	+	-	+	A	+++	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S12	MP2	++	+	+	-	++	+	+	A	+++	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S13	MP2	++	+	+	+	++	+	+	A	+++	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S14	MP1	++	+	+	±	+	+	-	A	+++	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S15	MP4	++	+	+	+	+++	+	+	A	+++	-	-	+	±	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S16	MP3	++	+	-	+	+++	+	-	A	+++	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S17	MP2	++	+	+	+	+	+	-	A	-	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S18	MP2	+	+	+	+	±	+	-	A	+	-	-	+	±	-	±	<i>Bacillus cereus</i>
S19	MP2	++	+	+	+	+	+	-	A	++	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S20	MP4	-	+	-	-	±	-	-	A	+	+						
S21	MP3	-	+	-	-	±	+	-	A	-	+						
S22	MP2	-	+	-	-	-±	+	-	A	+	+						
S23	MP1	-	-	-	-	-±	+	-	A	+	+						
S24	MP2	-	-	-	-	±	-	+	A	+	+						
S25	MP1	-	+	-	-	±	-	+	A	+	+						
S26	MP4	-	-	+	+	+	-	-	A	+++	+						

Annexes

S27	MP3	-	+	-	-	+	-	-	A	+	+							
S28	MP2	-	-	+	-	+	-	-	A	++	+							
S29	MP2	-	-	-	-	+	-	-	A	+	+							
S30	MP4	-	-	+	-	±	-	-	A	++	+							
S31	MP1	-	-	+	-	+	+	-	A	+	+							
S32	MP3	-	+	-	-	+	+	-	A	-	+							
S33	MP2	-	+	-	-	+	+	-	A	+	+							
S34	MP1	-	+	-	-	+	-	-	A	+	+							
S35	MP4	++	+	+	+	+++	+	-	A	+++	-	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S36	MP1	-	+	-	-	+	-	+	A	+	+							
S37	MP3	++	+	+	±	+	+	+	A	+++	-	-	+	+	-	+		<i>Bacillus cereus</i>
S38	MP2	++	+	+	±	+++	+	+	A	+++	-	-	+	+	-	+		<i>Bacillus cereus</i>
S39	MP2	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+		<i>Bacillus cereus</i>
S40	MP2	+	+	+	+	+	+	+	A	-	-	+	+	+	+	+		<i>Bacillus cereus</i>
S41	MP2	++	+	+	-	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+		<i>Bacillus cereus</i>
S42	MP2	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	+	+	+	+	+		<i>Bacillus cereus</i>
S43	MP2	-	+	-	-	+	-	+	A	-	+							
S44	MP1	+++	+	+	±	+	+	+	A	++	-	-	+	+	-	+		<i>Bacillus cereus</i>

Annexes

S45	MP4	+	+	+	+	+++	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S46	MP3	+	+	+	-	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S47	MP1	+	+	+++	+	+++	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S48	MP2	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S49	MP2	+	+	+	+	±	+	-	A	-	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S50	MP4	+	+	+	+	±	+	-	A	-	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S51	MP1	-	+	-	-	±	-	+	A	+	+						
S52	MP2	-	+	-	-	±	+	+	A	+	+						
S53	MP1	+	+	++	+	±	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S54	MP4	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S55	MP2	+	+	+	+	-	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S56	MP2	-	+	-	-	+	-	+	A	+	+						
S57	MP2	+	+	++	+	++	-	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S58	MP3	+	+	+	±	+++	-	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S59	MP1	+	+	+	+	+++	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>

Annexes

																	<i>cereus</i>
S60	MP1	+	+	+	+	+++	+	-	A	+++	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S61	MP3	+	+	++	+	++	+	-	A	+++	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S62	MP2	-	+	-	-	+	+	+	A	-	+						
S63	MP1	-	-	+	+	+	+	+	A	-	+						
S64	MP2	++	+	+++	+	+	+	+	A	++	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S65	MP3	++	+	+	+	+++	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S66	MP2	++	+	+	+	+++	+	+	A	+++	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S67	MP2	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S68	MP3	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S69	MP1	-	+	-	-	±	+	-	A	+	-						
S70	MP2	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S71	MP2	±	+	+	+	+++	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S72	MP1	+	+	+	+	+++	+	+	A	+++	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S73	MP3	-	-	-	-	+	+		A	+	+						
S74	MP2	+	+	+	+	-	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus</i>

Annexes

																	<i>Bacillus cereus</i>
S75	MP1	++	+	+	+	+	+	+	A	+++	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S76	MP1	+	+	+	+	+	+	+	A	-	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S77	MP1	+	+	-	-	+	+	-	A	+	+	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S78	MP4	++	+	+	±	++	+	+	A	+++	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S79	MP4	-	+	-	+	+	-	+	A	-	+						
S80	MP2	++	+	++	+	+++	-	+	A	+++	-	-	+	±	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S81	MP3	+	+	+	+	+++	+	-	A	++	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S82	MP2	+++	+	+	+	+++	+	-	A	++	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S83	MP1	+++	+	+	+	+++	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S84	MP4	+++	+	++	-	+	+	-	A	++	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S85	MP3	+++	+	+	+	+	+	+	A	++	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S86	MP1	+++	+	+	+	+	+	+	A	+	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S87	MP4	+++	+	+	+	+	+	+	A	++	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>

Annexes

S88	MP3	+++	+	+	+	+	-	+	A	++	-	-	+	+	+	-	<i>Bacillus cereus</i>
S89	MP1	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S90	MP2	+	+	+	±	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S91	MP4	+	+	+	-	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S92	MP1	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S93	MP1	+	+	+	+	+	-	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S94	MP1	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S95	MP3	+	+	+	-	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S96	MP3	+	+	+	++	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S97	MP2	+	+	+	++	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S98	MP1	+	+	++	+	+	+	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S99	MP2	+	+	+++	+	+	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S100	MP3	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>

Annexes

S101	MP1	+	+	+	+	+	+	-	A	-	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S102	MP1	+	+	+	-	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S103	MP3	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S104	MP4	+	+	++	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S105	MP3	+	+	+	+	+	-	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S106	MP1	+	+	+	±	+	+	+	A	-	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S107	MP2	+	+	+	-	+	+	+	A	+	-	+	±	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S108	MP3	+	+	+	+	+	-	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S109	MP1	+	+	++	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S110	MP1	+	+	++	-	+	+	+	A	+	-	-	±	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S111	MP4	+	+	+++	±	+	-	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S112	MP3	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S113	MP2	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>

Annexes

S114	MP1	+	+	+	++	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S115	MP4	+	+	+	-	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S116	MP3	+	+	+	±	+	+	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S117	MP1	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S118	MP2	+	±	+	+	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S119	MP3	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S120	MP1	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S121	MP4	+	+	+	±	+	+	-	A	+	--	-	+	-+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S122	MP3	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S123	MP1	+	+	±	++	+	+	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S124	MP1	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S125	MP4	+	+	+	±	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S126	MP1	+	+	+	-	++	-	-	A	+	-	±	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>

Annexes

S127	MP3	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S128	MP2	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S129	MP2	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S130	MP1	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S131	MP4	+	+	++	-	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S132	MP1	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	--	<i>Bacillus cereus</i>
S133	MP1	+	+	+	±	+	+	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S134	MP3	+	+	+	+	+	-	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S135	MP4	+	+	+	+++	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S136	MP3	+	+	+	++	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S137	MP1	+	+	+	-	+	+	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S138	MP1	+	+	+	+	+	-	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S139	MP1	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>

Annexes

S140	MP2	+	+	++	-	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S141	MP2	+	+	+	++	+	-	-	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S142	MP1	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S143	MP3	+	+	±	-	+	+	-	A	++	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S144	MP3	+	+	+	±	+	+	-	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S145	MP2	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S146	MP3	+	+	+	+	++	+	-	A	+	-	+	+	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
S147	MP3	+	+	++	-	+	-	-	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S148	MP2	+	+	+	+	+	+	-	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S149	MP2	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S150	MP3	+	+	+	+	+	-	+	A	+	-	-	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S151	MP1	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S152	MP3	+	+	+	-	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>

Annexes

S153	MP3	+	+	+	+	+	-	-	A	+	-	+	+	+	-	+	<i>Bacillus cereus</i>
S154	MP3	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>
S155	MP3	+	+	+	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	-	-	<i>Bacillus cereus</i>

(1) ; lecithinase, (2) : Hémolysine, (3) amylase, (4) : caséinase, (5) : catalase, (6) :oxydase,(7) :réduction de nitrate en nitrite,(8) :type respiratoire,(9) : mobilité,(10) :non fermentation du mannitol,(11) :ADH,(12) :GEL,(13) :GLU,(14) : SAC,(15) :AMY,(A) : aérobie.

الملخص

العصوية الشمعية هي نوع من البكتيريا المكونة للبوغ المعروفة بمخاطرها على الصحة. هذه البكتيريا لديها القدرة على الانضمام وتشكيل الأغشية الحيوية على أسطح المعدات الغذائية. وأنشأت أيضا مقاومتها للبيئات الكيميائية و الحرارية الغير المناسبة (المنظفات، البسترة، التعقيم) وفي هذه الأطروحة، اتخذنا في البداية عينات من مواقع مختلفة من خط إنتاج الحليب المبستر لمصنع الألبان من أجل عزل ابواغ هذه البكتيريا. 155 عينة تم عزلها منها 126 منها اتضح انها تنتمي الى نوع العصوية الشمعية

في المرحلة الثانية، التوصيف بواسطة التصاق الميكروبات الى المذيبات وإمكانات زينا للابواغ تبين أن 11 سلالات مكونة للابواغ من أصل 14 كانت محبة للماء و 3 كانت كارهة للماء. وعلاوة على ذلك، تم العثور على شحنة سالبة للجراثيم في درجة الحموضة 7. ملاحظة الابواغ بواسطة المجهر الالكتروني وحساب طول و عدد الزوائد مع سطح البوغ وظهارة البوغ بواسطة الحبكة اعلامية Image J اظهروا ان التصاق الابواغ يتأثر بوجود وظهارة البوغ ، وجود وطول الزوائد. سطح البوغ و وظهارة البوغ تؤثر أيضا على ظاهرة الالتصاق.

في المرحلة الثالثة و الاخيرة اظهرت دراسة تأثير خمسة بروتوكولات التنظيف والتطهير على اثنين من الابواغ لهذه السلالة ذات القدرة على الالتصاق على الفولاذ المقاوم للصدأ (واحدة محبة والأخرى كارهة للماء) تأثير ملحوظ في درجات الحرارة والاتصال من الوقت. زيادة التركيز في العنصر الكيماوي يسبب سوى تأثير طفيف.

التغيير في البروتوكول 2 (بداية الشطف في حرارة معتدلة تطبيق هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 2% لمدة 10د، 70° م. الشطف الوسيط استخدام المنتج التجاري، 0,8%، 2% و 5% لمدة 5 و 10 / 15 و 60، 70 و 80° م. الشطف النهائي الماء في حرارة معتدلة) هو مطلوب: استعمال تراكيز و درجات الحرارة منخفضة مقارنة بالبروتوكولات الأخرى والنتيجة هي نفسها. ي موضع اخر و حسب انخفاض النسب اللوغاريتمية تم ملاحظة ان مرحلة التطهير ساهمة بتأثير طفيف في عملية التنظيف.

الكلمات المفتاحية: العصوية الشمعية ، لامائية و الشحنة الكهربائية، التنظيف والتطهير الحراري-الكيميائي.

Résumé

Bacillus cereus est une bactérie sporulée reconnue pour présenter un risque sanitaire. Cette bactérie a la capacité d'adhérer et de former des biofilms sur les surfaces des équipements agroalimentaires. Sa résistance aux environnements chimiques et thermiques défavorables (détergents, traitement de pasteurisation, stérilisation) est aussi établie.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons dans une première partie effectué des prélèvements à partir de différents sites d'une chaîne de production de lait pasteurisé d'une usine laitière afin d'en isoler des spores de *Bacillus cereus*. 155 isolats ont été obtenus parmi lesquels, 126 se sont révélés appartenant au groupe *Bacillus cereus*.

Dans une deuxième partie, la caractérisation par la méthode MATS et par la mesure du potentiel zéta des spores de *Bacillus cereus* a montré que sur 14 spores testées, 11 spores se sont révélées hydrophiles et 3 hydrophobes. Par ailleurs, les spores ont été trouvées chargées négativement à pH 7. L'observation des spores au microscope électronique à transmission et la détermination du nombre et de la longueur des appendices ainsi que la surface de la spore et de l'exosporium par le logiciel Image J montrent que l'adhésion des spores est affectée par la présence d'un exosporium, par la présence et par la longueur des appendices. La surface de la spore et de l'exosporium influent également sur l'adhésion des spores étudiées.

Dans la troisième et dernière partie, l'étude de l'effet de cinq protocoles de nettoyage et désinfection sur deux spores de *Bacillus cereus* adhérentes à l'acier inoxydable (une spore hydrophobe et l'autre hydrophile) a montré l'influence marquée de la température et du temps de contact. L'augmentation de la concentration de l'agent chimique n'entraîne qu'un léger effet. Une variante du protocole 2 (Pré-rinçage à température ambiante. Application de NaOH à 2% 10min/70°C, Rinçage intermédiaire. Application produit commercial : 0,8%, 2% et 5% / 5,10 et 15 min / 60, 70 et 80°C. Rinçage final : eau à température ambiante) est recommandée: en utilisant des concentrations et des températures faibles par rapport aux autres protocoles, l'action est la même. Par ailleurs et d'après les valeurs des réductions logarithmiques, il a été observé que l'étape de désinfection n'a pas augmenté de façon significative l'effet du nettoyage.

Mots clés : *Bacillus cereus*, hydrophobicité et charge électrique nettoyage et désinfection thermochimique.

Abstract:

Bacillus cereus is a spore-forming bacterium known to present a health risk. This bacterium has the ability to adhere and form biofilms on the surfaces of food equipment. Its resistance to unfavorable chemical and thermal environments (detergents, pasteurization and sterilization) is also established.

As part of this thesis, we have in the first part taken samples from different sites of pasteurized milk production line of a dairy plant in order to isolate *Bacillus cereus* spores. 155 isolates were obtained among them, 126 were found to belong to the *Bacillus cereus* group.

In a second part, the characterization by the MATS method and by measuring the zeta potential of the *Bacillus cereus* spores showed that 14 spores tested, 11 spores proved hydrophilic and 3 hydrophobic. Furthermore, the spores were found negatively charged at pH 7. The observation of spores by transmission electron microscopy and the determination of the number and length of appendages as well as the surface of spore and exosporium by Image J software show that the adhesion of the spores is affected by the presence of an exosporium, by the presence and by the length of the appendages. The surface of the spore and exosporium also influence the adhesion of spores studied.

In the third part, the study of the effect of five cleaning and disinfection protocols on two *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel (hydrophobic and the other hydrophilic spore) showed the strong influence of the temperature and time of contact. Increasing the concentration of the chemical agent causes only a slight effect. A protocol 2 (Pre-rinsing: at room temperature NaOH. Application: 2% 10 min / 70 ° C, intermediate rinsing. Application commercial product: 0.8%, 2% and 5% / 5,10 and 15 min / 60, 70 and 80 ° C. Final rinsing: water at room temperature) is recommended. Using low concentrations and low temperatures compared to other protocols, the effect on adhered spores is the same. Furthermore and according to the log reduction values, it has been observed that the disinfection step did not increase significantly the effect of cleaning.

Keywords: *Bacillus cereus*, hydrophobicity and electrical charge, thermo-chemical cleaning and disinfection.