

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة ابوبكر بلقايد-تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN

كلية علوم الطبيعية والحياة، وعلوم الأرض والكون

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

Département de Biologie



MÉMOIRE

Présenté par

BOUCHENAFI Bilal & AMEUR Ghizlene

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Microbiologie et Contrôle de qualité

Thème

L'effet du conditionnement des surfaces en acier inoxydable par le lait sur la formation du biofilm par des souches de *Bacillus spp.*

Soutenu le 20/06/2022, devant le jury composé de

- | | | | |
|----------------|----------------------|-----|-----------------------|
| • Encadrant | Dr CHERIF ANTAR Asma | MCB | Université de Tlemcen |
| • Président | Dr BELLIFA Samia | MCB | Université de Tlemcen |
| • Examinatrice | Dr BENDIMERAD Nahida | MCB | Université de Tlemcen |

Année universitaire 2021-2022

Remerciements

Merci à Dieu Tout Puissant de nous avoir donné le foie, la force, le courage et la patience afin de terminer ce travail.

En tout premier lieu, nous remercions notre encadrant Dr CHERIF ANTAR Asma enseignante à Institut des sciences et techniques appliquées ISTA, Université de Tlemcen, de nous avoir fait l'honneur d'encadrer et sur tout pour nous avoir soutenu et guidé tout au long de notre travail .sans oublier, sa disponibilité et surtout au patience, qu'il trouve ici l'expression de nos profonde reconnaissance, nous avons beaucoup appris de vous

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

Dr BELLIFA Samia enseignante au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des sciences de la terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire et pour toutes les informations et les conseils qu'elle nous a donnée au cours de nos années universitaires.

Dr BENDIMERAD Nahida enseignante à Institut des sciences et techniques appliquées ISTA, Université de Tlemcen, qui nous a fait l'honneur d'examiner ce modeste travail et participer à la soutenance.

Nous remercions s'adressent à tous les enseignants de la promotion, un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la finalisation de notre travail

Dédicace

Je dédie cet ouvrage.

A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect :
mon cher père.

A ma maman qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'elle trouve ici le
témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mes chers sœurs Wissem, Chaimaa, Fatima Zohra et mes petites sœurs adorables Israa et
Alaa source de joie et de bonheur.

A mon cher cousin adoré Abdallah.

A mes chères tantes Ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la
réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon
parcours je vous aime.

À quelqu'un qui a quitté ma vie et qui est présent dans mon cœur, je souhaite que tu sois
parmi nous aujourd'hui, mais tu resteras toujours dans ma mémoire, ma chère tante MOUNIA
, que Dieu ait pitié de toi.

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que j'aime.

GHIZLENE

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide de Dieu tout puissant À Celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études. Ce travail est dédié :
Aux deux êtres les plus chers à mon cœur sur cette terre; ma mère, qui a su habilement guider mes premiers pas dans ce monde. Que Dieu la bénisse.

A mon chère père, dont le courage et l'éducation ont fait de moi ce que je suis.

A ma chère sœur Pour son soutien moral et conseils précieux tout au long de mes études. A mon chère frère Pour son soutien moral.

À la mémoire de ma très chère grande-mère «B.Fatouma» qui a représenté pour moi le Symbole de la femme, la source de tendresse et qui le sera toujours et l'ange qui n'a pas cessé de croire en moi, tu seras toujours dans mes pensées.

Et toutes mes proches familles.

À tous mes amis pour leur sympathie.

BILAL

الملخص

في الطبيعة، تعيش معظم الكائنات الحية الدقيقة داخل مجتمعات ميكروبية تسمى البيوفلم. تتكون الأغشية الحيوية من نوع واحد أو كائنات دقيقة متعددة الأنواع تلتصق بسطح خامل أو حي.

B. sporothermodurans. في هذا السياق، درسنا مقاليتين من البيولوجيا الجزيئية التي تناولت ارتباط وتشكيل الغشاء الحيوي على أسطح من الفولاذ المقاوم للصدأ ملامسة لبروتينات الحليب وتطور الغشاء الحيوي بواسطة البكتيريا المحبة للحرارة بما في ذلك *Bacillus licheniformis* و *Geobacillus stearothermophilus* و *Bacillus subtilis* و *Anoxybacillus vlavithermus*. يتم اكتشافهما بشكل متكرر في منتجات الحليب المجففة الأساسية. أوضحت أن *B. sporothermodurans* لديها قدرة قوية على تشكيل الأغشية الحيوية على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ. وبالنسبة للمقال الثاني، أظهرت النتائج أن السلالات المحبة للحرارة تمتلك قدرات قوية على تحلل البروتين واللاكتوز في الحليب منزوع الدسم، وأن تأثيرات التلف قد تم فرضها بواسطة سلالات متعددة وتأثيرات متبادلة عبر الأنواع على التطور. وقد قدمت الأغشية الحيوية الرقيقة دليلاً مهماً لفهم الاستعمار من البكتيريا السائدة المحبة للحرارة أثناء معالجة مسحوق الحليب

الكلمات المفتاحية: *Bacillus spp*، البيوفلم، فيلم التعبئة والتغليف، صناعة الالبان.

Abstract

In nature, most microorganisms live in microbial communities called biofilms. Biofilms are made up of single or multi-species microorganisms that adhere to an inert or living surface.

The objective of our work was to evaluate the effect of conditioning on the formation of biofilm by *Bacillus* spp. Given the sanitary conditions that our country work has experienced this part has been cancelled

In this context, we reviewed two articles in the literature that discussed the attachment and formation of biofilms of *B. sporothermodurans* on stainless steel surfaces in contact with milk proteins and the development of biofilms by thermophilic bacteria including *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, and *Anoxybacillus vlavithermus* frequently detected in powdered milk products. The results showed that *B. sporothermodurans* had a strong ability to form biofilm on stainless steel surfaces. And for the second paper, the results showed that thermophilic strains possessed strong protein and lactose degrading abilities in skim milk, and that the spoilage effects were overlapped by several strains. Mutual influences between species on biofilm development provided important evidence for understanding the colonization of the predominant thermophilic bacteria during milk powder processing.

Key words: *Bacillus* spp, Biofilm, conditioning film, dairy industries.

Résumé

Dans la nature, la plupart des microorganismes vivent au sein de communautés microbiennes appelés biofilm. Les biofilms sont constitués de microorganismes mono-espèce ou multi-espèce qui adhèrent à une surface inerte ou vivante.

L'objectif de notre travail était d'évaluer l'effet du conditionnement sur la formation du biofilm par *Bacilles spp.* Vu les conditions sanitaires que notre travail pays a connu cette partie à été annulée.

Dans ce contexte nous avons étudié deux articles de la bibliographie qui ont traité la fixation et la formation du biofilm de *B. sporothermodurans* sur des surfaces en acier inoxydable en contact avec des protéines de lait , et le développement du biofilm par des bactéries thermophiles incluant *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* et *Anoxybacillus vlavithermus* fréquemment détectées dans les produits de base de lait en poudre. Les résultats ont montré que *B. sporothermodurans* à une forte capacité à former le biofilm sur les surfaces en acier inoxydable. Et pour deuxième article, les résultats ont montré que les souches thermophiles possédaient de fortes capacités de dégradation des protéines et du lactose dans le lait écrémé, et que les effets d'altération étaient superposés par plusieurs souches et Les influences mutuelles inter-espèces sur le développement du biofilm ont fourni des preuves importantes pour comprendre la colonisation des bactéries thermophiles prédominantes pendant le traitement du lait en poudre

Mots clés : *Bacilles spp.*, Biofilm, film de conditionnement, industries laitier.

Liste des figures

Figure 1 : Résumé des caractéristiques phénotypiques des isolats de <i>Bacillus sp</i> (Kaya et Christian, 2018).....	04
Figure 2 : Observation microscopique de <i>Bacillus subtilis</i> après coloration de Gram (Agenor et al., 2019).....	05
Figure 3 : Observation par Microscope électronique à balayage des souches de <i>Bacillus cereus</i> (Simões et al., 2007).....	06
Figure 4 : <i>Bacillus anthracis</i> (Lucia et al., 2006).....	07
Figure 5 : Microscopie électronique à balayage du <i>B. coagulans</i> (KaiYue et al., 2020).....	07
Figure 6 : Représentation schématique de la structure de la spore bactérienne et photographie au Microscopie Electronique à Transmission (MET) d'une spore de <i>Bacillus subtilis</i> . Echelle : 100 nm (Loison, 2015).	09
Figure 7 : Schéma simplifié du cycle de sporulation de <i>B. subtilis</i> (Modugno, 2019).....	11
Figure 8 : image d'un biofilm de BS prise par microscopie électronique (Maxime Ardré, 2014).....	16
Figure 9 : Représentation schématique des étapes de formation du biofilm (Yannick D.N et al., 2014).....	21
Figure 10 : Micrographe d'un biofilm de 6 jours formé par <i>B.cereus</i> sur une surface en inox (Simões et al., 2010).....	25
Figure 11 : Surface en acier inoxydable et organigramme de la conception expérimentale. (a) Surfaces en acier inoxydable (AISI 304). (b) Diagramme du plan expérimental pour l'évaluation de l'effet des protéines du lait. L'effet des protéines du lait.....	32
Figure 12 : Comptage des cellules et spores sessiles dans le cycle de vie du biofilm de <i>B.sporothermodurans</i> : cellules sessiles (a) et spores (b) à la surface de SS.....	42
Figure 13 : Caractérisation par MEB du biofilm de <i>B. sporothermodurans</i> sur la surface des SS le 1er jour.....	45
Figure 14 : Caractérisation par MEB du biofilm de <i>B. sporothermodurans</i> sur la surface des SS au 5eme jour.....	46
Figure 15 : Caractérisation par MEB du biofilm de <i>B. Sporothermodurans</i> sur la surface des SS au 10 jour.....	49

Figure 16: Diagramme schématique résumant les principaux résultats du cycle de vie du biofilm de <i>B. sporothermodurans</i>	49
Figure 17 : Images montrant les capacités de formation de biofilm dans les cultures mono-spécifiques sur des surfaces en acier inoxydable immergées dans du lait écrémé. (A) numéros UFC ; (B) images SEM ; (C) Images CLSM. Les données représentent les moyennes \pm SD des résultats obtenus à partir de trois expériences indépendantes.....	54
Figure 18 : Images montrant les capacités de formation de biofilm dans les cultures mono-spécifiques sur des surfaces en acier inoxydable immergées dans du lait écrémé. (A) numéros UFC ; (B) images SEM ; (C) Images CLSM. Les données représentent les moyennes \pm SD des résultats obtenus à partir de trois expériences indépendantes.....	56
Figure 19 : Changements de pH du lait écrémé affectés par des incubations de bactéries thermophiles mono-spécifiques et bispécifiques. Les données représentent les moyennes \pm SD des résultats obtenus à partir de trois expériences indépendantes.....	58
Figure 20 : Représentations schématiques de l'analyse FTIR des composants du lait écrémé décomposés par des souches bactériennes thermophiles simples, doubles ou quatre. (A) Courbes de spectre FTIR ; (B) Analyse PCA des courbes FTIR dérivées secondes.....	59
Figure 21 : Les images CLSM des biofilms multi-espèces contenaient <i>B. licheniformis</i> , <i>G. stearothermophilus</i> , <i>B. Subtilis</i> et <i>A. flavithermus</i> dans les 48 h.....	61
Figure 22 : Modifications du nombre d'UFC dans le biofilm et du pH du lait affecté par des incubations de bactéries thermophiles mixtes dans les 48 h. Les données représentent les moyennes \pm SD des résultats obtenus à partir de trois expériences indépendantes.....	62
Figure 23 : Analyse de la structure communautaire de biofilms multi-espèces sur des surfaces en acier inoxydable immergées dans du lait écrémé en 48 h. (A) Apparence de la colonie ; (B) Résultats de séquençage à haut débit.....	64

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taxons de la famille des <i>Bacillaceae</i> appartenant au genre <i>Bacillus</i>	42
Tableau 2 : Caractéristiques des souches de <i>Bacillus cereus</i> isolées de l'industrie laitière utilisées pour les expériences d'adhésion.....	52

Liste des abréviations

OGBa : Les bactéries des groupes opérationnels *Bacillu amyloliquefaciens*

CFU : Unité formant colonie.

UHT : ultra haute température.

EPS : Extra cellular polymérique substance.

PKa: constante d'acidité.

MEB : Microscopie électronique à balayage.

AISI 304 : Surfaces en acier inoxydable.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

NaCl : Chlorure de sodium.

SS : surface inoxydable.

SEM : microscope électronique à balayage microscope.

CLSM : microscope confocal à balayage laser.

XPS : Spectroscopie photo électronique à rayons X.

LDT : la moyenne du film traité.

STM : la méthode du tube unique.

PH : potentiel Hydrogène.

C° : degré Celsius.

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

eADN : l'ADN extracellulaire.

CIP : nettoyage sur place.

LR : la réduction logarithmique.

FTIR : par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

PH : concentration en ion hydrogène.

CCDE: cytoplasme avec débris cellulaires.

TCE : extrait cellulaire total.

PE : extrait périplasmique.

LPS : Lipopolysaccharides.

Tables des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

المخلص

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale..... 01

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralité sur *Bacillus spp*

I.1 Définition et caractéristiques..... 04

I.2 Les différentes espèces qui appartenant au groupe *Bacillus spp*..... 05

I.2.1 *Bacillus subtilis*..... 05

I.2.2 *Bacillus cereus*..... 05

I.2.3 *Bacillus anthracis*..... 06

I.2.4 *Bacillus coagulans*..... 07

I.3 Classification et taxonomie de *Bacillus spp*..... 08

I.4 sporulations 08

I.4.1 Définition de la spore..... 08

I.4.2 Cycles de sporulation..... 09

I.4.3 Caractéristique des spores..... 11

I.5 *Bacillus spp* en industrie laitière..... 12

Chapitre II : Les biofilms en industrie laitière

II.1.Historique..... 15

II.2.Définition..... 16

II.3 étapes de formation..... 17

II.3.1 Le conditionnement de surface..... 17

II.3.2 Transport des bactéries vers le support..... 17

II.3.3 L'adhésion..... 18

II.3.4 La croissance et la maturation du biofilm..... 19

II.3.5 Détachement et dispersion du biofilm.....	20
II.4 Les biofilms en industrie laitière.....	21

Chapitre III : Les facteurs influençant la formation de biofilm

III.1 Les facteurs influençant la formation de biofilm.....	24
III.1.1 Les facteurs liés aux microorganismes.....	24
III.1.1.1 L'influence de <i>Bacillus cereus</i> sur la formation de biofilm.....	25
III.1.1.2 La sporulation.....	25
III.1.1.3 La mobilité.....	26
III.1.2 Les facteurs environnementaux.....	26
III.1.2.1 La température.....	26
III.1.2.2 le pH.....	26
III.1.2.3 Concentrations en nutriments.....	27
III.2.3 Les facteurs liés aux surfaces.....	27
III.1.3.1 La rugosité du support.....	28
III.1.3.2 Effet du conditionnement de la surface.....	28
III.1.3.2.1 Adhésion spécifique.....	28
III.1.3.2.2 Adhésion non spécifique.....	29

Partie II : Analyse d'articles

Article 1 : Influence des protéines du lait sur l'adhésion et la formation de biofilms de <i>Bacillus sporothermodurans</i> : Implications pour le traitement industriel du lait.....	31
1. Introduction.....	31
2. Méthodologie.....	32
2.1 Souches bactériennes et préparation de l'inoculum.....	32
2.2 Nettoyage et préparation de la surface en acier inoxydable	32
2.3 Formations de biofilm in vitro de <i>B. sporothermodurans</i> pour l'évaluation d'effet des protéines du lait.....	33
2.4 Nombre de cellules sessiles et de spores du biofilm de <i>B. sporothermodurans</i>	34
2.5 Analyse de la surface du film de conditionnement.....	34
2.6 Caractérisation du biofilm de <i>B. sporothermodurans</i> par microscopie électronique à balayage (MEB).....	35
2.7 Efficacité du traitement enzymatique et des désinfectants contre le biofilm de <i>B. sporothermodurans</i> par la méthode à un seul tube (STM).....	35
2.8 Analyse statistique.....	35

Article 2 : Développement d'un biofilm multi-espèces formées par des bactéries thermophiles sur acier inoxydable immergé dans du lait écrémé.....	36
1. Introduction.....	36
2. Méthodologie.....	37
2.1 Souches bactériennes.....	37
2.2 Conditions de culture du biofilm.....	37
2.3 Observation du biofilm au microscope électronique à balayage (MEB).....	38
2.4 Observation du biofilm par microscope à balayage laser confocal (CLSM).....	38
2.5 Détection de la composition du lait avarié par infrarouge à transformée de Fourier Spectroscopie (FTIR).....	38
2.6 Analyse statistique.....	39
Résultats et discussions	
Article 1	41
Article 2	53
Conclusion générale.....	66
Références bibliographiques.....	68
Annexes	86

Introduction Générale

La contamination des surfaces des équipements utilisées en industrie agroalimentaires par les bactéries présente de sévères problèmes industriels. Ces bactéries contaminantes sont connues pour leur capacité d'adhérer aux surfaces et, par conséquent, former des biofilms. Ces biofilms sont responsables de la détérioration des produits transformés, de la diminution de la durée de vie des produits et la transmission de bactéries pathogènes aux consommateurs. Ils sont également responsables de la biocorrosion des équipements et la diminution du rendement. **(Bekkaoui, 2016).**

Le lait est un produit qui constitue un milieu très riche et par conséquent favorable pour le développement des microorganismes **(Mennad, 2017)**. *Bacillus spp* fait partie des microorganismes qui menacent l'industrie laitière par leur capacité à produire des biofilms résistants aux agents antimicrobiens, production de toxines et la formation de spores **(Nechaf et Mokrani, 2020 ; Dromigny, 2007)**.

L'objectif de notre travail était d'évaluer l'effet du conditionnement des surfaces en acier inoxydable par le lait sur la formation du biofilm par des souches de *Bacillus spp*.

Malheureusement ce travail n'a pas été réalisé vu les circonstances exigées par la pandémie causée par le Corona-virus. Pour cela et dans le même contexte, deux articles ont été analysés. Le premier consiste à étudier l'effet des protéines du lait sur l'adhésion et la formation du biofilm par *Bacillus sporothermodurans*. Porte sur le développement d'un biofilm multi-espèces formé par des bactéries thermophiles sur des surfaces en acier inoxydable conditionnées par le lait écrémé.

Le deuxième travail bibliographique nous explique le développement d'un biofilm multi-espèces formé par des bactéries thermophiles sur l'acier inoxydable dans du lait écrémé.

Partie 1
Synthèse
Bibliographique

Chapitre I :
Généralités sur *Bacillus spp.*

I.1. Définition et caractéristiques :

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm, sporulés, à Gram positif, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (sauf *B. anthracis* et *mycoides* qui sont immobiles). Certaines espèces sont parfois capsulées comme *Bacillus anthracis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mégathérium* et *Bacillus subtilis* qui peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique. Les bactéries de ce genre sont aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase (**Cherif, 2014**) (**figure1**). Ce genre bactérien est caractérisé par une grande diversité phénotypique et génomique qui lui a valu son intérêt historique. Il correspond à des espèces dont l'intérêt est avant tout industriel grâce à la production d'enzymes extracellulaires, des protéases et des amylases largement utilisées dans les détergents biologiques. De nombreuses espèces du genre *Bacillus* peuvent être utilisées en agriculture, alors que d'autres sont utilisées comme probiotique en alimentation humaine (**Malek, 2019**).

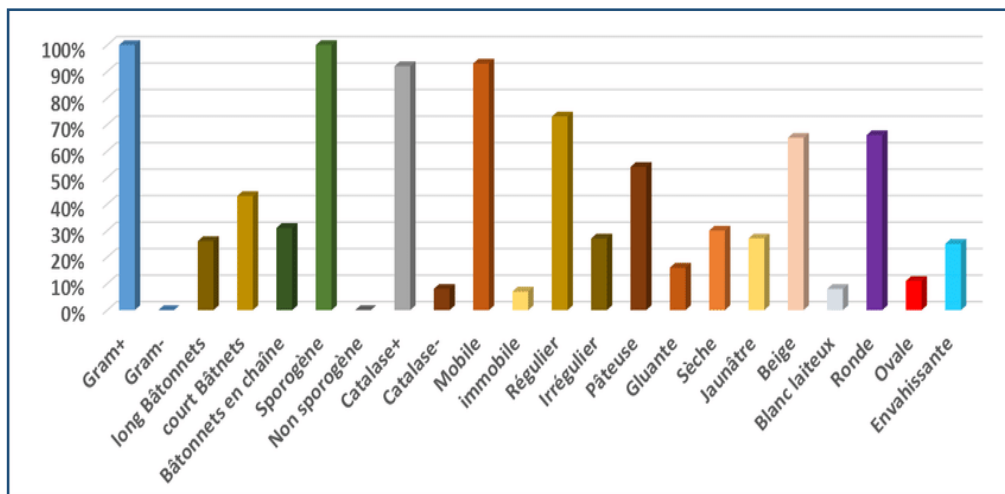


Figure 1 : Résumé des caractéristiques phénotypiques des isolats de *Bacillus spp*. (Kaya et Christian, 2018).

Les caractères physiologiques des *Bacillus* sont impressionnants. Ils peuvent dégrader la plupart de la matière organique animale ou végétale (cellulose, amidon, protéines et hydrocarbures) par la production d'enzymes extracellulaires, produisant aussi des antibiotiques peptidiques, des molécules peptidiques de signal. Ils sont hétérotrophes, nitrifiants, dénitrifiants, fixateurs d'azote, précepteurs de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisant le manganèse. Ces microorganismes sont des chimiolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles et sont capables de croître à des

valeurs de pH, de température et de concentrations en sel où peu de organismes peuvent survivre (Cherif, 2014).

I.2. Les différentes espèces appartenant au groupe *Bacillus spp.* :

Il existe un grand nombre d'espèces avec des propriétés physiologiques et des habitats très variés appartenant au groupe *Bacillus* parmi lesquelles on trouve des espèces thermophiles, acidophiles, psychrophiles et alcalinophiles.

I.2.1. *Bacillus subtilis* : *Bacillus subtilis* (**figure2**) est un germe du sol, non pathogène que l'on trouve couramment en association avec les plantes et leur rhizosphère. *B.subtilis* a été exploité pendant plusieurs applications industrielles, y compris la production des enzymes hydrolytiques, la fermentation alimentaire et plus récemment, comme probiotique (Arnaouteli *et al.*, 2021). Cette espèce possède l'avantage d'avoir un génome entièrement séquencé, ce qui facilite sa manipulation génétique, tout en favorisant la compréhension des gènes impliqués dans la formation de biofilm (Zhu et Stülke, 2018).

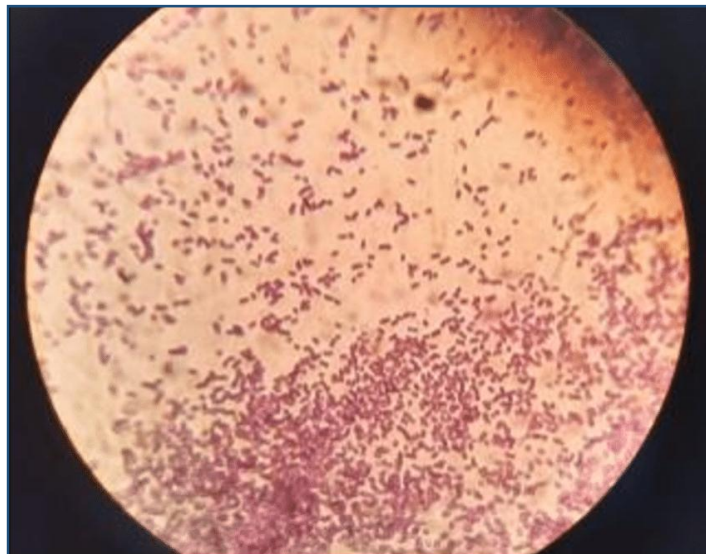


Figure 2 : Observation microscopique de *Bacillus subtilis* après coloration de Gram (Agenor *et al.*, 2019)

I.2.2. *Bacillus cereus* : *Bacillus cereus* (**figure 3**) est un agent pathogène d'origine alimentaire bien connu, capable de provoquer deux types de maladies gastro-intestinales, la diarrhée et les vomissements. Il est particulièrement préoccupant pour l'industrie alimentaire, car il pose de sérieux problèmes de sécurité alimentaire en raison de la formation de spores, de biofilms et la production de toxines diarrhéiques et/ou émétiques. Les spores de *Bacillus cereus* sont des cellules hautement spécialisées et métaboliquement dormantes qui sont réfractaires à des

conditions environnementales extrêmes, notamment la chaleur, la congélation, le séchage et les radiations (**Yiying et al., 2020**). Différentes études ont révélé que l'origine des souches et les conditions de sporulation incluant la composition du milieu, la température, le pH et l'activité de l'eau peuvent affecter les caractéristiques des spores de *B.cereus*, notamment sa résistance et sa germination (**Yiying et al., 2020**).

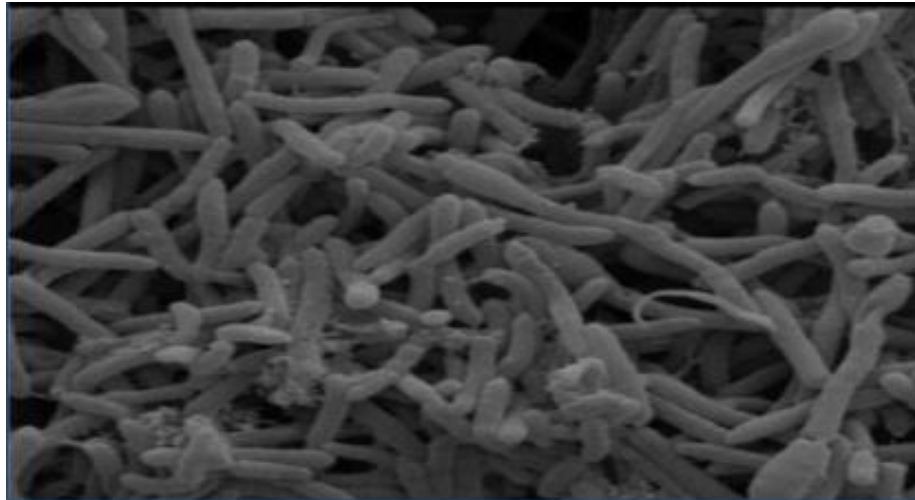


Figure 3: Observation par Microscope électronique à balayage des souches de *Bacillus cereus* (**Simões et al., 2007**).

I.2.3. *Bacillus anthracis* : *Bacillus anthracis* (**figure 4**) est un agent étiologique de l'anthrax, une maladie aiguë souvent mortelle qui touche couramment le bétail et les animaux sauvages, et plus rarement les humains, dans le monde entier. Les infections naturelles à l'anthrax touchent principalement les herbivores, qui sont infectés par l'ingestion de spores présentes dans le sol ou dans les aliments. Les spores excrétées par les carcasses d'animaux touchés par cette maladie constituent la principale voie d'infection des carnivores et contaminent durablement les sols qui, à leur tour, infectent les herbivores se nourrissant sur ces terrains, même des décennies plus tard (**Château et al., 2020 ; HuefferK et al., 2020**).

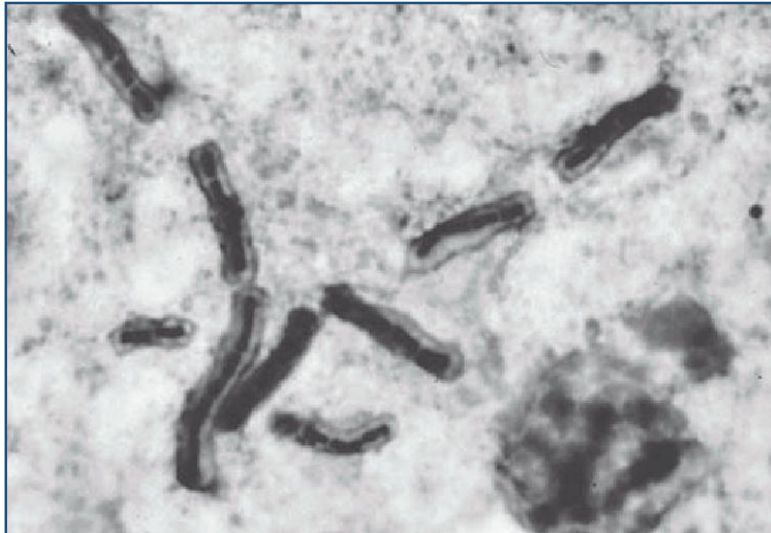


Figure 4 : *Bacillus anthracis* (Lucia *et al.*, 2006)

I.2.4. *Bacillus coagulans* : *Bacillus coagulans* (figure 5) est une bactérie non pathogène endospore, anaérobie. Identifiée à l'origine sous le nom de *Lactobacillus sporogenes* qui a été isolée du lait contaminé en 1933 (Bang *et al.*, 2021 ; André *et al.*, 2017). Contrairement aux autres espèces de *Bacillus*, *B.coagulans* ne produit pas d'endotoxines et est généralement considérée comme inoffensive. Par conséquent, des souches de *B. coagulans*, comme LactoSpore et GBI-30, sont reconnues comme étant généralement sûres (GRAS) par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis depuis 2012 (Bang *et al.*, 2021).

Aujourd'hui, *B. coagulans* est considéré comme un probiotique prometteur en raison de ses caractéristiques, comme la tolérance au sel biliaire et à l'acide, qui lui permettent de survivre dans le tractus gastro-intestinal. De plus, il a été démontré que ses propriétés probiotiques atténuent le syndrome du côlon irritable (Zhou *et al.*, 2020 ; Majeed *et al.*, 2015).



Figure 5 : Microscopie électronique à balayage du *B. coagulans* (KaiYue *et al.*, 2020).

I.3. Classification et taxonomie de *Bacillus spp* :

Le genre *Bacillus* est un vaste groupe de bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives appartenant à la famille des *Bacillaceae*, embranchement des *Firmicutes*, Classe *Bacilli* et l'ordre des *Bacillales*, ayant en commun la faculté de produire des endospores (**Fritze et al., 2004**).

Ce groupe comprend actuellement neuf espèces de *Bacillus*, à savoir *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. bombysepticus*, et le membre le plus récent du groupe est *B. toyonensis*. Les espèces du groupe *B. cereus* sont très proches les unes des autres, et leur toxicité va des souches virulentes utilisées comme probiotiques aux souches hautement toxiques responsables des maladies graves et de décès. Les membres du groupe *B. cereus* sont des saprophytes courants du sol et se propagent facilement dans de nombreux types d'aliments fréquemment isolés dans les produits laitiers (**Doyle et al., 2019**).

I.4. La sporulation :

I.4.1. Définition de la spore :

Depuis leur découverte, les endospores bactériens (ou spores) ont attiré l'attention de la communauté scientifique. Elles comptent parmi les types cellulaires les plus résilients connus et peuvent survivre très longtemps sans nutriments (**Eammonet al., 2021**). Ce sont des formes microbiennes multicouches extrêmement résistantes aux perturbations environnementales. Cette résistance est notamment liée à leur structure unique qui est particulièrement peu perméable et compacte (**Loison, 2015**).

La spore est souvent décrite comme un empilement de couches de membranes et enveloppes. Les spores comprennent plusieurs couches, la couche la plus externe nommée l'exosporium, le manteau, le cortex, la membrane interne et le noyau central qui contient des acides nucléiques (ADN et ARN) (**Setlow, 2006**).

L'exosporium joue un rôle dans la résistance à des traitements chimiques. De plus, elle améliore les propriétés d'adhésion des spores aux différentes surfaces (**Faile et al., 2007**). En dessous de la tunique, on retrouve le cortex qui est composé de peptidoglycane et qui est bien conservé chez certaines bactéries comme *B. subtilis* et *B. cereus*. À l'intérieur du cortex se trouve les dernières couches de la spore notamment la membrane interne et le protoplaste (**Setlow, 2014**).

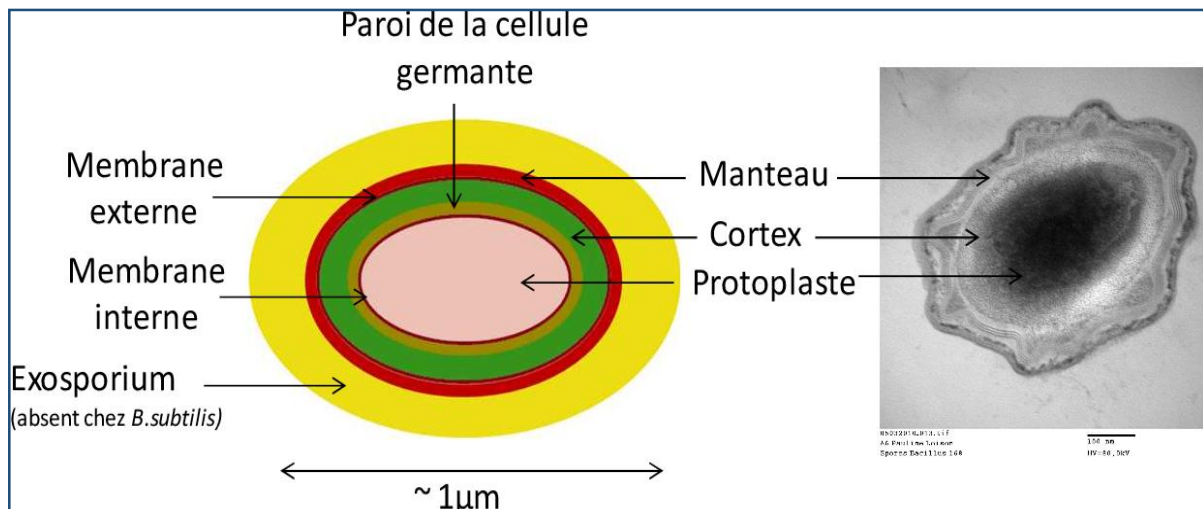


Figure 6: Représentation schématique de la structure de la spore bactérienne et photographie au Microscopie Electronique à Transmission (MET) d'une spore de *Bacillus subtilis*. Echelle : 100 nm (Loison, 2015).

I.4.2. Cycles de sporulation :

Le cycle de vie de *Bacillus* sporulés se compose de trois processus physiologiques qui sont la croissance, la sporulation et la germination comme l'indique la **figure 7**. Le passage d'un mode de développement à un autre est déterminée par la disponibilité des éléments nutritifs, qui est détectée par le micro-organisme (Rosenberg *et al.*, 2012).

Le principal facteur de sporulation est le manque de nutriments, avec un nombre significatif d'autres signaux environnementaux et intercellulaires entrant dans le processus décisionnel de sporulation (Gauvry *et al.*, 2017). Chez *B. subtilis*, par exemple, ces signaux sont perçus par des kinases ayant des récepteurs intra-membranaires spécifiques : KinA, KinB, KinC et KinD (Modugno, 2019) (**figure 8, A**).

KinA et KinB vont successivement transférer un groupement phosphate à deux protéines intermédiaires : Spo0F et Spo0B. Spo0B transfère ensuite son groupe phosphate au facteur de transcription Spo0A qui induit l'entrée de la sporulation. Spo0A peut également être directement phosphorylé par KinC ou déphosphorylé par KinD. Ce transfert de phosphates via ce système dit « phospho-relais » permet une régulation fine de l'apport de sporulation, pour s'assurer que ce processus nécessitant une énergie intensive n'est utilisé qu'en dernier recours.

Les systèmes de contrôle négatif sont ainsi adaptés à chaque phosphorylation intermédiaire (**Figure 7, A**). Alors qu'un niveau élevé de phosphorylation de Spo0A induit l'entrée de la sporulation, des niveaux intermédiaires peuvent induire la formation des biofilms ou du processus de cannibalisme. Pour l'entrée en sporulation le processus nécessite aussi

l'activation d'un autre facteur de Transcription σ_H impliqué dans l'initiation de la division asymétrique de la cellule. Ce facteur lié à celui de Spo0A. Suite à l'activation de σ_H et Spo0A, le processus de division cellulaire est initié (**Figure 7, B**). L'ensemble des processus menant à l'initiation de la division cellulaire constituent **l'étape I** de la sporulation (**Modugno, 2019**).

L'étape II de la sporulation, la cellule mère se divise pour former un nouveau compartiment, par l'intermédiaire d'un septum de division propre au processus de sporulation.

L'étape III, le nouveau compartiment créé est invaginé dans la cellule mère. La pré-spore nouvellement formée est entourée de trois membranes, dont la seconde a une orientation inversée, lui donnant un rôle important lors de la déshydratation de la future spore (**Setlow et al., 2013**).

Lors de **l'étape IV**, le pH de la spore et sa concentration en potassium diminue, induisant le début de sa déshydratation. Une accumulation de peptidoglycanes entre la membrane interne et externe de la spore initie la formation du cortex et du manteau.

Entre les **étapes IV et V**, la formation du manteau externe de la spore est largement entamée. Durant la maturation la spore se charge en cations divalents. Simultanément, la cellule mère synthétise du DPA (acide pyridine-2,6-dicarboxylique) qui s'accumule dans la spore. Suite à sa déshydratation, la concentration en DPA de la spore excède sa limite de solubilité et des complexes Ca-DPA sont alors formés (**Tocheva et al., 2017 ; McKenney et al., 2012**).

Au cours de **l'étape VII**, la cellule mère est lysée, libérant la spore mature. Lors des différents stades de sporulation, les facteurs de transcription σ_G , σ_E , σ_F , σ_K (figure 1, B) sont très importants car ces facteurs de transcription et de régulation impliqués dans le processus de sporulation induisent aussi la synthèse de toxines chez certaines espèces (**Higgins et Dworkin., 2013**).

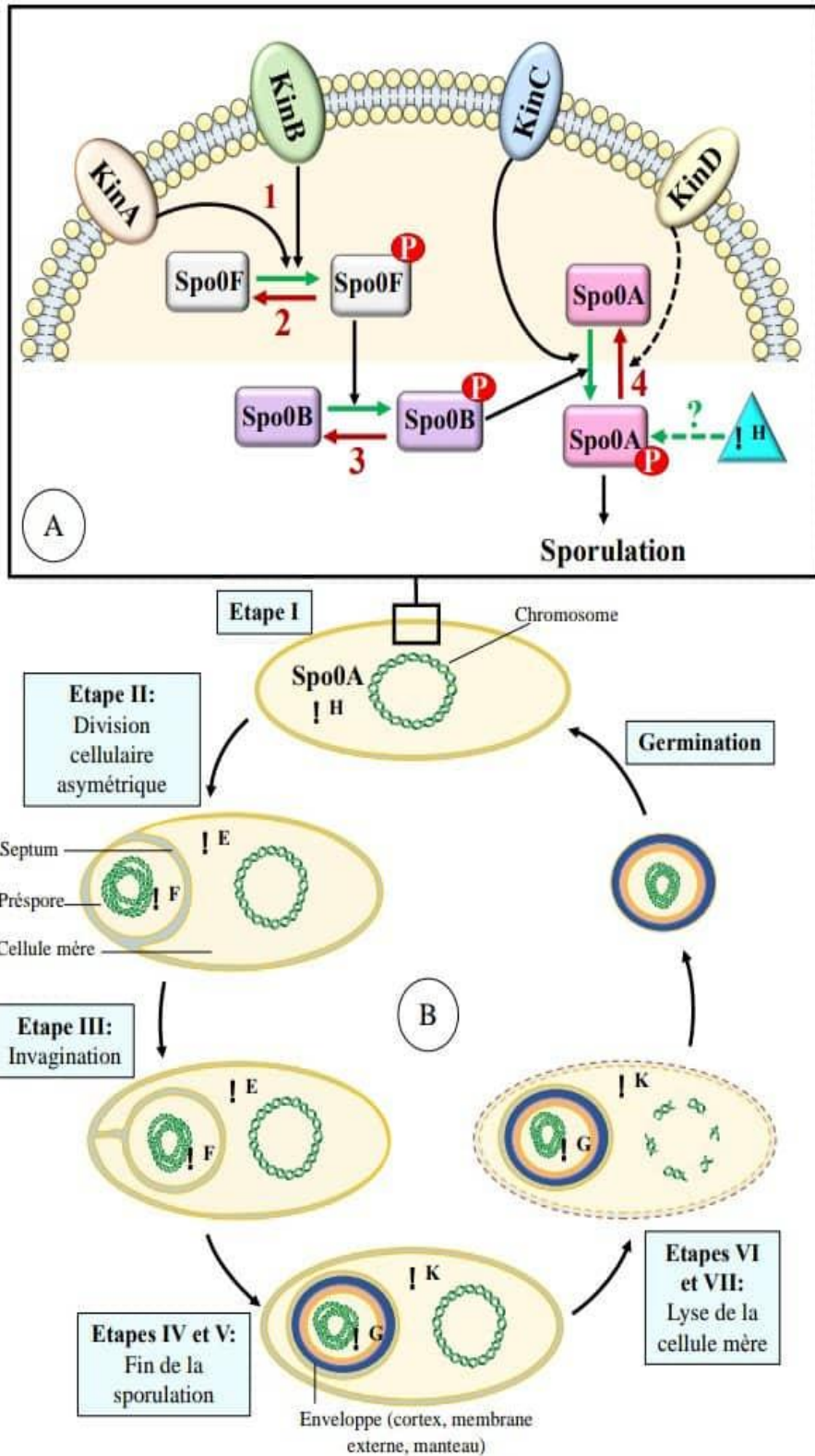


Figure 7: Schéma simplifié du cycle de sporulation de *B. subtilis* (Modugno, 2019).

I.4.3. Caractéristique des spores :

La caractéristique commune des bacilles sporulés est la capacité de différencier une forme cellulaire particulière, l'endospore. La formation de spores commence lorsque la

croissance ne peut plus avoir lieu à cause d'épuisement des nutriments ou d'autres conditions non physiques dans l'environnement. La spore est une forme cellulaire au repos, caractérisée par plusieurs couches protectrices entourant le cytoplasme déshydraté qui contient le nucléotide (**Henriques et Moran, 2007**). Cette organisation structurelle rend les spores extrêmement résistantes aux agressions physiques et chimiques externes et capables de survivre presque indéfiniment en l'absence d'eau et de nutriments. La longévité exceptionnelle de la spore dans l'environnement est la principale raison de la distribution omniprésente de ces organismes, en particulier des organismes aérobies (**Wang et al., 2021**).

Les bactéries thermophiles sporulées sont considérées comme une contamination majeure de l'industrie laitière, car elle sont capables de se multiplier rapidement et de créer un danger pour la sécurité alimentaire (**Wang et al., 2021 ; Hadri et al., 2019**).

Les spores ont une plus grande propension que les cellules végétative pour l'attachement (**Burgess et al., 2014**) . Une fois la bactérie attachées à la surface et dans des conditions optimales, les spores germent probablement, et les cellules végétatives se reproduisent, formant un biofilm (**Burgess et al., 2009**).

Les propriétés d'adhésion des spores chez *B. cereus* sur l'acier inoxydable utilisée en industrie laitière sont responsables de leur persistance sur les équipements laitiers et de la formation de biofilm (**Malek, 2013**).

I.5. *Bacillus spp* en industrie laitière :

Les bactéries du groupe *Bacillus spp.* occupent une place de premier plan parmi les micro-organismes préjudiciables dans les industries agroalimentaires en raison de leur ubiquité et de leur capacité à former des biofilms et à résister sous forme de spore aux barèmes de pasteurisation pratiqués dans les industries (**Merzougui et al., 2013**).

B. cereus sont considérées, comme le principal problème microbiologique dans l'industrie laitière (**Gopal et al., 2015 ; Marchand et al., 2012**). La dissémination de cette flore se fait depuis la ferme où le sol, la litière et la souillure du pis constituent les premières sources de contamination (**Malek, 2019**). À l'usine, de nombreux sites de contamination sont également identifiés le long des lignes de transformation du lait. Les tanks de stockage du lait (**Sarkar, 2014**), les pasteurisateurs et la conditionneuse, ainsi que les sections de post-pasteurisation (**Cherif-Antar et al., 2016 ; Malek et al., 2013 ; Salustiano et al., 2009**) sont décrits comme des réservoirs de *B. cereus*. La quasi omniprésence de cette bactérie dans l'environnement laitier est attribuée au grand pouvoir d'adhésion des spores, leur capacité de formation du biofilm sur les surfaces en acier inoxydable et leur résistance à la désinfection chimique (**Failla et al., 2013**).

En industrie laitière, les biofilms se forment souvent 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 laitiers. De plus, il est considéré comme une principale source de la transmission des maladies. La formation des biofilms sur les équipements laitiers peut mener à des problèmes de santé publique et à des pertes économiques importantes (**Gram et al., 2007**).

Les biofilm sont le plus résistants aux agents antimicrobiens comparés aux cellules planctoniques. De ce fait, ils représentent une menace pour les équipements de traitement des denrées alimentaire et ils doivent être éliminés (**Simões et Vieira, 2009**).

Chapitre 2 :
Les biofilms en industrie
Laitière.

II.1. Historique :

La formation de biofilm est un processus omniprésent dans les communautés bactériennes qui leur permet de survivre et de persister dans diverses niches environnementales. La première découverte des biofilms a été faite en milieu marin au début du 20ème siècle dans le cadre des travaux portant sur les problèmes de détérioration des coques des navires (**Angst, 1923 ; Henrici, 1933 ; Bagge et al., 2001**). Ces premières études ont démontré que les salissures qui affectent les bateaux étaient des bactéries présentes dans l'eau, ne flottaient pas librement mais vivaient sur des surfaces immergées dans l'eau. L'existence de l'état sessile avec l'état planctonique a été reconnue suite à la découverte faite par **Zobell en 1943** montrant que le nombre de bactéries colonisant les parois d'une bouteille remplie d'eau de mer était supérieur à celui des bactéries dans l'eau (**Donlan, 2002**). Cependant, les outils de recherche disponibles à l'époque, notamment les techniques traditionnelles de microscopie, ne permettaient pas d'observer les biofilms.

Le concept du biofilm a été proposé et généralisé par **William Costerton** en **1980** définissant les biofilms comme étant des communautés microbiennes qui adhèrent aux surfaces biotiques ou abiotiques par des mécanismes spécifiques et qui offrent des avantages dans cette niche écologique particulière (**Costerton et al., 1978**). Cette période est également marquée par la découverte des biofilms dans les dispositifs médicaux. En effet, grâce au microscope électronique la capacité d'un biofilm à se développer dans un implant médical a été démontrée pour la première fois chez un patient porteur d'un stimulateur cardiaque (pacemaker) et qui a développé une infection à *Staphylococcus aureus* (**Marrie et al., 1982**).

Depuis lors et à ce jour, de nombreuses études ont montré que les surfaces des appareils médicaux sont favorables à la colonisation microbienne et au développement du biofilm (**Djeribi et al., 2012 ; Treter et Macédo, 2011**). L'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) depuis les années 1990 a permis d'observer des biofilms intacts, révélant leur structure et leur architecture tridimensionnelle (**Tomas et al., 2010**). Depuis, les recherches sur les biofilms ont considérablement augmenté notamment dans le domaine clinique (**Vertes et al., 2012 ; Donlan, 2011 ; Costerton et al., 2005**).

Les techniques de microscopie à haute résolution telle que la microscopie électronique à balayage, microscopie à balayage laser, microscopie à force atomique fréquemment utilisées en combinaison, ont permis la connaissance et la compréhension d'une façon approfondie ce phénomène en industries alimentaires. Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y

compris les secteurs des produits laitiers sont remis en cause par le problème des biofilms (**Srey et al., 2013**). Ces derniers causent des pertes annuelles de plusieurs millions de dollars (**Brook et Flint, 2008**). Leur formation sur les surfaces en contact avec les aliments est quasi inévitable et est favorisée par les conditions qui prévalent dans les établissements de transformation des aliments. Les biofilms des industries alimentaires sont à l'origine des problèmes qui affectent la qualité hygiénique et sanitaire des produits transformés ainsi que celle des matériaux. En effet, les biofilms sont incriminés dans des toxi-infections alimentaires (**Lequette et al., 2010**).

II.2.Définition :

Un biofilm est une communauté microbienne sessile, caractérisée par des cellules qui sont irréversiblement attachées à un substratum ou une interface, emprisonnées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires. Cette matrice est autoproduite et exhibant un phénotype altéré par rapport au taux de croissance et à la transcription des gènes. Le biofilm peut se former sur des surfaces vivantes ou non-biotiques et peut-être répandu aussi bien dans les milieux naturels qu'industriels (**figure 8**) Sa formation se produit spontanément partout où il y a des micro-organismes, des surfaces, des nutriments et de l'eau (**Giaouris et al., 2020 ; Donlan et Consterton, 2002**).

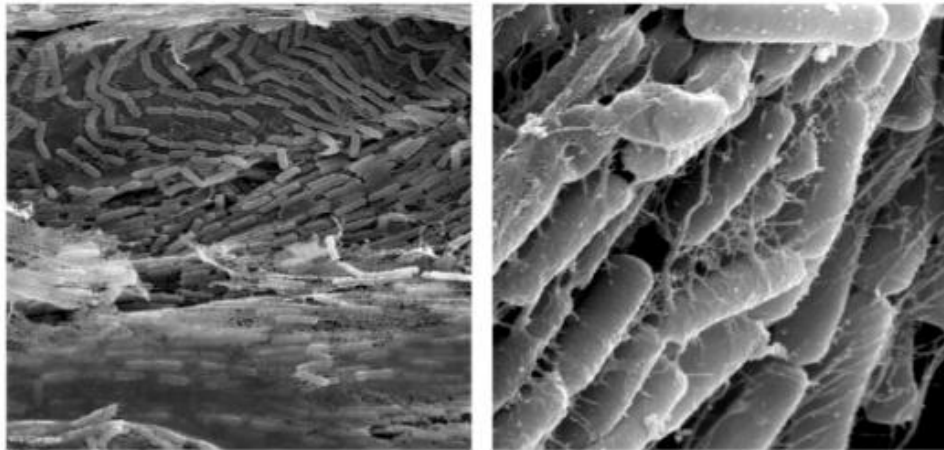


Figure 8: Image d'un biofilm de *Bacillus subtilis* prise par microscopie électronique (**Maxime Ardré, 2014**).

Les cellules microbiennes qui croissent dans un biofilm sont physiologiquement distinctes des cellules planctoniques d'un même organisme, qui par contraste, sont des cellules-simples qui peuvent flotter ou nager dans un milieu liquide. Le développement de l'architecture du biofilm est en grande partie liée à la production de la matrice extracellulaire qui contient des exopolysaccharides (EPS), des protéines et des acides nucléiques (**Racha et al., 2016**). Cette

matrice rend les bactéries tolérantes aux conditions difficiles et résistantes aux traitements antibactériens (**Roy et al., 2017**).

II.3. Étapes de formation :

La formation de biofilm est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes bien caractérisées, le modèle à six étapes schématisé dans la figure ci-dessous est universellement adopté pour décrire la formation des biofilms d'une manière générale (**Figure 9**).

II.3.1. le conditionnement de surface : Le conditionnement de surface des matériaux d'adhésion ou la formation du film de conditionnement constitue la première étape de formation de biofilm. Cette étape facilite la fixation et l'attachement des bactéries sur la surface (**Merzougui et al., 2013**). Cependant, la surface de tout support exposé à un milieu aqueux sera inévitablement et presque immédiatement conditionnée ou recouverte de polymères provenant de ce milieu (**Donlan, 2002**).

Le film de conditionnement peut être constitué par des composés chimiques inorganiques, organiques ou de composés biologiques de l'environnement (**Zottola et Sasahara, 1994**). L'adsorption de ces molécules provoque des modifications des propriétés physico-chimiques de surface du support et affecte l'adhésion bactérienne (**Loriteset al., 2011 ; Bakker et al., 2004**). Ce film est produit dans un liquide pendant l'immersion dans ce dernier (**Verran, 2002**). Inversement, le film de conditionnement peut altérer la surface des équipements de façon à promouvoir leur affinité pour les microorganismes (**Jain et Bhosle, 2009**).

II.3.2. Transport des bactéries vers le support : L'interaction entre les bactéries et le support nécessite une réconciliation d'environ 50 nm (**Hori et Matsumoto, 2010**). Les bactéries passent des signaux environnementaux par un mécanisme actif ou passif. Le transport passif est dominé par des phénomènes non spécifiques tels que le flux, le mouvement brownien et la viscosité du milieu. Tandis que le transport actif est le déplacement de la cellule en réponse à la force d'attraction exercée par la couche mucus riche en nutriments (chimiotaxie). Ce phénomène implique des organites de mouvements comme les flagelles, mais aussi des récepteurs spécifiques et sensibles aux changements de concentration des nutriments présents (**Lopez et al., 2010**).

La mobilité bactérienne joue un rôle important dans la colonisation des surfaces et la formation du biofilm grâce aux flagelles qui permettent de franchir la barrière électrostatique répulsive). En outre, la mobilité du flagelle est dans les stades précoces et les interactions cellule-surfaces. Alors que sa synthèse se réprime après l'adhésion initiale chez la plupart des bactéries (**Houry et al., 2011**).

La mobilité contribue également au développement du biofilm sur le plan de sa structure et architecture tridimensionnelle, en intervenant dans le phénomène d'agrégation des cellules adhérees et la formation de micro-colonies (**Picioreaunu et al., 2007 ; O'Toole et Kolter, 1998**). Il existe trois types de mouvement qui sont :

- le type swimming.
- Le type twitching
- Le type swarming (**Tremplay et Deziel, 2010**).
- La mobilité par nage (swimming motility) : Elle est modulée par le flagelle dans les milieux liquides.
- La mobilité en groupe ou radeau (swarming mobility) : Elle est observée sur des surfaces visqueuses ou des milieux de culture à faible concentration d'agar, et est considérée comme un facteur intervenant dans la résistance des biofilms aux agents antimicrobiens (**Lai et al., 2009**).
- La mobilité par glissement (twitching motility) : C'est un déplacement associé aux surfaces, observé chez les cellules adhérees après la disparition du flagelle, Il est attribué aux pilis du type IV. Ce type de déplacement a également été mis en évidence chez d'autres espèces bactériennes (**Burrows, 2012**).

En résumé, la mobilité peut affecter l'adhésion et la formation de biofilm via différents mécanisme en fonction du type de bactéries.

II.3.3. L'adhésion : Les structures d'adhésion telles que les fimbriaie et les flagelles influencent l'adhésion bactérienne au substrat favorisant ainsi la formation de biofilm. Ces structures sont responsables de la motilité qui est la capacité cellulaire de migration sur la surface (**Schniderberend et al., 2019**). Il est cependant admis que l'adhésion bactérienne aux surfaces est caractérisée par une phase physico-chimique initiale non spécifique, suivie par une phase moléculaire et cellulaire spécifique appelée couramment **adhésion réversible** et **adhésion irréversible**.

- **La phase réversible** : La première étape physique, instantanée et réversible est l'étape d'attachement des bactéries sur la surface. Les microorganismes vont pouvoir adhérer à la surface par des liaisons physicochimiques (interactions électrostatiques, de van der Waals ou hydrophobes lorsque les interactions sont gouvernées par l'entropie) et par des interactions liées au mouvement brownien (i.e. mouvements incessants et aléatoires en solution). Elle correspond principalement à des interactions à longue distance, qui se produisent lorsque la distance qui sépare les bactéries du support atteint 50 nm (**Oss *et al.*, 1988**).
- **La phase irréversible** : Une seconde étape non instantanée liée à la physiologie des bactéries (nécessitant que les liaisons créées entre les bactéries et la surface durant l'étape d'attachement soient maintenues et consolidées), irréversible du point de vue chimique et cellulaire. Elle consiste en une adaptation de la bactérie à la surface. Elle est caractérisée par des interactions à courte portée telles que les interactions hydrophobes, formation acide-base de Lewis et dipôle. Ces échanges sont plus forts et apparaissent lorsque la distance est inférieure à 3 nm : c'est la région appelée du minimal principal. Très simplement, les bactéries proches de la surface deviennent attachées (**Karaten et Watnick, 2009**).

L'adhérence des bactéries à la surface est améliorée par la liaison sélective des polymères de surfaces bactériennes telles que les capsules, fimbriae et EPS qui ont un effet de colle (**Katsikigiani et Missirlis, 2004**).

Outre les caractéristiques propres des bactéries, l'adhésion bactérienne est influencée par de nombreux autres facteurs (**Katsikogianni et Missirlis, 2004 ; An *et al.*, 1998**). Parmi ceux-ci, figurent la nature de la surface du point de vue acido-basique au sens de Lewis et la présence éventuelle de charges, qui, si elles existent, jouent un rôle important par rapport aux simples forces de van der Waals qui sont plus faibles (**Speranza *et al.*, 2004**). Un autre facteur à prendre en compte est la rugosité de la surface : les irrégularités d'une surface, la présence de trous et l'augmentation de la porosité sont trois facteurs augmentant le nombre de bactéries adhérant à la surface (**Scheuerman *et al.*, 1998**).

II.3.4. La croissance et la maturation du biofilm : Après l'adhésion sur les surfaces, les cellules bactériennes se multiplient de façon exponentielle. Ceci conduit à la formation de micro-colonies et la construction d'un réseau d'exopolysaccharides qui procure une liaison entre les cellules de biofilm et améliore la protection des bactéries au sein du biofilm contre différents agents chimiques (**Anand *et al.*, 2014**).

La prolifération des cellules aboutit à la formation de micro-colonies qui sont décrites comme des foyers tridimensionnels hautement récalcitrants (**Conibear *et al.*, 2009**). En effet, l'unité de base du biofilm est la micro-colonie et qui est aussi l'une des caractéristiques les plus remarquables du phénotype biofilm (**Donlan, 2002**).

Suite à la formation de ces micro-colonies, des canaux se forment entre elles et permettent la circulation des fluides, des nutriments, acheminement de l'oxygène et élimination des déchets, ce qui permet donc au biofilm de se développer et d'acquérir une structure complexe. Sa maturation engendre des changements phénotypiques et une synthèse polymérique importante (**Roux et Ghigo, 2006**).

Les contacts rapprochés entre les micro-organismes du biofilm favorisent le transfert horizontal du matériel ce qui facilite la propagation des gènes de résistance aux ATB (**Trautneret Darouche, 2004**).

II.3.5 Détachement et dispersion du biofilm : La phase de dispersion est considérée comme l'étape finale qui complète le cycle du biofilm. Elle est également appelée phase planctonique, puisque des cellules différenciées quittent le biofilm et retournent à l'État libre perdant ainsi le phénotype biofilm, mais pouvant coloniser d'autres surfaces (**McDougald *et al.*, 2012**).

Une variété de mécanismes de dispersion/dissolution est mise en place selon les espèces. Ces mécanismes comprendraient d'une part, la dégradation de la matrice extracellulaire par digestion enzymatique (**Lequette *et al.*, 2010**) et différenciation cellulaire telle que l'activation des fonctions de motricité de type swimming d'autre part (**McDougald *et al.*, 2012**).

Quand l'épaisseur du biofilm atteint un seuil maximal, le détachement de quelques bactéries de biofilm peut être initié par différents facteurs tels que les perturbations mécaniques (forces de cisaillement), la dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire ou de substrat sur lequel le biofilm est attaché, production d'agents tensioactifs et disponibilité des nutriments (**Goetz *et al.*, 2016**). Ces bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (**Kaplan, 2010**).

Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries. Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables de coloniser d'autres surfaces (**Joshi *et al.*, 2010**) -

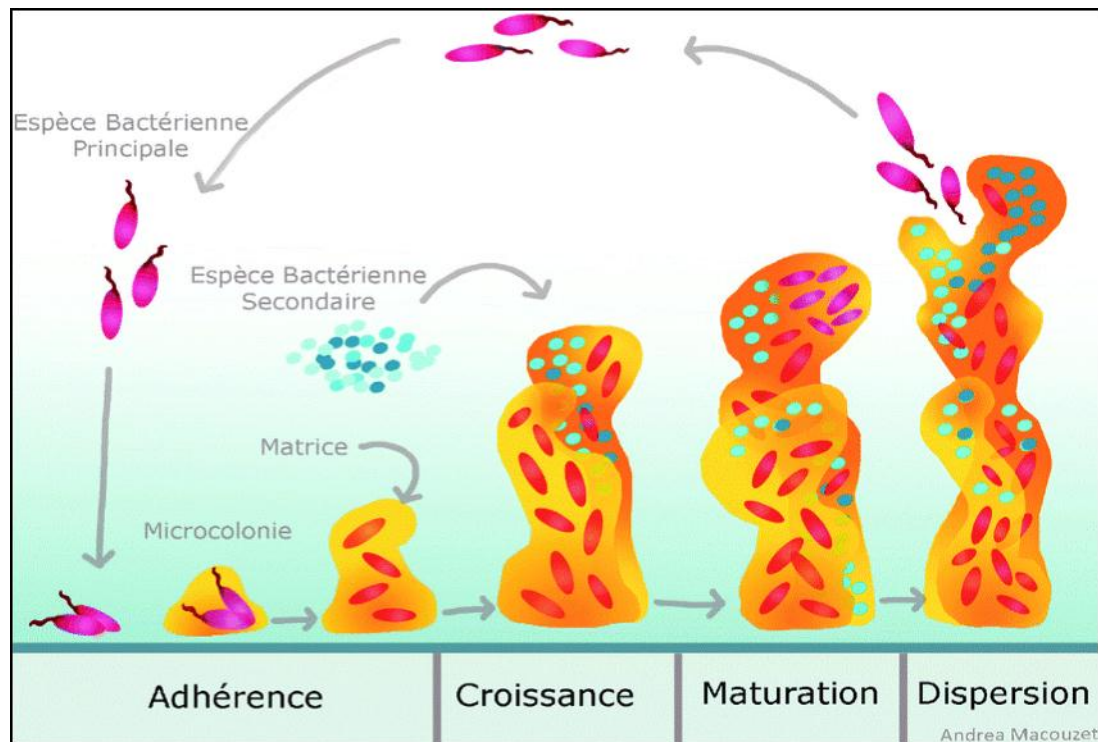


Figure 9: Représentation schématique des étapes de formation du biofilm (Yannick D.N *et al.*, 2014)

II.4. Les biofilms en industrie laitière :

Dans l'industrie alimentaire, les bactéries pourraient être en mesure de se fixer et à former des biofilms sur les surfaces des chaînes de transformation des aliments (Aung *et al.*, 2011 ; Langoni *et al.*, 2008). Les biofilms formés sur ces dispositifs sont particulièrement connus par leurs effets négatifs sur la santé. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus, on peut citer les contaminations des produits alimentaires et la bio-détérioration des matériaux (en particulier la bio-corrosion) (Klinger *et al.*, 2005).

En industrie laitière, la formation de biofilm peut avoir lieu dans les différents sites de la chaîne de transformation du lait, avec une prévalence élevée au niveau des sites difficiles à nettoyer tels que les extrémités mortes, les joints, les valves, les creux et les crevasses (Gopal *et al.*, 2015). Le développement du biofilm sur les équipements laitiers est très rapide (8–12 h), avec des nombres de bactéries souvent supérieurs à 10^6 bactéries/cm² (Bremer *et al.*, 2009). Le risque de transfert de ces bactéries au lait qui circule dans les lactoducs, ou la contamination croisée, est grand. Ce qui implique la contamination microbienne des produits laitiers transformés et la diminution de leur sécurité et durée de vie. La réadhésion des bactéries à la surface des équipements du système de canalisation du lait survient même durant le nettoyage

en place (CIP). Dans ce domaine-là, l'émergence de la résistance des biofilms aux traitements antimicrobiens conventionnels est également soulignée (**Simoes *et al.*, 2010 ; Shi et Zhu, 2009**).

Chapitre 3 :

Les facteurs influençant la

Formation de biofilm.

Les biofilms formés sur les surfaces de transformation des aliments sont d'un intérêt considérable dans le contexte de l'hygiène alimentaire (**Efstathios *et al.*, 2020**).

III.1 les facteurs influençant la formation de biofilm :

L'adhérence bactérienne et le développement ultérieur du biofilm peuvent être influencés par de nombreux facteurs. Ces facteurs sont répartis en trois groupes distincts :

- Facteurs liés aux microorganismes.
- Facteur liés à l'environnement.
- Facteurs liés au support.

Ces facteurs peuvent également influencer la morphologie des cellules bactériennes qui jouent également un rôle dans ce processus (**Palmer *et al.*, 2007; Wirtanen et Salo, 2005**).

III.1.1 Les facteurs liés aux microorganismes :

L'adhérence des cellules bactériennes aux surfaces est une stratégie essentielle pour leur survie. Il est vrai que les biofilms sont formés par de nombreux microorganismes. Dans le milieu aqueux, chaque membre du biofilm est choisi selon les propriétés de surface cellulaire (**Frank, 2001**). Des composés liés à la membrane cellulaire comme les lipopolysaccharides (LPS) et les lipoprotéines qui se trouve à la membrane externe sont responsables de l'hydrophobicité de la cellule. L'hydrophobicité peut augmenter quand la température de croissance diminue et dépend aussi du mode de croissance de la cellule (**Smoot et Pierson 1998 ; Nue, 1996**).

La surface hydrophobe des bactéries a gramme positif sont due a la partie lipide des acides lipotéchoïque qui se prolonge à l'extérieur (**Frank, 2001**).

Les EPS peuvent affecter l'hydrophobicité des surfaces des cellules et donc augmenter ou empêcher le procédé d'attachement selon la surface (**Rosenberg *et al.*, 1983**).

Parmi les caractéristiques des bactéries qui possèdent les flagelles est la formation des liens adhésifs avec les surfaces d'adhérence et la formation des biofilms ainsi que les interactions cellule-surface (**Sauer et Campeur, 2001**).

Les pili sont importants pour l'adhérence bactérienne et la colonisation de la surface car ils peuvent s'adhérer aux particules inorganique et fortement a d'autres cellules (**Sauer et Camper, 2001**).

III.1.1.1 L'influence de *Bacillus cereus* sur la formation de biofilm: Dans l'industrie laitière, *Bacillus cereus* représente plus de 12% de la flore microbienne constitutive de biofilms et est connu comme étant un groupe producteur des biofilms qui constituent une source de contamination des aliments pendant la fabrication et la transformation (**Yiying Huang et al., 2020**). Les biofilms de *B. cereus* (**figure 10**) 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. Les spores adhérentes peuvent déclencher le processus de formation de biofilm ce qui peut être une source de et qui détermine d'ailleurs la durée de conservation du produit (**Ryu et Beuchat, 2005 ; Flint et al., 2001**).

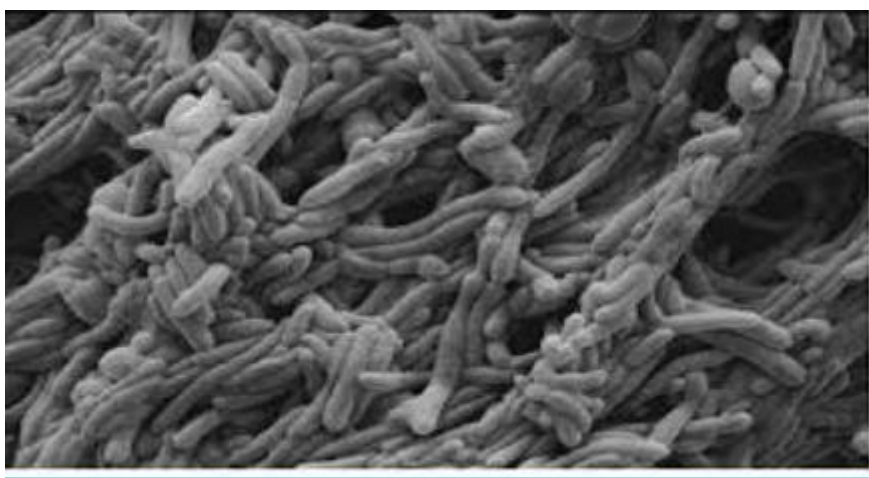


Figure 10: Micrographe d'un biofilm de 6 jours formé par *B.cereus* sur une surface en inox (**Simões et al., 2010**).

III.1.1.2 La sporulation: En raison de leurs propriétés, les spores, adhèrent plus facilement aux surfaces en acier inoxydable principalement hydrophobes (**Ryu et Beuchat, 2005**).

Lorsque des bactéries sporulées survivent dans le lait UHT, elles sont associées à des biofilms qui se forment sur les équipements. Par exemple, *Bacillus sporothermodurans*, peut former des spores résistantes au traitement thermique dans le lait UHT. Ceci lui confère l'habilité de former des biofilms sur les surfaces d'équipements dans l'industrie laitière (**Alonso et al., 2022 ; Jindal et Anand, 2018**). Quant à *Bacillus cereus*, cette dernière peut se développer dans les systèmes de stockage et de tuyauterie industrielle laitière avec un liquide résiduel agissant comme une source de spores et mettant l'environnement de production alimentaire à risque de contamination (**Alonso et al., 2021;Faille et al., 2014**). Toutes ces bactéries sporulées sont nuisibles aux industries laitières car elles peuvent former des biofilms mono et multi-espèces (**Perez Alonso et al., 2021; Ostrov et al., 2019; Wedel et al., 2019**).

Afin de prévenir ou d'éviter la formation d'un biofilm et de minimiser ou d'éliminer la contamination bactérienne des produits laitiers, il est important d'élucider la nature physico chimique de l'adhésion (**Ribeiro et al., 2017**).

III.1.1.3 La mobilité : Les structures d'adhésion telles que les pilines, les fimbriaes et les flagelles influencent l'adhésion bactériale au substrat en favorisant la formation de biofilms. Ces structures sont responsables de la motilité, c'est-à-dire de la capacité des cellules à migrer à la surface. Par exemple, la présence du flagelle chez *Bacillus* lui permet d'atteindre des sites favorables à son développement et par la suite ça lui permet de former le biofilm (**Perez Alonso, 2021 ; Schniederberend et al., 2019 ; Houry et al., 2010**).

III.1.2 Les facteurs environnementaux :

Le développement des biofilms dépend fortement des conditions environnementales dans lesquelles ils sont formés, c'est-à-dire les différents paramètres auxquels ils sont soumis tels que, la température, le pH, les nutriments et les conditions hydrodynamiques.

Tout changement de l'un de ces paramètres est en général perçu comme un stress et peut déclencher une réponse particulière au sein d'un biofilm. Il est par conséquent essentiel d'étudier la réponse des biofilms suite à une contrainte extérieure imposée (**Rajitha et al., 2021 ; Toyofuku et al., 2016**).

III.1.2.1 La température : L'activité métabolique et enzymatique des bactéries peuvent être affectées par la température et qui peut influencer même certains paramètres physico-chimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut aussi avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles, ainsi sur l'adhésion (**Dumas, 2007**).

Les biofilms formés par *Anoxybacillus flavithermuse* et *Geobacillus stearothermophilus*, par exemple, se forment principalement à des températures élevées entre 40 et 65°C (**Sadiqet al., 2017**). Tandis que, *Bacillus licheniformis* est capable de se développer dans des conditions mésophiles et thermophiles à des températures de 30 à 55°C (**Hill et Smythe, 2012**).

III.1.2.2 le pH: Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation protonation et déprotonation des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (constante d'acidité) ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions

électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (**Boutaleb, 2007**). Selon **Nguyen et al., (2012)** ils ont prouvé que le pH peut affecter l'expression de fimbriae et d'autres composants d'adhésion bactérienne. Cependant, l'adhésion bactérienne peut indirectement être affectée par le pH dans un court temps de contact estimé (de 30 minutes à 12 heures) car le pH influence le conditionnement à la surface de l'acier inoxydable (**Nguyen et al., 2012**).

III.1.2.3 Concentrations en nutriments : Dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm, ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (**Spormann, 2008**).

L'augmentation de la concentration totale des solides du lait (protéine de lactosérum et caséine) dissous peut provoquer un retard dans le début de la formation de biofilm et des spores ainsi le préconditionnement de la surface d'acier inoxydable des protéines du lait adsorbé (**Murali et al., 2021**)

III.1.3 Les facteurs liés aux surfaces :

Il existe plusieurs facteurs liés aux surfaces industrielles qui peuvent influencer l'attachement microbien et par conséquent la formation de biofilms. De ce fait, le choix des matériaux en industries agro-alimentaires et plus précisément en industries laitières est d'une grande importance.

En industrie laitière, plusieurs types de matériaux sont utilisés comme les polymères en caoutchouc (**Faile et Carpentier, 2009**) mais, les plus couramment utilisés sont en acier inoxydable. Ces derniers sont beaucoup plus utilisés car ils possèdent des propriétés de surface (rugosité, hydrophobicité...) qui répondent aux exigences des matériaux en contact avec les aliments. Ce sont des matériaux neutres sur le plan chimique, bactériologique et organoleptique, ils sont faciles à nettoyer et résistent à la corrosion. Néanmoins, l'augmentation de l'hydrophobicité du matériel en acier inoxydable ou même du téflon induit l'augmentation de l'adhésion des spores de *Bacillus cereus* (**Marchand et al., 2012 ; Bremer et al., 2009**).

De plus, l'adhésion de différentes bactéries à la surface de différents matériaux hydrophobes et hydrophiles comme le polystyrène et le verre n'est pas influencée par le type de matériel. Cependant, il est admis que les cellules dont la surface est hydrophobe adhèrent préférentiellement aux surfaces hydrophobes qu'aux surfaces hydrophiles et inversement (**Bernardes et al., 2010 ; Shi et zhu, 2009**).

III.1.3.1 La rugosité du support: Largement controversée quant à sa relation à l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm, la surface de l'acier inoxydable n'est pas uniforme mais présente des dissymétries révélées dans l'ultrastructure de ce matériau et exprimées sous le terme de rugosité. Celle-ci peut influencer le mode d'agrégation des cellules et la formation de micro colonie et par conséquent la morphologie et la structure du biofilm (**Johnson, 2008**).

III.1.3.2 Effet du conditionnement de la surface : L'adhésion bactérienne et le développement ultérieur d'un biofilm commencent par le conditionnement de la surface avec des molécules provenant du milieu environnant et de la lyse cellulaire. Puisque ces molécules diffusent plus rapidement que les cellules bactériennes en raison de leur taille réduite la formation de couches de conditionnement peut prendre de quelques secondes à quelques minutes (**Garrido et al., 2014 ; Bruinsma et al., 2001**). Après le conditionnement de la surface, les bactéries se fixent, adhèrent et sont retenues sur une surface (**Whitehead et Verran, 2015**). C'est à ce moment que la prolifération des bactéries peut aboutir à la formation de biofilms. Puisque la nature chimique de la surface initiale influencera l'attachement et la rétention des bactéries, on peut supposer que le type de film de conditionnement présent affectera à son tour la formation du biofilm (**Moreira et al., 2017**). Cet ordre des événements de formation du biofilm peut être perturbé par le conditionnement des surfaces car il modifie les propriétés physico-chimiques de ces surfaces ce qui influence par la suite sur la vitesse et l'étendue de l'attachement microbien.

Dans une étude menée par Moreira (**2017**) et son équipe en il a été démontré qu'il peut y avoir une réduction de la formation de biofilm en utilisant des concentrations optimales de film de conditionnement avec certains extraits cellulaires comme le TCE(cytoplasme avec débris cellulaires), CCDE (cytoplasme avec débris cellulaires) et le PE (extrait périplasmique) dans une chambre d'écoulement à plaques parallèles. A partir de ces résultats, ils ont déduit que la concentration du film de conditionnement influence la formation de biofilm. les composants cellulaires affectent la quantité et le regroupement des bactéries sur les surfaces de polystyrène et leur proportion à induire la formation de biofilm ainsi que sur l'adhésion bactérienne (**Moreira et al., 2017**).

III.1.3.2.1 Adhésion spécifique : L'adhérence de *B. cereus* sur les surfaces peut être affectée par des interactions entre le microorganisme, la surface de contact et les conditions du milieu qui peuvent être associés aux caractéristiques physicochimiques, les communications cellulaires et les appendices extracellulaires ainsi que les interactions hydrophobes (**Bernardes et al., 2010**). Globalement, les propriétés hydrophobes des microorganismes et la surface de

contact ont été considérées comme des outils importants pour comprendre les mécanismes d'adhésion et de formation des biofilms (**Maria Cecilia et al., 2017**).

III.2.3.2.2 Adhésion non spécifique : L'adhésion non spécifique aux surfaces est directement liée à la combinaison des propriétés colloïdales de base et aux interactions hydrophobes et potentielles zêta. En outre, la morphologie et la structure des bactéries, telles que la présence d'appendices extracellulaires, peuvent influencer l'attachement microbien (**Maria Cecilia et al., 2017 ;Simoes et al., 2010**).

Matériel
&
Méthodes

Article 1 : Influence des protéines du lait sur l'adhésion et la formation de biofilms de *Bacillus sporothermodurans* : Implications pour le traitement industriel du lait

(Alonso *et al.*, 2022).

1. Introduction :

La définition du biofilm dans l'industrie laitière est similaire à celle des environnements industriels et cliniques. Les biofilms sont des communautés bactériennes structurées, intégrées dans une matrice polymérique autoproduite qui confère des propriétés émergentes à l'espèce (Stoodley *et al.*, 2002 ; Costerton *et al.*, 1999). Cependant, dans l'industrie laitière, la composition du lait peut affecter l'adhésion bactérienne (Flint *et al.*, 2015 ; Speers et Gilmour, 1985).

B. sporothermodurans est une bactérie à Gram-positif, avec une croissance optimale à 37°C, pH 5-9 et une concentration de NaCl allant jusqu'à 5% (Logan & Vos, 2015 ; Pettersson *et al.*, 1996). Le développement de *B. sporothermodurans* sur les surfaces des équipements de la ligne de traitement du lait UHT peut être une source de contamination du produit final, ce qui peut conduire à une croissance microbienne supérieure à 10⁵ UFC/mL pendant 5 jours. Bien que cette bactérie n'altère pas le lait et elle n'est pas pathogène, cette espèce est devenue une menace pour la santé publique (Jindal & Anand, 2018 ; Pettersson *et al.*, 1996).

La présence de *B. sporothermodurans* non pathogène est corrélée à une forte numération de bactéries mésophiles aérobies dans le lait UHT. Par conséquent, quand cette bactérie se multiplier elle ne produit aucune modification sensorielle (production de gaz, acides et caséine hydrolysée) pendant le stockage (Gupta & Anand, 2018 ; Lewis, 2014). De plus, les biofilms provoquent des piqûres et de la corrosion sur l'acier inoxydable, ce qui rend l'élimination de ces micro-organismes gênants encore plus difficile pour l'industrie laitière (Aouadhi *et al.*, 2016 ; Jindal *et al.*, 2016 ; Flint *et al.*, 2011).

Bacillus sporothermodurans est un producteur de spores très résistantes à la chaleur, ce qui cause un problème pour l'industrie laitière dans le monde entier. Dans ce travail, nous allons étudié l'attachement et la formation de biofilms sur des surfaces en acier inoxydable en contact avec des protéines de lait (caséine et lactosérum).

2 Méthodologie :

2.1 Souches bactériennes et préparation de l'inoculum :

Pour l'inoculum, *B. sporothermodurans* DSMZ 10599 a été isolé de l'industrie laitière italienne fabriquant UHT (Collection allemande de micro-organismes et de cultures cellulaires, Braunschweig, Allemagne) et deux autres souches qui ont été isolées du lait UHT. Toutes les souches ont été stockées à -20 °C dans une solution de glycérol à 30 %. Avant la formation du biofilm, chaque micro-organisme était cultivé séparément dans un bouillon d'infusion du cœur du cerveau, complété par de la vitamine B12 (BHI-B12) pendant 24 h à 37 °C. La Préparation de l'inoculum pour la formation du biofilm a été effectuée à l'aide d'un ensemble de trois souches (2 mL pour chacune). Les inoculums ont été normalisés à 1 Mac Farland (-3×10^8 UFC/mL) à l'aide d'un densitomètre. Ensuite une dilution a été effectuée pour atteindre un inoculum nominal d'environ 10^5 UFC/mL.

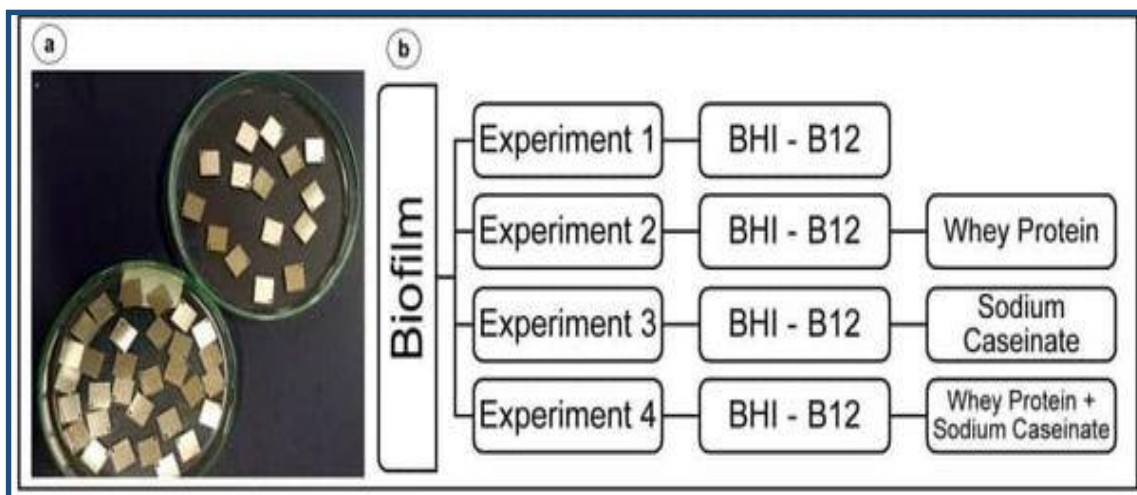


Figure 11 : Surface en acier inoxydable et organigramme de la conception expérimentale. (a)

Surfaces en acier inoxydable (AISI 304). (b) Diagramme du plan expérimental pour l'évaluation de l'effet des protéines du lait. L'effet des protéines du lait

2.2 Nettoyage et préparation de la surface en acier inoxydable :

Les surfaces en acier inoxydable (SS) (AISI 304) utilisées pour les essais avaient des dimensions de 1,0 cm, 0,1 cm d'épaisseur, (**figure 11 a**). La rugosité initiale ($0,34 ; 0,03 \mu\text{m}$) a été vérifiée à l'aide d'un profilomètre. L'homogénéité des surfaces SS a été évaluée par microscope électronique à balayage (BEM) et la composition chimique de surface a été évaluée par photoélectron à rayons X modèle de spectroscopie (XPS) VSW HA-100 (VSW Scientific Instrument),

Les surfaces en acier inoxydable ont été nettoyées avec de l'acétone pour enlever la graisse du procédé de fabrication puis lavé par sonication avec une solution de NaOH à 1% pendant 30 min, suivi d'un rinçage dans de l'eau stérile et immergé dans 1% d'acide nitrique pendant 15 min. Après, elles ont été rincés deux fois dans l'eau distillée et stérilisées à 121 °C pendant 15 min (**Antoniou & Frank, 2005**).

Les surfaces SS ont été utilisés plusieurs fois dans les mêmes expériences et conservés jusqu'à l'utilisation. Avant la formation du biofilm, les surfaces en l'acier inoxydables ont été imagées par microscopie optique pour vérifier le nettoyage et l'enlèvement du biofilm, et également confirmé visuellement à l'aide d'un biodétecteur microbien (BioFinder, iTram® Higiene, Espagne). Ce produit favorise une réaction enzymatique par décomposition du peroxyde d'hydrogène, formant des zones de bulles et indiquant une réaction positive (**iTram, 2020; Ripolles et al., 2019; Ripolles et al., 2018**).

2.3 Formation de biofilm *in vitro* de *B. sporothermodurans* pour l'évaluation d'effets des protéines du lait :

Quatre expériences ont été réalisées pour évaluer l'effet des protéines du lait sur les biofilms *in vitro* (**Figure 11 b**). Les surfaces ont été suspendus par du fil de nylon et immergés dans 60 mL de différents concentrations du milieux. :

- **L'expérience 1** : était le test de contrôle, avec milieu de culture BHI-B12 seulement.
- **Dans l'expérience 2** : 7 g/L protéines de lactosérum (normes WPC 80, Arlafoods - SP, Brésil) a été ajoutés au BHI-B12.
- **Dans L'expérience 3** : 28 g/L de caséine (caséinate de sodium, Alibra Campinas - SP, Brésil) était utilisée.
- **Et pour l'expérience 4** : les deux protéines du lait ont été utilisées.

Cette préparation a également été effectuée pour le contrôle d'échantillons, mesurés par XPS (section 2.5). Les protéines du lait utilisées correspondent à la teneur moyenne en protéines par litre de lait (~3,3 %), où la concentration de caséine varie de 75 % à 85 %, et les protéines de lactosérum de 15 % à 22 % (**Huppertz et Kelly, 2009 ; Flint et al., 2001**).

L'inoculum a été dilué dans un milieu de culture jusqu'à atteindre une concentration de 10^4 UFC/ml. Toutes les expériences ont été maintenues à 35°C (température de croissance optimale), dans des conditions statiques. Le pH initial a été ajusté à 7 et mesuré avant

l'élimination des cellules sessiles. La formation du biofilm de *B. sporothermodurans* a été observée pour deux surfaces d'acier inoxydable, après 24 h, 72 h, 120 h, 168 h et 240 h.

2.4 Nombre de cellules sessiles et de spores du biofilm de *B. sporothermodurans* :

Pour chaque dénombrement, les surfaces en acier inoxydable ont été transférées à une solution saline stérile de 10 mL (NaCl à 0,85 % en poids/vol), et conservés pendant 1 min pour éliminer les cellules mal adhérentes

Pour l'élimination des cellules sessiles, les surfaces en acier inoxydable ont été immergées dans un tube contenant 10 mL d'une solution saline stérile et 5 g de billes de verre stériles puis immergées dans un appareil à ultrasons (Sharp UT-204) pendant 5 minutes, puis évaluées par microscopie optique (**Hamilton et al., 2009 ; Andrade et al., 1998**). Pour le dénombrement des spores, un tube contenant les cellules du biofilm a été placé dans un bain-marie à 100°C pendant 30 min pour éliminer les cellules végétatives et induire la germination des spores. Après élimination des cellules sessiles et choc thermique, ils ont été dilués avec une solution saline (0,85% NaCl). Ensuite, une quantité de 0,1mL a été étalée sur une gélose BHI et incubé à 37°C pendant 24h. Les dénombrements ont été effectués après 1, 3, 5, 7, et 10 jours. Pour chaque jour, deux surfaces d'acier inoxydable ont été dénombrées. Les données ont été transformées en log UFC et calculées à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Log (CFU/cm}^2\text{)} = [(M/VA)] \times (Vd/A) \times D$$

VD = volume de rinçage (ml) ; **VA** = volume d'aliquote plaqué (ml) ; **M** = nombre moyen de colonies après incubation sur la plaque (UFC) ; **D** = dilution décimale ; et **A** = surface de la SS (cm²) (**Campos Bernardes et al., 2012 ; Goeres et al., 2009**).

2.5 Analyse de la surface du film de conditionnement :

La composition chimique de la surface SS conditionnée par les protéines du lait a été analysée à l'aide de XPS (analyseur hémisphérique VSW HA-100). Les mesures ont été effectuées dans un environnement à ultra-vide (UHV) avec une pression de $\sim 2,10^{-8}$ mbar.

La source de rayons X utilisée était une anode en aluminium avec émission Al K α (h ν = 1486,6 eV) et une énergie de passage de l'analyseur de 44 eV. Quatre surfaces SS ont été traitées à la même culture et de concentration moyenne pendant 24 h, comme décrit précédemment, sans inoculum bactérien. Avant d'introduire les échantillons dans le XPS Chambre UHV, ils ont été rincés à l'eau déminéralisée, séchés dans une hôte à flux d'air laminaire à température

ambiante et conservés dans un dessiccateur. Les données XPS de ces surfaces ont été comparées à celles des surfaces SS propres (témoin).

2.6 Caractérisation du biofilm de *B. sporothermodurans* par microscopie électronique à balayage (MEB). :

Les biofilms ont été observés en utilisant MEB. Les échantillons ont été préparés selon **lorite *et al.*, (2011)**. Les structures de surface ont été identifiées dans les images et les surfaces correspondantes ont été mesurées à l'aide de Fiji (répartition du logiciel Image J, US National Institutes of Health, Bethesda,) (**Schindelin *et al.*, 2012**).

2.7 Efficacité du traitement enzymatique et des désinfectants contre le biofilm de *B. sporothermodurans* par la méthode à un seul tube (STM) :

La méthode à un seul tube (ASTM E2871) a été réalisée pour évaluer l'efficacité des produits enzymatiques et désinfectants contre le biofilm de *B. sporothermodurans*, qui ont été cultivés dans BHI B12 pendant 24 h. Pour chaque désinfectant, 3 témoins non traités et 5 surfaces traitées. Les produits ont été évalués pendant 15 min) et 30 min à 50°C et sont vortexés pendant 10 min à 50 °C et 15 min à 40 °C. Pour les produits Ecolab®, le neutralisant utilisé était le bouillon DE, tandis qu'un mélange de 30 g/L de Tween 80 de 3 g/L de lécithine et 1 g/L de L-histidine a été utilisé pour les produits iTram®. Le biofilm était retiré et désagrégé par vortex et sonication. Ensuite, les cellules sessiles ont été comptées sur BHIB12 et incubées à 35°C.

2.8 Analyse statistique :

Touts les résultats ont été calculés dans le logiciel OriginPro. La normalité des données a été testée à l'aide des tests de Shapiro Wilk et Levene, avec $p \leq 0,05$ pour toutes réponses. L'influence du lactosérum et des caséines sur la formation de biofilm (cellules sessiles et spores) a été évalués par ANOVA à deux voies et Test de comparaisons multiples de Tukey (valeurs P inférieures à 5 %). Pour les analyses des zones de biofilm, les échantillons normalement distribués ont été analysés à l'aide de l'ANOVA à sens unique et des tests Tukey (teste comparaison multiples), tandis que les données à distribution non normale ont été analysées à l'aide des tests de Kruskal Wallis et Dunn. Le niveau de signification était de 5 %.

Article 2 : Développement d'un biofilm multi-espèces formé par des bactéries thermophiles sur de l'acier inoxydable immergé dans du lait écrémé

(Wang *et al.*, 2021)

1 Introduction :

Les bactéries thermophiles sont les contaminants majeurs de l'industrie du lait en poudre car elles présentent un risque pour la sécurité alimentaire et l'environnement. Elles préfèrent les conditions chaudes et leurs spores pourraient survivre à la stérilisation comme les bactéries isolées des produits à base de lait en poudre *Bacillus subtilis* et *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* *Anoxybacillus flavithermus*, (**Dettling *et al.*, 2020; Delaunay *et al.*, 2019 ; Wiedmann et Martin, 2016; Reginensiet *al.*, 2011**). Les souches thermophiles possédaient de fortes capacités de décomposition des protéines et du lactose dans le lait écrémé.

Ces bactéries possèdent de forte capacité d'altération , Ils sont capables de se multiplier rapidement et capables de former des biofilms sur les surfaces en acier inoxydable leurs biofilms emploient des stratégies de survie plus fortes et plus résistantes aux régimes de nettoyage et de désinfection (**Maes *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2019 ; Bridier *et al.*, 2011**). une recherche spécifique sur les biofilms formés par les bactéries sporulées thermophiles est utile pour comprendre le mécanisme de formation et acquérir des méthodes de contrôle ciblées (**Wang *et al* 2021 ; Wang *et al* 2020 ; Sadiq *et al* 2019 ; Sadiq *et al.*, 2017**).

Les biofilms d'*Anoxybacillus* et de *Geobacillus* ont été évalué par **Karaca, Buzrul, et Cihan (2019)** dans l'industrie laitière et que le matériau de surface, la température et le type de lait aient un effet cumulatif sûr la formation de biofilm .et que ces biofilms d'espèces mixtes sont plus courantes dans un environnements réel que les biofilms d'une seule espèce, Il existe des interactions compétitives ou coopératives entre les différents souches (**Burmolle *et al.*, 2014**).

Dans cette étude, nous avons exploré le processus de développement du biofilm multi-espèces formé par les quatre bactéries thermophiles sur l'acier inoxydable dans le lait écrémé qui en résultent.

2 Matériel et méthodes

2.1 Souches bactériennes :

Quatre souches thermophiles incluant *B. licheniformis* (alignement 99,66% d'identité avec la souche ATCC 14580 de *B. licheniformis*), *G. stearothermophilus* (99,85% d'identité avec la souche DSM de *G. stearothermophilus*), *B. subtilis* (100,00 % d'identité d'alignement avec la souche soilG2B de *B. subtilis*), et *A. flavithermus* (100,00 % d'alignement avec la souche KLDS 9.1101 de *A. flavithermus*) ont été obtenus auprès du College of Biosystems Engineering and Food Science de l'Université de Zhejiang , qui ont été isolées à partir de produits à base de lait en poudre sur le marché chinois et identifiées par Nucleotide BLAST de la séquence de l'ARNr 16S dans la base de données NCBI (Sadiq *et al.*, 2016).

2.2. Conditions de culture du biofilm :

B. licheniformis, *G. stearothermophilus*, *B. Subtilis* et *A.flavithermus* ont été incubés dans des conditions d'aération à 55 °C séparément pendant une nuit. Des coupons stériles d'acier inoxydable (AISI304 au fini 2B, 10 mm 10 mm) ont été utilisés comme substrat pour la formation de biofilms par ces souches bactériennes après leur immersion dans l'acétone (Sinopharm, Chine) pendant 30 min pour enlever la graisse, lavés avec de l'éthanol à 75 % et rincés avec l'eau, puis stérilisés. Les coupons en acier inoxydable ont été immergés dans de puits de plaques de culture cellulaire à 24 puits (Corning, États-Unis) contenant 1 mL de lait écrémé et 20 µL de culture bactérienne diluée d'une seule espèce ou mélange multi-espèces de bactéries diluées (1:1 ou 1:1:1:1, V/V). Après 24 h d'incubation à 55 °C, les valeurs de pH des cultures bactériennes ont été déterminées par un acidomètre (PB-10, Sartorius, Allemagne). Ensuite les coupons étaient retirés du milieu par des pinces stériles, puis rincés trois fois avec une solution saline tampon de phosphate stérile (PBS, 0,01 M, pH 7,4) pour enlever les cellules non attachées. Ensuite, chaque coupon a été transféré dans un tube centrifuge de 50 mL contenant 2 mL de solution stérile de NaCl (0,85 %) et 3 g de billes de verre (3 mm de diamètre), puis mélanger au vortex pendant 1 min afin d'obtenir des suspensions de cellules de biofilm. Les suspensions bactériennes ont été réparties sur des plaques des géloses de bouillon de soja tryptique. Les colonies des biofilms sont dénombrées après-incubation à 55 °C/24 h (CFU/cm² 1 cm² égale à 10⁻⁴ m²).

2.3. Observation du biofilm au microscope électronique à balayage (MEB) :

Après 24 h de culture dans le lait écrémé à 55 °C, les coupons de biofilm ont été lavés avec du PBS stérile (0,01 M, pH 7,4) et fixés avec 2,5 % glutaraldéhyde à 4 °C pendant une nuit, suivi de 15 min de rinçage avec PBS (0,1 M, pH 7,0) en trois fois. Les coupons sont ensuite fixés avec 1% d'acide osmique (SPI-CHEM, USA) pendant 1 h 30 min par trois lavages consécutifs (15 min chacun) avec PBS (0,1 M, pH 7,0). Ensuite, les coupons ont été déshydratés avec 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95 % d'éthanol (dans l'eau, V/V) et 100 % d'éthanol dans l'ordre, et chaque étape a été traitée pendant 15 min. Après cela, les coupons ont été séchés avec CO₂ liquide dans un séchoir à point critique (Hitachi HCP-2, Japon). Les échantillons déshydratés ont ensuite été recouverts d'or et de palladium dans une pulvérisation ionique et observé dans SEM. Les images ont été acquises pour chaque échantillon de biofilm d'au moins cinq domaines différents.

2.4. Observation du biofilm par microscope à balayage laser confocal (CLSM) :

Les cellules du biofilm collées sur des coupons en acier inoxydable ont été traitées avec (PI) avec du SYTO 9 et de l'iodure de propidium (PI) (Flimtracer) Kit de viabilité du biofilm LIVE/DEAD, Thermo Fisher, États-Unis) pendant 20 min à température ambiante et protégées de la lumière. Après coloration, les coupons ont été rincés avec du PBS stérile (0,01 M, pH 7,4) pour l'observation microscopique, Les biofilms sur substrat ont été examinés par le CLSM, avec un Plan-Apochromat 20x/0,8 M27 objectif. La fluorescence verte et rouge de SYTO 9 et PI étaient excités en utilisant un faisceau laser Ar à 488 nm et une source de He/Ne à 561 nm respectivement. Les images de piles bidimensionnelles et tridimensionnelles ont été acquises pour chaque échantillon de biofilm provenant d'au moins cinq zones différentes.

2.5. Détection de la composition du lait avarié par infrarouge à transformée de Fourier Spectroscopie (FTIR) :

Des changements dans la composition du lait avarié dus aux différentes bactéries thermophiles ont été détectés par FTIR. Après incubation à 55°C pendant 24 h en présence d'une seule, double ou quatre espèces bactériennes, les échantillons de lait contaminé ont été lyophilisés avec un lyophilisateur, puis les poudres sèches ont été mélangées avec du bromure de potassium sec (2 %, W/W). Les mélanges ont été pressés dans les moules, puis analysé à l'aide du spectromètre FTIR dans une région de 4000 à 400 cm⁻¹ (1 cm équivaut à 10-2 m). Après cela, les courbes de spectre FTIR ont été lissées par la méthode Savitzky-Golay, dans laquelle points de fenêtre était de 25, et l'ordre polynomial était de 3. Ensuite, courbes lissé ont

pris la deuxième dérivée, et plusieurs gammes représentatives de différents échantillons, y compris 3000 à 2800 cm^{-1} , 1800–1700 cm^{-1} , 1700–1600 cm^{-1} , 1600–1500 cm^{-1} , 1500–1200 cm^{-1} et 1200–900 cm^{-1} , ont été traitées par l'analyse des composantes principales (APC).

2.6. Analyse statistique :

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type (SD) avec chaque expérience en triplicata. Les ACP ont été calculées par le logiciel OriginPro (version 2020, OriginLab, USA).

Résultats et discussion

Article 1 : Influence des protéines du lait sur l'adhésion et la formation de biofilms de *Bacillus sporothermodurans* : Implications pour le traitement industriel du lait

(Alonso *et al.*, 2022)

3.1. Résultats de l'analyse de surface du film de conditionnement et des surfaces conditionnées :

Les spectres XPS ont montré la présence de matière organique après 24 h, ce qui caractérise le conditionnement des surfaces et favorise la formation de biofilms. Dans l'industrie laitière, les films de conditionnement se forment lorsque les composants organiques du lait sont adsorbés sur les surfaces dans un environnement fluide. Cette étape se produit sur des échelles de temps de quelques minutes à quelques heures, modifiant les propriétés physico-chimiques des surfaces (énergie libre de surface, hydrophobie et charges électrostatiques) (Kumar *et al.*, 2021 ; Marchand *et al.*, 2012 ; Barnes *et al.*, 1999)

3.2. Dénombrement Cellules sessiles et des spores :

Un Groupe de trois souches de *B. sporothermodurans* a été utilisé pour favoriser la synergie entre les souches et, par conséquent, la formation d'un biofilm robuste. Ainsi, le cycle de vie du biofilm a été évalué sous l'influence des protéines du lait, à partir de la fixation des cellules, de leur maturation, de leur dispersion et de leur sporulation. Par conséquent, le cycle de vie observé (10 jours) a considéré la capacité de formation du biofilm dans les usines laitières en l'absence de régimes de nettoyage adéquats. Le pH initial (jour 1) était de 7 pour toutes les expériences, tandis que le pH final (jour 10) était de 9 pour BHI-B12 (Exp. 1) et de 8 pour les autres groupes. Après avoir retiré le biofilm des surfaces SS et désagrégé les cellules, des comptages de cellules sessiles et de spores ont été effectués (Figure 15 a et b). Le nombre de cellules sessiles variait de $4,8 \pm 0,3 \log \text{CFU/cm}^2$ pour le stade d'attachement (adhésion bactérienne) et jusqu'à $10,2 \pm 0,3 \log \text{CFU/cm}^2$ au stade de maturation du biofilm (**Tableau 1**). Le nombre moyen de cellules bactériennes sessiles par jour est présenté dans le **Tableau 1** et la (**Figure12 a**) Les valeurs les plus élevées ont été observées au jour 5 avec des comptes de $10,2 \pm 0,3 \log \text{CFU/cm}^2$ pour BHI-B12 (expérience. 1), $9,7 \pm 0,2 \log \text{CFU/cm}^2$ pour BHI-B12-W (expérience. 2), $8,7 \pm 0,4 \log \text{CFU/cm}^2$ pour BHI-B12-C (expérience. 3), et $9,0 \pm 0,2 \log \text{CFU/cm}^2$, Pour BHI-B12-W/C (expérience 4).

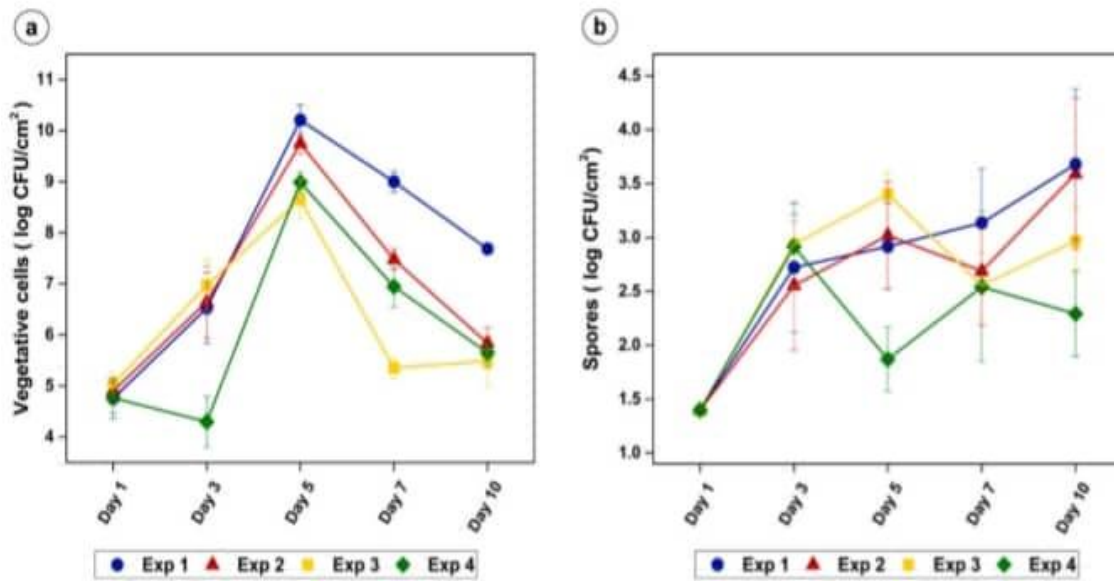


Figure 12 : dénombrement des cellules sessiles et spores dans le cycle de vie du biofilm de *B. sporothermodurans* : cellules sessiles (a) et spores (b) à la surface de SS.

Tableau1 : Valeurs moyennes de comparaison du cycle de vie du biofilm.

	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp.4
Day 1	4.8 ± 0.4	4.9 ± 0.2	5.0 ± 0.2	4.8 ± 0.3
Day 3	6.5 ± 0.7 ^a	6.6 ± 0.7 ^{a, b}	6.9 ± 0.5 ^b	4.3 ± 0.5 ^c
Day 5	10.2 ± 0.3	9.7 ± 0.2	8.7 ± 0.4	9.0 ± 0.2
Day 7	9.0 ± 0.2 ^a	7.5 ± 0.2 ^{b, d}	5.3 ± 0.2 ^{c, d}	6.9 ± 0.4 ^d
Day 10	7.7 ± 0.1 ^a	5.8 ± 0.3 ^b	5.5 ± 0.5 ^b	5.6 ± 0.3 ^b

Valeurs (log CFU/cm²) et écart-type suivis des mêmes lettres dans les lignes ne diffèrent pas dans le test Tukey (p > 0,05).

La dispersion passive du biofilm a été observée à partir des jours 7 et 10 pour tous les substrats. Les résultats n'indiquent aucune différence significative pour le nombre moyen de cellules sessiles entre les expériences pour le jour 1 et le jour 5. Cependant, des différences significatives ont été trouvées aux jours 3, 7. La sporulation a été observée au jour 3. Le nombre de spores variait de <1,4 (jour 1) à 3,7 log ± 0,3 log spores/cm² (jour 10) (**Figure 12 b**). En ce qui concerne le nombre de spores, aucune différence significative n'a été observée pour toutes les expériences.

Tous ces résultats indiquent que *B. sporothermodurans* peut se développer dans différents substrats laitiers et que les protéines du lait affectent la formation de biofilms sur l'acier inoxydable, en particulier dans les expériences 2, 3 et 4, par rapport au groupe témoin. Un faible nombre de cellules de *B. sporothermodurans* au stade de l'adhésion a été observé dans l'expérience 4 (jour 3). Cependant, ce scénario n'a pas empêché le biofilm d'atteindre sa maturité au (Jour 5), ce qui suggère que les protéines influent le comportement bactérien. (**Yun et al., 2014 ; Barnes et al., 1999**).

Un biofilm mono-espèce de *B. sporothermodurans*, avec un taux de $3,10 \pm 0,02$ log UFC/cm², et un biofilm multi-espèces de *Geobacillus* et *B.licheniformis* avec $5,1 \pm 0,02$ log UFC/cm² sur des surfaces de SS ont été précédemment rapportés dans la littérature. L'inoculum initial était de 10^7 UFC/mL et le dénombrement a eu lieu après 3 jours (**Jindal et al., 2016**). Les valeurs pour le biofilm mono-espèce sont inférieures à celles rapportées dans ce travail (minimum : $4,3 \pm 0,7$, exp. 4 et maximum : $7,0 \pm 0,7$, exp. 4). $7,0 \pm 0,7$, exp. 3) pour la même durée. Cependant, différente méthode de dégradation qui comprenait des écouvillons et un vortex (**Jindal et al., 2016**) a été utilisée. Le grand nombre de cellules de biofilm rapporté dans ce travail pourrait probablement être associé au piégeage et à l'encrassement.

Bacillus pumilus peut former un biofilm d'une charge de 5,9 logs UFC/cm² sur les surfaces en acier inoxydable après 2 jours, ils atteignant des valeurs similaires à celles des résultats rapportées dans l'étude de **Kilic et ColeriCihan (2020)**. Les spores de *Bacillus*, y compris les bacilles thermophiles, peuvent se fixer plus facilement aux surfaces en acier inoxydable que les cellules végétatives (**Parkar et al., 2001**). Le même comportement a également été observé pour les spores de *B. sporothermodurans*, *B. licheniformis* et *G. stearothermophilus* (**Jindal et Anand, 2018**). De plus, la corrosion est inévitable après une exposition prolongée à ces espèces (**Gupta et Anand, 2018**). Par conséquent, la présence de spores dans l'industrie laitière est préoccupante, car elles résistent à des conditions de traitement sévères et affichent une résistance thermique et aux désinfectants, tout en contribuant à la corrosion et à la piqûre des équipements (**Li et al., 2020 ; Gupta et Anand, 2018 ; Wan et al., 2018**)

3.3. Caractérisation de la formation du biofilm de *B. sporothermodurans* par microscopie électronique à balayage (MEB) :

Malgré des différences significatives entre le nombre de cellule et des biofilms dans les quatre expériences, il est possible que les protéines du lait contribuent aux changements

dans le phénotype du biofilm. Pour expliquer le comportement de *B. sporothermodurans* et l'influence des protéines du lait, ils ont effectué des mesures SEM de la surface couverte par le biofilm des échantillons au jour 1, jour 5 et jour 10.

Jour 1 - La surface mesurée a montré des différences significatives pour le premier jour. En particulier, les surfaces des biofilms des expériences 3 et 4 étaient significativement différentes les unes des autres (**Figure 13 c, d, e**). Ainsi, le MEB a révélé que ce comportement a pu être influencé par la caséine, qui était présente dans les deux expériences. Dans l'expérience 2 (**Figure 13b**), les formes des biofilms liés à la surface observée ont montré une distribution inhabituelle, avec de petites grappes et des motifs circulaires se développant dans le plan horizontal. Les valeurs moyennes, médianes, minimales et maximales des surfaces des biofilms sont conformes à cette constatation (**tableau1**).

De manière intéressante, des différences significatives dans les diamètres des cellules ont également été observées, notamment pour l'expérience 4, les valeurs minimale, moyenne et maximale étaient respectivement de 0,6 μm , $0,8 \pm 0,02 \mu\text{m}$ et 0,9 μm . En revanche, les expériences 1, 2 et 3 présentaient des valeurs de 0,4 μm , une moyenne de $0,6 \pm 0,01 \mu\text{m}$ et un maximum de 0,9 μm . Pour la longueur de *B. sporothermodurans* sur les surfaces ou les biofilms sont formés, les valeurs variaient d'un minimum de 2,5 μm à un maximum de 26,9 μm . Les longueurs moyennes pour les exp. 1, 3 et 4 étaient respectivement de $7,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $7,0 \pm 0,7 \mu\text{m}$, $7,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$, et sans différence significative au jour 1. Cependant, la longueur moyenne pour l'exp. 2 était de $10,9 \pm 0,4$.

Jusqu'à présent, les cellules planctoniques de *B. sporothermodurans* ont été examinées avec du MEB, avec des longueurs comprises entre 6 μm et 10 μm et des diamètres de 0,5 μm (**Montanari et coll., 2004**). Ces valeurs sont inférieures aux valeurs maximales observées pour les cellules sessiles rapportées dans ce travail (longueurs jusqu'à $\sim 27 \mu\text{m}$ et largeurs $\sim 0,9 \mu\text{m}$), l'augmentation du diamètre de ce micro-organisme peut être liée à la présence de spores centrales ou subterminales.

D'autre part, les dimensions des cellules bactériennes, l'attachement cellulaire et la structure du biofilm peuvent également être affectés par la composition chimique du milieu de culture (**Gloaget al., 2020 ; Gupta et Anand, 2018**). Les différences d'attachement cellulaire observées dans la distribution spatiale des expériences 3 et 4 peuvent être expliquées par les interactions des cellules avec ces composés chimiques. Ces interactions peuvent être une

préoccupation pour la sécurité alimentaire, car ces protéines sont fréquemment en contact avec les surfaces dans la production laitière (Flint *et al.*, 2015).

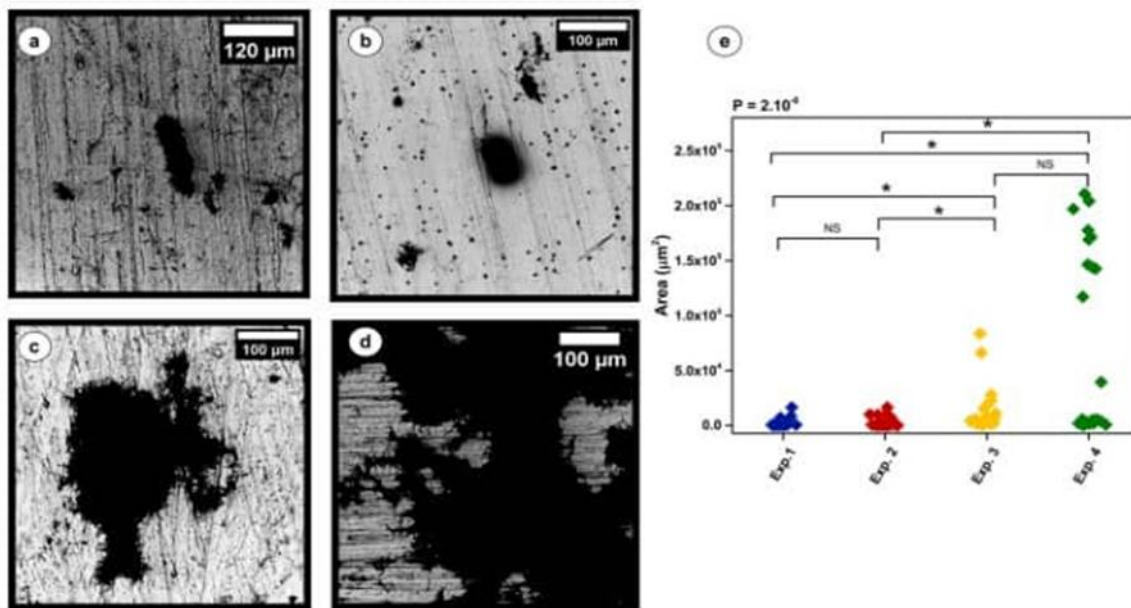


Figure 13 : Caractérisation par MEB du biofilm de *B. sporothermodurans* sur la surface des SS le 1er jour.

Jour 5 - De façon remarquable, les biofilms matures ont montré des différences significatives par rapport aux résultats de l'attachement cellulaire (Jour1) et entre les expériences du Jour 5. Les protéines du lait (Protéines de lactosérum et caséine) ont affecté le nombre final de cellules sessiles présentes sur les surfaces des SS (Résultats présentés dans la (étapes Cellules sessiles et comptage des spores), et les données SEM ont également montré un comportement hétérogène (Figure 14 b, c et d), indiquant que les protéines du lait peuvent avoir un impact sur la formation du biofilm

La taille des niches dans la maturation du biofilm était significativement plus élevée dans l'expérience 1 - groupe témoin (Figure 14 a), montrant des différences significatives par rapport à l'expérience 2 (Figure. 14 b, e et f), l'expérience 3 (Figure 14c, e et f), et expérience 4 (Figure 14d et e).

En général, le comportement de *B. sporothermodurans* dans le groupe témoin a suivi la maturation attendue du biofilm (jour 5), avec plus de niches que pendant l'attachement des cellules (jour 1). Ce résultat est cohérent avec nos observations précédentes, qui ont montré une augmentation du nombre de cellules végétatives. L'analyse comparative est également évidente dans les valeurs moyennes, médianes, maximales et minimales des surfaces de biofilms

(Tableau 1 supplémentaire). Nous avons pu visualiser et mesurer les cellules individuelles sous fort grossissement pour tous les groupes, sauf pour l'expérience 2. Les moyennes étaient de $6,2 \pm 0,8 \mu\text{m}$, $6,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$, et $3,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ pour la longueur, et $0,5 \pm 0,03 \mu\text{m}$, $0,7 \pm 0,02 \mu\text{m}$, et $0,8 \pm 0,05 \mu\text{m}$ pour le diamètre, dans l'exp. 1, l'exp. 3, et exp. 4, respectivement. De plus, les motifs circulaires des agglomérats dans l'expérience 2 ont confirmé nos résultats pour le jour 1 (figure 15 b).

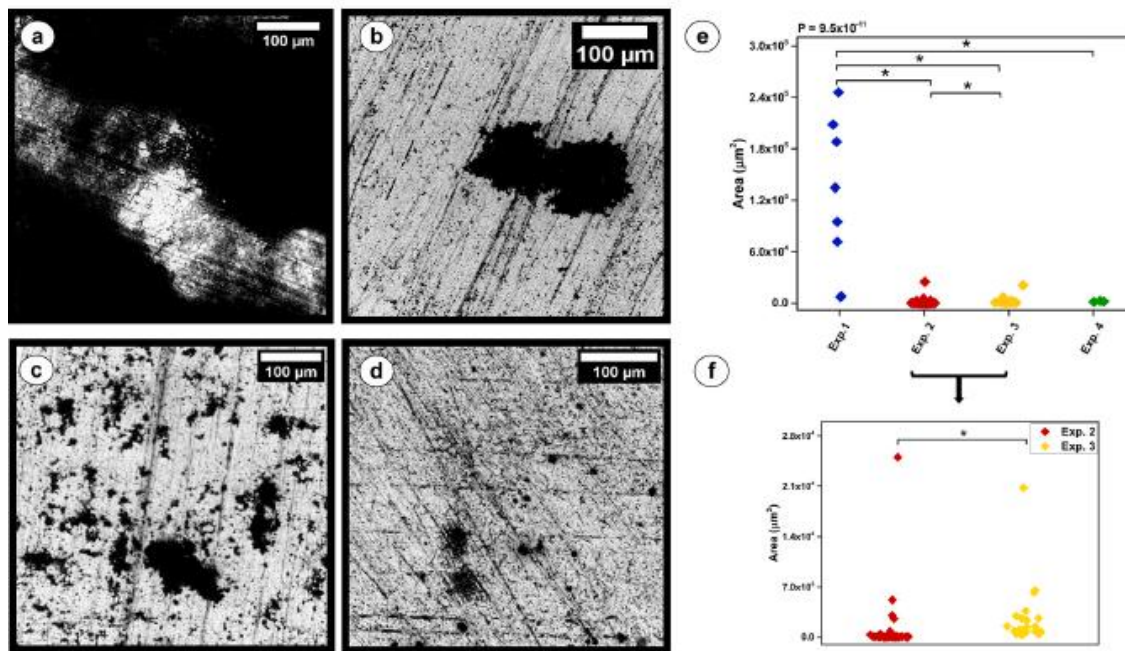


Figure 14 : Caractérisation par MEB du biofilm de *B. sporothermodurans* sur la surface des SS au 5eme jour.

Nos résultats indiquent que les protéines du lait affectent la structure de *B. sporothermodurans* sur les surfaces de SS, et par conséquent, la matrice des substances polymériques extracellulaires (EPS) qui contribuent au cycle de vie du biofilm (Karygianni *et al.*, 2020). Bien que l'EPS soit commun à la plupart des bactéries, différents formats structurels et distributions sont présentés par les bactéries Gram-positives, y compris des polymères de paroi secondaire liés de manière covalente au peptidoglycane, des glycoconjugués, des protéines glycosylées, des polysaccharides capsulaires et des exopolysaccharides sécrétés (Whitfield *et al.*, 2020)

La distribution spatiale du biofilm au jour 5 peut être considérée comme une dispersion. Les comptages de cellules sessiles (résultats présentés dans la section 3.2) montrent que le

biofilm a atteint sa croissance maximale au jour 5 pour toutes les expériences. En comparant ces données avec les observations microscopiques, un grand nombre de petites niches de biofilm sont révélées dans la phase de dispersion active. Dans ce cas, les bactéries se répandent sur l'acier inoxydable, avec quelques et petits clusters. Ce processus est déclenché par des signaux et se caractérise par une transition ordonnée (**McDougald *et al.*, 2012**). Cette dispersion, également appelée native, est initiée par les bactéries qui sont situées au centre des biofilms matures (**Rumbaugh et Sauer, 2020**). Par conséquent, la dispersion active n'est remarquée que par microscopie. Ces résultats indiquent que l'utilisation de plus d'une technique pour quantifier les cellules adhérentes et observer l'architecture des biofilms est extrêmement utile (**Azeredo *et al.*, 2017**)

Jour 10 - Une réduction de la taille des biofilms liés à la surface a été observée dans l'expérience 1 - groupe témoin. Visuellement, la plupart des amas observés présentaient un détachement et une érosion (**Figure 15**). Ces observations peuvent également être confirmées par des mesures de niche (**tableau 1**). Le stade auquel la distribution spatiale du biofilm a une hauteur maximale après le détachement des cellules est connu sous le nom de dispersion passive, et se produit généralement à la fin des cycles de vie et est caractérisé par le détachement et l'érosion des cellules (**McDougald *et al.*, 2012**). Contrairement à la dispersion active, qui a été observée au jour 5 uniquement par MEB, cette dispersion passive a pu être confirmée par des comptages de plaques, un comportement attendu au jour 10. La distribution spatiale dans l'expérience. 1 (**Figure 15a**) était significativement différente par rapport à l'Expérience 2 (**Figure 15 b**) et l'expérience. 3 (**Figure 15 c**). Dans l'expérience 2, ils ont une augmentation des amas par rapport aux autres jours, bien que de petits amas soient restés sur la surface du SS.

En outre, des différences dans la longueur et le diamètre des cellules ont également été observées au jour 10, notamment la petite taille des niches. Cependant, des études plus détaillées pour caractériser chimiquement ces petites niches doivent encore être réalisées. Dans l'expérience 3, les bactéries ont présenté de longues connexions et des structures qui font partie de la distribution spatiale du biofilm. Ces cellules allongées ont également été observées dans l'expérience 4, ainsi que les cellules impliquées dans l'EPS. Les structures avaient une forme circulaire, qui était la même que celle observée dans l'exp. 1 et dans l'expérience 2.

Un diagramme schématique résumant les principaux résultats du cycle de vie du biofilm de *B. sporothermodurans* est présenté dans la **Figure 16**.

Bien que nous ayons vu des cellules allongées dans cette étude, nous ne pouvons pas conclure ce qu'elles représentent. Dans la littérature, les cellules allongées sont un comportement commun des cellules planctoniques des souches HRS, précédemment observées par des microscopes optiques conventionnels (**Pettersson et al., 1996**). Cependant, pour *Xylella. fastidiosa*, ce comportement est plus fréquent dans les cellules sessiles situées aux bords des biofilms. Cela s'explique par le fait que les bactéries allongées sont responsables de l'interconnexion des petits amas bactériens dans le biofilm (**Janissen et al., 2015**). Des chaînes de cellules allongées avec une septation minimale visible sont trouvées sur les bords de la population bactérienne en expansion. Ceci a été précédemment rapporté pour *Campylobacte jejuni* en présence de lait et de sang (**Liu et al., 2020**), et pour les biofilms de *Xylella . fastidiosa* (**Janissen et al., 2015**). De plus, la surproduction de protéines (GpSB et YpsA) peut favoriser la filamentation, ou la formation de cellules allongées par la perturbation de l'assemblage de FtsZ (structure en anneau et protéine centrale de division) (**Brzowski et al., 2020 ; White et Eswara, 2020 ; Amos et Lowe, 1998**). Cette élongation est intéressante pour les groupes de recherche étudiant des organismes non-modèles, car elle peut révéler de nouveaux mécanismes de régulation (**White et Eswara, 2020**).

L'homogénéité des échantillons de SS a été vérifiée avant la formation du biofilm, et aucun des échantillons ne présentait de fissures ou de tranchées. Cependant, des couches de biofilm ont été observées pour couvrir les fissures ou les tranchées de surface dans l'expérience 4 .La corrosion et les piqûres sur les surfaces en acier inoxydable peuvent abriter des bactéries indésirables (agents de détérioration et pathogènes), mettant ainsi en danger la chaîne de production. Les piqûres sur les surfaces en acier inoxydable causées par ces bactéries ont été rapportées précédemment (**Gupta et Anand, 2018**). La corrosion induite par les microbes (MIC) est un domaine d'étude qui présente un grand intérêt pour l'industrie laitière (**Gupta et Anand, 2018 ; Li et al., 2020**).

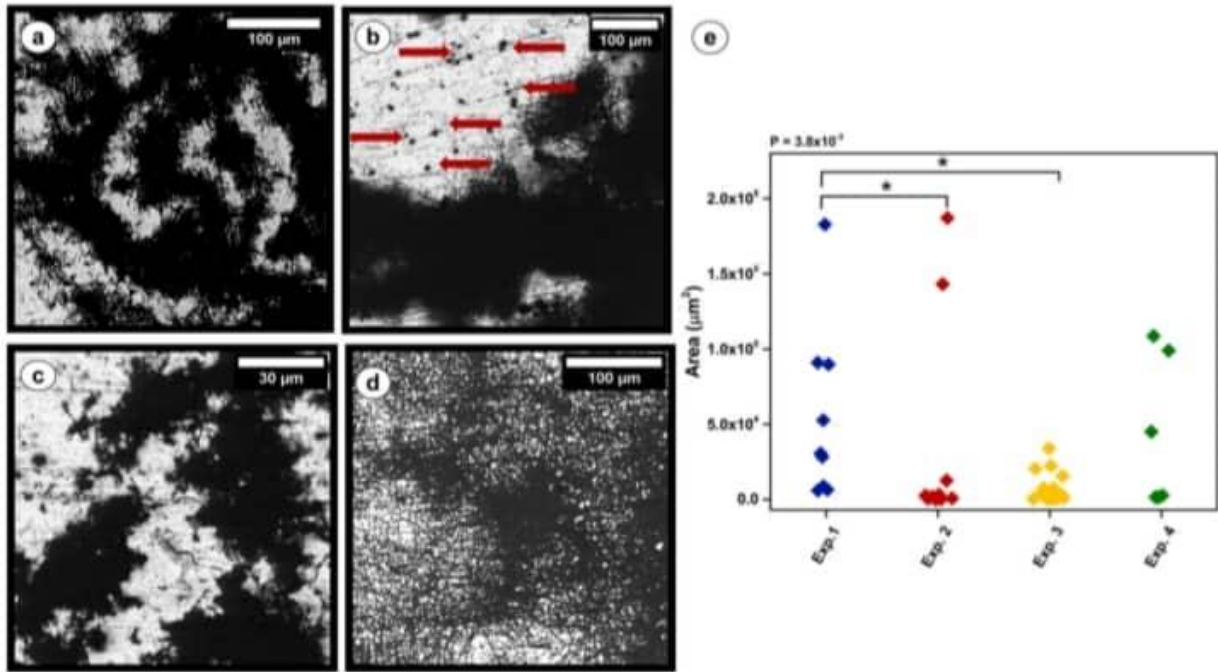


Figure15: Caractérisation par MEB du biofilm de *B. Sporothermodurans* sur la surface des SS au 10 jour.

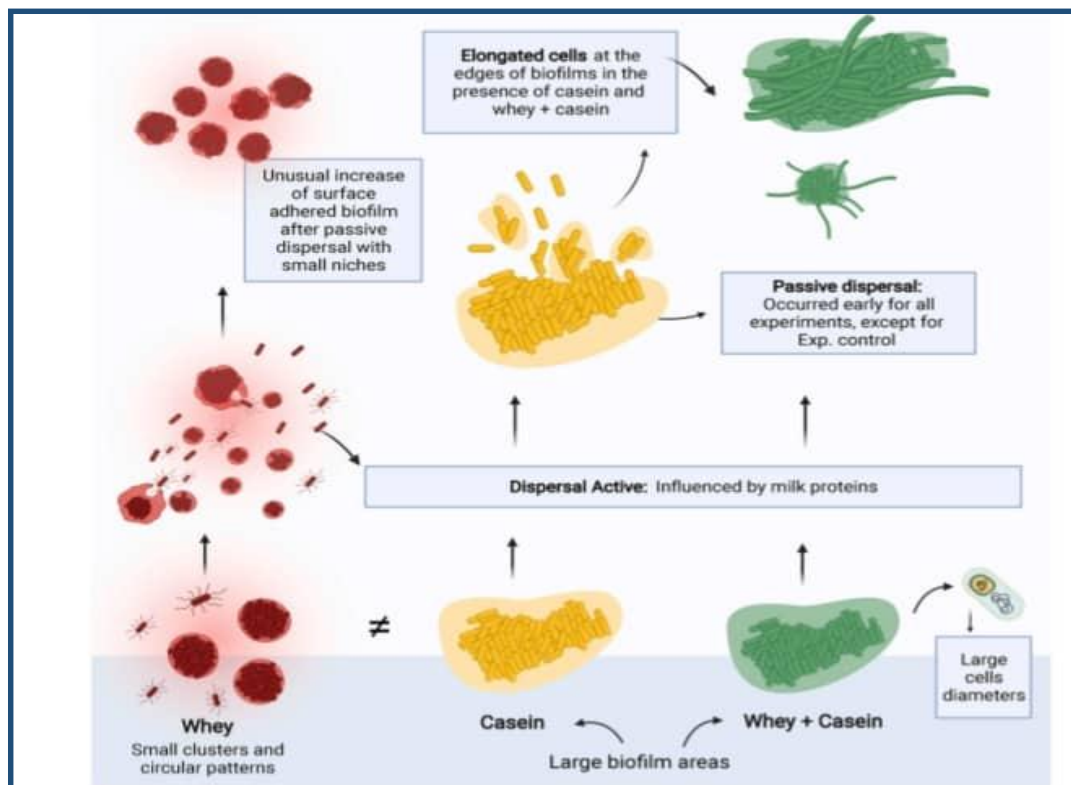


Figure16: Diagramme schématique résumant les principaux résultats du cycle de vie du biofilm de *B. sporothermodurans*.

En plus de l'influence du film de conditionnement sur les biofilms liés à la surface, la formation de biofilms à la surface air-liquide se produit également, ce qui peut être lié à la compétition par paire entre les biofilms pour l'oxygène ou les nutriments. Cette formation peut être liée à des lignées adaptatives, permettant une interaction avec l'environnement et présentant un avantage accru en termes de fitness (Koza *et al.*, 2020). En outre, les adaptations physiologiques et adaptations morphologiques, communes à l'interface air-liquide pour les biofilms, peuvent déclencher des changements métaboliques et la sporulation. Ces cellules sont métaboliquement plus actives et agressives dans les interactions et les actions coordonnées contre les concurrents (Astorga *et al.*, 2020). Une possibilité est que la compétition entre les biofilms influence le nombre de cellules sessiles. Par conséquent, pour les études *in vitro*, nous recommandons que les travaux futurs adoptent une approche plus large pour accompagner cette formation, incluant à la fois la microscopie et le comptage. Les essais de formation de biofilms sur la surface air-liquide sont également intéressants pour les études concernant la production et la comparaison des EPS (Martin *et al.*, 2020 ;H' olscher *et al.*, 2015).

D'autres bacilles, tels que *B. cereus*, *B. subtilis* et *B. licheniformis* associés au lait forment également des biofilms à l'interface air-liquide avec une pellicule robuste (Ostrov *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2017). De plus, *B. cereus* présente une meilleure formation de biofilms à l'interface air-liquide que dans les systèmes immergés (Wijman *et al.*, 2007). Nous n'avons pas trouvé d'études qui rapportent la formation de *B. sporothermodurans* dans ce système. Nous suggérons donc que les études futures évaluent davantage ce microorganisme, car il peut être présent dans les pipelines industriels et de stockage ou rester dans le liquide résiduel après un cycle de production (Wijman *et al.*, 2007).

3.4. Évaluation des traitements enzymatiques et des désinfectants contre les biofilms de *B.sporothermodurans* par la méthode du tube unique (STM) :

La méthode à tube unique (ASTM E2871) était la méthode standard choisie pour mesurer l'efficacité des produits antimicrobiens contre les biofilms, qui est déterminée par une réduction logarithmique des comptages cellulaires viables. L'inoculum initial a été augmenté de 10^4 à 10^8 UFC/mL pour vérifier que la réduction des cellules viables atteindrait les valeurs prévues (~ 5 log).

Bien que l'inoculum soit dans des conditions différentes des expériences précédentes, L'évaluation a été effectuée après 24 heures de biofilm dans le milieu BHI-B12. La valeur log

du milieu témoin non traité (LDC) et les surfaces traitées (LDT), ainsi que le LR des produits enzymatiques et les désinfectants utilisés sont présentés au **tableau 2**

Les produits enzymatiques (iTram®) ont été efficaces pour l'élimination du biofilm de *B. sporothermodurans* sur les surfaces en inox (tableau 2) Il est important de noter que les produits enzymatiques ne sont pas bactéricides ; ils ne décomposent que les matières protéiques et les matrices polysaccharidiques (**Anand et al., 2014**). Ainsi, les protocoles d'application iTram® recommandent que les produits enzymatiques soient appliqués avant une désinfection. Produits enzymatiques doivent être appliqués avant un désinfectant (**iTram Hygiene, 2020b**). La méthodologie de ce travail ayant évalué uniquement l'efficacité des produits et non le processus de nettoyage, on s'attend à ce que lorsqu'ils sont appliqués en même temps que les autres étapes, un niveau d'élimination plus élevé serait atteint que les données présentées (**iTram Hygiene, 2020b**). En outre, l'effet synergique des enzymes (amylase, protéase et lipase) à un pH neutre contre la formation de biofilms dans l'industrie alimentaire a déjà été démontré dans un précédent travail (**Tsiaprazi-Stamou et al., 2019**), ainsi que dans un tuyau de remplissage de produits laitiers (**Fysun et al., 2019**).

Les produits enzymatiques ont été efficaces pour éliminer le biofilm de *B. sporothermodurans* des surfaces en surfaces d'acier inoxydables. Il est important de noter que les produits enzymatiques ne sont pas bactéricides; ils ne décomposent que les matières protéiques et les matrices polysaccharidiques (**Anand et coll., 2014**). Par exemple, les protocoles d'application (iTram) recommandent l'application de produits enzymatiques avant un désinfectant. La méthodologie de ce travail évaluait uniquement l'efficacité des produits et non le processus de nettoyage, on s'attend à ce que, lorsqu'elle est appliquée conjointement avec les autres étapes, le niveau d'élimination soit plus élevé que les données présentées (**iTram Hygiene, 2020**).

La composition chimique des deux produits est un mélange de différentes concentrations d'acide acétique et peracétique, d'acide octanoïque et de peroxydes d'hydrogène. Ces produits sont recommandés pour la désinfection des surfaces en acier inoxydable. (**ECOLAB, 2020b; 2020a**).

La composition chimique des toutes premières couches trouvées sur la surface a été déterminée par analyse XPS, avant (contrôle) et après la procédure STM. Les spectres de l'étude pour tous les échantillons prélevés après le traitement n'ont montré aucune trace significative de matière organique à la surface. Tous les spectres ont indiqué une composition chimique

identique à l'échantillon témoin, qui caractérise l'efficacité de la procédure de nettoyage de désinfection. Par conséquent, ces produits peuvent être utilisés comme stratégie pour prévenir et réduire l'impact des biofilms de *B. sporothermodurans*. L'efficacité du traitement enzymatique et de la désinfection des biofilms de *B. sporothermodurans* a constitué la dernière étape de cette recherche.

Tableau 02 : Efficacité du traitement enzymatique et des désinfectants sur le biofilm de *B. sporothermodurans*

	Enzymatic treatment (Itram®)				Disinfectants (Ecolab®)			
	Biojet + Enzyjet Plus		Enzycip		Vortex		Vortex ES	
	LD	SD	LD	SD	LD	SD	LD	SD
Treated sample (LD _T)	3.83	0.39	3.06	0.57	3.62	0.37	2.42	0.36
Control sample (LD _C)	8.86	0.18	8.14	0.10	8.13	0.13	8.74	0.03
Log10 reduction (LR)	5.03	0.43	5.08	0.57	4.51	0.39	6.32	0.36

LD : densité log10 ; **SD** : Ecart-type.

Article 2 : Développement d'un biofilm multi-espèces formé par des bactéries thermophiles sur de l'acier inoxydable immergé dans du lait écrémé

(Wang *et al.*, 2021)

3.1. Incubation d'une seule espèce et formation d'un biofilm de bactéries thermophiles :

B. licheniformis, *G. stearothermophilus*, *B. Subtilis* et *A. flavithermus* ont toutes été capables d'adhérer sur l'acier inoxydable mis en contact avec le lait. Après des cultures séparées pendant 24 h à 55 °C, comme le montre la (**Figure 17A**), *B. licheniformis* et *G. stearothermophilus* ont produit des biofilms, avec dénombrement de cellules adhérentes atteint 6,12 et 6,01 log CFU/cm², respectivement. Le nombre de cellules adhérentes d'*A. flavithermus* était de 4,32 log CFU/cm², tandis que *B. Subtilis* était simplement de 2,52 log CFU/cm². Les images SEM de la (**figure 17B**) ont également présenté un assemblage dense de biofilms d'adhérence de *B. licheniformis* et *G. stearothermophilus* sur acier inoxydable, ainsi qu'une distribution des clairsemés coupons *B. Subtilis* et *A. flavithermus*. Ces quatre souches étaient rhabdoïdes avec des apparences similaires. Il semble que la longueur moyenne des cellules de *B. licheniformis* et de *G. stearothermophilus* était plus longue que celles de *B. Subtilis* et d'*A. flavithermus*. Les images du CLSM ont montré que le biofilm formé par *B. licheniformis* était rassemblé en différents groupes à haute densité cellulaire tandis que *G. stearothermophilus* produisait un biofilm épais en tuiles, ce qui aboutissait également à une biomasse élevée. Presque toutes les cellules de *B. licheniformis* étaient vivantes (en vert sur les images), tandis que des cellules mortes rares (en rouge sur les images) de *G. stearothermophilus* ont été observées. Deux biofilms faiblement formés, *B. Subtilis* et *A. flavithermus*, ont également employé des structures spatiales de biofilm différentes, bien qu'ils aient relativement une faible biomasse. *B. Subtilis* a produit un biofilm stéréo épais à base de matrice protéique à partir du lait putride, et *A. flavithermus* a adhéré fermement sur un substrat en acier inoxydable en couche mince. Plusieurs grappes de cellules mortes de *B. Subtilis* sont apparues, tandis que la dispersion de cellules mortes de *A. flavithermus* représentait une proportion élevée.

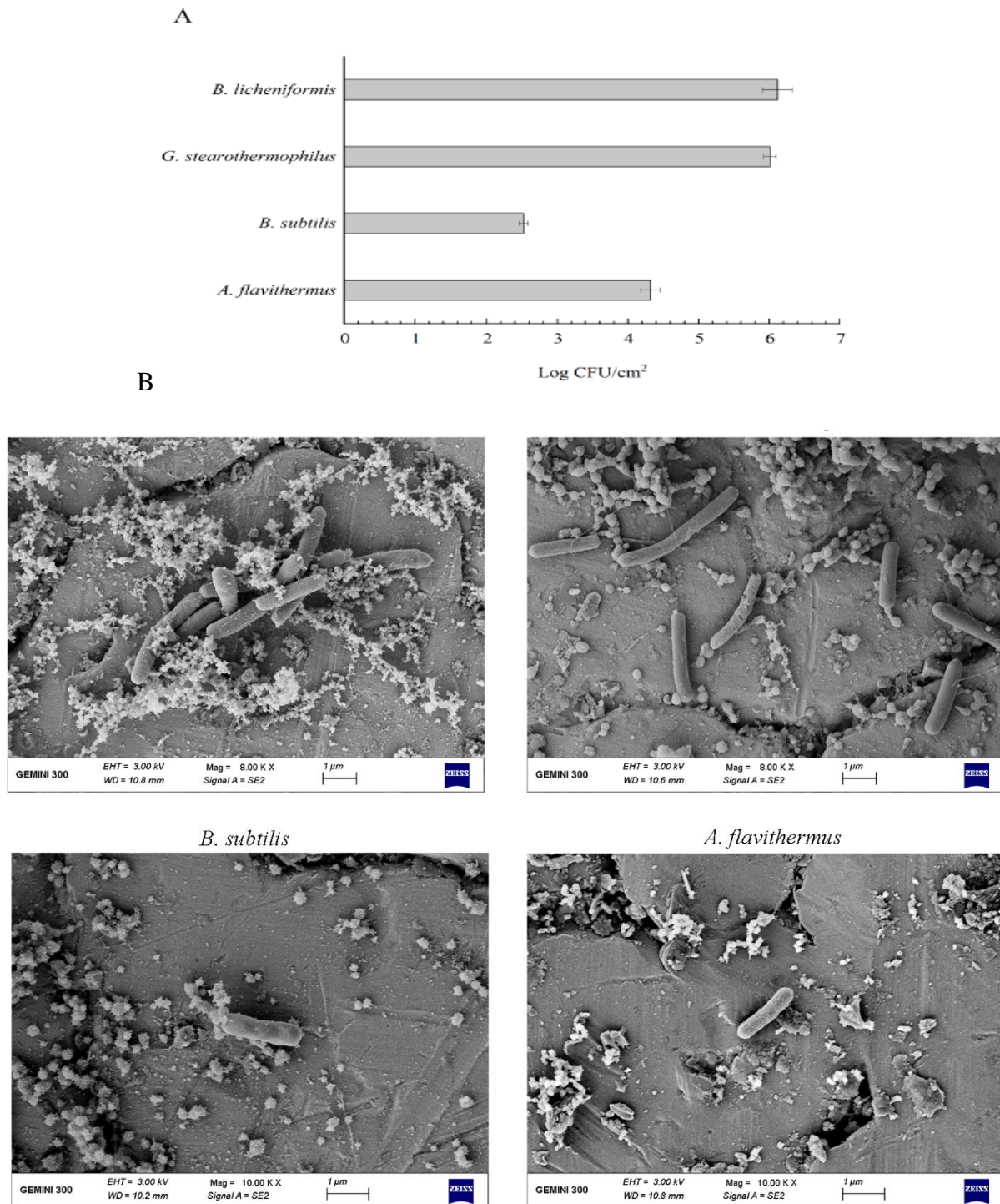


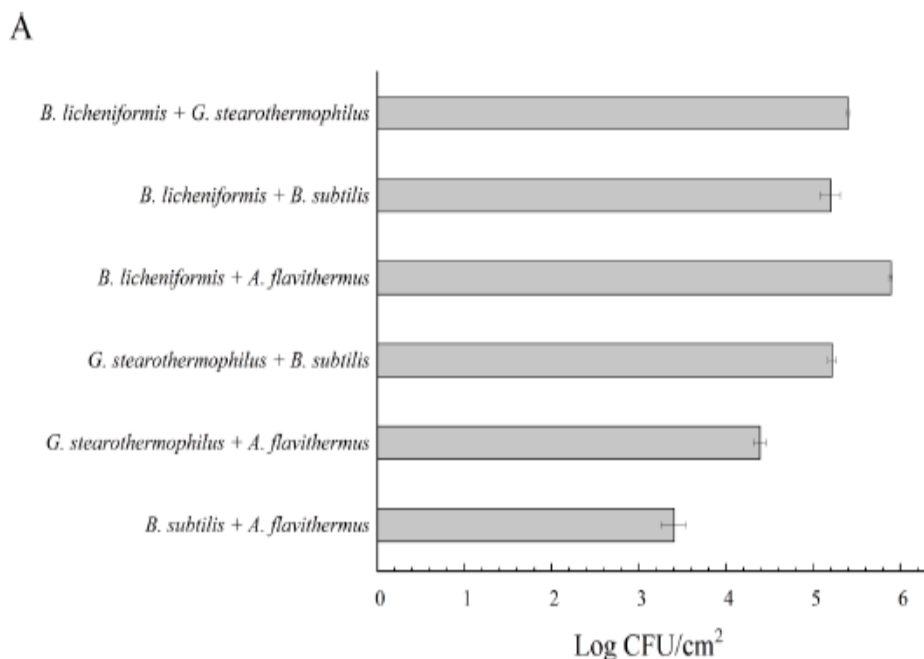
Figure 17 : Images montrant les capacités de formation de biofilm dans les cultures mono-spécifiques sur des surfaces en acier inoxydable immergées dans du lait écrémé. (A) numéros UFC ; (B) images SEM. Les données représentent les moyennes \pm SD des résultats obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

D'après les résultats montrés les chercheurs ont remarqué que le biofilm formé par les bactéries thermophiles présentait des risques de qualité lors de traitement du lait en poudre.

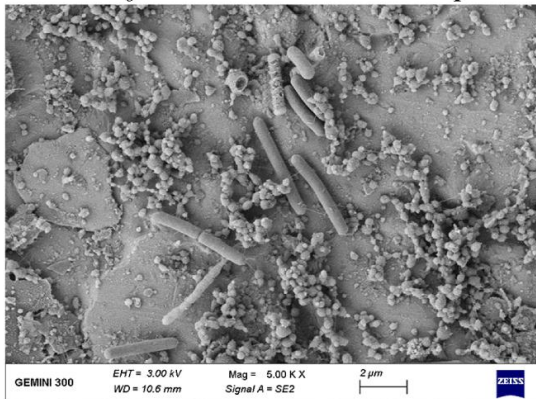
Notamment lors de l'étape continue d'évaporation avant le séchage par atomisation. Les espèces prédominantes isolées des produits à base de poudre de lait ont attiré l'attention de l'industrie laitière. *B. licheniformis*, *G. stearothermophilus*, *B. subtilis* et *A. flavithermus* ont été trouvés omniprésents pendant le traitement de la poudre de lait.

3.2. Incubation de deux espèces et formation de biofilms de bactéries thermophiles :

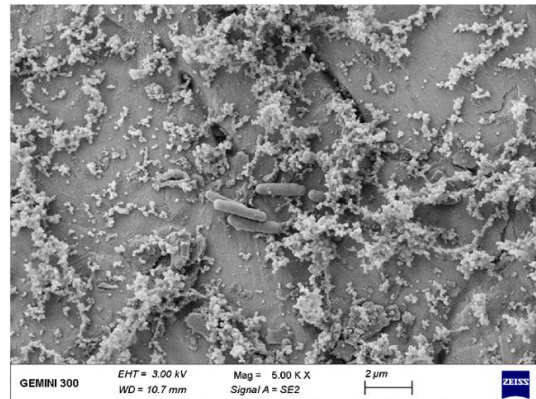
Le nombre de cellules des biofilms à double espèce, y compris *B. licheniformis*+*G. stearothermophilus*, *B. licheniformis* + *B. subtilis*, *B. licheniformis* + *A. flavithermus*, *G. stearothermophilus*+ *B. subtilis*, *G. stearothermophilus* + *A. flavithermus* et *B. subtilis* + *A. flavithermus*, étaient de 5,39, 5,20, 5,89 5,22, 4,39 et 3,41 log CFU/cm² respectivement (**Figure 18 A**). La biomasse des biofilms à double espèce était inférieure à celle des biofilms à espèce unique en général. Les images SEM et l'apparence des colonies des biofilms à double espèce sont présentées dans les **Figure 18 B**. Il est difficile d'identifier les cellules et de calculer le nombre d'UFC/cm². Leurs pourcentages exacts dans les systèmes à double espèce, que ce soit sous le microscope électronique à balayage ou sur les plaques de gélose. Mais deux types de cellules et de colonie ont été découverts de façon évidente, surtout pour *B. licheniformis* + *G. stearothermophilus*, *G. stearothermophilus*, *B. licheniformis* + *B. subtilis*, *B. licheniformis* + *A. flavithermus*, *G. stearothermophilus* + *B. subtilis*. Cependant, pour *G. stearothermophilus* + *A. flavithermus*, presque toutes les cellules observées étaient des cellules de *G. stearothermophilus*.



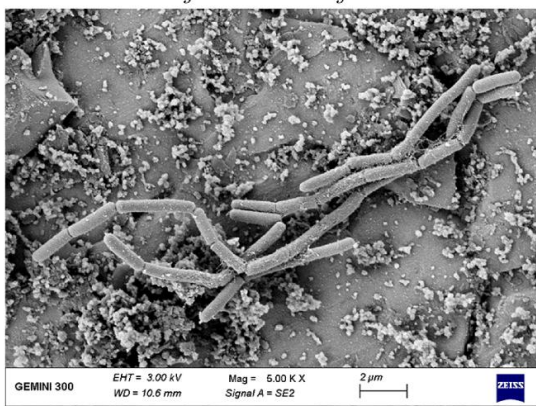
B. licheniformis + *G. stearothermophilus*



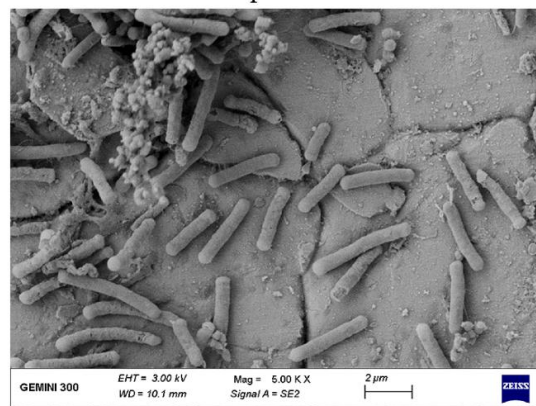
B. licheniformis + *B. subtilis*



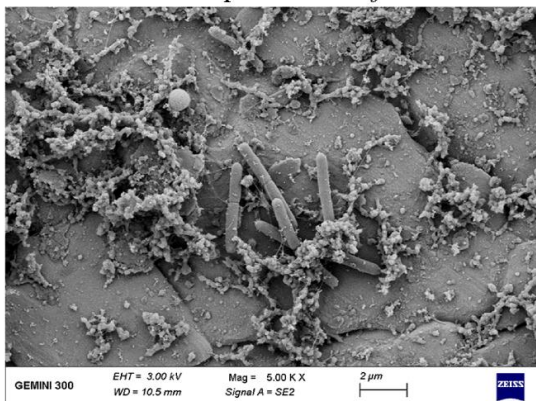
B. licheniformis + *A. flavithermus*



G. stearothermophilus + *B. subtilis*



G. stearothermophilus + *A. flavithermus*



B. subtilis + *A. flavithermus*

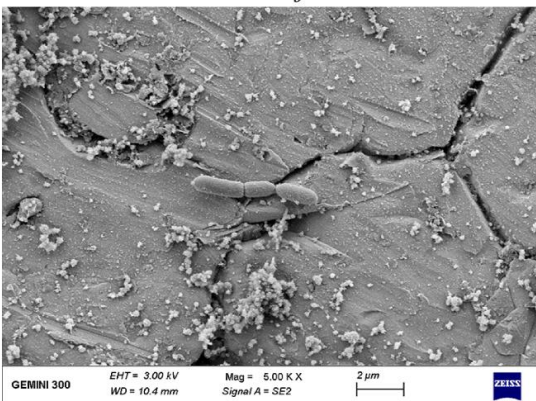


Figure 18 : Images montrant les capacités de formation de biofilm dans les cultures mono-spécifiques sur des surfaces en acier inoxydable immergées dans du lait écrémé. (A) numéros UFC ; (B) images SEM. Les données représentent les moyennes \pm SD des résultats obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

Le but de cette étude était d'étudier la capacité de formation de biofilms par les quatre espèces à la fois en culture mono-espèce et en culture multi-espèce. Les résultats de l'incubation d'une seule espèce ont révélé que *B. licheniformis* et *G. stearothermophilus* étaient plus compétente pour établir des biofilms sur de l'acier inoxydable immergé dans du lait écrémé que

Bacillus subtilis et *A. flavithermus*. Alors que, parmi les 6 groupes expérimentaux il a été remarqué que la co-culture des deux espèces *B. licheniformis* plus *A. flavithermus* a atteint le nombre le plus élevé d'UFC.

En revanche, lorsque les deux forts producteurs de biofilms *B. licheniformis* et *G. stearothermophilus* ont été inoculé ensemble, le nombre totale d'ufc était inférieur à celui de leurs cultures mono-spécifiques tandis que le nombre d'ufc de *G. stearothermophilus* et de *A. flavithermus* s'est rapprochés de celui de la culture individuelle d'*A. flavithermus*.

Ces résultats indiquent qu'il peut y avoir des effets synergiques sur la prolifération et la croissance entre *B. licheniformis* et *A. flavithermus*, alors qu'entre *G. stearothermophilus* et *A. flavithermus* une relation antagoniste a été observée

3.3. Effets de la détérioration du lait par les bactéries thermophiles

Après 24 heures de culture, les valeurs de pH du lait putride altéré par une et deux espèces thermophiles sont indiquées dans la **figure 19**. Une et deux espèces thermophiles ont été montrées dans la **Figure 19**. Dans des conditions aseptiques, le pH du groupe témoin était de 7,03. La reproduction de *B. licheniformis* a légèrement augmenté le pH du lait à 7,08, tandis que *G. stearothermophilus* a réduit significativement le pH à 4,89. *B. subtilis* a abaissé le pH à 6,72, et *A. flavithermus* l'a fait baisser à 6,44. Les communautés bi-spécifiques ont fait la moyenne des effets des deux souches co-cultivées et ont donné des valeurs modérées par rapport aux incubations d'une seule espèce. Concrètement, *B. licheniformis*+ *G. stearothermophilus* était de 5,54, *B. licheniformis*+ *B. subtilis* était de 6,93, *B. licheniformis*+ *A. flavithermus* était de 6,39, *G. stearothermophilus*+ *B. subtilis* était de 5,55, *G. stearothermophilus*+ *A. flavithermus* était de 4,91, et *B. subtilis*+ *A. flavithermus* de 6,59. Les courbes du spectre FTIR des échantillons à une espèce, à deux espèces, à quatre espèces et du groupe témoin présentaient des différences de composition (**Figure 20 A**). Les bandes principales et les attributions des spectres FTIR ont été répertoriées dans le Tableau 1. Les résultats de l'ACP des courbes de l'IRTF de second dérivé dans différentes gammes sont présentés à la figure 4B. Différentes gammes sont présentées sur la (**Figure 20 B**). Entre 3000 et 2800 cm^{-1} le groupe témoin et le groupe du lait putride sont significativement séparés. *B. licheniformis*, *A. flavithermus*, *B. subtilis* étaient loin du groupe témoin, tandis que *G. stearothermophilus* était proche du groupe témoin. Dans les zones 1800-1700 cm^{-1} et 1700-1600 cm^{-1} les distributions étaient assez similaires. *G. stearothermophilus*, *B. licheniformis* + *A. flavithermus* étaient les deux groupes les plus éloignés du groupe témoin. Deux groupes les

plus éloignés du contrôle. Dans $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ les groupes mono-spécifiques possédaient plus de diversités par rapport au contrôle que leurs mélanges. Dans $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ *A. flavithermus* était le plus éloigné du contrôle. Dans $1200-900\text{ cm}^{-1}$ tous les groupes de lait putride étaient assez éloignés du témoin, Il est intéressant de noter que *G. stearothermophilus* et les groupes à deux espèces contenant *G. stearothermophilus* étaient proches du groupe à quatre espèces.

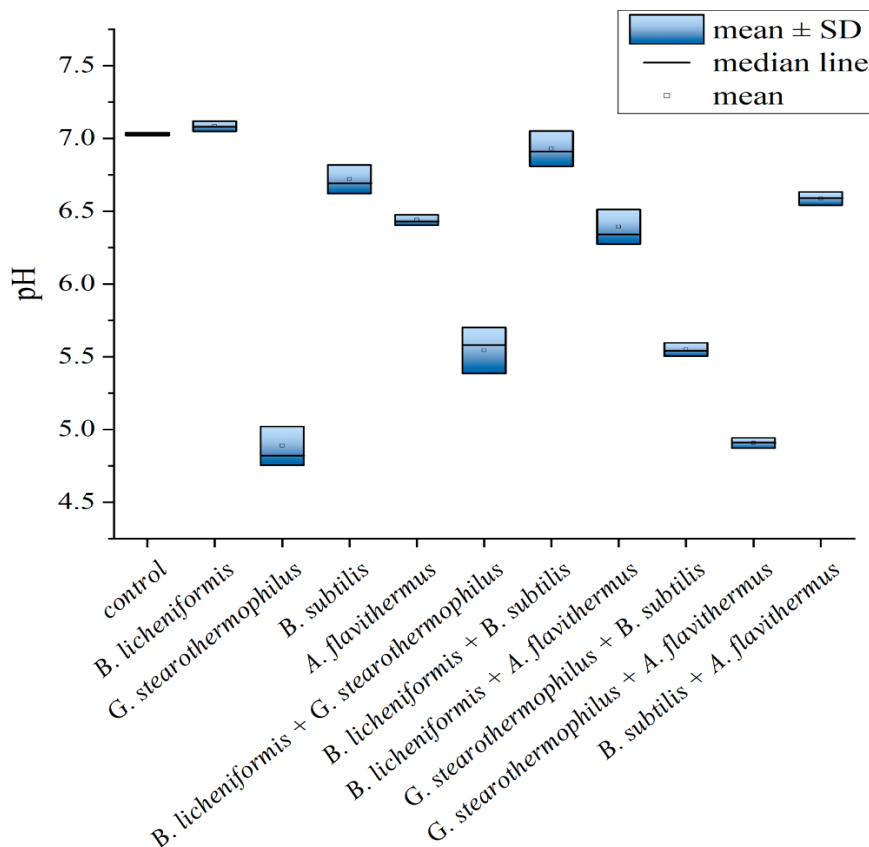


Figure 19 : Changements de pH du lait écrémé affectés par des incubations de bactéries thermophiles mono-spécifiques et bispécifiques. Les données représentent les moyennes \pm SD des résultats obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

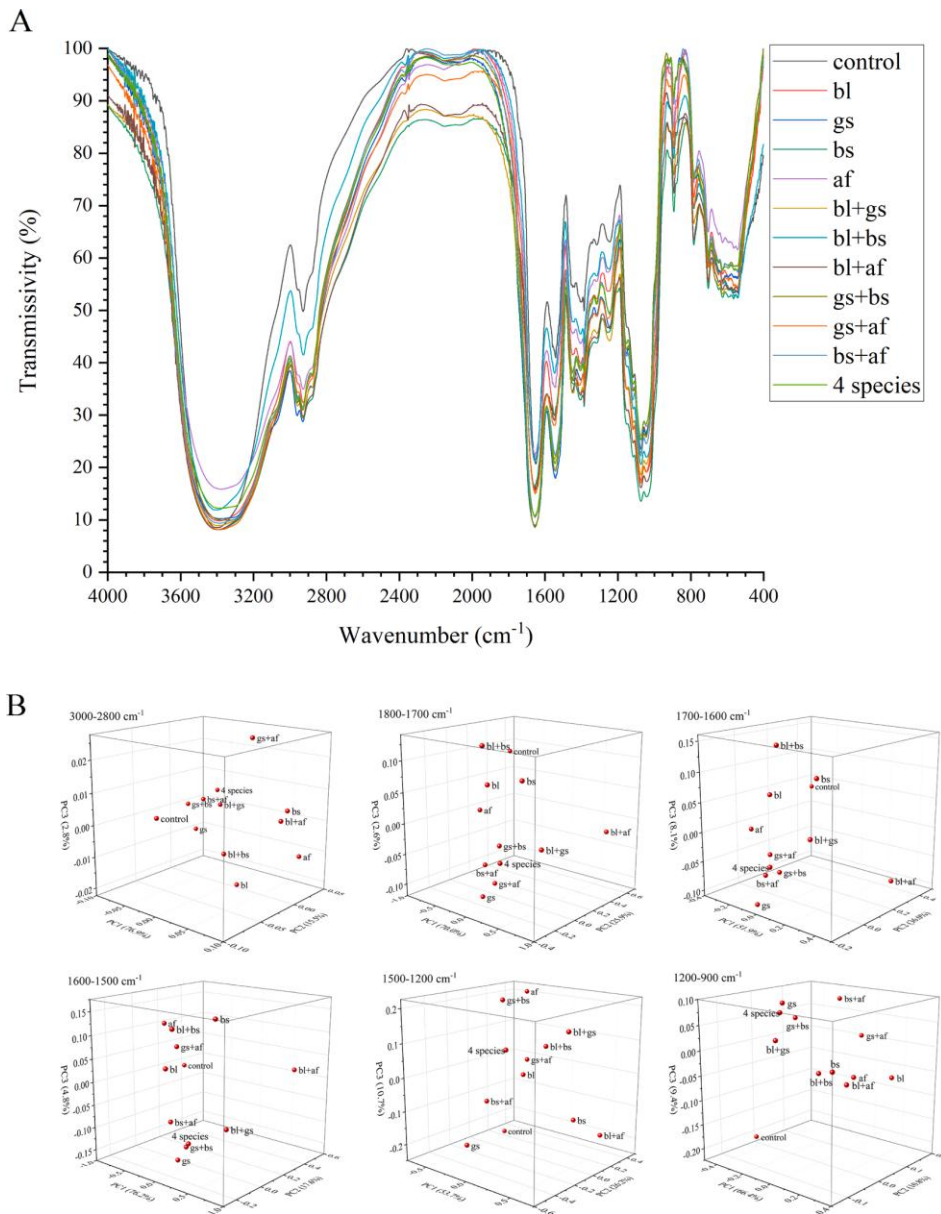


Figure 20 : Représentations schématiques de l’analyse FTIR des composants du lait écrémé décomposés par des souches bactériennes thermophiles simples, doubles ou quatre. (A) Courbes de spectre FTIR ; (B) Analyse PCA des courbes FTIR dérivées secondes.

D’après les résultats de l’effet de la détérioration du lait par les bactéries thermophiles, il a été révélé qu’il existe une tendance superposée des souches mixtes en termes de pH et de composition du lait altéré.

Les altérations du pH reflètent les changements de composition du lait, et les résultats du spectre FTIR dans la plage de 4000-400 cm^{-1} peuvent montrer les différences avec précision (Karoui *et al.*, 2010 ; Karoui *et al.*, 2007). On remarque que dans les plages 1800-1700 cm^{-1} , 1700-1600 cm^{-1} et 1600-1500 cm^{-1} , il y avait plusieurs pics caractéristiques des protéines, tels

que 1650 cm^{-1} et 1550 cm^{-1} . Alors que, les pics caractéristiques des hydrates de carbone, y compris le lactose, se situaient dans la plage $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, notamment à 1080 cm^{-1} . De plus, les pics caractéristiques des graisses étaient principalement distribués entre 3000 et 2800 cm^{-1} .

En outre, les résultats de l'ACP indiquent que les souches thermophiles possèdent des capacités d'hydrolyse assez fortes sur les protéines et le lactose dans le lait, et que la culture d'espèces mixtes présente des effets superposés sur la dégradation de la composition du lait, par rapport à la culture d'espèces uniques.

Afin d'étudier plus en profondeur cet impact superposé, les quatre espèces ont été cultivées de manière mixte. Le biofilm multi-espèces est devenu mature après 36 heures, et le nombre d'UFC et le pH du lait ont eu tendance à être stables.

3.4. Processus de croissance du biofilm multi-espèces formé par les quatre bactéries thermophiles

La **figure 21** a montré le processus de croissance du biofilm multi-espèces, dans lequel *B. licheniformis*, *G. stearothermophilus*, *B. Subtilis* et *A. flavithermus* ont été inoculés avec la même biomasse initiale, cultivés en mélange sur des surfaces inoxydables immergées dans du lait écrémé à 55 °C pendant 48 heures. Ont été trouvées adhérant aux surfaces en acier inoxydable à 12 h, après les substrats ont été progressivement recouverts de cellules de biofilm adhérentes. Les résultats CLSM ont montré que le biofilm multi-espèces est devenu plus épais, et la couche adhérente détectée était de 12,92, 19,38, 33,60 et 49,11 μm , correspondant à un temps de culture de 12 h, 24 h, 36 h et 48 h, respectivement. Les cellules mortes étaient assez peu fréquentes à 12 h, mais ont atteint des proportions plus élevées après 36 h. Le nombre total de cellules du biofilm est indiqué dans **la figure 22**, les valeurs de $\log\text{ CFU}/\text{cm}^2$ étaient 4.35, 5.28, 5.88 et 6.15 à 12 h, 24 h, 36 h et 48 h, respectivement. Au fur et à mesure que la population bactérienne augmentait, le pH des échantillons de lait a baissé de 6,69 à 6,26, 5,67 et 5,64, à 12 h, 24 h, 36 h et 48 h, respectivement.

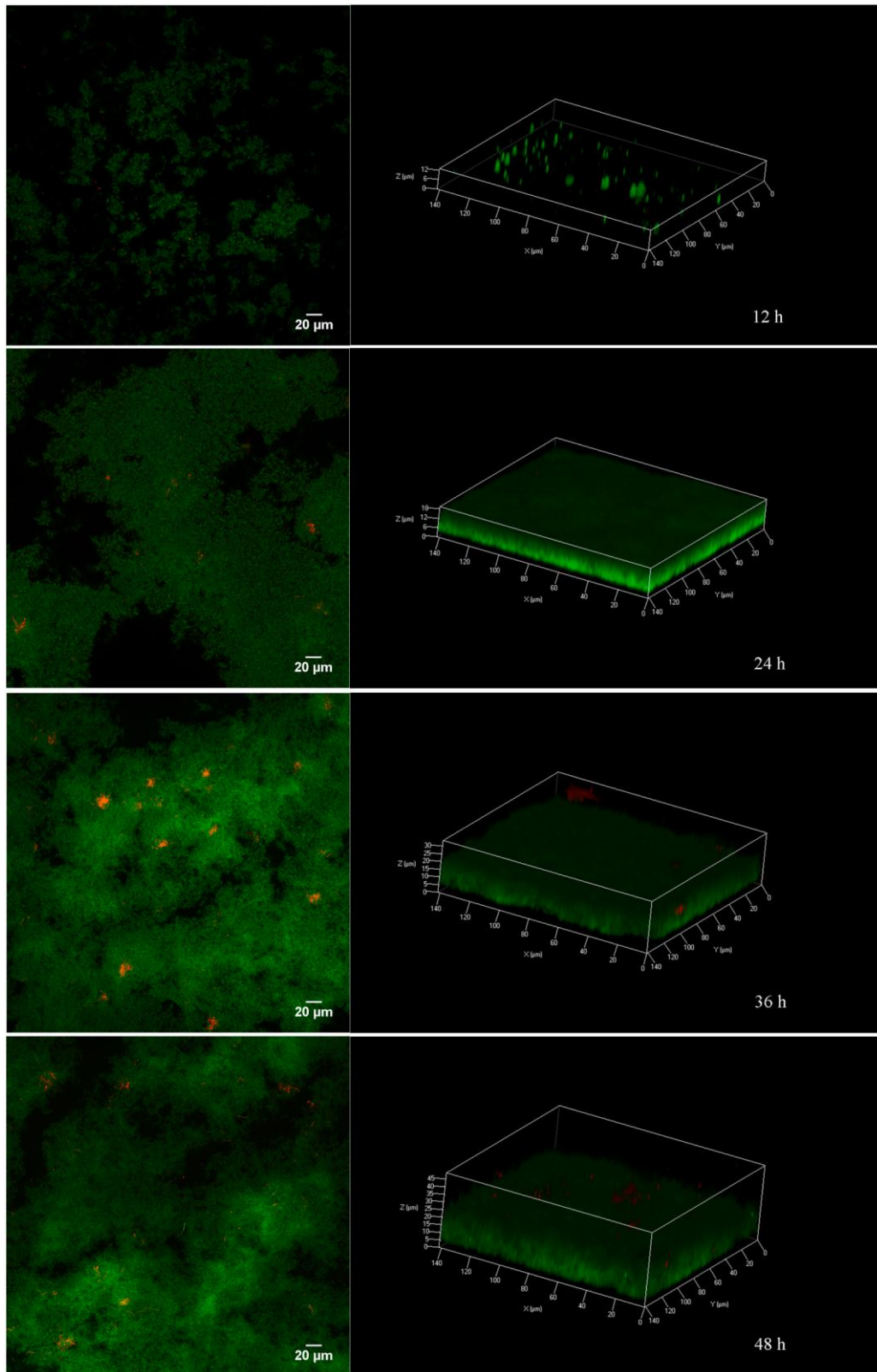


Figure 21 : Les images CLSM des biofilms multi-espèces contenaient *B. licheniformis*, *G. stearothermophilus*, *B. Subtilis* et *A. flavithermus* dans les 48 h.

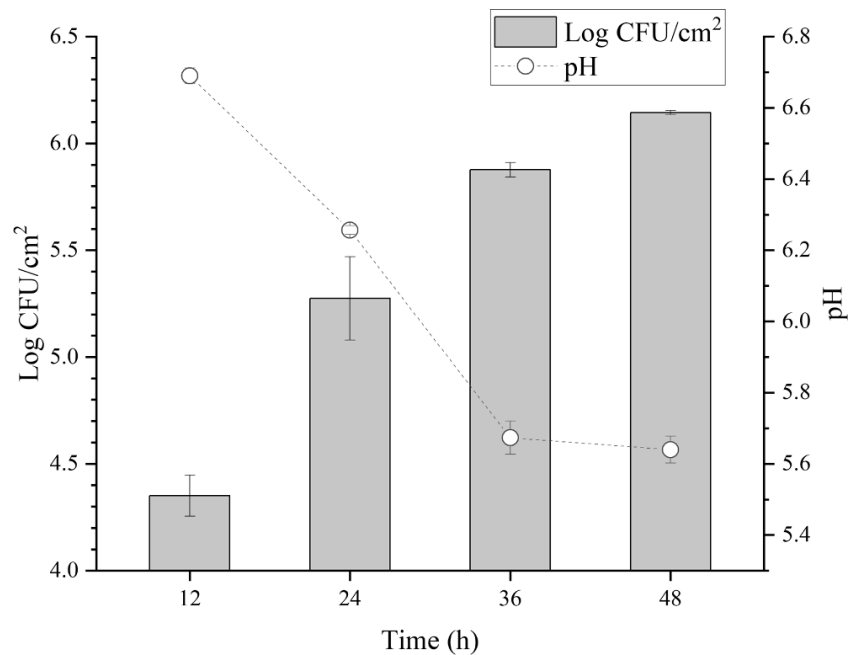


Figure 22 : Modifications du nombre d'UFC dans le biofilm et du pH du lait affecté par des incubations de bactéries thermophiles mixtes dans les 48 h. Les données représentent les moyennes SD des résultats obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

D'après les résultats de la culture mixte, il a été indiqué que l'abondance des espèces au sein du biofilm n'était pas stable tout au long du processus, mais qu'elle était dynamique en interne avec le développement du biofilm. Il est important de noter que *B. licheniformis* était totalement prédominante à 12 heures contrairement à *G. stearothermophilus* qui était prédominante après 24 heures. De plus, *A. flavithermus* a été détecté à 12 heures, mais était en dessous du seuil de détection après 24 heures. En tenant compte des résultats de la culture mixte, il semble aussi que *B. licheniformis* et *G. stearothermophilus* étaient en compétition dans le biofilm, mais que *B. licheniformis* et *A. flavithermus* coopéraient entre eux. Cela explique pourquoi l'espèce prédominante dans les produits de lait en poudre était différente dans les différentes lignes de traitement.

Outre les microorganismes de la matière première, le temps de traitement dans les différentes usines peut également influencer la communauté microbienne dans les produits finis de lait en poudre. On en déduit que *B. licheniformis* pourrait devenir la souche prédominante dans une chaîne de transformation en 12 heures de production continue, et que *G. stearothermophilus* pourrait devenir prédominant après 24 heures de production continue.

3.5. Changements dans la structure de la communauté au cours du développement multi-espèces

Les colonies récupérées des biofilms multi-espèces sur des plaques de gélose TSB sont présentées dans la **Figure 23 A**. Bien que différentes formes aient été observées, il est difficile et imprécis d'identifier une bactérie spécifique en se basant uniquement sur les formes des colonies. Les résultats du séquençage Illumina MiSeq de la **Figure 23 B** ont révélé que les proportions de souches variaient de manière significative au cours des 48 heures. *B. licheniformis*, *G. stearothermophilus* et *A. flavithermus* sont absorbés 96,3 %, 1,6 % et 0,9 % respectivement, tandis que *B. subtilis* n'a pas été détecté en raison de sa faible quantité. - Après 24 h, *G. stearothermophilus* est devenu l'espèce la plus prédominante dans la culture mixte, tandis que *B. licheniformis* occupait la deuxième plus grande proportion. En raison de leur faible abondance basée sur le nombre de cellules en raison de leur faible abondance basée sur le nombre de cellules. Les pourcentages de *B. subtilis* et de *A. flavithermus* étaient inférieurs au seuil de détection après 24 heures. Les proportions détaillées de *G. stearothermophilus* et de *B. licheniformis* étaient de 92,7% et de 7,2% à 24 h, 69,0% et 31,0% à 36 h, 87,2% et 12,7% à 48 h, respectivement.

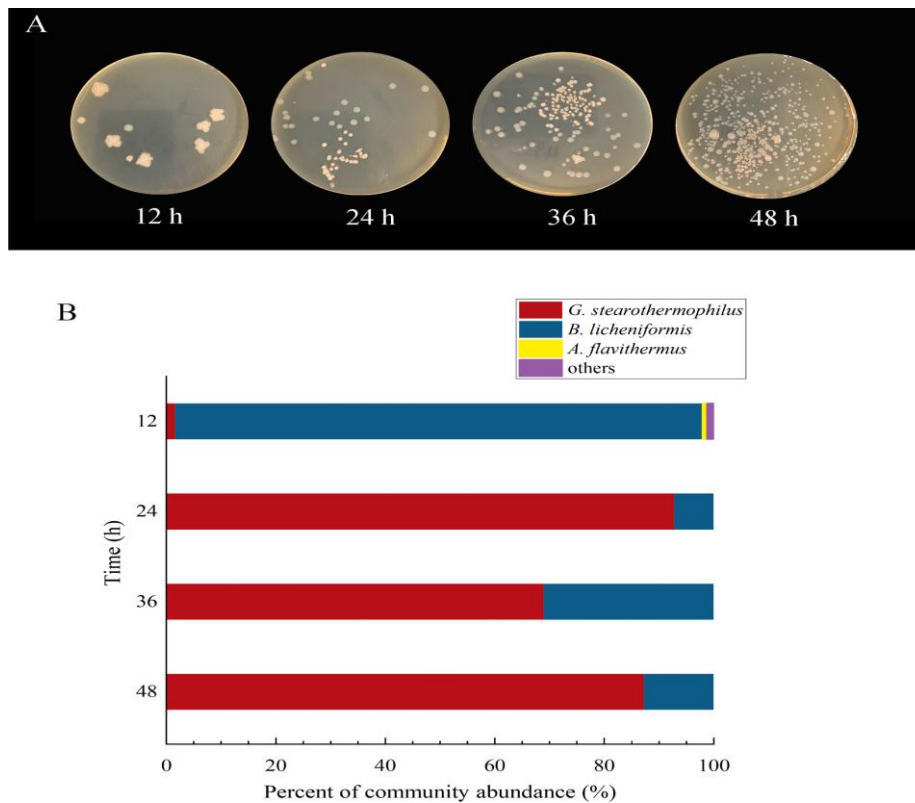


Figure 23 : Analyse de la structure communautaire de biofilms multi-espèces sur des surfaces en acier inoxydable immergées dans du lait écrémé en 48 h. (A) Apparence de la colonie ; (B) Résultats de séquençage à haut débit.

En tenant compte des résultats mentionnés au-dessus sur les changements de structures dans la communauté bactérienne au cours du développement multi-espèces on remarque que la synergie ou la compétition entre les bactéries thermophiles a conduit à des fluctuations des proportions de souches, et les interactions inter-espèces ont eu une influence significative sur la structure de la communauté bactérienne. Dans cette étude, les modèles coopératifs et compétitifs dans les biofilms multi-espèces ont eu une influence significative sur le développement des souches prédominantes de la communauté microbienne coexistant pendant la production de lait en poudre. Dans l'ensemble, les interactions interspécifiques peuvent affecter la structure de la communauté des bactéries thermophiles, ce qui constitue une question importante pour la prévention des biofilms dans l'industrie laitière.

Conclusion générale

Le cycle de vie du biofilm de *B. sporothermodurans* sur les surfaces en acier inoxydable est influencé par les protéines du lait (lactosérum et caséines). La densité du biofilm formé par *B. sporothermodurans* sur les surfaces en acier inoxydable a été influencée par les protéines du lait, qui ont également modifié les distributions spatiales, les dimensions et les morphologies des cellules en biofilm. Des caractéristiques liées aux biofilms, telles que des cellules allongées et entrelacées, des piqûres ou des corrosions éventuelles des surfaces, et la formation de biofilms à l'interface air-liquide ont également été montrés. L'ensemble des bactéries thermophiles *B. licheniformis*, *G. stearothermophilus*, *B. Subtilis* et *A. flavithermus* testées sont fréquemment observées dans les produits à base de lait en poudre avec une capacité à former du biofilm mono et multi-espèces sur les surfaces en acier inoxydable, ainsi que les changements de composition du lait. Les interactions interspécifiques entre les différentes souches à l'intérieur des biofilms, à la fois coopératives et compétitives ont joué un rôle dans la détermination des souches prédominantes et la structure communautaire des bactéries thermophiles coexistantes. L'exploration sur le processus de développement des biofilms multi-espèces devrait améliorer la qualité des produits à base de lait en poudre et établir un système de prévention des biofilms pour l'industrie laitière à l'avenir.

Références bibliographique

A

1. **Austin JW, Bergeron G (1995)**. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *J. Dairy Res.*, 62: 509-519.
- 2 **Alice Chateau, Sander E. Van der Verren,, Han Remaut, and Antonella Fioravanti .** The Bacillus anthracis Cell Envelope: Composition, Physiological Role, and Clinical Relevance. *Microorganisms*. 2020 Dec; 8(12): 1864
- 3 **André S. , Vallaeyes T., Planchon S. (2017)**. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology*, 168(4), 379–387.
- 4 **An, Y.H., Friedman, R.J.** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* : 1998, 43. 338-348.
- 5 **Ana Lucia Schild Elisa Simone V. Sallis Mauro Pereira Soares, Franklin Riet-Correa 2006**: <https://www.researchgate.net/publication/250046390> Anthrax in cattle in southern Brazil: 1978-2006.
- 6 **Abee T, Groot MN, Tempelaars M, Zwietering M, Moezelaar R, van der Voort M. 2011**. Germination and outgrowth of spores of Bacillus cereus group members: diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiol.*, 28:199-208.
- 7 **Anand S., Singh D., Avadhanula M., Marka S. (2014)**. Developpement and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes.Comprehensive review in food science and food safety. 13 : 18-33
- 8 **Andersson, A., and U. Ro"nner. 1998**. Adhesion and removal of dormant, heat-activated, and germinated spores of three strains of Bacillus cereus. *Biofouling* 13:51–67.
- 9 **Aung J, Sutherland IW. 2011**. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol.*, 9:261-6.

B

- 10 **Bennett, R. W., & Belay, N. (2001)**. Bacillus cereus. In F. P. Downes, & K. Ito (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4th ed.). Washington, DC, USA: American Public Health Association.

- 11 **Boutaleb N.(2007)**. Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat : Université de Bretagne Sud UFR science et science de l'ingénieur.194 -195.
- 12 **Bremer PJ, Seale B, Flint S, Palmer J. 2009**. Biofilms in dairy processing. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, IV, editors. Biofilms in the food and beverage industries. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head, p 396–431
- 13 **Bagge D., M. Hjelm, C. Johansen, I. Huber, L. Gram. 2001**. *Shewanella putrefaciens* Adhesion and Biofilm Formation on Food Processing Surfaces. Applied and environmental microbiology., 67: 2319– 2325.
- 14 **Bernardes P. C., N. J. de Andrade, S. O. Ferreira, J.P. N. de Sá, E. A. Araújo, D. M. Z. Delatorre, L. M. Pinheiro Luiz. 2010**. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate of *Bacillus cereus* from a dairy plant. Brazilian Journal of Microbiology, 41: 984-992
- 15 **Bhattacharyya P.N., Goswami M.P., Bhattacharyya L.H.** Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review. J. Phytol. 2016;8:26–41. doi: 10.19071/jp.2016.v8.3022
- 16 **Boyadzhieva, I. P., Atanasova, M., & Emanuilova, E. (2010)**. A novel, thermostable manganese-containing superoxide dismutase from *Bacillus licheniformis*. Biotechnology Letters, 32(12), 1893–1896. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0368-8>
- 17 **Burgess, S. A., Flint, S. H., & Lindsay, D. (2014)**. Characterization of thermophilic bacilli from a milk powder processing plant. Journal of applied microbiology, 116(2), 350-359
- 18 **Bruinsma, G. M., Van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2001)**. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses.
- 19 **Bessières, A. Bolotin et S. Borchert (1997)**. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390:249–256.
- 20 **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.
- 21 **Bahar O. , T. Goffer, S. Burdman. 2009**. Type IV Pili Are Required for Virulence, Twitching Motility, and Biofilm Formation of *Acidovorax avenae* subsp. Citrulli. MPMI, 22 : 909–920
- 22 **Bakker D. P, H. J. Busscher, J. van Zanten, J. de Vries J. W. Klijnstra, H. C. van der Mei. 2004**. Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coatings after reconditioning film formation in the marine environment. Microbiology, 150: 1779–1784.
- 23 **Brooks J.D., and S.H. Flint. 2008**. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. International journal of food and science technology vol. 43 (12): 2163-2176.

- 24 **Bruellhoff K, Fiedler J, Möller M, Groll J, Brenner RE. 2010.** Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces. *Int J Artif Organs.*, 33: 646-53
- 25 **Burrows L.L. 2012.** *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu. Rev. Microbiol.*, 66:493–520.

C

- 26 **Costerton J. W. G.G. Geesey, K.J. Cheng. 1978.** How bacteria stick. *Scientific American*, 238: 86-95.
27. **CHERIF Hafsa(2014)** Thèse Présentée par Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Option: Microbiologie Thème Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols arides.
28. **Chen, L., Tim Coolbear, and Roy M. Daniel.** "Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines." *International dairy journal* 14.6 (2004): 495-504.
29. **Chloé MODUGNO (2018)** effet d'un traitement combinant hautes pressions et biopreservation sur l'inactivation et la reprise de croissance des spores de *Bacillus* et *Clostridium*. Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté Discipline : Génie des Procédés Alimentaires
30. **Caiazza, N. C., Merritt, J. H., Brothers, K. M. O'Toole, G. A. 2007.** Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 189, 3603–3612
31. **Compère C, M-N Bellon-Fontaine, P Bertrand, D Costa, P Marcus, C Poleunis, C-M Pradiere, B Rondotf & M G Walls. 2001.** Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater Biofouling: *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 17: 129-145.
- 32 **Conibear T.C.R., S. L. Collins, J.S. Webb. 2009.** Role of Mutation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *PLoS ONE* 4(7): e6289.
34. **Costerton J. W. G.G. Geesey, K.J. Cheng. 1978.** How bacteria stick. *Scientific American*, 238: 86-95.
35. **Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. 2005.** Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs.*, 28 :1062-8.

D

36. **Dromigny E. (2007).** *Bacillus cereus*. Monographie de Microbiologie. Éditions médicales Internationales. Éditions TEC & DOC Lavoisier.379p.
- 37 **.Dat, N. M., Hamanaka, D., Tanaka, F., & Uchino, T. (2014).** Surface conditioning of stainless steel coupons with skim milk solutions at different pH values and its effect on bacterial adherence. *Food Control*, 21, 1769e1773.

38. **Dumas C. (2007)** Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 53 : 468-473.
39. **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 Second Edition Volume Three: The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg, USA.
40. **Drenkard, E., & Ausubel, F. M. (2002).** Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 416, 740e743.
41. **Deejing, S., Yoshimune, K., Lumyong, S., & Moriguchi, M. (2005).** Purification and characterization of hyperthermotolerant leucine aminopeptidase from *Geobacillus thermoleovorans* 47b. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(7), 269-276.
42. **Dal Peraro M., van der Goot F.G.** Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. *Nat Rev. Microbiol.* 2016;14:77–92. doi: 10.1038/nrmicro.2015.3.
43. **De Hoon, M.J., Eichenberger, P., and Vitkup, D. (2010)** Hier-archical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr Biol*20: R735–R745.
44. **Davey ME, O'toole GA. 2000.** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 64:847-67.
45. **Djeribi R., W. Bouchloukh, T. Jouenne, B. Mena. 2012.** Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *American Journal of Infection Control* xxx (2012) 1-6
46. **Donlan RM. 2011.** Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clin Infect Dis.*, 52:1038-45.
47. **Donlan, R.M., and J.W. Costerton. 2002.** Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, Vol.15 (2): 167-193
48. **Dunlop P, Oliver L, Byrne T, McAdams E. 2005.** Detection and removal of pathogenic biofilms on medical implant surfaces. *Stud Health Technol Inform.* 117:213-7.

E

49. **Errington, J. (2003)** Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol*1: 117–126.
50. **Eammon P. Riley,1 Corinna Schwarz,2 Alan I. Derman,2 and Javier Lopez-Garrido2,*** Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. doi: 10.15698/mic2021.01.739. *Microb Cell.* 2021 Jan 4; 8(1): 1–16.
51. **Eichenberger, P. (2007).** Genomics and cellular biology of endospore formation. In *Bacillus*:

F

52. **Frank J. F. 2001.** Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Adv. Food. Nutr. Res.* 43: 319-369.

53. **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.
54. **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.
55. **Faille, C., Bénézech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., Ronse, A., Slomianny, C., (2014).** Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiol.* 40, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.12.004>.
56. **Faille C, Carpentier B. 2009.** Food contact surfaces, surface soiling and biofilm formation. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, IV, editors. *Biofilms in the food and beverage industries*. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head Publishing Limited. p 304–30.
57. **Fernandes, M., Fujimoto, G., Schneid, I., Kabuki, D. Y., & Kuaye, A. Y. (2014).** Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. *International Dairy Journal*, 38, 16e23.
58. **Flint, S.H. P. J. Bremer, J. D. Brooks. 1997.** Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, Vol. 11, issue 1: 81-97.
59. **Fagerlund A., Lindback T., Storset A.K., Granum P.E., Hardy S.P.** *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology*. **2008**;154:693–704. doi: 10.1099/mic.0.2007/014134-0.
60. **Faille, C., Tauveron, G., Le Gentil-Lelievre, C., & Slomianny, C. (2007).** Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of food protection*, 70(10), 2346-2353.
61. **Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., ... & Wang, L. (2007).** Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5602-5607.
62. **Fritze, D. (2004)** Taxonomy and systematics of the aerobic endospore forming bacteria: *Bacillus* and related genera. In *Bacterial Spore Formers* ed. Ricca, E., Henriques, A.O. and Cutting, S.M. pp. 17–34. Norfolk, UK: Horizon Bioscience

G

63. **Gauvry E, Mathot A-G, Leguérinel I, Couvert O, Postollec F, Broussolle V, et al.** Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Res Microbiol.* 2017;168: 369–378. doi:10.1016/j.resmic.2016.10.006
64. **Ghelardi, E. F. Celandroni, S. Salvetti, C. Barsotti, A. Baggiani S. Senesi. 2002.** Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS microbiology letters*, 208: 129-134.

65. **Glasset B, Herbin S, Guillier L, Cadel-Six S, Vignaud M, Grout J, Pairaud S, Michel V, Hennekinne J, Ramarao N, Brisabois A (2016)** Bacillus cereus-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: Epidemiology and genetic characterisation. *Eurosurveillance* 21(48). 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.48.30413.
66. **Giaouris-Avila, C., Ríos-Castillo, A. G., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2020)**. Development of a peroxide biodecolorimeter for a direct detection of biofilms produced by catalase-positive bacteria on food-contact surfaces. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 506–515. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1418434>
67. **Goetzet A, Dickerson TJ, Janda KD. 2016**. Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. *Chem Soc Rev.*, 37: 1337-46
68. **Gopal MH, Velge P, Couvert O, Carlin F, Debuyser ML, Nguyen-The C. 2015**. Ability of Bacillus cereus group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J of Clinical Microbiol* 48: 3388-3391
69. **Gottenbos B., H.C. van der Mei, H. J. Busscher. 1999**. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods in Enzymology*, 310: 523-33.
70. **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.
71. **Govindasamy, V., M. Senthilkumar, V. Magheshwaran, U. Kumar, P. Bose, V. Sharma, et K. Annapurna (2010)**. Plant Growth and Health Promoting Bacteria, *Microbiol. Monographs* 1-346.

H

72. **Hueffer K., Drown D.M., Romanovsky V., Hennessy T.** Factors Contributing to Anthrax Outbreaks in the Circumpolar North. *EcoHealth*. 2020;17:174–180. doi: 10.1007/s10393-020-01474-z.
73. **Hamadi. F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M., Kouider N.(2004)**. Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Annals of Microbiology* . 54:213-225.
74. **Hill, B. M., & Smythe, B. W. (2012)**. Endospores of thermophilic bacteria in ingredient milk powders and their significance to the manufacture of sterilized milk products: An industrial perspective. *Food Reviews International* . 28: 299–312.
75. **H.-C. Flemming, J. Wingender**(Bacillus cereus sensu lato biofilm formation and its ecological importance) *The biofilm matrix Nat Rev Microbiol*, 8 (2010), pp. 623-633
76. **Henriques AO, Moran Jr CP.** Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61: 555–588. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093224

77. **Higgins D, Dworkin J.** Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. 2013;36: 131–148. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x.Recent

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01124213>. ID: 191067655.

78. **Hazan Z., J. Zumeris, H. Jacob, H. Raskin, G. Kratysh, M. Vishnia, N. Dror, T. Barliya, M. Mandel, G. Lavie.** 2006. Effective Prevention of Microbial Biofilm Formation on Medical Devices by Low-Energy Surface Acoustic Waves. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50: 4144–4152.

79. **Heydorn A., A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersbøll, S. Molin.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT *Microbiology*, 146: 2395–2407.

80. **Hori K, Matsumoto S.** 2010. Bacterial adhesion : from mechanism to control. *Biochemical engineering journal*, 48: 424-434

81. **Huck JR, BH Hammond, Murphy SC, Woodcock NH, Boor KJ.** 2007. Tracking Spore-Forming Bacterial Contaminants in Fluid Milk-Processing Systems. *J Dairy Sci* 90: 4872-4883.

I

82. **I. Sutherland** (*Bacillus cereus* sensu lato biofilm formation and its ecological importance) The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment *Trends Microbiol*, 9 (2001), pp. 222-227

J

83. **Jindal, S., & Anand, S. (2018).** Comparison of adhesion characteristics of common dairy sporeformers and their spores on unmodified and modified stainless steel contact surfaces. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 5799–5808. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14179>.

84. **Jindal, S., Anand, S., Huang, K., Goddard, J., Metzger, L., Amamcharla, J., 2016.** Evaluation of modified stainless steel surfaces targeted to reduce biofilm formation by common milk sporeformers. *J. Dairy Sci.* 99, 9502–9513.

85 **J.D. Wang and P.A. Levin** *Nat Rev Microbiol*, 7 (2009), pp. 822-827.

86. **Jain A, Bhosle NA.** 2009. Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion *Biofouling*, 25: 13-19

87. **Joshi M. Y., J.S. Kim, W. K. Paek, J. Lim, H. Lee, P. Kim, J. Y. Ma, W. Kim, Y.H. Chang.** 2010. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a New Member of the *Bacillus cereus* Group Isolated from Foreshore Tidal Flat Sediment. *The Journal of Microbiology*, 49: 1027-1032

K

88. **K. Rajitha a,b, Y.V. Nancharaiah a,b,* , V.P. Venugopalan b,c.** Temperature induced amyloid production, biofilm formation and fitness in marine *Bacillus* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation*161(2021)105229. Journal homepage www.elsevier.com/locate/ibiod.
89. **KaiYue Liu, Hua Fang, Fengjie Cui, Belinda Nyabako, TingLei Tao, Xinyi Zan, Huayou Chen, Wenjing Sun(2020)** *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(1) DOI:10.1007/s00253-020-10703-y. ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of *Bacillus coagulans* know. *Journal of bacteriologie*,196(7),12976-1305
90. **Konuray G. , Erginkaya Z. (2018).** Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry. *Foods*, 7(6), 92
91. **Keren, I. , Shah, D. , Spoering, A. , Kaldalu, N. et Lewis, K. (2004) .** Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli* . *journal of bacteriology*. 186 , 8172 – 8180.
92. **Kim JB, Jeong HR, Park YB, Kim JM, Oh DH. 2010.** Food poisoning associated with emetic-type of *Bacillus cereus* in Korea. *Foodborne Pathog Dis.*, 7:555-63
93. **Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F.** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-materials interactions. *European Cells and Materials* : 2004, 8. 37-57.
94. **Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A.M. Albertini, G.V. Alloni, M. Azevedo, G. Bertero, P. ofia Arnaouteli, Natalie C. Bamford , Nicola R. Stanley-Wall and Ákos T. Kovács (2021) .** *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions <https://doi.org/10.1038/ s41579-021-00540-9>.
95. **Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F.** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-materials interactions. *European Cells and Materials* : 2004, 8. 37-57.
96. **Kaplan-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R. 2010.**D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Int J Med Microbiol.*, 300: 544-8.
97. **Karatan E, Watnick p. 2009.** Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms *Microbiol Mol Biol Rev.*, 73: 310–347
98. **Klinger T., Yano T., Kuda M.T. (2005).** Resistance to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. *Food and science technology*. 41 : 988-993..

L

99. **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.

100. **Logan, N. A. (2014).** The Genus *Geobacillus*. *The Prokaryotes*, 133–147.
doi:10.1007/978-3-642-30120-9_212
101. **Lai S.,J. Tremblay, Eric Déziel. 2009.** Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental Microbiology*, 11: 126-136
102. **Lemon K., P, Darren E. Higgins, R. Kolter. 2007.** Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Journal of bacteriology*, 189: 4418–4424
103. **Lequette Y, Boels G, Clarisse M, Faille C. 2010.** Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 26:421-31.
104. **Lequette Y, Garénaux E, Tauveron G, Dumez S, Perchat S, Slomianny C, Lereclus D, Guérardel Y, Faille C. 2011.** Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology* 77:4905-4911.
105. **Li Y., G. Hao, C. D. Galvani, Y. Meng, L. De La Fuente, H. C. Hoch, T. J. Burr. 2007.** Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell–cell
- 106 **López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. 2010.** *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, a000398. Karatan E, Watnick p. 2009. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms *Microbiol Mol Biol Rev.*, 73: 310–347
107. **Lorite GS, Rodrigues CM, de Souza AA, Kranz C, Mizaikoff B, Cotta MA. 2011.** The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci.* 359:289-95
108. **Lowery CA, Park J, Kaufmann GF, Janda KD. 2008.** An Unexpected Switch in the Modulation of AI-2- Based Quorum Sensing Discovered through Synthetic 4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione Analogues. *J Am Chem Soc.*, 130:9200–9201

M

109. **MOKRANI Souad et NECHAF Sarah., 2019-2020.** Thème Evaluation de la formation de biofilm de *Bacillus cereus* isolée du lait de vache cru et recherche des molécules anti-biofilm. Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de ;MASTER. Spécialité : Biotechnologie Microbienne.
110. **M. BARTOSZEWICZ, BM. HANSEN, I. SWIECICKA,** “The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk”, *Food Microbiol*, 2008, 25: 588-96.
111. **Majeed M. , Nagabhushanam K., Natarajan S., Sivakumar A., Ali F., Pande A., Majeed S., Karri S. K. (2015).** *Bacillus coagulans* MTCC 5856 supplementation in the management of diarrhea predominant Irritable Bowel Syndrome: A double blind randomized placebo controlled pilot clinical study. *Nutrition Journal*, 15(1), 21.
112. **McKenney PT, Driks A, Eichenberger P.** The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2012;11: 33–44. doi:10.1038/nrmicro2921

113. **Messelh usser U., Fricker M., Ehling-Schulz M., Zeigler H., Elmer-Englhard D., Kleih W & Busch U. (2007).** Real-time-PCR-system zum Nachweis von *Bacillus cereus* (emetischer Typ) in Lebensmitteln. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2 :190-193.
114. **Moreira, J.M.R., Gomes, L.C., Whitehead, K.A., Lynch, S., Tetlow, L.A., Mergulh ao, F.J.,** Effect of surface conditioning with cellular extract on *Escherichia coli* adhesion and initial biofilm formation. *Food and Bioprocess Processing* <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.03.008>.
115. **Madegowda M., Eswaramoorthy S., Burley S.K., Swaminathan S.** X-ray crystal structure of the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Proteins*. 2008;71:534–540. doi: 10.1002/prot.21888.
116. **Majeed M. , Nagabhushanam K., Natarajan S., Sivakumar A., Ali F., Pande A., Majeed S., Karri S. K. (2015).** *Bacillus coagulans* MTCC 5856 supplementation in the management of diarrhea predominant Irritable Bowel Syndrome: A double blind randomized placebo controlled pilot clinical study. *Nutrition Journal*, 15(1), 21.
117. **MALEK 2019** . Bactéries sporulées et biofilms : un problème r eurrent dans les lignes de production de lait reconstitu e ou recombin e pasteuris e. *Can. J. Microbiol.* 65: 1–16 (2019) dx.doi.org/10.1139/cjm-2018-0435.
118. **Marchand, S. J. De Block, V.e De Jonghe, A. Coorevits, M. Heyndrickx, L. Herman. 2012.** Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11: 133-147.
- 119 **Maria Cecilia Ribeiro a, *, Meg da Silva Fernandes a, Arnaldo Yoshiteru Kuaye a, Rafael Jimenez-Flores b, Mirna Gigante .2017** , Preconditioning of the stainless steel surface affects the adhesion of *Bacillus cereus* spores 108-114 *International Dairy journal* homepage: www.elsevier.com/locate/idaairyj.
- 120 **Menad N. (2017).** Effet antagoniste des bactéries lactique isolées   partir du lait de vache vis- -vis des *Salmonella* sp. Thèse en vue d'obtention de doctorat en microbiologie   l'université de Mostaganem. 196 p.
121. **Malek Fadila.,2012-2013** le biofilm en industrie laitière .thèses en vu de l'obtention du diplôme en doctorat
122. **Moïse Doria Kaya-Ongoto, Aim e Christian Kayath (2018).** identification of bacteria of the genus *Bacillus* using a new generation of housekeeping genes Development of Novel Discrimination of *Bacillus* spp Identification. DOI:10.13140/RG.2.2.18527.71843.
123. **Manuel Sim oes, Maria Ol via Pereira, Maria J Vieira (2007)** . Influence of biofilm composition on the resistance to detachment. DOI:10.2166/wst.2007.293. <https://www.researchgate.net/publication/6289595>.
124. **Murali Kumar 1, Steve Flint 2, Jon Palmer 1, Sawatdeenaruenat Chanapha 1, Chris Hall (2021).** Influence of the incubation temperature and total dissolved solids concentration on the biofilm and spore formation of dairy isolates of *Geobacillus*

stearothermophilus. *Appl Environ Microbiol.* 2021 Feb 5;87(8):e02311-20. doi: 10.1128/AEM.02311-20.

125. **Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW. 1982.** Scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation.*, 66:1339-41

126. **McDougald D., S. A. Rice, N. Barraud, P. D. Steinberg, S. Kjelleberg. 2012.** Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* 10: 39-50

N

127. **Ni Wang a , Yujie Jin , Guoqing He , Lei Yuan.** Development of multi-species biofilm formed by thermophilic bacteria on stainless steel immersed in skimmed milk, *Food Research International* 150 (2021) 110754. journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres.

128. **Nguyen Manh Dat a,* , Daisuke Hamanaka b , Fumihiko Tanaka b , Toshitaka Uchino.** Control of milk pH reduces biofilm formation of *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus paracasei* on stainless steel , *Food Control*23(2012) 215-220.

129. **Neu T. R. 1996.** Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60: 151-166.

130. **Nassima DIDOUH 2015** , Doctorat en Biologie Moléculaire et biochimie Option : Maitrise du Développement Microbien (Caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection).

131. **Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... & Ivanov, M. V. (2001).** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433-446.

O

132. **ocheva, E.I., Ortega, D.R., and Jensen, G.J. (2016)** Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. *NatRev Microbiol*14: 535–542.

133. **O'Neil HS, Marquis H. 2006.** *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. *Infect Immun.*,74:6675-81

134. **O'Toole GA, Kolter R. 1998.** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.*, 30:295-304

135. **Piciooreanu C. J.-U. Kreft, M. Klausen, J.A.J. Haagensen, T. Tolker-Nielsen, S. Molin. 2007.** Microbial motility involvement in biofilm structure formation – a 3D modelling study. *Water Science & Technology*, 55 : 337–343.

P

136. **Parkar, S. G., S. H. Flint, J. S. Palmer, and J. D. Brooks. 2001.** Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *J. Appl. Microbiol.* 90:901–908.

137. **Paulo Agenor Alves Bueno, Edgar Lopes Balestri, Rafael De Almeida Vidal Feres Rosiello, Cristian Coelho Silva (2019)** Use of starch manufacturer residue in the production of inoculating biofertilizer DOI:10.5902/2236117038537
138. **Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, E., & Priest, F. G. (1996).** *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(3), 759–764. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-3-759>.
139. **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.
140. **Peña, W. E. L., N. J. de Andrade, N. F. F. Soares, V. O. Alvarenga, S. Rodrigues Junior, D. Granato, A. D. G. Zuniga, et A (2020).** *Journal of Dairy Science* Vol. 103 No. 6, 2020
141. **Palmer J., Flint S., Brooks J. 2007.** Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 577–588.
142. **Pauline Loison (2015)** Etude de la spore de *Bacillus subtilis* : caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. NNT : 2013DIJOS078ff. HAL Id: tel-01124213
143. **Postollec, F., Bonilla, S., Baron, F., Jan, S., Gautier, M., Mathot, A. G., ... & Sohier, D. (2010).** A multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food. *International journal of food microbiology*, 142(1), 78-88

R

144. **Ramarao N., Sanchis V (2013).** The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: A review. *Toxins*. 2013;5:1119–1139. doi: 10.3390/toxins5061119.
145. **Rajitha, K., Nancharaiah, Y.V., Venugopalan, V.P., 2020a.** Insight into bacterial biofilm barnacle larvae interactions for environmentally benign antifouling strategies. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 149, 104937.
146. **Rajitha, K., Nancharaiah, Y.V., Venugopalan, V.P., 2020b.** Acid soluble extracellular matrix confers structural stability to marine *Bacillus haynesii* pellicle biofilms. *Colloids Surf., B* 194, 111160.
147. **Rajitha, K., Nancharaiah, Y.V., Venugopalan, V.P., 2020c.** Role of bacterial biofilms and their EPS on settlement of barnacle (*Amphibalanus reticulatus*) larvae. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 150, 104958
148. **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.
149. **Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. W. (2003).** A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International journal of food microbiology*, 85(1), 45-61

150. **Rosenberg A, Sinai L, Smith Y, Ben-Yehuda S.** Dynamic expression of the translational machinery during *Bacillus subtilis* life cycle at a single cell level. *PLOS ONE* 2012;7:e41921.
151. **Racha M., Faille C., Kallassy M., Gohar M. (2016).** *Bacillus cereus* Biofilms same, only different. *Frontiers in microbiology* 7 : 1-16.
152. **Rosmaninho R., O. Santos, T. Nylander, M. Paulsson, M. Beuf , T. Benezech, S. Yiantsios, N. Andritsos. 2006.** Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling – Evaluation of fouling by milk components. *Journal of Food Engineering* 80: 1176-1187
153. **Roy D, McEvoy J, Blonigen M, Amundson M, Khan E. 2017.** Seasonal variation and ex-situnitrification activity of ammonia oxidizing archaea in biofilm based wastewater treatment processes. vol244:850-859 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.060>

S

154. **Speranza, G., Gottardi, G., Pederzoli, C., Lunelli, L., Canteri, R., Pasquardini, L., Carli, E., Lui, A., Maniglio, D., Brugnara, M., Anderle, M.** Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials* : **2004**, 25. 2029-2037.
155. **Scheuerman, T.R., Camper, A.K., Hamilton, M.A 1998.** Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *Col. Interf. Sci.* : 1998, 208. 23-33.
156. **Stenfors A.T., Fagerlund A., Granum E. (2008).** From soil to gut : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology review* 32 (4) : 479-606.
157. **Schraft H, Steele M, McNab B, Odumeru J, Griffiths MW. 1999.** Epidemiological typing of *Bacillus* spp. isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 62: 4229-4232.
158. **Stragier, P., and Losick, R. (1996)** Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 30:297–341.
159. **Spormann A.M. (2008).** Physiology of Microbes in Biofilms. Part of the Current Topics in Microbiology and Immunology book series .322 :17-36
160. **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.
161. **Shakerifard P, Gancel F, Jacques P, Faille C. 2009.** Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. *Biofouling.*, 25:533-41.
162. **Simões M., M. O. Pereira, S. Sillankorva, J. Azeredo, M.J. Vieira. 2007.** The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, 2007; 23(3/4): 249 – 258.
163. **Shi X., and X. Zhu. 2009.** Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in food science and technology* 20: 407-413.
164. **Schniederberend, M., Williams, J.F., Shine, E., Shen, C., Jain, R., Emonet, T., Kazmierczak, B.I., 2019.** Modulation of flagellar rotation in surface-attached bacteria: a pathway for rapid surface-sensing after flagellar attachment. *PLoS Pathog.* 15, e1008149.

165. **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.
166. **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.
167. **Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M.A., Christiansson, A., Salkinoja-Salonen, M., 2010.** Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol.* 27, 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.004>.
168. **Sauer K., Camper A. K. 2001.** Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* 183: 6579–6589.
169. **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.
170. **Speranza, G., Gottardi, G., Pederzoli, C., Lunelli, L., Canteri, R., Pasquardini, L., Carli, E., Lui, A., Maniglio, D., Brugnara, M., Anderle, M.** Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials* : 2004, 25. 2029-2037.
171. **S. Fakhry,I. Sorrentini,E. Ricca,M. De Felice,L. Baccigalupi**(Characterization of spore forming Bacilli isolated from the human gastrointestinal tract) First published: 21 November 2008 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03934.x>(caractéristique de spore)
172. **Setlow P, Johnson EA.** Spores and Their Significance. In: Doyle MP, Buchanan R, editors. *Food Microbiology : Fundamentals and Frontiers.* ASM press. Washington; 2013. pp. 45–79.
173. **Setlow, P. (2006).** Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.
174. **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.
175. **Souad Merzougui1, 2, Mustapha Lkhider3, Nozha Cohen1.(2013)** *Bacillus cereus*, un réel problème pour l’industrie agro alimentaire ? *Bacillus cereus*, a real problem for food industry? ScienceLib Editions Mersenne volume 5,N 130915 ISSN 2111-4706.
- 176.**Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P. 2009.** Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *J Microsc.* 235(2):124-7
- 177.**Schniderberend B, Ekelund K, Ogura H, Christiansson A. 2019.** Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International dairy journal* 14: 17-27.
178. **Shrout J.D., D. L. Chopp, .2006.** The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional *Molecular Microbiology* 62, 1264–1277.

179. **Spoering A. L, M. S. Gilmore. 2006.** Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 9:133–137.
180. **Srey S., I.K. Jahid, S.D. Ha. 2013.** Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food control*, 31: 572-585.

T

181. **Trishala Gopikrishna 2021.** Impact of Bacillus in fermented soybean foods on human health, *Annals of Microbiology (IF2.112)*, Pub Date : 2021.
182. **Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., Nomura, N., 2016.** Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80 (1), 7–12.
183. **Touch, V., Deeth, H.C., 2009.** Microbiology of raw and market milks. In: *Milk Processing and Quality Management*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 48–71.
[https://doi.org/ 10.1002/9781444301649.ch3](https://doi.org/10.1002/9781444301649.ch3).
184. **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.
185. **Teh, K. H., S. Flint, J. Palmer, P. Andrewes, P. Bremer et D. Lind-say. 2014.** Le biofilm - une source méconnue d'enzymes d'altération dans les produits laitiers ? *Int. Dairy J.* 34:32-40. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.002>.
186. **Tocheva EI, Ortega DR, Jensen GJ.** Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. *Nat Rev Microbiol.* 2017;14: 535–542.
[doi:10.1038/nrmicro.2016.85](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.85). Sporulation
187. **Todhanakasem T, Young GM. 2008.** Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *J. Bacteriol.* 190:6030-4.
188. **Tomás I, Henderson B, Diz P, Donos N. 2010.** In vivo oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.) ©FORMATEx
189. **Trautnert Darouche.2004.** Catheters: a suitable surface for biofilm formation *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A_ Mendez Vilas (ED). Formatex 2011
190. **Tremblay J. E. Déziel.. 2010.** Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility *BMC Genomics*, 11:587
191. **Treter J., A. J. Macedo. 2011.** Catheters: a suitable surface for biofilm formation *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A_ Mendez Vilas (ED). Formatex 2011

V

192. **van Oss, C.J., Chaudhury, M.K., Good, R.J(1988).** Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem. Rev* : 1988, 88. 927-941.

193. **Vlamakis, H., Chai, Y. R., Beaugerard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013).** Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11 (3), 157–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>.
194. **Vanessa Pereira Perez Alonso a,* , Rodrigo Cezar de Campos Ferreira b, Mônica Alonso Cotta b, Dirce Yorika Kabuki 2022 .** Influence of milk proteins on the adhesion and formation of *Bacillus sporothermodurans* biofilms: Implications for dairy industrial processing. *Food control* 134(2022)108743. journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont
195. **Vanessa Pereira Perez Alonso *, J'essica de Oliveira Morais, Dirce Yorika Kabuki 2021.** Incidence of *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans* and *Geobacillus stearothermophilus* in ultra-high temperature milk and biofilm formation capacity of isolates .*International Journal of Food Microbiology* 354(2021)109318.
196. **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.
197. **Verran J, Packer A, Kelly P, Whitehead KA. 2010.** Titanium-coating of stainless steel as an aid to improved cleanability. *Int. J. Food Microbiol.*, 141. Supplement 1: S134-9.
198. **Verstraeten N., K. Braeken, B. Debkumari, M. Fauvart, J. Fransaer, J. Vermant J. Michiels. 2008.** Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Journal of Theoretical Biology*, 251 : 24–34.
199. **Vertes A., V. Hitchins , K. S. Phillips. 2012.** Analytical Challenges of Microbial Biofilms on Medical Devices. *Anal. Chem.*, 84 : 3858–3866

W

200. **Whitehead, K.A., Verran, J., 2015.** Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Curr. Opin. Food Sci.* 2, 84–91.
- 201 **Won Yeong Bang, O-Hyun Ban, Bo Som Lee, Sangki Oh, Chanmi Park, Mi-Kyung Park, Sung Keun Jung, Jungwoo Yang, Young Hoon Jun 2021.** Genomic-, phenotypic-, and toxicity-based safety assessment and probiotic potency of *Bacillus coagulans* IDCC 1201 isolated from green malt; *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2021, <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab026>.
202. **Wedel, C., Wenning, M., Dettling, A., Scherer, S., Hinrichs, J., 2019.** Resistance of thermophilic spore formers isolated from milk and whey products towards cleaning-in-place conditions: influence of pH, temperature and milk residues. *Food Microbiol.* 83, 150–158.
203. **Wijman JGE, De Leeuw PPLA, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T (2007).** Air liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation and Dispersion. *Appl. Environ. Microb.*, 73(5): 1481- 1488.
- 204 **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.

206. **Whitehead, K. A., et J. Verran. 2015.** Formation, architecture et fonctionnalité des biofilms microbiens dans l'industrie alimentaire. *Curr. Opin. Food Sci.* 2:84-91. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.02.003>.

. 207. **Wuertz H.-C. Flemming, S 2019** Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms *Nat Rev Microbiol*, 17 (2019), pp. 247-260.

208. **Won Yeong Bang, O-Hyun Ban, Bo Som Lee, Sangki Oh, Chanmi Park, Mi-Kyung Park, Sung Keun Jung, Jungwoo Yang, Young Hoon Jung.(2021).** Genomic-, phenotypic-, and toxicity-based safety assessment and probiotic potency of *Bacillus coagulans* IDCC 1201 isolated from green malt, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volume 48, Issue 5-6, June 2021,

Y

209. **Yiying Huang, Steve H. Flint, Jon S. Palmer*. Bacillus cereus spores and toxins – The potential role of biofilms 2020.** *Food Microbiology* 90(2020)103493. journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm A Review on the Biotechnological Applications of the Operational Group *Bacillus amyloliquefaciens*.

210 **Yicen Lin , Romain Briandet , 'Akos T. Kov'acs 2022.** *Bacillus cereus sensu lato* biofilm formation and its ecological importance. *Biofilm* 4 (2022) 100070. journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/biofilm

211. **Yiying Huang, Steve H. Flint, Jon S. Palmer*2020.** *Food microbiologie* 103493 *Bacillus cereus* spores and toxins – The potential role of biofilms *Food Microbiology* journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Z

212. **Zhu K., Didier A., Dietrich R., Heilkenbrinker U., Waltenberger E., Jessberger N., Martlbauer E., Benz R 2016.** Formation of small transmembrane pores: An intermediate stage on the way to *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) full pores in the absence of NheA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016;469:613–618.

213. **Zhou Y. , Zeng Z., Xu Y., Ying J., Wang B., Majeed M., Majeed S., Pande A., Li W. (2020).** Application of *Bacillus coagulans* in animal husbandry and its underlying mechanisms. *Animals*, 10(3), 454.

214. **Zhu, B., and Stülke, J. (2018).** SubtiWiki in 2018: From genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 46, D743- D748

215. **Zottola, E.A. and Sasahara, K.C. (1994)** Microbial Biofilms in the Food Processing Industry—Should They Be a Concern. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 125-148 [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90047-7](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)90047-7)

Annexes



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Influence of milk proteins on the adhesion and formation of *Bacillus sporothermodurans* biofilms: Implications for dairy industrial processing

Vanessa Pereira Perez Alonso^{a,*}, Rodrigo Cezar de Campos Ferreira^b, Mônica Alonso Cotta^b, Dirce Yorika Kabuki^a

^a Department of Food Science and Nutrition, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

^b Applied Physics Department, Institute of Physics "Gleb Wataghin, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Biofilm life cycle
Biofilm architecture
Bacillus sporothermodurans
Microscopy
Whey
Casein
Biofilm dispersal
Sanitizer

ABSTRACT

Bacillus sporothermodurans is a producer of highly heat-resistant spores, which is a problem for the dairy industry worldwide. In this work, we studied the attachment and biofilm formation on stainless steel surfaces in contact with milk proteins (casein and whey). The results of the biofilm formation were obtained by the plate count method. In conjunction, biofilms (niches and cell sizes) were measured by scanning electron microscopy (SEM) on the 1st, 5th and 10th day. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was a complementary technique that probed the conditioning of the substrate surface after 24 h. The milk proteins affected the total bacterial count in the samples, and also influenced the biofilm architecture. Sessile cell counts varied from 4.3 log CFU/cm² in the attachment stage to up to 10.2 log CFU/cm² in the matured biofilm stage. The spore counts varied from $<1.4 \pm 0.02$ (1st day) to $3.7 \log \pm 1.1$ log spores/cm² (10th day). The control group at the biofilm maturation stage (5th day) had higher niches than at the cell fixation (1st day) and was different from the other groups that showed active dispersion in the presence of milk proteins. The same occurred on the 10th day for the control group. Circular patterns in the biofilm with casein, passive dispersal and elongated cells were also observed. Enzyme treatment and disinfectants may be used to remove or reduce biofilm formation.

1. Introduction

The definition of biofilm in the dairy industry is similar to that of the industrial and clinical environments. Biofilms are structured bacterial communities embedded in a self-produced polymeric matrix that confers emergent properties to the species (Costerton et al., 1999; Stoodley et al., 2002). However, in the dairy industry, the milk composition can affect bacterial adhesion (Flint et al., 2015; Speers & Gilmour, 1985). Milk is a biochemical complex rich in proteins, fat globules, lactose, minerals, vitamins, with a neutral pH (6.4–6.8), high water activity (aw: 0.99), and oxidation-reduction potential (Eh: > 0.3 mV), suitable for providing growth to aerobic microorganisms (Flint et al., 2015; Hassan & Frank, 2011; Huppertz & Kelly, 2009).

The presence of milk residues from the production process conditions the stainless steel (SS) surfaces for biofilm formation, as these nutrients are adsorbed onto the surface. Therefore, biofilm formation on surfaces directly in contact with milk, such as heat exchangers, evaporators,

tubes, and reservoirs is common (Anand et al., 2014; Flint et al., 2015). Some bacterial species (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, and *Moraxella-like*) can fix onto glass, rubber, and SS surfaces and they show high adherence with lactose and non-casein proteins due to the synthesis of an essential polymer for cell adhesion (Flint et al., 2015; Speers & Gilmour, 1985). On the other hand, the adhesion of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Serratia marcescens* onto the SS surface is reduced in the presence of skimmed milk, as well as individual milk proteins (Barnes et al., 1999). The κ-casein has also shown an inhibitory effect on biofilm formation and virulence of *L. monocytogenes* (Yun et al., 2014). The peptide-based coating has also been tested to modify the physical properties of SS surfaces and resulted in the reduction of *Bacillus licheniformis* and *Pseudomonas aeruginosa* (Friedlander et al., 2019). In skimmed milk, high biofilm dispersal can occur in mono or multispecies of *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*, except for *Enterococcus faecalis* (Alonso & Kabuki, 2019).

* Corresponding author. Department of Food Science and Nutrition, School of Food Engineering, University of Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80, Barão Geraldo, Campinas, Cep: 13.083-53, SP, Brazil.

E-mail address: vanessaperezalonso@gmail.com (V.P.P. Alonso).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108743>

Received 27 July 2021; Received in revised form 27 November 2021; Accepted 29 November 2021

Available online 1 December 2021

0956-7135/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Development of multi-species biofilm formed by thermophilic bacteria on stainless steel immersed in skimmed milk

Ni Wang^a, Yujie Jin^b, Guoqing He^{b,*}, Lei Yuan^{c,**}

^a School of Chemical and Environmental Engineering, College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Soochow University, Suzhou 215123, China

^b College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

^c College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China

ARTICLE INFO

Keywords:

Biofilm
Multi-species
Interaction
Thermophilic bacteria
Milk powder

ABSTRACT

Thermophilic bacteria, such as *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus Subtilis* and *Anoxybacillus flavithermus*, are detected frequently in milk powder products. Biofilms of those strains act as a major contamination to milk powder manufactures and pose potential risks in food safety. In this study, we explored the developing process of multi-species biofilm formed by the four thermophilic bacteria on stainless steel immersed in skimmed milk. The results showed that the thermophilic strains possessed strong capacities to decompose proteins and lactose in skimmed milk, and the spoilage effects were superimposed from multiple strains. *B. licheniformis* was the most predominant species in the mixed-species biofilm after 12-h incubation. From 24 h to 48 h, *G. stearothermophilus* occupied the highest proportion. Within the multi-species biofilm competitive relation existed between *B. licheniformis* and *G. stearothermophilus*, while synergistic impacts were observed between *B. licheniformis* and *A. flavithermus*. The interspecies mutual influences on biofilm development provided important evidences for understanding colonization of the predominant thermophilic bacteria during milk powder processing.

1. Introduction

Thermophilic spore-forming bacteria are considered as major contamination to milk powder industry, since their existences both in the environment and raw materials pose potential risks in food safety. They prefer warm circumstance around 55 °C, and their spores could survive heat sterilization and mix into the final products. Thermophilic bacteria have been isolated from milk powder products in many countries worldwide, among which *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus Subtilis* and *Anoxybacillus flavithermus* are observed frequently (Burgess, Flint, & Lindsay, 2014; Delaunay et al., 2019; Dettling et al., 2020; Kent, Chauhan, Boor, Wiedmann, & Martin, 2016; Reginensi et al., 2011; Ronimus et al., 2003; Ruckert, Ronimus, & Morgan, 2004; Sadiq et al., 2016; Scott, Brooks, Rakonjac, Walker, & Flint, 2007). These four species possess strong spoilage capacities, which could lead to proteolysis, lipolysis, sliminess and coagulation of milk, causing quality ruin to dairy products. During milk powder processing, wet-mix milk concentrates are normally evaporated at temperatures between 50 °C and 70 °C (Zhang, Munir, Udugama, Yu, & Young, 2018),

where thermophilic bacteria are capable to multiply rapidly and create a hazard in food safety. So, the evaporation process before spray drying is a critical control point against thermophilic bacteria multiplication for milk powder manufactures (Boyadzchieva, Atanasova, & Emanuilova 2010; Hadri et al., 2019).

A major reason for thermophilic bacteria colonization is that they are capable to form biofilms on stainless steel surfaces, a common material for dairy processing line such as pipeline, tanks, heat exchange and other equipment. Biofilms in dairy plants formed by thermophilic bacteria are multicellular and multi-species communities, in which bacteria embedded within their self-produced matrix of extracellular polymeric substances (Vlamakis, Chai, Beaugerard, Losick, & Kolter, 2013). Biofilm cells employ stronger survival strategies, and are more resistant to cleaning and disinfection regimes than planktonic cells (Bridier, Brian det, Thomas, & Dubois-Brissonnet, 2011; Maes et al., 2019; Yuan et al., 2019). Thus, specific researches on biofilm formed by thermophilic spore-forming bacteria are helpful in understanding the formation mechanism and acquiring targeted control methods.

Single-species bacterial biofilm formation has been investigated in

* Corresponding author at: College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, 866 Yuhangtang Road, Hangzhou 310058, China.

** Co-corresponding author.

E-mail addresses: gqhe@zju.edu.cn (G. He), leiyuan0926@163.com (L. Yuan).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110754>

Received 15 July 2021; Received in revised form 22 September 2021; Accepted 10 October 2021

Available online 13 October 2021

0963-9969/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

الملخص

في الطبيعة، تعيش معظم الكائنات الحية الدقيقة داخل مجتمعات ميكروبية تسمى البيوفلم. تتكون الاغشية الحيوية من نوع واحد او كائنات دقيقة متعددة الأنواع تلتصق بسطح حامل او حي.

B. sporothermodurans. في هذا السياق، درسنا مقاليتين من البليوغرافيا التي تناولت ارتباط وتشكيل الغشاء الحيوي على أسطح من الفولاذ المقاوم للصدأ ملامسة لبروتينات الحليب وتطور الغشاء الحيوي بواسطة البكتيريا المحبة للحرارة بما في ذلك *Bacillus licheniformis* و *Geobacillus stearothermophilus* و *Anoxybacillus vlavithermus* و *Bacillus subtilis*. يتم اكتشافهما بشكل متكرر في منتجات الحليب المجففة الأساسية.

ان *B. sporothermodurans* لديها قدرة قوية على تشكيل الأغشية الحيوية على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ. وبالنسبة للمقال الثاني، أظهرت النتائج أن السلالات المحبة للحرارة تمتلك قدرات قوية على تحلل البروتين واللاكتوز في الحليب منزوع الدسم، وأن تأثيرات التلف قد تم فرضها بواسطة سلالات متعددة وتأثيرات متبادلة عبر الأنواع على التطور. وقد قدمت الأغشية الحيوية الرقيقة دليلاً مهماً لفهم الاستعمار من البكتيريا السائدة المحبة للحرارة أثناء معالجة مسحوق الحليب

الكلمات المفتاحية: *Bacillus spp*، البيوفلم، فيلم التعبئة والتغليف، صناعة الالبان.

Abstract

In nature, most microorganisms live in microbial communities called biofilms. Biofilms are made up of single or multi-species microorganisms that adhere to an inert or living surface.

The objective of our work was to evaluate the effect of conditioning on the formation of biofilm by *Bacillus spp*. Given the sanitary conditions that our country work has experienced this part has been cancelled

In this context, we reviewed two articles in the literature that discussed the attachment and formation of biofilms of *B. sporothermodurans* on stainless steel surfaces in contact with milk proteins and the development of biofilms by thermophilic bacteria including *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, and *Anoxybacillus vlavithermus* frequently detected in powdered milk products. The results showed that *B. sporothermodurans* had a strong ability to form biofilm on stainless steel surfaces. And for the second paper, the results showed that thermophilic strains possessed strong protein and lactose degrading abilities in skim milk, and that the spoilage effects were overlapped by several strains. Mutual influences between species on biofilm development provided important evidence for understanding the colonization of the predominant thermophilic bacteria during milk powder processing.

Key words: *Bacillus spp*, Biofilm, conditioning film, dairy industries.

Résumé

Dans la nature, la plupart des microorganismes vivent au sein de communautés microbiennes appelées biofilm. Les biofilms sont constitués de microorganismes mono-espèce ou multi-espèce qui adhèrent à une surface inerte ou vivante.

L'objectif de notre travail était d'évaluer l'effet du conditionnement sur la formation du biofilm par *Bacilles spp*. Vu les conditions sanitaires que notre travail pays a connu cette partie à été annulée.

Dans ce contexte nous avons étudié deux articles de la bibliographie qui ont traité-la fixation et la formation du biofilm de *B.sporothermodurans* sur des surfaces en acier inoxydable en contact avec des protéines de lait et-le développement du biofilm par des bactéries thermophiles incluant *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* et *Anoxybacillus vlavithermus* fréquemment détectées dans les produits de base de lait en poudre. Les résultats ont Montré que *B. sporothermodurans* à une forte capacité à former le biofilm sur les surfaces en acier inoxydable. Et pour deuxième article, les résultats ont montré que les souches thermophiles possédaient de fortes capacités de dégradation des protéines et du lactose dans le lait écrémé, et que les effets d'altération étaient superposés par plusieurs souches et Les influences mutuelles inter-espèces sur le développement du biofilm ont fourni des preuves importantes pour comprendre la colonisation des bactéries thermophiles prédominantes pendant le traitement du lait en poudre

Mots clés : *Bacilles spp* , Biofilm , film de conditionnement , industries laitier.