

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCCEN-
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE,
ET DES SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)

Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme

Doctorat en Biologie

Option : Maitrise du développement microbien

Présentée par :

Mme AHMED AMMAR Imane

THEME

Occurrence, isolement des principales bactéries formatrices de biofilm et évaluation de l'efficacité du nettoyage et de désinfection dans les industries laitières

Soutenue le : 24.10.2021 devant le jury composé de

Président	Mr MOUSSA BOUDJEMAA Boumediene	Pr. Université de Tlemcen
Directeur de thèse	Mr AGGAD Hebib	Pr. Université de Tiaret
Examineur	Mr ABDEHADI Si Ameer	Pr. Université de Tiaret
Examineur	Mr ZIDANE Khaled	Pr. Université de Tiaret
Examineur	Mr REBIAHI Sid Ahmed	Pr. Université de Tlemcen
Examineur	Mr BARKA Mohamed Saleh	M.C. A Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022

REMERCIEMENTS

« La recherche est une école où l'on apprend l'importance du dialogue, de la confrontation des idées, du respect d'autrui (...). La démarche scientifique n'est pas seulement porteuse d'espoir pour la compréhension du monde qui nous entoure (...) elle apporte aussi à ceux qui la pratiquent un enrichissement intellectuel et moral. »

Claude Cohen-

*Il me sera difficile d'exprimer en quelques mots toute ma reconnaissance au Professeur **AGGAD HABIB** directeur du Laboratoire d'hygiène et de pathologies animale de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret, qui a encadré mon travail et apporté son expérience au sujet.*

*Nous tenons à remercier aussi monsieur **MOUSSA BOUDJEMAA Boumediene**, professeur, Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen ; qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de thèse.*

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury :

*A Monsieur **BARKA Mohamed Saleh**, Maître de conférences A Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen*

*A Monsieur **REBIAHI Sid Ahmed**, professeur A, Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen.*

*A Monsieur **ABDEHADI Si Ameur**, Professeur, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.*

*A Monsieur **ZIDANE Khaled**, Professeur,
Université Ibn Khaldoun de Tiaret.*

*Mes remerciements s'adressent particulièrement à Mr **HARZALLAH Abdelkader** propriétaire de la laiterie « **BAHDJA LAIT** » de Sougueur pour son engagement dans la réalisation et la réussite de la plus importante partie de ce travail, pour sa disponibilité et ses conseils.*

*Je remercie aussi Mr **BELHADJ AMAR Sadék**, Directeur de l'unité **GIPLAIT** de Tiaret pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de l'unité.*

*J'adresse mes remerciements à l'ensemble du personnel de l'unité **GIPLAIT** de Tiaret et de la laiterie Bahdja Lait de Sougueur pour leur esprit d'ouverture, leur enthousiasme et leur disponibilité. Mes remerciements vont tout particulièrement à Mr **KHARROUBI Mohammed** chargé de la production au sein de l'unité **GIPLAIT** de Tiaret pour sa disponibilité, sa sympathie et ses conseils.*

*Je tiens à remercier aussi toute l'équipe du Laboratoire d'hygiène et de pathologies animale de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret ; à Mr **Mustapha, Redouane, Zahira, Amina et Leila**.*

*Mes remerciements s'adressent également à Dr **A. BOUZIANE** et Dr **M. MAACHI** ; Médecins biologistes pour leur disponibilité et leurs conseils scientifiques qui m'ont aidé dans la suite de mes travaux.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également à Mr **AISSET** de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Tiaret pour sa disponibilité et son soutien moral.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à Mme **MARZOUK Belarbi** et Mme **HASSAINE. H**, Mr **AZZI Rachid** et Mr **CHAOUICHE Mohamed Tarik**, Chef Département adjoint Responsable de la post-graduation - Biologie- Université de Tlemcen pour leur soutien et leur aide précieuse.*

DEDICACES

*« Grace à Dieu tout clément et miséricordieux, Qui ma tracé la route,
et ma donné le pouvoir et le courage de continuer jusqu'à la fin »*

Avant tous, je dédie ce travail :

A tous ceux qui me sont proches et chers

*A vous mes parents ; qu'ils trouvent ici gratitude pour leur patience,
leur confiance en moi, leur encouragements, leur soutien moral et
même financier dans les moments les plus difficiles de ma vie et leur
disponibilité ;*

*A l'être le plus cher a mon cœur, a celle qui m'a guidé pour faire mes
premiers pas et qui m'a appris mon premier mot, a celle qui fut
toujours a mes cotes ma mère,*

*A toi mon papa qui était toujours à mes cotés, pour son soutien et ses
conseils pertinents qui ont illuminé mon chemin jusqu'à la réalisation
de mon rêve,*

A mon mari Mounir pour sa patience et sa compréhension

*A mes filles Yasmine Amira et Nadine Rachha ; la lueur de mes yeux je
vous adore,*

*A mes chères sœurs ; Fatima, Yamina et Djihane qui malgré la
distance ont toujours été à mes cotés.*

A toute ma famille

*A la pensée de ma grand mère Mima et mon grand-père Hbibí qui ne
sont plus de ce monde que dieu les accueille en son vaste paradis*

*A la famille Ouadañ de tlemcen ; Tonton Ali et Tata Fouziya je
n'oublierai jamais votre soutien et votre générosité durant mon cursus
universitaire.*

*A toutes les personnes qui ont contribué de pré ou de loin à la
réalisation de ce projet de doctorat.*

Imane

TABLES DES MATIERES

Liste des abréviations	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des figures.....	III
Liste des annexes	IV
المخلص.....	V
Résumé.....	VI
Abstract.....	VII
Introduction	1
<i>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	
Chapitre I : <i>GÉNÉRALITÉS</i>	
1. Filière lait en Algérie	3
2. Qualité du lait produit	4
2.1. Dangers biologiques	5
2.2. Dangers chimiques	6
2.3. Dangers physiques	7
Chapitre II : <i>BIOFILMS BACTÉRIENS</i>	
1. Historique	8
2. Définition	9
3. Développement du biofilm	10
3.1. Etapes de formation de biofilm	10
3.2. Structure de biofilm	13
4. Facteurs influençant le développement de biofilm	15
4.1. Facteurs liés à la surface des matériaux	15
4.2. Facteurs liés à la cellule bactérienne	16
5. Utilisations	17
6. Résistance aux agents antimicrobiens	18
6.1. Résistance aux agents désinfectants	18
Chapitre III : <i>BIOFILMS BACTÉRIENS ET INDUSTRIES LAITIÈRES</i>	
1. Effet des biofilms	19
1.1. Biofilms positifs	19
1.2. Biofilms négatifs	20
2. Biofilms dans les industries agro-alimentaires	21
2.1. Biofilms à une seule espèce	21
2.2. Biofilm à microflore variée	23
Chapitre IV : <i>MÉTHODES DE DÉTECTION DES BIOFILMS</i>	
1. Méthode de culture de tissus en plaque (TCP)	25
2. Méthode en tube (TM)	26

3. Culture sur Rouge Congo Agar (RCA)	27
4. Biofilm Ring Test (BFRT)	28
Chapitre V : NETTOYAGE ET DESINFECTION DANS LES INDUSTRIES LAITIÈRES	
1. Nettoyage	30
1.1. Agents de nettoyage	30
1.2. Efficacité du nettoyage	32
1.3. Système de nettoyage en industrie laitière	32
2. Désinfection	33
3. Méthodes alternatives pour le contrôle de biofilms (Stratégie verte)	36
3.1. Enzymes	36
3.2. Phages	37
3.3. Bio régulation	37
PARTIE PRATIQUE	
Chapitre I : EVALUATION DE L'EFFICACITE DU NETTOYAGE EN PLACE	
1. Matériel et méthodes	40
1.1. Matériel	42
1.2. Méthodes	42
1.2.1. Audit des procédures du Nettoyage en place	42
1.2.2. Prélèvement échantillons	43
1.2.3. Préparation des dilutions	44
1.2.5. Dénombrement de la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)	44
2. Résultats	45
2.1. Application des procédures du NEP	45
2.2. Distribution des prélèvements (laiterie 01)	46
2.3. Dénombrement de la FMAT avant et après nettoyage en place	47
3. Discussion	49
Chapitre II : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES GERMES CONTAMINANTS	
1. Matériel	52
2. Méthodes	52
2.1. Prélèvements	52
2.2. Isolement et purification	53
2.3. Conservation des souches	55
3. Résultats	55
3.1. Etude de la composition de la microflore	57
3.2. Etude de la distribution des isolats selon les sites des prélèvements	58
4. Discussion	60
Chapitre III : DETECTION DE LA CAPACITE DE LA FORMATION DE BIOFILMS	
1. Matériel	63
1.1. Echantillons	63
2. Méthodes	64
2.1. Méthode en tube (TM)	64
2.2. Méthode de culture de tissu sur plaque (TCP)	65

3. Résultats	66
3.1. Production de biofilm par la méthode en tube (TM)	66
3.2. Production de biofilm par la méthode de tissu en plaque (TCP)	67
3.3. Corrélation entre les deux méthodes	68
4. Discussion	69
<i>Conclusion</i>	71
<i>Références bibliographiques</i>	73
<i>Annexes</i> <i>Publication</i>	

Liste des abréviations

ADH : Arginine di hydrolase
AFNOR : Association française de Normalisation
AHL : Acyl Homosérines Lactones
AI : Auto-Inducteur
BCC : Bouillon Coeur Cerveille
BFRT: Biofilm Ring Test
BHIB: Brain Heart Infusion Broth
BN : Bouillon Nutritif
CV : Cristal Violet
DO : Densité Optique
EPS : Exo polysaccharides
FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale
GN : Gélose Nutritive
HACCP: Hasard Analysis Critical Control Point
LDC : Lysine décarboxylase
LPS : Lipopolysaccharides
MADR : Ministère de l'agriculture et du développement rural
MEB : Microscopie électronique à balayage
NEP : Nettoyage en place
ODC : Ornithine décarboxylase
ONIL : Office National Interprofessionnel du Lait et des produits laitiers
ONPG : Orthonitrophényl – B-D – galactopyranoside
PBS : Tampon Phosphate Salin
PIA : Polysaccharide Intercellular Adhesin
PME: Petite et Moyenne Entreprise
PMI: Petite et Moyenne Industrie
QS : Quorum Sensing
RCA : Rouge Congo Agar (Red Congo Agar)
SPA: Société par Action
TCP : Plaque de Culture de Tissus
TDA : Tryptophane Désaminase
TM : Méthode en tube.
TPS : Tampon Phosphate Salin
TSE : Tryptone Sel Eau
UFC : Unité Formant Colonie
VP₁ : Voges-Proskauer Test 1
VP₂ : Voges-Proskauer Test 2

Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
Synthèse bibliographique		
Tableau 01	Evolution de la production laitière et la collecte du lait (1982-2012).	4
Tableau 02	Composition de la matrice de biofilm bactérien	13
Tableau 03	Différentes microflores bactériennes en biofilm dans les équipements de l'industrie laitière	24
Tableau 04	Propriétés principales des principales catégories de produits détergents	29
Tableau 05	Avantages, inconvénients et spectre d'action des principales catégories de produits désinfectants	35
Tableau 06	Méthodes alternatives à l'utilisation de produits conventionnels de nettoyage et de désinfection	38
Partie pratique		
Tableau 07	Capacité de production de lait et produits dérivés par l'unité Sidi Khaled	42
Tableau 08	Composition et conditions d'application des détergents homologués utilisés en CIP (laiterie 01)	46
Tableau 09	Composition et conditions d'application des détergents homologués utilisés en CIP (laiterie 02).	46
Tableau 10	Dénombrement de la flore totale avant et après nettoyage en place (laiterie 01).	47
Tableau 11	Dénombrement de la flore totale avant et après nettoyage en place (laiterie 02)	48
Tableau 12	Distribution des isolats selon les sites des prélèvements (laiterie 01)	58
Tableau 13	Distribution des isolats selon les sites des prélèvements (laiterie 02)	59
Tableau 14	Distribution des isolats sélectionnés pour la détection de la formation de biofilm selon les sites de prélèvements	64
Tableau 15	Interprétation de l'adhérence	66
Tableau 16	Production de biofilm par les deux méthodes TM et TCP	68

Liste des figures

N°	Titre	Page
Synthèse bibliographique		
Figure 01	Biofilm poly microbien cultivé sur une surface d'inox en laboratoire examinés en microscopie à épi fluorescence.	8
Figure 02	Représentation schématisée des principales étapes de la formation d'un biofilm par <i>P. aeruginosa</i> à partir de cellules planctoniques	10
Figure 03	Composition du biofilm : Les cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques	14
Figure 04	Micrographes électroniques de biofilms formés par la souche <i>Listeria monocytogenes</i> Lm 68 sur l'acier inoxydable à (a) 4c°, (b) 12c°, (c) 22c° et (d) 37c° : ×10 000·(a-c), ×5000·(d	22
Figure 05	images de micro-colonies d'un biofilm à <i>Salmonella</i> observé en microscopie électronique à balayage	23
Figure 06	Formation de biofilm en microplaque	26
Figure 07	Dépistage de la production de biofilm par la méthode en tube (TM).	27
Figure 08	Culture sur la gélose Rouge Congo.	27
Figure 09	Principe de Biofilm Ring Test.	28
Figure 10	Turbine de pulvérisation pour le nettoyage des cuves	32
Partie pratique		
Figure 11	Situation géographique des deux laïeries	40
Figure 12	Nécessaire pour la réalisation des prélèvements	43
Figure 13	Méthode de prélèvement à partir des équipements	43
Figure 14	Technique de la préparation des dilutions décimales	44
Figure 15	FMAT sur milieu PCA	47
Figure 16	Contamination des sites de prélèvements après nettoyage en place et comparaison entre les deux laïeries	49
Figure 17	Utilisation de la galerie API Staph dans l'identification des bactéries isolées..	54
Figure 18	Isolement des bactéries	55
Figure 19	Identification par les galeries API Staph (a), API 20E (b) et (c) Aspect de la galerie API 20 E avec la souche <i>Escherichia. Coli</i> .	56
Figure 20	Test de catalase (a) ; test de coagulase (b), coloration Gram (c et d)	56

Figure 21	Distribution des isolats selon leur nature (Laiterie 01).	57
Figure 22	Distribution des isolats selon leur nature (Laiterie 02).	57
Figure 23	Détection de la production de biofilm par la méthode en tube (TM).	67
Figure 24	Détection de la production de biofilm par la méthode de tissu en plaque (TCP)	68

LISTE DES ANNEXES

Annexe 01	Fiche d'évaluation d'un établissement de manipulation et de transformation des produits laitiers
Annexe 02	Contamination des sites de prélèvements après nettoyage en place
Annexe 03	Tableau de lecture du catalogue analytique API 20E
Annexe 04	Tableau d'identification du catalogue analytique API Staph
Annexe 05	Composition du tampon phosphate salin (TPS)
Annexe 06	Composition et préparation du milieu PCA (Plate Count Agar)
Annexe 07	Composition et préparation du T.S.E
Annexe 08	Lecture de la microplaque après 24h d'incubation Lecteur ELISA
Annexe 09	Lecture de la microplaque après calcul de la Do-Blanc
Annexe 10	Détection de la production de biofilm pour les souches isolées par méthodes TCP et TM

ملخص

في صناعة الألبان ، تكوين الأغشية الحيوية على الأسطح يمكن أن يؤدي ليس فقط إلى خسائر اقتصادية ولكن أيضاً إلى مشاكل صحية خطيرة وصحة الإنسان.

ركزت الدراسة على منتجين للألبان يقعان في غرب الجزائر (منطقة تيارت) وكانت لها 3 أهداف: كفاءة التنظيف في المكان ،وعزل وتحديد الجراثيم الملوثة وكذلك تقييم القدرة على تكوين الأغشية الحيوية.

لهذا الغرض تم اتباع المنهجية التالية: التدقيق وأخذ العينات قبل التنظيف وبعده من أجل تقييم التلوث من مجموع الجراثيم ،والبحت عن الجراثيم الملوثة وتحديدتها قبل التنظيف وبعده وتقييم القدرة على تكوين الأغشية الحيوية بشكل نهائي لبعض البكتريات باستخدام طريقتين (الزراعة الصفيحة وطريقة الأنوب).

أظهرت دراسة كفاءة التنظيف أن الصودا والأحماض القوية تستخدم للتنظيف ، بينما كانت الإجراءات غير فعالة مع انخفاضات ميكروبية ملحوظة على مستوى الملبنة الأولى (لوغاريمات **0.44** الى **1.79**) مقارنة بالثانية (لوغاريم **0.05** إلى **0.29**)

اختلفت تركيبة البكتيريا الملوثة وفقاً لموقع أخذ العينات ، حيث غلبت البكتيريا الدقيقة (22.72٪) تليها المكورات العنقودية (27.27٪) والمكورات الدقيقة (29.62٪) تليها الإشريكية القولونية (24.06٪) ، على التوالي بالنسبة للملبنة 1 و 2. 22 عزلة تم اختبارها، **13.63**٪ وجدت منتجة قوية للوحل ، تنتمي إلى جنس *Micrococcus* و *Pseudomonas* .

يجب أن يؤدي تطبيق إجراءات تنظيف أكثر صرامة إلى تقليل حدوث ذلك ، وبالتالي تقليل الإزعاج والمخاطر الكامنة.

الكلمات المفتاحية: البيوفيلم ، البكتيريا ، صناعة الألبان ، التنظيف في المكان ، التطهير

RESUME

En industrie laitière, la formation de biofilms sur les surfaces peut conduire non seulement à des pertes économiques mais également à des sérieux problèmes d'hygiène et de santé humaine.

L'étude a porté sur deux laiteries localisées à l'ouest Algérien (région de Tiaret) et visait 3 objectifs : efficacité du nettoyage en place, isolement et identification des germes contaminants ainsi que l'évaluation de la capacité de formation de biofilm.

Pour ce faire la méthodologie suivante a été suivie : audit et prélèvement d'échantillons avant et après nettoyage en place en vue d'évaluer la contamination par la flore mésophile totale, recherche et identification des germes contaminants avant et après nettoyage en place et enfin évaluer la capacité de formation de biofilms de certains isolats par deux méthodes (culture en plaque et méthode en tube).

L'étude de l'efficacité du nettoyage a montré que la soude et des acides forts sont utilisés pour le nettoyage, alors que procédures étaient peu efficaces avec des réductions microbiennes plus marquées au niveau de la première laiterie (Log 0,44 à Log 1,79) par rapport à la seconde (Log 0,05 à Log 0,29). La composition de la microflore de contamination variait selon le site de prélèvement, avec prédominance de *Micrococcus* (22,72%) suivi par *staphylococcus* (27,27 %) et *Micrococcus* (29,62%) suivi par *Escherichia coli* (24,06%), respectivement pour les laiteries 1 et 2. Parmi les 22 isolats testés, 13,63 % étaient forts producteurs de slime, appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Micrococcus*.

L'application de procédure de nettoyage plus rigoureuse devrait réduire l'occurrence et par conséquent, les inconvénients et les dangers inhérents.

Mots clés : Biofilm, bactéries, industrie laitière, nettoyage en place, désinfection.

ABSTRACT

In dairy industry, formation of biofilms on surfaces can lead not only to economic losses but also to serious hygiene and human health problems.

The study focused on two dairies located in western Algeria (Tiaret region) and aimed 3 objectives: efficiency of cleaning in place, isolation and identification of contaminating germs as well as evaluation of the capacity for biofilm formation.

For this, the following methodology was followed: audit and sampling before and after cleaning in place in order to assess the contamination by the total mesophilic flora, search and identification of contaminating germs before and after cleaning in place and finally assess the biofilm-forming capacity of some isolates using two methods (plate culture and tube method).

The study of the efficiency of cleaning showed that soda and strong acids are used for cleaning, while procedures were inefficient with more marked microbial reductions at the level of the first dairy (Log 0.44 to Log 1,79) compared to the second (Log 0.05 to Log 0.29).

The composition of contaminating microflora varied according to sampling site, with predominance of *Micrococcus* (22.72%) followed by *staphylococcus* (27.27%) and *Micrococcus* (29.62%) followed by *Escherichia coli* (24.06%)), respectively for dairies 1 and 2. Among the 22 isolates tested, 13.63% were found strong producers of slime, belonging to *Pseudomonas* and *Micrococcus* genders.

Applying more rigorous cleaning procedures should reduce the occurrence and therefore the inherent inconvenience and dangers.

Keywords: Biofilm, bacteria, dairy industry, cleaning in place, disinfection

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les exigences croissantes en matière de sécurité sanitaire des aliments ont conduit les industriels du secteur agro-alimentaire à une réalisation rigoureuse des opérations de nettoyage et de désinfection des locaux, surfaces et équipements.

Ainsi dans de nombreuses industries alimentaires les lignes de production subissent une procédure de Nettoyage en place NEP quotidienne. Or de nombreux microorganismes sont capables de se fixer sur les surfaces d'équipement en contact avec les aliments et de rester viables même après Nettoyage en place, ils sont donc capables de former un biofilm.

Dans les industries laitières l'adhésion des microorganismes contaminants sur les surfaces constitue une source majeure de sérieux problèmes à la fois en termes de qualité d'hygiène, de santé publique (**Manuel et al., 2009 ; Simoes et al., 2010**) ainsi que des pertes économiques (**Gymoese et Vogel, 2007**) et posent un risque de contamination secondaire du lait et des produits laitiers. (**Flint et al., 1997; Sharma et Anaud, 2002**).

L'Algérie se positionne parmi les pays les plus grands consommateurs de lait au monde (premier au Maghreb) avec une moyenne de 137 L/habitant/an. Devant cette consommation accrue opposée à une faible production nationale, l'Algérie se place aussi dans la catégorie des grands importateurs de poudre de lait (3^{ème} mondiale).

La flambée des prix des matières laitières n'est pas l'unique difficulté des industriels laitiers, c'est toute une série de problèmes qui fait face à l'amélioration de la production du lait, notamment l'hygiène.

Le lait est un produit très périssable et vulnérable à la contamination par divers microorganismes. On considère d'habitude que les sources majeures de cette contamination proviennent de l'équipement incorrectement nettoyé et désinfecté (**Jessen et Lammert, 2003**).

L'efficacité de la désinfection reste toutefois variable d'une application à une autre. En effet, si près de 100 % des cellules se trouvant à l'état planctonique peuvent être éliminées, ce rendement est moindre sur des cellules adhérentes (en biofilm).

C'est pour cette raison que les procédures de nettoyage en place doivent assurer une bonne qualité d'hygiène des lignes de transformation des aliments par l'élimination complète des bactéries. (**Sharma et Anaud, 2002 ; Bremer et al., 2006**).

L'installation du programme du nettoyage et de désinfection dans le cadre du HACCP en Algérie est une pratique relativement récente pour les acteurs de la filière lait.

L'application de ce programme joue un rôle primordial dans la détermination de la qualité hygiénique du lait et des produits laitiers. C'est dans ce contexte que s'est inscrit notre travail de thèse dont l'objectif fondamental est :

- Description des pratiques du nettoyage et de désinfection réalisées au niveau des laiteries et l'évaluation de leurs efficacités par l'évaluation de la FMAT des équipements laitiers réalisée avant et après Nettoyage en place.
- Isolement et l'identification des principales bactéries responsables de la formation de biofilm.
- Etude de la capacité de la formation de biofilms bactériens à partir des souches isolées, par les différentes techniques de détection de la production de biofilms bactériens.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. GENERALITES

1. FILIERE LAIT EN ALGERIE

La filière lait est définie à travers ses quatre principaux maillons : la production, la collecte, la transformation- commercialisation et la consommation, à cela, s'ajoute l'importation de la poudre de lait et ses dérivés.

L'industrie laitière, le maillon le plus puissant de la chaîne laitière, constitue le centre de commande à partir duquel surgissent des boucles de rétroaction, permettant à la filière lait de s'adapter et d'évoluer. (Souki, 2007)

La structure générale de l'industrie laitière est basée sur la coexistence de trois formes d'entreprises :

- Les unités de production publique organisées sous forme de groupe industriel de production du lait (GIPLAIT) ; composés de 19 filiales d'une capacité de 1,4 milliard de litre/an
- Les entreprises privées PME/PMI composées de 220 unités, dotées d'une capacité de transformation avoisinant les 200 millions de litre/an. (MADR, 2004)

A ces trois catégories s'ajoutent les toutes petites laiteries qui opèrent dans l'informel.

La filière lait reste déstructurée avec un taux de collecte frôlant les 10% de la production nationale dont 70% de la demande en lait est fournie par les importations. Ces dernières constituent le centre névralgique de la filière lait. Cependant, les entreprises de transformation du lait sont considérées comme le noyau de la filière lait par leur capacité de transformer et de conserver ce produit hautement périssable. Le tableau 01 ci-dessous résume l'évolution de la production laitière et la collecte du lait (1982-2012).

Tableau 01 : Evolution de la production laitière et la collecte du lait (1982-2012).

(Ministère de l'agriculture et de développement rural, 2013).

Année	1 : Production du lait Cru (10 ⁶ litres)	2 : Collecte de lait (10 ⁶ litres)	Taux de collecte (2/1) %
1982	538	-	-
1988	886	-	-
1992	1229	38,5	3,13
1997	1050	112,7	10,73
1998	1200	92,5	7,71
1999	1558.6	97	6,22
2000	1583.6	100	6,31
2001	1637.2	91,4	5,58
2002	1560	86.3	5,53
2003	1650	75,2	4,55
2004	1630	91,8	5,63
2005	1600	194	10,25
2006	1750	220	12,57
2012	3000	550	18,33

Face à cette consommation accrue opposée à une faible production nationale, l'Algérie se positionne aussi dans la catégorie des grands importateurs de poudre de lait et fait massivement appel aux importations ce qui augmente l'ampleur de la dépendance de l'Algérie des fournisseurs étrangers de la poudre de lait.

2. QUALITE DU LAIT PRODUIT

Intensifier la production laitière pour assurer les besoins de la population en cette protéine passe impérativement par la mise en place d'une synergie entre les différents acteurs de cette filière lait afin d'assurer la quantité et la qualité.

Donc, il ne suffit pas de réduire l'importation de la poudre de lait ni d'importer des vaches pour améliorer la production du lait cru puisque ce dernier présente d'importantes charges microbiennes.

Même avec une collecte de 550 millions de litres en 2012 pour une prévision de 800 millions de litres en 2013, la qualité n'est toujours pas assurée car la marge bactérienne reste importante dans le lait cru puisque les éleveurs ne sont pas formés et continuent à travailler avec des méthodes dépassées. De plus, le poids de l'informel dans le circuit de la collecte est important et sans aucun contrôle ce qui présente un risque pour la santé publique. C'est ainsi que la qualité du lait produit dépend fortement de la synergie entre éleveurs, agriculteurs et transformateurs.

Afin de juguler cette carence, l'Algérie a mis en œuvre un dispositif de développement de la production laitière nationale par des mesures d'incitation et d'encouragement à travers le paiement à la qualité bactériologique ainsi que la mise en place d'un système HACCP, un outil qui a pour but d'identifier, d'évaluer et de maîtriser les dangers significatifs au regard de la sécurité sanitaire des aliments, de la production jusqu'à consommation. Le HACCP s'intéresse aux 3 classes de dangers pour l'hygiène des aliments :

2.1. Dangers biologiques

Le lait est un aliment de choix : il contient des graisses, du lactose, des protéines, des sels minéraux, des vitamines et 87% d'eau. Son Ph est de 6,7. Il constitue un substrat très favorable au développement des microorganismes.

On répartit les microorganismes du lait, selon leur importance, en deux grandes classes:

La flore indigène ou originelle et la flore contaminante. Cette dernière est subdivisée en deux sous classe : la flore d'altération et la flore pathogène (**Vignola, 2002**).

Les dangers biologiques constituent l'un des problèmes les plus rencontrés en industrie laitière, vu que l'importance de la charge bactérienne du lait cru même après un traitement thermique reste élevée, résultat des contaminations et multiplications successives associées aux mauvaises conditions hygiéniques et de conservation lors de la traite à la ferme et au cours du transport vers les centres de collecte (**Hamiroune et al., 2014**).

La présence de certains germes contaminants dans le lait cru même après traitement thermique constitue une source majeure de toxi-infections d'origine alimentaire qui peuvent nuire à la santé du consommateur.

2.2. Dangers chimiques

En élevage bovin, une gamme très variée d'antibiotiques est utilisée par les éleveurs pour lutter contre diverses maladies et améliorer le rendement de leurs productions (**Thomson et al., 2008 ; Regula et al., 2009 ; Pardon et al., 2012**).

Leur présence est souvent à l'origine de potentiels risques toxicologique pour le consommateur et de développement de bactéries résistantes aux antibiotiques (**Kabir et al., 2004 ; Persoons, 2011**). Face à ces risques, plusieurs pays ont réglementé l'usage des antibiotiques et initié le contrôle systématique du lait cru avant son utilisation.

Dans l'Union Européenne, les fréquences de contrôle des résidus d'antibiotiques par les transformateurs sont très élevées et les contrôles sont systématiques au niveau des citernes de camions de collecte pour déceler la présence d'inhibiteurs (**Commission Européenne, 2010**). L'absence d'inhibiteur est un critère de qualité qui conditionne le prix du lait payé à l'éleveur. C'est certainement pour cette raison que le taux de non-conformité en matière de résidus dans le lait est très faible dans l'UE.

En Algérie, 89,09 % des laits provenant des élevages des Wilayas, Blida, Alger, Tipaza et Médéa ont donné des résultats positifs lors du contrôle de résidus de tétracyclines et 65,46 % lors du contrôle de résidus de bêta-lactamines (**Tarzaali et al., 2008**). Par ailleurs, environ 29 % des échantillons de lait produit dans l'Ouest algérien contiennent des résidus d'agents antibactériens (**Aggad et al., 2009**). Dans l'Algérois, 9,87 % des échantillons de lait cru étaient contaminés par des résidus de pénicillines et/ou tétracyclines pour 97,33 % des échantillons positifs et de macrolides et/ou d'aminosides pour 2,67 % des prélèvements testés positifs (**Ben-Mahdi et Ouslimani, 2009**).

Ces résultats reflètent une utilisation anarchique des antibiotiques en élevage ce qui a pour conséquence un risque accru d'antibiorésistance pouvant occasionner des infections graves chez l'homme (**Mensah et al., 2014**).

2.3.Dangers physiques

La présence de corps étrangers, notamment durs et/ou pointus ou acérés, dans un produit alimentaire, représente un réel danger pour le consommateur en cas d'ingestion accidentelle. Ces corps étrangers sont devenus la première source de réclamations des consommateurs dans l'industrie agro-alimentaire.

Au sens large, il convient d'appeler corps étranger ou contaminant dense «toute particule de matière présente dans un produit alimentaire dont la nature ou la texture n'est pas attendue par le consommateur ou le client ». Le terme «contaminant dense» est aussi souvent utilisé pour distinguer ces matières étrangères des autres contaminants de nature chimique (résidus de produits phytosanitaires, métaux lourds, mycotoxines, etc.) ou biologique (micro-organismes, parasites, allergènes, etc.). On distingue en général :

- Les corps étrangers d'origine endogène (ceux apportés par les matières premières et leurs emballages).
- Les corps étrangers d'origine exogène (ceux incorporés au cours du process).

La lutte contre la présence des corps étrangers concerne tous les acteurs de la filière. Elle s'inscrit dans la démarche globale HACCP des entreprises agro-alimentaires, qui comprend les étapes suivantes :

- La connaissance des corps étrangers potentiellement présents depuis la matière première jusqu'au produit fini, identification de leurs natures, de leurs causes et de leurs fréquences, et des conditions de leur survenue : phase d'analyse des dangers.
- La connaissance des consommateurs à qui sont destinés les produits.
- La sélection et mise en application des mesures de prévention adaptées.
- Le choix facultatif, en complément, des solutions de détection et de tri minimisant la probabilité de trouver un corps étranger dans le produit fini.
- La définition de mesures de traçabilité, alertes et rappels produits, en concertation avec les fournisseurs et les clients de l'entreprise.

BIOFILMS BACTERIENS**1. HISTORIQUE**

Les biofilms constituent la première forme de vie organisée sur la terre depuis environ 3,5 milliards d'années qui se retrouvent dans l'environnement terrestre à tous les niveaux, même dans les environnements extrêmes (pores au sein des glaciers, eau à haute concentration saline, milieu irradié, etc.).

On accorde la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope, ANTONI Van Leeuwenhoek (1632-1723), qui observa vers 1683 des communautés de micro-organismes à la surface des dents (**Donlan, 2002**).

En 1933, Henrici lors d'expériences visant à étudier la croissance d'algues sur des lames de verre, observa des communautés bactériennes fixées sur ces lames. C'est la que le concept de « biofilm » est né, mais le terme n'est pas encore utilisé.

En 1943, Claude Zobell montra que les bactéries colonisant les parois d'un récipient rempli de liquide sont plus nombreuses que celle en suspension (**Zobell, 1943**).

La plupart des micro-organismes favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée sur un support (état sessile) plutôt que libre et isolée dans le milieu environnemental (état planctonique).

Costerton et al. (1978) ont proposé le terme de « biofilm » en suggérant qu'il s'agissait du mode de vie naturel de la plus part des micro-organismes. Cette proposition, qui s'appuyait initialement sur la comparaison de nombre de bactéries sous forme planctonique d'une part, et au sein de biofilms dans les cours d'eau d'autre part, est désormais admise par les microbiologistes. La figure 01 est une illustration de l'aspect d'un biofilm polymicrobien.

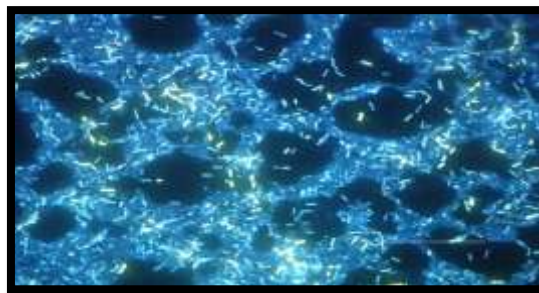


Figure 01 : Biofilm Poly microbien cultivé sur une surface d'innox en laboratoire examinés en microscopie à épi fluorescence (**Ricardo et al., 2002**).

2. DEFINITIONS

Plusieurs définitions d'un biofilm peuvent être trouvées dans la littérature, et elles importent généralement les trois éléments clés du biofilm à savoir : le micro-organisme, la surface et la matrice nutritive. D'ailleurs, la complexité de ce phénomène dépend de la complexité de ces trois éléments (**Carpentier et al., 1998**).

Très simplement dit : un biofilm est une communauté microbienne adhérente à une surface et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharides (**Characklis, 1989 ; Costerton et Stewart, 1999**). La formation des biofilms constitue donc la stratégie privilégiée de survie développée par les micro-organismes.

Les biofilms se construisent et évoluent en conjuguant de fortes interactions entre la dynamique des systèmes vivants et l'évolution de la surface. Ce sont des lieux d'échange d'informations chimiques (quorum sensing) et biologiques (**Parsek, 2000**).

Le biofilm peut être défini comme une communauté bactérienne hétérogène de point de vue des activités métaboliques et de la croissance (**Mah et O'Toole, 2001**).

Selon (**Hall-Stoodley et al., 2004**) la biomasse microbienne fixée sur des surfaces constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice d'exopolysaccharides riche en eau, en sucre et en protéines. Présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales ou animales, elles sont appelées Biofilms.

Dans les environnements naturels, les biofilms jouent un rôle de réservoir d'espèces microbiennes et garantissent l'équilibre écologique.

Les biofilms sont des dépôts organiques qui se forment naturellement dans les réseaux d'eau (naturels et artificiels). Ils se trouvent partout où l'eau est en contact avec une surface solide. On ne trouve pratiquement aucune surface qui ne soit pas recouverte de biofilm (**Heiermann et Thut, 2007**).

Les études menées sur les biofilms ces dernières années ont permis d'établir l'existence de changements radicaux dans l'expression génétique et les phénotypes entre les formes planctoniques et sessiles. Ces changements radicaux permettent d'expliquer l'adaptation des biofilms à des conditions environnementales stressantes et l'acquisition d'avantages évolutifs (**Clutterbuck, 2007 ; Goller et Romeo, 2008**).

Bridier et al., 2011 considèrent que le biofilm est une étape normale ou potentielle du cycle de vie de la plupart des bactéries, parfois en réaction à un stress. Sa structure est hétérogène, souvent sous forme de colonie d'une ou de plusieurs espèces de bactérie et d'une matrice extra cellulaire composée de substances polymériques.

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobées d'une matrice polymérique et attachée à une surface. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans les conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques. La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs micro- organismes (**Tremblay et al., 2014**).

3. DEVELOPPEMENT DU BIOFILM

Le développement des biofilms est largement décrit par la littérature, il a été décrit par plusieurs auteurs à cause de son importance.

3.1. Etapes de formation de biofilm

La formation des biofilms est un processus complexe qui se déroule en trois principales phases : une phase d'initiation qui aboutit à l'adhésion des bactéries, une phase d'accumulation et formation de micro colonies et une phase de maturation du biofilm. La figure ci-dessous résume les principales étapes de la formation d'un biofilm.

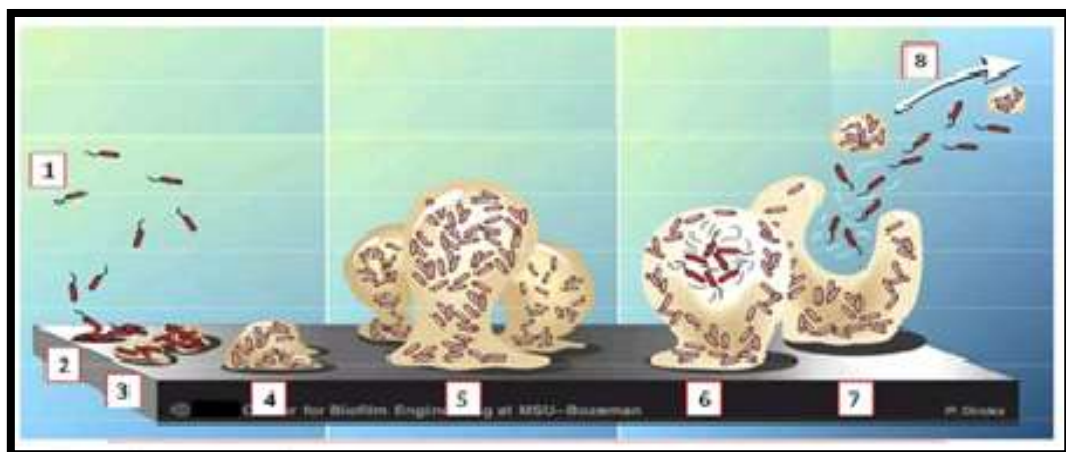


Figure 02 : Représentation schématisée des principales étapes de la formation d'un biofilm par *P. aeruginosa* à partir de cellules planctoniques (**Besassier et al., 2005**).

Le mécanisme de formation des biofilms comprend une succession d'étapes (**Costerton et al., 1999 ; Klinger 2005**).

Tout d'abord, les bactéries interagissent avec un substrat et s'y fixent de façon réversible par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals : on parle d'adhérence (**Golovlev, 2002 ; VanHoudt et Michiels CW 2005**). Puis les bactéries se fixent de façon irréversible et spécifique au substrat grâce à des molécules d'adhésion comme par exemple les pili, et synthétisent une matrice d'exopolysaccharides (EPS) : il s'agit de la phase d'adhésion.

On distingue ensuite des phases de croissance et de maturation du biofilm.

Puis, sous l'effet de facteurs environnementaux, des bactéries vont se détacher du biofilm, et se disperser sous forme planctonique dans le milieu environnemental : on parle d'essaimage du biofilm (**Clutterbuck et al., 2007**).

Appelé aussi film de conditionnement, composé de macromolécules organiques ou inorganiques puis des bactéries. Le film primaire est essentiel, car il modifie certaines propriétés physicochimiques de surfaces, et peut donc influencer l'adhésion bactérienne (**Rubio, 2002**).

Les bactéries s'approchent étroitement de la surface, ce transport dépend de la nature du milieu dans lequel les bactéries évoluent (viscosité, force ionique) ainsi que du mouvement de ce milieu (écoulement, sédimentation, etc.). Les bactéries se déplacent à l'aide des appendices (pili, flagelles). Ce dernier favorise un environnement idéal pour leur attachement et leur croissance (**Costerton et al., 1999**).

L'attachement des bactéries à la surface des canalisations s'effectue plus favorablement au niveau de dépôts minéraux et organiques, ou à la surface de tubercules de corrosion

Cette étape peut être considérée comme étape-clé de la formation des biofilms, vu qu'elle traduit l'affinité des microorganismes pour un substrat, Plus cette affinité est grande, plus la formation des biofilms est favorable. Elle peut être divisée en deux étapes principales :

- *L'adhésion réversible*, qui correspond à une adsorption réversible des cellules: une fraction des bactéries planctoniques transportées par l'eau se dépose au niveau de la surface des canalisations. Cette étape ne fait intervenir que des processus physiques (interactions électrostatiques, électrodynamiques), et dépend de la nature du support et de son conditionnement préalable (présence de tubercules de corrosion, par exemple). Les bactéries ne sont fixées que de manière réversible au support; elles se détachent facilement sous l'action de contraintes hydrodynamiques imposées par le milieu. Cette phase est en général de courte durée (**Gauthier et Isoard, 1989**).

- *L'adhésion irréversible*, cette étape est plus lente que la précédente, l'irréversibilité de l'adhésion faisant appel au métabolisme bactérien.

En effet, la sécrétion d'exopolymères par les microorganismes leur permet de consolider leur adhésion au support, formant autour de la bactérie une enveloppe.

La croissance du biofilm correspond à la multiplication cellulaire, la production de l'EPS ainsi que du matériel extracellulaire varié. La prolifération des cellules aboutit à la formation de microcolonies qui sont décrites comme des foyers tridimensionnels hautement récalcitrants (**Conibear et al., 2009**).

Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, le biofilm entame des phases de croissance et de maturation. La maturation du biofilm est divisée en deux phases (**Clutterbuck et al., 2007**). La première phase est marquée par des régulations de gènes importantes, engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques (**Sauer, 2003**). La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses protéiques importantes, très différente de celles ayant lieu lors de la première phase de maturation du biofilm.

Au sein du biofilm mature, les microcolonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm ; d'autre part d'évacuer les déchets (**Filoux et Vallet, 2003**).

L'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation (**Clutterbuck et al., 2007**).

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du stade de dispersion : des formes planctoniques sont détachées dans le milieu extérieur à partir du biofilm. Les cellules libres peuvent coloniser de nouvelles niches écologiques et par conséquent la formation d'autres biofilms (**Clutterbuck et al., 2007**).

Le détachement de cellules du biofilm intervient aussi lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène, apparition de forces de cisaillement, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments (**Sauer et al., 2002**).

3.2. STRUCTURE DE BIOFILM

Le développement de l'architecture des biofilms bactériens est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les bactéries du biofilm. Cette matrice inclut tous les éléments du biofilm autre que les microorganismes (**Sutherland, 2001**).

La matrice des biofilms bactériens est constituée d'exopolymères pouvant occuper jusqu'à 75-95% du volume du biofilm mature et lui donnant une architecture particulière.

Ces polymères sont synthétisés et sécrétés par les bactéries au sein du biofilm. Leur production est donc sous contrôle génétique. Leurs propriétés physico-chimiques sont donc très variées, en fonction du genre bactérien, l'âge du biofilm, de la température et de la disponibilité en nutriments ainsi que des facteurs environnementaux (**Flemming et Wingender, 2010**).

Elle est essentiellement composée d'eau (jusqu'à 97 %), de polymères polysaccharidiques sécrétés par les microorganismes, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur. Néanmoins, on peut également y trouver d'autres composants, tels que de l'ADN, de l'ARN, de protéines, d'agents tensioactifs, des lipides, de glycolipides et de cations (**Sutherland, 2001**) (tableau 02).

Tableau 02:Composition de la matrice de biofilm bactérien (**Sutherland, 2001**).

Composants	% de la Matrice
Eau	> 97%
Cellules microbiennes	2-5%
Polysaccharides (homo et hétéro polysaccharides)	1-2%
Protéines (Extracellulaires et résultant de la lyse)	< 1-2% (incluant plusieurs enzymes)
ADN et ARN	< 1-2% (à partir des cellules lysées)
Ions	Liés et libres

La matrice présente différentes fonctions, elle est notamment responsable de l'architecture du biofilm. C'est un milieu visqueux qui permet la protection et la stabilité mécanique du biofilm. Elle facilite l'arrangement des cellules au sein du biofilm et la communication intercellulaire, notamment en concentrant des molécules, signal nécessaire au développement du biofilm (**Allison, 2003**).

Les EPS dans un biofilm bactérien assurent plusieurs fonctions (**Flemming et Wingender, 2010**) ; ils permettent d'initialiser la première étape de la colonisation et de l'attachement à long terme du biofilm. Ces polymères assurent la cohésion du biofilm en formant un réseau de polymères hydratés, mécanisme médiateur de la stabilité du biofilm, détermine sa structure et assure une bonne communication cellule-cellule. Les EPS comme source de nutriment, fournissent une source de carbone, de nitrogène et de phosphate utilisée par le biofilm.

La bactérie lors de sa croissance en biofilm, synthétise et secrète les EPS, ces derniers, en tant que barrière protectrice, confèrent une résistance aux défenses de l'hôte et une tolérance lors de conditions défavorables et aux fortes concentrations d'agents antimicrobiens (**Mah et O'Toole, 2001 ; Simoes et Vieira., 2009 ; Simoes et al., 2010; Flemming et Wingender, 2010**). La figure ci-dessous illustre la composition du biofilm.

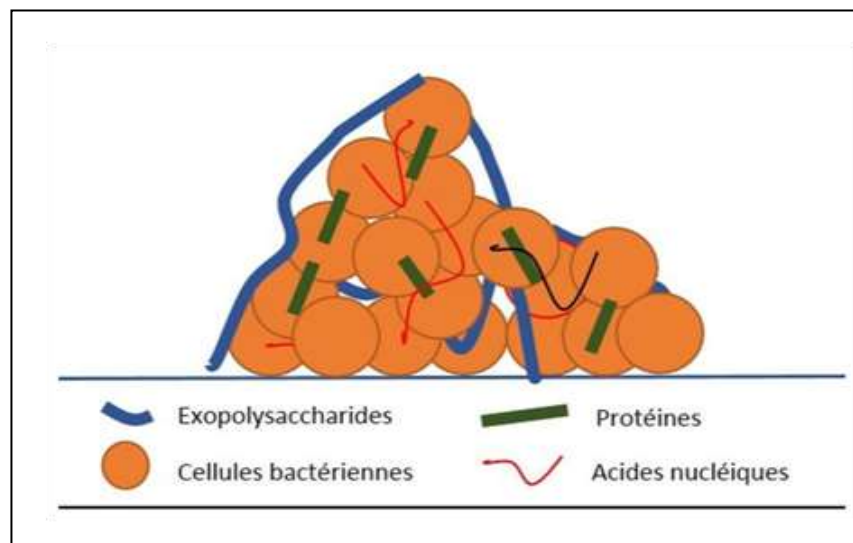


Figure 03 : Composition du biofilm : Les cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (**Lister et Alexander., 2014**).

4. Facteurs influençant le développement de biofilm

Au cours de la formation de biofilm, plusieurs paramètres jouent un rôle très important et peuvent modifier l'adhésion des micro-organismes. Ces facteurs peuvent être liés à la surface, au micro-organisme ou à l'environnement.

4.1. Facteurs liés à la surface des matériaux

L'adhésion bactérienne est influencée par les caractéristiques physico-chimiques du substrat. En effet, la balance hydrophile/hydrophobe ainsi que les charges à la surface jouent un rôle non négligeable sur l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm (**Gottenbos et al., 2001; Speranza et al., 2004 ; Terada et al., 2005**).

La charge à la surface d'un solide peut engendrer des forces électrostatiques d'attraction ou de répulsion lors de l'approche de la bactérie.

Les cellules bactériennes possèdent une charge négative sur leur membrane cellulaire mais cette charge est plus ou moins importante d'une souche à l'autre. La charge de surface du matériau peut être modifiée par le pH et la composition ionique de la solution environnante. Rendre la surface d'un matériau hydrophobe et apolaire pourrait réduire l'adhésion microbienne et les liens adhésifs entre le micro-organisme et le matériau (**Lerebour et al., 2004**). Cependant la charge de la surface peut aussi être modifiée par l'adsorption de protéines, qui a lieu au cours des premières étapes de l'adhésion. Cette adsorption augmente avec l'hydrophobicité du support (**Pamula et al., 2004**).

Les traitements de nettoyage des surfaces influencent la charge et l'énergie de surface du matériau (**Boulangé-Petermann, 1996**). Selon les produits utilisés pour le nettoyage des surfaces (produits acides, basiques, etc.), les surfaces peuvent être plus ou moins chargées et posséder des énergies de surface différentes, engendrant ainsi une adhésion différente du micro-organisme. Le nettoyage de l'acier avec un mélange HF/HNO₃ dissout la couche d'oxydes du matériau. Dès que le matériau est exposé à l'air, il se recouvre à nouveau d'oxydes. Selon le temps d'exposition à l'air, la couche d'oxydes ne possède pas les mêmes propriétés et peut donc influencer l'adhésion.

La rugosité semble jouer un rôle important dans l'adhésion bactérienne, l'influence de la rugosité du support reste tout de même un paramètre très discuté dans la littérature. **Pedersen (1990)** a constaté qu'un acier inoxydable mat rugueux était 1,4 fois plus recouvert

de micro-organismes que l'acier électro poli. Pour certains auteurs, les surfaces rugueuses possèdent une surface active plus importante et protègent les cellules des forces de cisaillement dues à l'écoulement. En revanche, pour d'autres, la rugosité permet de réduire la surface de contact entre le micro-organisme et le support, favorisant ainsi son détachement (**Boulangé- Petermann, 1997**).

Du fait de la variabilité des espèces étudiées ainsi que des gammes de rugosité étudiées, des supports utilisés, et des méthodes d'évaluation de l'adhésion, il est difficile de conclure rapidement quant à l'effet de la rugosité sur l'adhésion.

4.2. Facteurs liés à la cellule bactérienne

De nombreux facteurs cellulaires peuvent modifier l'adhésion cellulaire sur les surfaces. Parmi ceux-ci, certains sont liés à la physiologie du micro-organisme lui-même, la présence d'appendices (pili, flagelle), le milieu de croissance et les conditions de culture, le temps de contact avec le support et la composition du milieu de suspension (**Chmiellewski et Frank, 2003**).

Drenkard et Ausubel. (2002) ont montré que, la capacité d'adhésion d'une bactérie à une surface d'un matériau dépend de l'interaction de l'hydrophobicité.

Les bactéries Gram- sont généralement plutôt hydrophiles, cependant, les protéines de surface présentes sur leur paroi peuvent les rendre hydrophobes. Il a été démontré que cette caractéristique du micro-organisme se révèle importante du point de vue de l'adhésion.

Pradier et al. (2005) ont montré que, parmi trois souches de bactéries marines Gram-, la souche dont la surface est la plus riche en protéines adhère deux fois plus à l'acier mais aussi au verre et au téflon que les autres souches. D'autres auteurs ont démontré, par exemple, que le nombre de spores hydrophobes adhérees sur différents supports (PVC, verre, acier inoxydable) de *Bacillus cereus* était dix fois plus élevé que celui des spores hydrophiles de *Bacillus subtilis* (**Faille et al., 2002**).

Plusieurs cellules produisent des filaments ou des substances polymériques extracellulaires. Ces dernières, semblent jouer un rôle important dans le mécanisme de l'attachement cellulaire ; ce sont les flagelles, pilis ou fimbreae et pédicules (**Harbron et Kent, 1988**).

Les flagelles quand ils existent, sont responsables de la motilité bactérienne
La résistance des biofilms, en termes de force d'adhérence, peut être due à la présence

d'appendices. Les pilis sont nécessaires à l'agrégation des cellules et ont un rôle structurel dans la formation du biofilm (**Reguera et al., 2007**).

Il a été démontré que la température de croissance avait un effet significatif sur la mobilité électrophorétique cellulaire et la production de flagelles (**Briandet et al., 1999**) et ainsi sur l'adhésion. La surface de la bactérie, et donc son caractère hydrophobe peuvent être affectés par la température de croissance. De même, la composition du milieu de culture reste aussi un paramètre important. La force ionique est souvent présentée comme un paramètre qui influence l'adhésion (**Fletcher, 1988**).

Le temps de contact entre le micro-organisme et son support est également très important et joue sur l'adhésion. Ainsi, certains auteurs ont pu mettre en évidence que des levures étaient plus résistantes à l'écoulement (se détachaient plus difficilement) sur une plaque de verre après un temps de contact de 15h que de 1h (**Mercier-Bonin et al., 2004**). Après un temps d'incubation plus long (15 à 180 minutes), le nombre de bactéries adhérees s'est aussi révélé plus important.

5. Utilisations

Si les biofilms sont une source de contamination dans des secteurs tels que l'agro-alimentaire ou le médical, ils peuvent également être utilisés positivement.

- Dans le traitement d'eaux usées. Ces procédés utilisent des supports fixes ou mobiles sur lesquels peuvent se développer des biofilms qui participent au traitement de la pollution. Les biofiltres aérés et les procédés à biofilm en digestion anaérobie (méthanisation) peuvent être également utilisés pour le traitement des eaux usées industrielles riches en matière organique (agro-alimentaire, papeterie, pharmacie, etc.).
- D'autres usages sont envisageables dans le domaine de la lubrification sous l'eau ou des piles microbiennes.
- Dans la nature, ils peuvent servir de bio-indicateurs et de marqueurs du degré de pollution chronique de leur habitat (**Wanner et Bauchrowitz., 2006**), leur analyse physicochimique peut apporter d'intéressantes informations sur les contaminants présents dans l'environnement, par exemple pour les métaux, métalloïdes toxiques ou les pesticides.

6. Résistance aux agents antimicrobiens

Les biofilms retrouvés dans des environnements naturels ou industriels sont résistants aux bactériophages, aux amibes ainsi qu'aux biocides utilisés dans les procédés industriels (Costerton et al., 1999).

Les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que sous forme planctonique. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens (Ceri et al., 2010).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) demeure la mesure de référence pour déterminer la sensibilité des bactéries planctoniques à divers agents antimicrobiens. Cependant, il faut être conscient qu'il n'existe pas une bonne corrélation entre la CMI de cultures bactériennes planctoniques et la concentration de l'agent antimicrobien requise pour éradiquer un biofilm (Olson, 2002). Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande résistance ou tolérance des biofilms aux antibiotiques (Anderson et al., 2008 ; Hall-Stoodley et al., 2009). D'autres facteurs liés à l'environnement spécifique du biofilm tel que le métabolisme des bactéries au sein d'un biofilm jouent également un rôle très important, étant donné la faible concentration de certains nutriments et le gradient en oxygène qui pourraient gêner l'action de l'antibiotique. La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques (Lewis, 2008).

6.1. Résistance aux agents désinfectants :

Cette résistance implique qu'au moins une partie de biofilm persistera après les cycles de nettoyage et désinfection traditionnellement utilisé en industrie et que par la suite le biofilm pourra se reformer. Il a ainsi été démontré que la croissance d'un biofilm pouvait reprendre en quelques jours ou quelques heures à la suite des opérations de désinfection (Costerton, 1999).

BIOFILMS BACTERIENS ET INDUSTRIES LAITIÈRES

Les biofilms se développent dans tous types d'environnements. Leur formation sur des surfaces ouvertes ou fermées pose des problèmes sanitaires récurrents dans beaucoup de secteurs (hospitaliers, pharmaceutique, etc.) et constitue une source de contamination critique dans l'industrie alimentaire. Dans certains cas, les biofilms sont responsables de graves contaminations des produits finis (**Wanner, 2006**).

Dans l'industrie alimentaire particulièrement l'industrie laitière, les biofilms constituent un problème majeur surtout quand la contamination concerne les produits laitiers. Les principales sources de contamination du lait et des produits laitiers sont généralement dues à l'inefficacité des procédures du nettoyage et de désinfection des équipements laitiers (**Gibson et al., 1999 ; Jessen et Lammert, 2003**). C'est pour cette raison, qu'il est extrêmement important de les nettoyer en tenant compte de la composition inorganique des dépôts et aussi de la constitution de la microflore. Les biofilms dans le milieu laitier se caractérisent par la prédominance des substances bactériennes polymériques extracellulaires en plus des résidus du lait, les protéines bactériennes et le calcium phosphate (**Flint et al., 1997 ; Mittelman, 1998**).

1. Effet des biofilms

Les biofilms peuvent avoir des effets positifs (propriétés de biofiltration, bioremédiation, etc.) ou des effets néfastes (bio corrosion, contamination, etc.).

1.1. Biofilms positifs :

Certains biofilms composés de souches non pathogènes jouent un rôle très intéressant par leur capacité à limiter le développement des flores indésirables dans les unités de production. Ce sont les biofilms positifs (**Moreau, 2008**).

1.1.1. Cellules immobilisées

Dans l'industrie laitière, les bactéries lactiques se trouvent généralement sous forme immobilisée, dans la mesure où le lait coagulé ne constitue pas un milieu liquide et ne permet donc pas aux bactéries en croissance les déplacements libres. L'immobilisation des bactéries est encore plus évidente au sein du fromage. Les *lactocoques* peuvent être immobilisés par un attachement sur les surfaces, la formation de chaînes ou l'emprisonnement au sein d'une matrice extracellulaire (**Mariam et al., 2004**).

Le développement d'un biofilm positif est lié aussi à la capacité d'adhésion des souches qui est un caractère discriminatif important, tel est le cas des microorganismes cobiotex

utilisé dans la lutte biologique par la production d'un biocide, isolées à partir de niches écologiques naturelles. Ils appartiennent à différents groupes de bactéries tel que le groupe des bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, etc.) et *Bacillus* largement rencontré en industries laitières.

- Les biofilms sont utilisés dans la production du vinaigre (acide acétique).
- Les biofilm ont également été utilisés dans la production d'antibiotiques par exemples : la production de pénicilline.
- Les biofilms sont également utilisés pour le traitement biologique des eaux résiduaires.

1.2. Biofilms négatifs :

La formation de biofilm dans les réseaux de distribution d'eau est également un des problèmes importants rencontrés dans le maintien de la qualité des aliments et de contamination dans les équipements de l'industrie agroalimentaire (**Alnnasouri, 2010**).

Les biofilms sont utilisés pour leur capacité de filtration (biofiltres), mais posent problème dans certains processus en étant source d'entartrement dans les conduites d'eau et sur les échangeurs thermiques (**Wanner et Bauchrowitz, 2006**).

En industrie laitière, la formation des biofilms au niveau des équipements peut conduire à de sérieux problèmes d'hygiène et à des pertes économiques dues non seulement à la contamination des produits laitiers mais aussi à la détérioration des équipements (**Gymoese et Vogel, 2007**).

1.1.1. Biocorrosion :

Les biofilms posent aussi un véritable problème dans les canalisations, ils sont aussi impliqués dans la détérioration des installations industrielles par bio-corrosion.

Les microorganismes au sein d'un biofilm catalysent les réactions chimiques et biologiques causant la biocorrosion des canalisations et des tanks de stockage (**Mittelman et al., 1998**). La biocorrosion résulte des biofilms composés de bactéries réductrices de sulfate qui interagissent avec de l'hydrogène moléculaire présent sur les surfaces des tubes et produisent du sulfure d'hydrogène, comme produit secondaire de métabolisme bactérien. Ce

processus décompose le fer et l'acier de tuyaux, même à paroi épaisse, ce qui entraîne des fuites et des graves défaillances des pipelines et des canalisations.

2. Biofilms dans les industries agro-alimentaires

La surveillance et le contrôle de biofilms dans les industries pourraient prévenir les pannes d'équipements, de réduire les dégradations des installations et par conséquent, les pertes économiques. Les biofilms sur les surfaces des équipements de fabrication des produits laitiers menacent la qualité et la sécurité des produits laitiers.

Il existe plusieurs types de biofilms en industries agroalimentaires, quelques exemples seront cités ci-dessous :

2.1. Biofilms à une seule espèce :

2.1.1. Biofilms à *Pseudomonas*

Cette bactérie est l'une des bactéries les plus étudiées dans le contexte des biofilms (**Musk et al., 2005**).

Pseudomonas. aeruginosa, comme d'autres bactéries à Gram négatif, produit des agrégats structurés ou biofilms maintenues par une matrice. Cette dernière est composée majoritairement d'un mélange comprenant en proportions des alginates (exopolysaccharide), des polyoses ainsi que des protéines et des rhamnolipides (**Ben Haj Khalifa et al., 2011 ; Barakat et al., 2014**).

Pseudomonas est l'une des plus importantes bactéries causant l'altération des produits issus du lait pasteurisé (**Wiedmann et al., 2000., Dogan et Boor, 2003**).

2.1.2. Biofilms à *Listeria monocytogenes*

Listeria spp a été trouvée dans différents emplacements des industries laitières (**Vilar et al., 2007 ; Waak et al., 2002**).

Cette bactérie peut survivre longtemps dans les industries de transformation des aliments, et est le plus souvent retrouvée dans les aliments à longue durée de conservation et consommés en l'état sans être chauffés. Il a été remarqué que certaines souches de *L. monocytogenes* peuvent s'établir au sein des industries agro-alimentaires et y rester ainsi plusieurs mois, voire des années (**Tompkin, 2002., Ferreira et al., 2014 ;**).

Son caractère psychrophile est adapté aux températures froides mais elle peut également supporter des températures jusqu'à 45°C qui favorise sa survie dans l'environnement laitier (**Borucki et al., 2003**).

Des micrographes électroniques de biofilms produits par la souche *Listeria monocytogenes* Lm 68 sur une surface en acier inoxydable ont montré que :

À 4 et 12 c°, *L. monocytogenes* a formé un biofilm rudimentaire composé d'agrégats de cellules liées par un réseau de substance polymérique extra cellulaire (EPS), bien que les cellules et EPS ont diminué à 4 et à 12 c°, le biofilm réapparaît principalement à 22 et à 37c° en monocouche, recouverte d'EPS (**figure 04**).

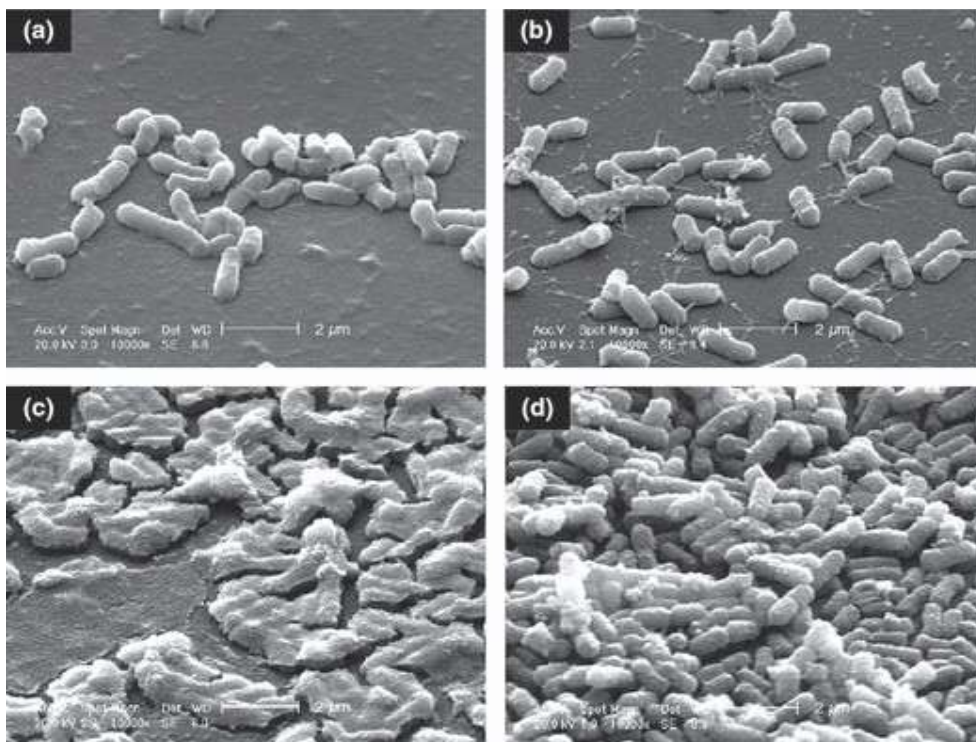


Figure 04 : Micrographes électroniques de biofilms formés par la souche *Listeria monocytogenes* Lm 68 sur l'acier inoxydable à (a) 4c°, (b) 12c°, (c) 22c° et (d) 37c° :

×10 000·(a–c), ×5000·(d) (**Di Bonaventura et al., 2008**)

2.1.3. Biofilms à *Salmonella*

En général, les salmonelles sont des indicateurs de la qualité hygiénique des aliments. Les salmonelles sont aussi des indicateurs de contaminations fécales, ce qui explique leur présence dans le tube digestif.

Ces *Enterobacteriaceae* sont pathogènes pour l'homme et la cause la plus fréquente de toxi-infections et c'est aussi le deuxième agent responsable d'accident alimentaire liés à la consommation de laits et des produits laitiers après les staphylocoques.

Les salmonelles peuvent adhérer aux surfaces des équipements des industries de transformation alimentaire et former des biofilms (**Helk et Wong, 1994 ; Jones et Bradshaw, 1996**). La figure ci-dessous montre des images de micro-colonies d'un biofilm à *Salmonella* observé en microscopie électronique à balayage.

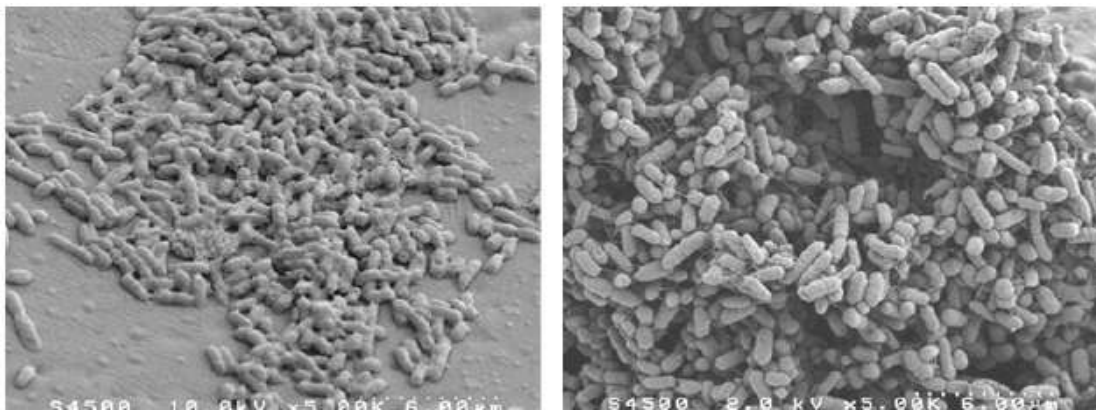


Figure 05 : images de micro-colonies d'un biofilm à *Salmonella* observé en microscopie électronique à balayage.

2.2. Biofilm à microflore variée

D'une manière générale la microflore du biofilm est complexe, et elle peut être constituée de nombreuses espèces et groupes bactériens très variés.

Le tableau 03 ci-dessous résume quelques espèces bactériennes susceptibles de former des biofilms sur les équipements laitiers (**Sharma et Anaud, 2002a**).

Tableau 03: Différentes microflores bactériennes en biofilm dans les équipements de l'industrie laitière (Sharma et Anaud, 2002b).

Gram+	%	Gram-	%
<i>Bacillus</i>	59 à 64	<i>Klebsiella</i>	55
<i>Staphylococcus</i>	21 à 28	<i>Shigella</i>	18 à 22
<i>Lactobacillus</i>	4 à 6	<i>E. coli</i>	9 à 30
<i>Micrococcus</i>	4	<i>Enterobacter</i>	18 à 24
<i>Streptococcus</i>	2	<i>Flavobacterium</i>	5
		<i>Proteus</i>	3

METHODES DE DETECTION DES BIOFILMS

Pour détecter la production d'un biofilm, il existe différentes méthodes, parmi lesquelles ; la méthode de Plaque de culture de tissus (TCP) (**Christensen et al., 1985**), la méthode en Tube (TM) (**Christensen et al., 1982**), la culture sur milieu rouge Congo (RCA) (**Freeman et al., 1989**) et le Biofilm Ring Test (BFRT).

Les essais de bioluminescence (**Donlan et al., 2002**) et l'examen microscopique par fluorescence (**Zufferey et al., 1988**) sont souvent soumis à de sévères limitations analytiques et sont incapables de détecter par précision l'adhésion bactérienne.

1. Méthode de culture de tissus en plaque (TCP)

La méthode de culture de tissus en plaque (TCP) décrit par (**Christensen et al., 1985**) permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm (**O'Toole et al., 2000**). Les biofilms mono-espèces peuvent se former sur des supports en polystyrènes en utilisant des microplaques à 96 puits.

A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu Bouillon infusion coeur cerveau (BHIB), les puits d'une microplaque de 96 puits sont inoculés avec des bactéries. Les microplaques sont incubées par la suite pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont lavés trois fois avec de tampon phosphate salin (PBS).

Les biofilms ainsi formés par l'adhésion des bactéries sessiles sont colorés avec du Cristal Violet (CV) à 0,1%. En fonction de la lecture des densités optiques (DO) de la phase biofilm (Figure 06).

Les bactéries sont classées comme suit : non formatrices du biofilm, formation modérée, fortement formatrice du biofilm (**Mathur et al., 2006**).

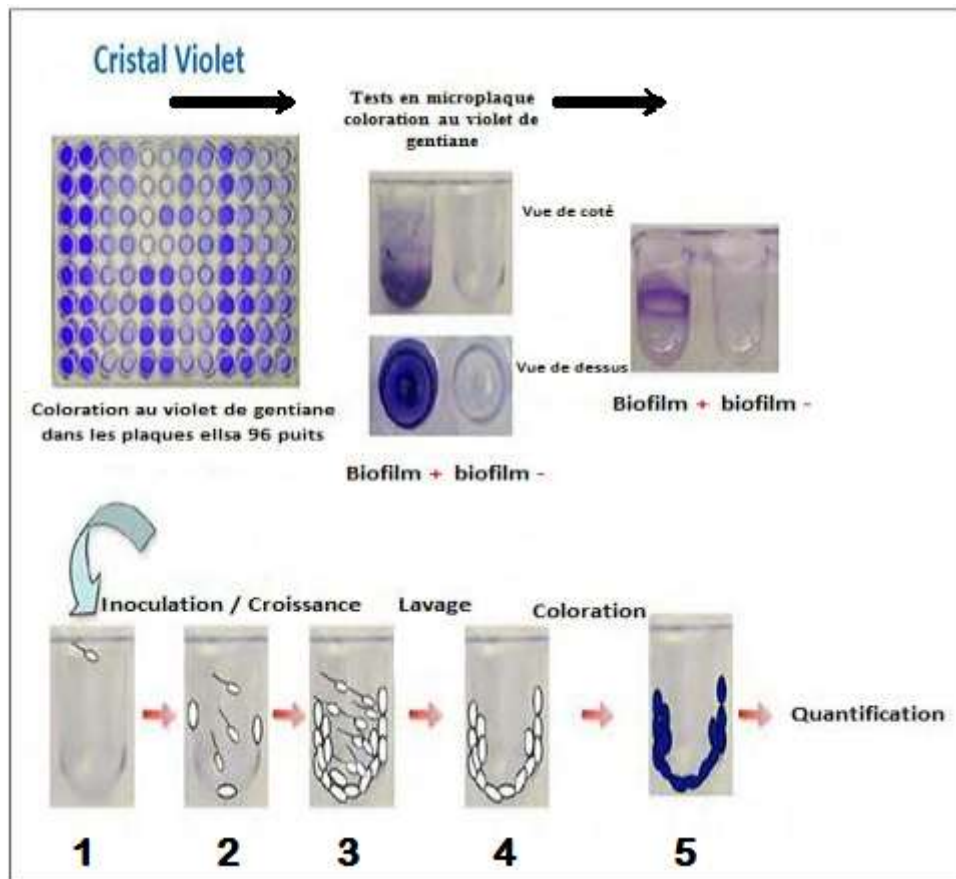


Figure 06 : Formation de biofilm en microplaque (Bellifa, 2013).

2. Méthode en tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par Christensen et al.,1982 ; Nagaveni et al., 2010 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; KaraTerki, 2014).

A partir d'une culture de 18-24 heures, une colonie estensemencée dans de BHIB Supplémenté de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 h. Les tubes sont lavés avec du PBS puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré par le CV (Figure 07).

La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le mur et le bas du tube (Mathur et al., 2006 ; Alnnasouri, 2010 ; Djelloul Daouadji, 2010 ; Bellifa, 2013).

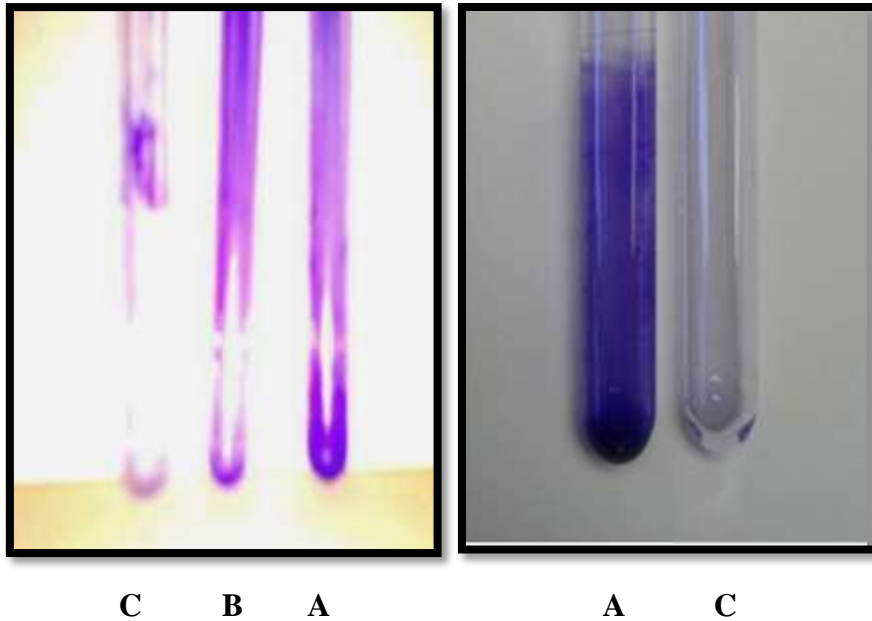


Figure 07. Dépistage de la production de biofilm par la méthode en tube (TM).
A : Elevé, B : Modéré, C : Non producteur de biofilm (Djelloul Daouadji, 2010).

3. Culture sur Rouge Congo Agar (RCA)

La gélose Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime (Freeman et al., 1989 ; Nagaveni et al., 2010 ; Kara Terki, 2014).

Sur ce milieu les souches exprimant le Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA) donnent des colonies noires contre des colonies de couleur rouge pour les souches PIA négatives. Les souches à phénotype variable donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Mathur et al., 2006 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; Bellifa, 2013) (figure 08).

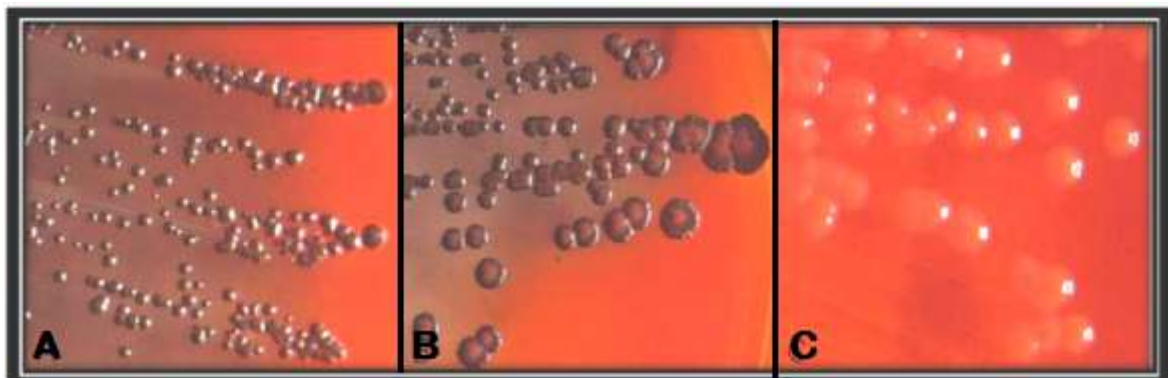


Figure 08. Culture sur la gélose Rouge Congo (Hou et al., 2012).
(A) RCA-positive souche de *S. epidermidis* (colonies noires), (B) RCA-positive souche de *S. aureus* (colonies noires), (C) RCA-négative souche de *P. aeruginosa* (colonies rouges).

4. Biofilm Ring Test (BFRT)

Il s'agit d'une nouvelle technique de détection et d'évaluation quantitative des biofilms développée par la Société Biofilm Control (**Nagant, 2013**). Cette méthode permet de suivre la formation de biofilm d'une façon simple et rapide, sans étapes de lavage ni de coloration (**Perrin, 2009**) en suivant l'immobilisation de billes magnétiques par les cellules bactériennes adhérant au fond du puits. Plus les billes seront piégées, moins elles se déplaceront dans le champ magnétique et moins elles se regrouperont au centre du puits.

L'immobilisation des billes est secondaire soit au fait qu'elles sont «piégées» par des Bactéries qui adhèrent au fond du puits, soit au fait que les propriétés rhéologiques du milieu sont modifiées (**Nagant, 2013**). La figure ci-dessous montre la technique de Biofilm Ring Test.

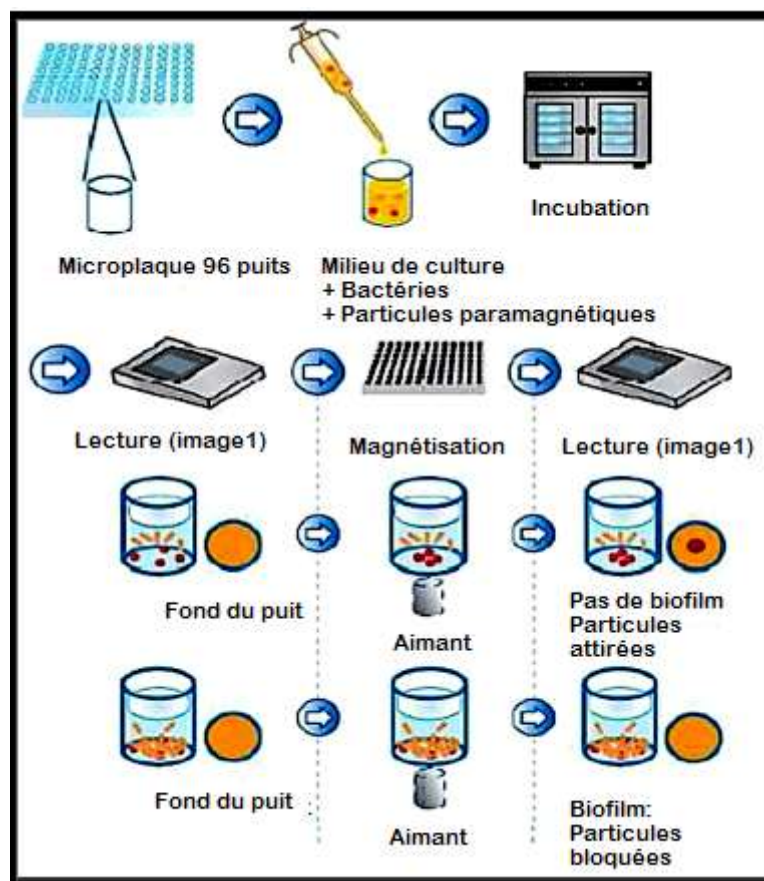


Figure 09: Principe de Biofilm Ring Test (**Perrin, 2009**).

NETTOYAGE ET DESINFECTION DANS LES INDUSTRIES LAITIERES

Dans l'industrie laitière, les opérations classiques de nettoyage et de désinfection constituent une étape essentielle de la production. L'efficacité de ces opérations affecte la qualité des produits finis (**Sharma et Anand, 2002; Bremer et al., 2006**).

La formation de biofilms constitue une source de contamination critique dans l'industrie alimentaire. Dans certains cas, ils sont responsables de graves contaminations des produits finis ainsi que des pertes économiques (**Bremer et al., 2006 ; Gymoese et Vogel, 2007**).

L'objectif du nettoyage et de la désinfection est de réduire la charge microbiologique présente sur les surfaces pour permettre de produire des aliments avec une qualité microbiologique satisfaisante.

Le nettoyage et la désinfection sont parmi les opérations les plus importantes de l'industrie agro alimentaire et ce pour diverses raisons :

- La qualité des produits finis est souvent influencée par des goûts étrangers dus à des développements microbiens. Ces développements se font au dépend de résidus du produit présent dans l'appareil après utilisation, ou à partir de dépôts qui se forment lors du traitement de certains produits comme le lait.
- L'aptitude au traitement thermique est fortement dépendante de la population initiale. En effet, quand on stérilise ou on pasteurise un produit par la chaleur, le temps du traitement dépend de la charge microbienne initiale. Il est beaucoup plus long si cette charge n'est pas réduite par un nettoyage préliminaire. Ceci augmente le coût du traitement et risque de diminuer la qualité du produit.
- Les souillures peuvent renfermer des microorganismes pathogènes et, par conséquence, constituer une source de contamination très dangereuse pour les produits alimentaires.
- La présence de résidus dans les produits conditionnés peut avoir une influence catastrophique sur l'opinion du consommateur.

1. Nettoyage :

Le nettoyage est une élimination partielle des souillures et des micro-organismes. **(ISO 14159, 2002).**

Le nettoyage est une étape clef dans la production et le maintien de la durabilité des équipements. Il s'agit d'une opération qui consiste à éliminer d'une surface donnée toute souillure visible ou invisible pouvant s'y trouver. **(Norbert et Goulois, 2003).** Dans le cas d'une surface alimentaire, le nettoyage a pour but de rendre la surface apte à être facilement désinfectée.

1.1. Agents de nettoyage

Le détergent acide est utilisé pour nettoyer les souillures minérales. Il existe parmi les produits de nettoyage acide, les acides minéraux et les acides organiques :

Les acides organiques sont des acides faibles, moins dangereux et corrosifs utilisable sur des métaux mous tel que l'aluminium vue leurs faible corrosivité comme les acides gluconique, citrique, sulfamique qui ne possèdent qu'une action de nettoyage considérablement inférieure à celle des acides forts ; leur action bactéricide est pratiquement nulle. Leur structure leurs permet de réduire de façon marquée la tension de surface des solutions de nettoyage, ce qui améliore leur pénétration dans les résidus. **(Dupuis et al., 2003).**

Les acides minéraux sont les plus utilisés. Ces acides forts sont également d'excellents détergents et bactéricides. On utilise les acides nitrique, chlorhydrique et phosphorique. L'acide sulfurique passivé possède une excellente action bactéricide, même vis-à-vis des spores.

Le nettoyage alcalin a pour rôle d'enlever la croute organique calcinée par les traitements de chaleur, dissoudre les matières grasses et dégrader les protéines en acides aminés et de les ioniser puis les solubiliser **(Dupuis et al., 2003).** Le tableau 04 suivant résume les avantages et les inconvénients des principales catégories des produits détergents.

Tableau 04 : Propriétés principales des principales catégories de produits détergents (**Jaudon et al., 2000**).

Produits détergents	Propriétés principales	Avantages	Inconvénients
Détergents alcalins et alcalins chlorés	Emulsification des matières grasses Solubilisation des protéines Elimination des matières colorées	Stables, résistants aux températures Insensibles aux eaux dures Facilement rinçables	Corrosifs sur les matériaux légers (aluminium et alliages)
Détergents acides	Dissolution des souillures minérales (pouvoir détartrant et désincrustant)		Corrosifs sur les surfaces métalliques A coupler avec d'autres détergents pour éliminer la totalité des souillures
Détergents neutres	Renforcement de l'action des détergents acides et alcalins	Tensio-actifs Anti-précipitants	
Produits enzymatiques	Amélioration de la destruction des biofilms lors du nettoyage par une action positive des enzymes sur le décollement des germes adhérents	Actifs à faible dose Non corrosifs Diminution du colmatage et de l'engorgement des siphons et canalisations Amélioration du processus de purification des affluents Biodégradabilité totale	Coûts plus élevés que les détergents conventionnels Respect strict de la température, du pH et du temps d'application Peu efficaces sur les souillures sèches, cuites et très adhérentes Aucune efficacité sur les souillures minérales

1.2. Efficacité du nettoyage

Pour être efficace, l'étape de décontamination-nettoyage doit respecter les quatre éléments du cercle de Sinner (**Norbert et Goulois, 2003**) à savoir :

Action mécanique* C'est un facteur très important, car le nettoyage serait inefficace sans action mécanique et sans détergent. Elle favorise aussi le contact entre les souillures et le détergent et elle décroche les souillures tenaces (Norbert et Goulois, 2003**).

**Température* : Son rôle dans la détergence est loin d'être négligeable, elle permet de favoriser le décollement des matières grasses et accélère les réactions chimiques et en particulier la saponification et de faciliter la pénétration du détergent.

**Temps de contact* : Le temps de contact doit être suffisant pour assurer un nettoyage complet. En générale, il est compris entre 5 et 10 minutes suivant les automates de lavage.

Nature de l'agent chimique* : Selon son action détergente ou alcaline, il est important aussi de respecter la dilution du produit dans les opérations de nettoyage. Un surdosage ou un sous-dosage ont des incidences sur le résultat attendu (Norbert et Goulois, 2003**).

1.3. Système de nettoyage en industrie laitière

Le Nettoyage En Place est un système de nettoyage qui consiste à enlever la souillure de son support juste après la fin de la chaîne de transformation des produits alimentaires.

Dans l'industrie laitière, le CIP est le plus utilisé pour nettoyer et désinfecter les équipements de processus alimentaire dans les circuits fermés (**Dunsmore et al., 1981; Austin et Bergeron., 1995**).

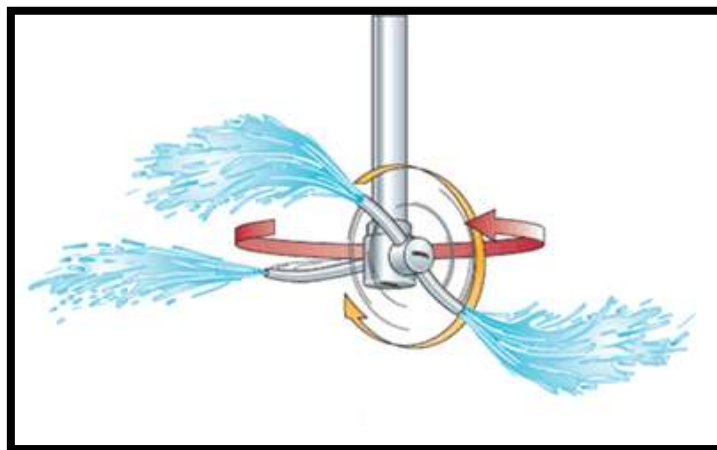


Figure 10 : Turbine de pulvérisation pour le nettoyage des cuves.

Le nettoyage en place comprend généralement sept opérations :

-Rinçage préliminaire : Un rinçage préliminaire est nécessaire pour enlever les souillures non adhérentes, il facilite les opérations de nettoyage (**Dupuis et al., 2003**).

-Nettoyage alcalin : Il se fait avec un détergent alcalin qui sert à enlever les souillures organiques (**Dupuis et al., 2003**).

-Premier inter-rinçage : Il a pour but d'éviter le mélange d'une phase acide avec une phase alcaline, il devra donc être réalisé jusqu'à ce que le pH revienne à la neutralité.

-Nettoyage acide : Il a pour but d'éliminer des dépôts minéraux. Dans certains cas, on remplace le lavage acide par un rinçage à l'eau légèrement acidifiée afin d'éliminer et de neutraliser toute trace résiduelle de détergent alcalin (**Dupuis et al., 2003**).

-Deuxième inter-rinçage : il a pour but d'éliminer les traces de détergent acide (**Dupuis et al., 2003**).

-Désinfection : Application de la solution de désinfection dans le respect des paramètres optimaux du spectre bactéricide recherché : temps, température, etc.

-Rinçage finale : Cette étape est très importante pour éliminer les agents de nettoyage et de désinfection qui pourraient contaminer les produits alimentaires traités.

2. Désinfection

La désinfection est l'élimination ou l'inhibition des micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes (sols et autres surfaces) contaminés en fonction des objectifs fixés présents dans un lieu, un objet ou sur la surface externe du corps humain.

En industrie agroalimentaire, le nettoyage et la désinfection ont pour but d'éliminer les souillures et de détruire les microorganismes présents dans les appareils et dans les emballages.

La désinfection est l'utilisation des produits antimicrobiens afin de tuer les microorganismes. Le but de la désinfection est de réduire le nombre de micro-organismes vivants présents sur les surfaces après le nettoyage et de prévenir la croissance microbienne avant le début de la production. Les désinfectants sont plus efficaces en absence des matières organiques ; graisses, hydrocarbures et protéines (**Bremer et al., 2006 ;Kuda et al., 2008**).

Selon (**Mosteller et Bishop, 1993 ; Jaudon et al., 2000 ; Simões et al., 2010**) les critères d'un bon désinfectant sont :

- ✓ Etre peu ou pas toxique pour le personnel.
- ✓ Etre facile à doser.
- ✓ Etre facile à rincer des surfaces
- ✓ Ne pas affecter les qualités sensorielles du produit.
- ✓ Avoir un spectre d'activité adapté aux objectifs fixés.
- ✓ Avoir une action rapide et durable.
- ✓ Avoir un effet prolongé dans le temps.
- ✓ Etre compatible et dénué d'inconvénient pour le matériel.

Contrairement aux antibiotiques, le mode d'action des désinfectants se caractérise par une absence de spécificité, et demeure partiellement compris.

Trois phases d'actions possibles sont (**Bourion, 1995**):

- ✓ La fixation sur la paroi bactérienne, conditionnée par la concentration du désinfectant et le mouvement des bactéries. Le phénomène est de nature chimique ou électrique.
- ✓ La pénétration à travers la paroi puis la membrane, conditionnée par la solubilité et l'ionisation.
- ✓ L'action proprement dite, qui peut toucher différentes cibles et notamment :
 - la membrane cytoplasmique, dont l'altération provoque la perturbation des échanges membranaires spécifiques et donc la désorganisation du métabolisme.
 - Les constituants cytoplasmiques, c'est-à-dire les acides nucléiques, les ribosomes, les protéines structurales, mais surtout les protéines enzymatiques dont l'oxydation et la dénaturation perturbent gravement le métabolisme cellulaire. Tout comme les détergents, la gamme de produits désinfectants est très variée.

Les principaux produits de désinfection sont décrits ci-après (tableau 05)

Tableau 05 : Avantages, inconvénients et spectre d'action des principales catégories de produits désinfectants (**McDonnell et Russell, 1999 ; Jaudon et al., 2000**).

Produits désinfectants		Avantages	Inconvénients	Spectre d'action
Produits halogénés	Produits Chlorés	Action rapide Peu ou non moussants Peu coûteux Rinçage facultatif Faible toxicité	Inactivés en présence de matières organiques Solutions instables à chaud et à la lumière Corrosifs à dose élevée et en milieux acides Polluants (production de produits dérivés) Production d'émanations gazeuses irritantes Faible mouillance	Bactéricides Virucides Activité sporicide discutée Activité fongicide peu marquée
	Produits Iodés	Actifs à faible dose et à basse température Faible toxicité	Sensibles à la présence de matières organiques Coûteux Instabilité à la chaleur Corrosifs Rinçage difficile, laissant une coloration jaunâtre sur les surfaces	Bactéricides Fongicides Peu efficaces sur les spores et les virus
Ammoniums quaternaires		Action détergente et désinfectante Peu toxiques Peu coûteux Stables (pH, température) Non corrosifs à pH neutre	Action lente et inhibée par les matières organiques Plus coûteux que les produits chlorés Très moussant, rinçage difficile Adaptation de <i>L. monocytogenes</i>	Bactéricides Fongicides Peu efficaces sur les spores et les virus

Tableau 05 : Avantages, inconvénients et spectre d'action des principales catégories de produits désinfectants (suite)

Produits désinfectants	Avantages	Inconvénients	Spectre d'action
Oxydes et peroxydes (acide peracétique principalement)	Actifs à faible dose et à basse température Action rapide Non moussants, bonne rinçabilité Peu coûteux Impact environnemental réduit Compatibles avec de nombreux matériaux	Sensibles à la présence de matières organiques Vapeurs irritantes Conductivité insuffisante pour suivre et réguler la concentration de manière automatique en circuit fermé	Bactéricides Sporicides Fongicides Virucides
Aldéhydes	Insensibles à la présence de matières organiques Peu coûteux Non corrosifs Bonne rinçabilité	Action lente Précipitation des protéines Odeur piquante Toxiques et allergisants Polluants	Bactéricides Sporicides Fongicides Virucides
Alcools	Action rapide Peu toxiques Non corrosifs Solutions auto-séchantes	Précipitation des protéines Coûteux Inflammables Toxiques et allergisants Polluants	Activité bactéricide modeste Non sporicides Activité fongicide négligeable

3. Méthodes alternatives pour le contrôle de biofilms (stratégie verte)

3.1. Enzymes

L'utilisation des détergents à base d'enzyme comme bio-nettoyants, connue aussi sous le nom « stratégie verte » constitue une nouvelle solution afin de lutter contre les biofilms dans les industries agroalimentaires. Suite à l'hétérogénéité des EPS, un mélange de plusieurs enzymes peut être nécessaire pour une dégradation suffisante des biofilms (Augustin et al., 2004).

3.2. Phages

Ce sont des ubiquistes de la nature. Les bactériophages sont les virus qui infectent les bactéries et constituent une approche naturelle, hautement spécifique, non toxique pour le contrôle de microorganismes responsables de la formation de biofilms. Cette nouvelle technique n'a pas été encore bien développée et relativement y'a peu d'informations exactes sur l'action des bactériophages sur un biofilm (**Sillankorva et al., 2004 ; Sutherland et al., 2004**).

3.3. Bio régulation

L'existence des interactions entre les multi espèces ou la simple production des métabolites peut interférer avec le développement et la formation de biofilm (**Carpentier et Chassing, 2004; Kives et al., 2005; Valle et al., 2006**). Quelques auteurs (**Leriche et Carpentier, 2000; Zhao et al., 2004**) révèlent que la formation de biofilm par les microorganismes sur les surfaces dans les industries laitières peut jouer un rôle important en interférant avec les activités biologiques des bactéries pathogènes. Certaines bactéries sont capables de synthétiser et d'excréter des bio surfactants qui possèdent des propriétés anti-adhésives (**Desai et Banat, 1997., Rodrigues et al., 2004; Nitschke et Costa, 2007**).

La découverte de l'utilisation du quorum sensing par les bactéries pour former des biofilms a orienté les chercheurs vers une nouvelle approche pour le control des biofilms (**Dunstall et al., 2005; Rasmussen et al., 2005**). Une bonne connaissance du phénomène de la communication cell-cell de certaines bactéries telle que *L. monocytogenes* peut être utilisé pour contrôler la formation de biofilms par identification des produits et substances agissant comme antagonistes du quorum sensing (**Simoès et al., 2009**).

De nouvelles stratégies, dont certaines ont déjà des applications concrètes dans les environnements agro-alimentaires (**Tableau 06**), ont donc été envisagées pour réduire l'utilisation de produits chimiques tout en assurant la maîtrise de l'implantation des pathogènes sur les surfaces (**Jayaraman et Wood, 2008; Cappitelli et al., 2014 ; Bridier et al., 2015**).

Tableau 06 : Méthodes alternatives à l'utilisation de produits conventionnels de nettoyage et de désinfection (Jayaraman et Wood, 2008; Cappitelli et al., 2014 ; Bridier et al., 2015).

Méthodes alternatives	Utilisations principales	Propriétés / Actions	Avantages	Inconvénients	Spectre d'action
Ozone, eau ozonée	Traitement de l'air Désinfection de contenants et d'emballages de cuisson Traitement des eaux de rinçage Traitement des surfaces des équipements avec l'eau ozonée	Oxydant puissant agissant sur les membranes cellulaires	Production en abondance rapide et facile Pas de résidus toxiques sur les surfaces Décomposition en oxygène sans laisser de produits dérivés Efficace à faible concentration et pour des périodes de contact courtes, même à faible température Elimination des odeurs Génération sur site	Très instable (demi-vie de 30 minutes), dissipation rapide de l'activité antimicrobienne Demande d'autorisation d'utilisation nécessaire Sécurité des opérateurs controversée (présence humaine interdite lors du fonctionnement du procédé)	Bactéricide Fongicide Virucide Parasiticide
Vapeur sèche saturée (110°C, haute pression)	Nettoyage et désinfection des outils et des surfaces	Propriétés dissolvantes et dégraissantes Propriétés désinfectantes (choc thermique)	Volume d'eau utilisée réduit de 90% Risque chimique limité Gain de temps de 40% (nettoyage et désinfection en une seule étape) Séchage des surfaces accéléré Génération sur site	Coût d'investissement élevé Désinfection chimique supplémentaire nécessaire	Bactéricide Fongicide

Tableau 06 : Méthodes alternatives à l'utilisation de produits conventionnels de nettoyage et de désinfection (suite)

Méthodes alternatives	Utilisations principales	Propriétés / Actions	Avantages	Inconvénients	Spectre d'action
Photocatalyse (UV)	Désinfection et purification de l'air Utilisation seule ou combinée avec la filtration	Particules polluantes adsorbées/oxydées à la surface du catalyseur (dioxyde de titane) sous l'effet des UV	Plus écologique que la fumigation Conception sur mesure pour tenir compte de l'environnement de chaque atelier Réduction de la consommation énergétique des installations (échangeurs thermiques) Génération sur site	Coût	Bactéricide Fongicide

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE I.

EVALUATION DE L'EFFICACITE DU NETTOYAGE EN PLACE

Introduction

Objectifs

Présentation des sites

Matériel de prélèvement

Méthode de prélèvement

Résultats

Discussion

EVALUATION DE L'EFFICACITE DU NETTOYAGE EN PLACE

La première partie de notre travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection appliquées dans les industries laitières car le matériel en contact avec le lait tel que les surfaces mal nettoyées et désinfectées deviennent propices à la formation des biofilms susceptibles de contaminer le lait.

OBJECTIFS

Nos objectifs seront atteints par l'évaluation des procédures de nettoyage et de désinfection avant et après nettoyage en place. Cette partie a été réalisée dans le laboratoire d'hygiène et de santé animale au niveau de l'université Ibn- Khaldoun de Tiaret (2012-2015).

1. MATERIEL ET METHODES

Les échantillons de notre étude proviennent de deux laiteries.

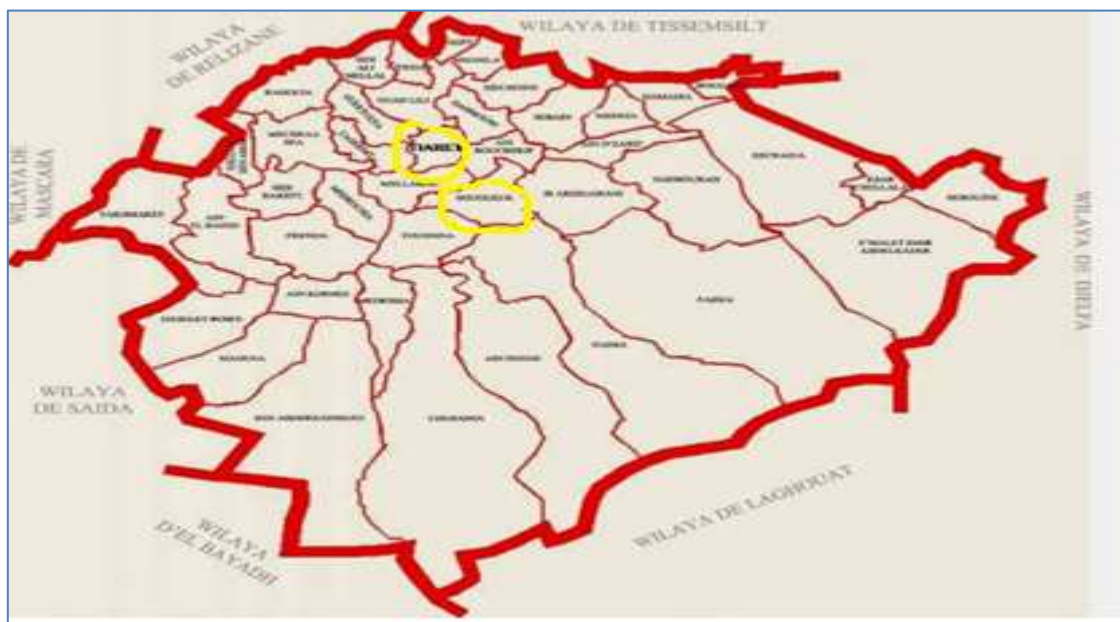


Figure 11: Situation géographique des deux laiteries: Laiterie 01 El Bahdja (à Sougueur) et Laiterie 02 Sidi Khaled (à Tiaret).

Laiterie 01

La laiterie El Bahdja constitue avec l'unité Giplait du secteur public, les seuls sites de production de lait frais dans les wilayas de Tiaret et de Tissemsilt voisine. Dirigée en SARL, elle est rentrée en production graduellement en 2009 pour atteindre un niveau de production de 30000 litres en 2014 dont 5000 litres de lait de vaches cru/jr. Le lait pasteurisé est produit à partir des poudres de lait importées de différents pays de l'Europe (l'Allemagne, la France, la Belgique et certains pays de l'Amérique du sud) , ainsi que du lait cru de vaches collecté de plusieurs élevages bovins de la région (32 élevages) et transporté dans des cuves isothermes.

Elle comprend un laboratoire de contrôle et de gestion de la qualité des produits laitiers en mesurant quelques paramètres microbiologiques et physico-chimiques tels que : la présence de certains germes, le taux de la matière grasse, l'acidité et la présence de résidus d'antibiotiques.

L'alimentation en eau est assurée par un forage. La qualité de l'eau est analysée au niveau du laboratoire d'analyses physico-chimiques.

Laiterie 02

Le groupe lait Giplait/SPA est l'un des plus importants producteurs de lait et produits laitiers en Algérie avec une capacité de production de plus de quatre (04) millions de litres/jour.

Outre la production et la commercialisation des laits et produits laitiers, le groupe a aussi pour mission de développer la production nationale de lait, comme il participe activement à la régulation du marché national du lait.

Le groupe compte 16 filiales dont 15 spécialisées dans la production de lait et dérivés et une chargée de la gestion des fermes pilotes dont la vocation principale est l'élevage de bovins laitiers.

La filiale Sidi Khaled de la wilaya de Tiaret est implantée à Zaaroura (zone industrielle), avec une production journalière de 126000 litres en moyenne de lait pasteurisé. Ce dernier est produit à partir des poudres de lait importées (la France et la Belgique et certains pays de l'Amérique du sud l'Argentine), ainsi que du lait cru de vaches collecté de plusieurs élevages bovins de la région et transporté dans des cuves isothermes. Le tableau 07 résume la capacité de la production de l'unité Sidi Khaled.

Tableau 07: Capacité de production de lait et produits dérivés par l'unité Sidi Khaled selon les données de la sous direction de fabrication, Mai 2017.

Produit	Production journaliere		Unité
	Capacité installée (transformation)	Production moyenne Production/jour	
Lait recombiné	120 000	100 000	Litres
Lait cru	10 000	10 000	//
Leben	5 000	5 000	//
Raib	10 000	5 000	//
Yaourt Euvé	10 000	5 000	//
Yaourt Brassé	2 000	00	//
Crème Dessert	1 000	2 000	//
Beurre Fermier		1 000	Kg

1.1. Matériel

- Agitateur dont le principe est basé sur un mouvement de rotation excentré du contenu des tubes à essai.
- Bain marie, Etuve (30°- 37°C), agitateur magnétique
- Autoclave en le maintenant à une température de 121°C ± 1 à une pression de un bar, pendant au moins 15 minutes
- Milieu PCA (Plate Count Agar) et Gélose nutritive, milieu TSE (Tryptone Sel Eau) (Annexe 07)

1.2. Méthodes

1.2.1. Audit des procédures du nettoyage en place

Des visites périodiques ont été effectuées afin de noter les pratiques de manipulation des produits laitiers au niveau des laiteries ainsi que la réalisation du programme de nettoyage en place. Des fiches ont été remplies minutieusement suite à un questionnaire et aux observations de plusieurs paramètres décrits par le programme CE-ASEAN (Annexe 01) à savoir ; Principes généraux, Conformité du matériel, nettoyage et désinfection.

1.2.2. Prélèvements des échantillons

Les prélèvements ont été réalisés à partir de plusieurs sites de manipulation des produits laitiers par l'utilisation de la méthode d'écouvillonnage avant et après NEP, les échantillons ont été transportés dans une glacière à une température de 4°C et sont ensuite analysés dès leur réception au laboratoire. Les sites des prélèvements sont :

- Réservoir du lait cru
- Tanks de stockage du lait recombinaé avant et après pasteurisation
- Lames d'agitateur
- Coudes
- Machine d'emballage.

Les échantillons ont été prélevés et préparés selon les dispositions de la réglementation utilisant la technique de l'écouvillonnage humide d'une surface de 10 cm² délimitée par un guide stérile tout en respectant les règles générales d'asepsie (Charpentier, 1999). Cette surface ainsi choisie est délimitée grâce à un guide en aluminium stérile, découpé en carré au centre, elle est ensuite essuyée par l'écouvillon pendant un certain moment afin de rassembler au maximum les germes pouvant s'y trouver. Le temps entre le prélèvement et les premières analyses ne dépassant pas les 24 heures.

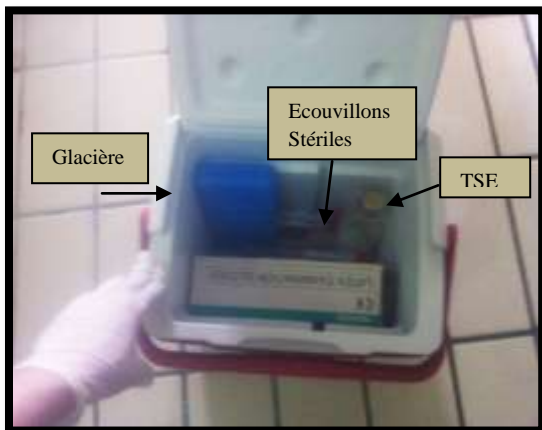


Figure 12 : Nécessaire pour la réalisation des prélèvements



Figure 13 : Méthode de prélèvement à partir des équipements laitiers (écouvillonnage)

1.2.3. Préparation des dilutions

Les dilutions ont été effectuées dans des conditions aseptiques. Leur mode de préparation est minutieux conformément à la norme ISO 6887-1 (figure 14). On prépare autant de tubes qu'il y a de dilutions à effectuer dans une solution TSE (**Dolabela-Costa et al., 2006**). A partir de cette solution mère, des séries de dilutions décimales sont réalisées jusqu'à la dilution 10^{-5} (**ISO 6887-1, 1999**).

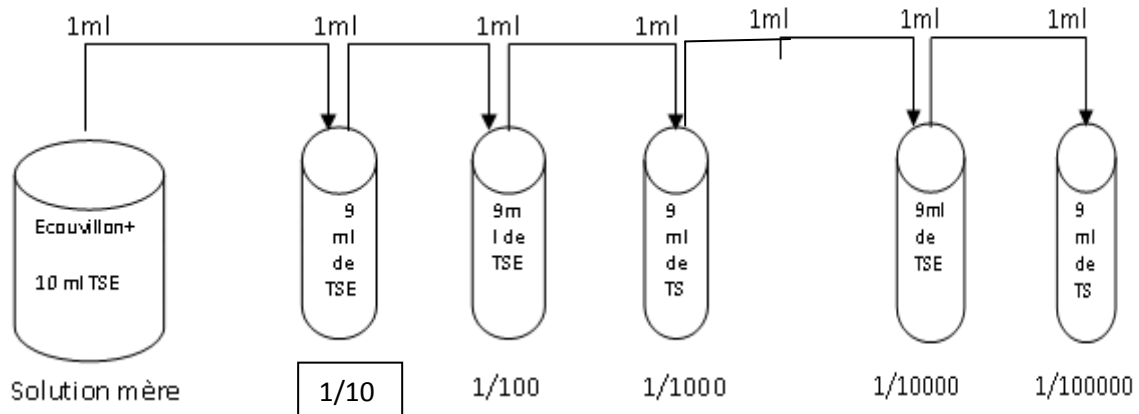


Figure 14 : Technique de la préparation des dilutions décimales

1.2.5. Dénombrement de la Flore Mésophile Aérobie Totale

C'est un indicateur d'hygiène important, elle permet d'évaluer le nombre d'UFC présentes dans un produit ou sur une surface. Ce dénombrement se fait à 30°C ce qui permet de dénombrier trois grands types de flore:

Comme il s'agit d'un milieu ordinaire, la plupart des micro-organismes peuvent se développer, sauf ceux qui sont exigeants et les micro-organismes anaérobies stricts.

L'unité est l'UFC (Unité Formant colonie) car une colonie observable sur la gélose peut venir d'un micro-organisme isolé, ou bien d'une spore ou d'une micro-colonie.

Nos échantillons ont été soumis au dénombrement de la flore aérobie mésophile totale sur milieu PCA (Plat Count Agar) après 72 heures d'incubation à 30°C, placer les boîtes de pétri retournées dans l'étuve.

Les résultats sont exprimés en unités formant colonies par cm^2 (UFC/ cm^2).

Retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies compris entre 15 et 300.

Après avoir dénombré les colonies caractéristiques dans une ou plusieurs boîtes de pétri à une ou plusieurs dilutions successives, on calcule le nombre de microorganismes par ml en effectuant la moyenne pondérée et en multipliant par le facteur de dilution appliqué.

La formule mathématique :

$$N = \frac{\sum \text{colonies}}{V_{mL} \times (n_1 + 0.1n_2) \times d_1}$$

- N : Nombre d'UFC par gramme ou par ml de produit initial
- $\sum \text{colonies}$: Somme des colonies des boîtes interprétables
- V_{mL} : volume de solution déposée (1 ml)
- n_1 : nombre de boîtes considéré à la première dilution retenue
- n_2 : nombre de boîte considéré à la seconde dilution retenue
- d_1 : facteur de la première dilution retenue

Les résultats sont aussi exprimés en Log Kill avant et après NEP en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Log kill} = \text{Log } N - \text{Log } n$$

(**N**: est le nombre d'UFC à partir d'une surface non traitée (avant NEP)

n: est le nombre d'UFC d'une surface traitée par un désinfectant (après NEP).

(Van de Weyer et al., 1993).

2. RESULTATS

2.1. Application des procédures du nettoyage en place

Au niveau de la laiterie El Bahdja, cette pratique est réalisée par le même opérateur selon le protocole suivant : un pré-rinçage à l'eau chaude suivi par un nettoyage alcalin, un inter-rinçage puis un nettoyage acide suivi d'un rinçage final. Tandis que la deuxième laiterie (GIPLAIT) n'effectue pas un inter-rinçage entre le nettoyage alcalin et le nettoyage acide.

La composition et les conditions d'application des détergents homologués utilisés sont illustrés dans le tableau ci-dessous

Tableau 08 : Composition et conditions d'application des détergents homologués utilisés en CIP (laiterie 01)

	Composition	Application	Conditions d'application			
			t(Min)	pH	C(%)	T(C°)
Détergeant Alcalin (Proflow®)	Soude riche en séquestrant et tensioactifs	Trempage ou circulation	15-20	≥12	1,5	60°
Détergeant Acide (Steriflow P-310)	Acides forts et tensioactifs	Trempage ou circulation	15-20	≤ 3	1,5	50°

t= temps ; C= concentration ; T= température

Tableau 09 : Composition et conditions d'application des détergents homologués utilisés en CIP (laiterie 02).

	Composition	Application	Conditions d'application			
			t(Min)	pH	C(%)	T(C°)
Détergeant Alcalin (Inovyn®)	Soude solide (micro-perles)	Trempage ou circulation	15-20	≥12	1,5	60°
Détergeant Acide	Acide nitrique 68%	Trempage ou circulation	15-20	≤ 3	1,5	50°

t= temps ; C= concentration ; T= température

La présente étude montre que les modalités d'application des détergents homologués sont relativement respectées selon les recommandations du fabricant de ces produits mais les deux laiteries n'utilisent pas de désinfectant dans les opérations de nettoyage en place.

2.2. Distribution des prélèvements (laiterie 01)

Un total de 96 prélèvements a été réalisé pour l'évaluation de l'efficacité du NEP dont (52) prélèvements réalisés au niveau de la première laiterie (EL BAHDJA LAIT) et (44) prélèvements réalisés au niveau de la deuxième laiterie (Unité GIPLAIT).

Ces prélèvements ont été effectués à partir de plusieurs sites des équipements laitiers à savoir : le réservoir du lait cru, les tanks de stockage du lait (avant et après pasteurisation), les lames d'agitateurs, les coudes et la machine d'emballage.



Figure 15 : FMAT sur milieu PCA

2.3. Dénombrement de la FMAT avant et après nettoyage en place

L'étude du dénombrement de la Flore totale avant et après nettoyage en place au niveau des deux laiteries a montré des résultats différents (Tableau 10 et 11).(Annexe02).

Tableau 10 : Dénombrement de la flore totale avant et après nettoyage en place (laiterie 01).

Site de prélèvement	Flore totale avant NEP		Flore totale après NEP		Log kill log N-log n
	Nombre	Log N (UFC/cm ²)	Nombre	Log n (UFC/cm ²)	
Réservoir du lait cru	06	3,85± 0,59	03	2,06± 0,39	1,79
Tank de stockage	13	3,92± 0,59	09	2,31± 0,52	1,61
Lames d'agitateur	04	3,30± 0,13	04	2,73± 0,62	0,57
Coude	05	3,69± 0,54	04	2,74± 0,23	0,95
Machine d'emballage	02	3,25± 0,07	02	2,81±0,58	0,44
Total	30		22		

Tableau 11 : Dénombrement de la flore totale avant et après nettoyage en place (laiterie 02).

Site de prélèvement	Flore totale avant NEP		Flore totale après NEP		Log kill Log N-log n
	Nombre	Log N (UFC/cm ²)	Nombre	Log n (UFC/cm ²)	
Réservoir du lait cru	05	4,49±0,06	04	4,44±0,11	0,05
Tank de stockage	11	4,32±0,10	10	3,81±0,50	0,51
Lames d'agitateur	/	/	/	/	/
Coude	05	4,32±0,06	05	4,22±0,02	0,10
Machine d'emballage	02	4,34±0,39	02	4,05±0,73	0,29
Total	23		21		

Concernant la première laiterie, le plus grand nombre de la FMAT avant NEP a été enregistré au niveau des tanks de stockage; 3,92 log UFC/cm² suivi par le réservoir du lait cru ; 3,85 log UFC/cm² et par les coudes ; 3,69 log UFC/cm². Tandis que les taux de la FMAT avant nettoyage en place enregistrés à partir des différents sites de prélèvement au niveau de la deuxième laiterie semblent très proches variant entre 4,49 log UFC/cm² enregistré au niveau du réservoir du lait cru et 4,32 log UFC/cm² ; au niveau des coudes.

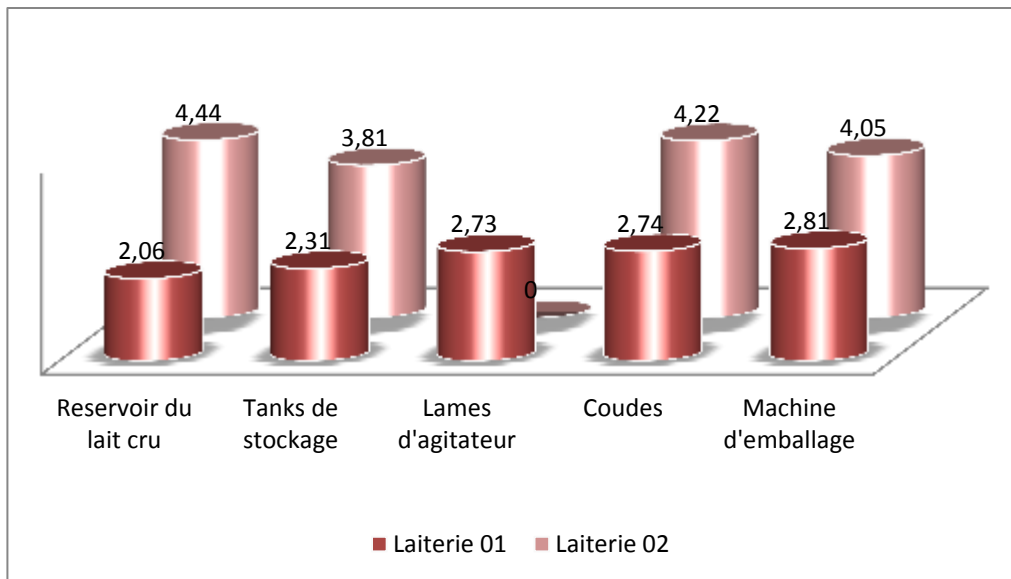


Figure 16: Contamination des sites de prélèvements après nettoyage en place et comparaison entre les deux laiteries

Les résultats de l'évaluation de l'efficacité du nettoyage en place effectuée au niveau de la première laiterie (Tableau 10) montrent que malgré les différences constatées avant et après NEP, les niveaux de contamination résiduelle restent faibles par rapport à ceux enregistrés au niveau de la deuxième laiterie (Tableau 11) à savoir ; 2,81 log UFC/cm² et 4,05 log UFC/cm² pour la machine d'emballage, 2,74 log UFC/cm² et 4,22 log UFC/cm² pour les coudes, 2,31 log UFC/cm² et 3,81 log UFC/cm² pour les tanks de stockage et 2,06 log UFC/cm² et 4,44 log UFC/cm² pour le réservoir du lait cru (Figure 16). Résultats détaillés Annexe 2.

3. DISCUSSION

Dans l'ensemble, ces résultats révèlent que les plus grandes contaminations initiales ont été enregistré au niveau des tanks de stockage du lait (avant et après pasteurisation) et au niveau du réservoir du lait crû ceci pourrait s'expliquer par le fait que les laiteries reçoivent les collecteurs du lait tout au long de la journée ce qui entrave le bon déroulement des opérations de nettoyage du réservoir du lait cru. Le niveau élevé de la flore de contamination au niveau des coudes même après NEP semble être due à la difficulté d'accès du nettoyage en place à ce type de segment tel que décrit par **Le Gentil, (2010)** ; durant le NEP, les surfaces les plus contaminées se localisent après les coudes ou les équipements complexes.

Les résultats obtenus par la présente étude réalisée au niveau de la première laiterie après NEP (2,06-2,81 log UFC/ cm²) semblent inférieurs à ceux enregistrés par **Ameur et al., (2011)** (3,7-5,5). Tandis que les résultats obtenus au niveau de la deuxième laiterie après NEP (3,81-4,44 log UFC/ cm² semblent très proches à ces dernières, mais malgré cela, les niveaux de contamination restent élevés par rapport aux études menées en Inde par (**Sharma et Anaud (2002a)**) où les valeurs enregistrées après NEP ont varié entre (1,25-2,23 log UFC/cm²).

Concernant les taux de réduction décimale pour la première et la deuxième laiterie ont varié respectivement entre (0,44-1,79) et (0,05-0,51). Ces taux restent proches de ceux obtenus par (**Malek et al., 2012**) qui ont enregistré un taux variant entre (0,039-2,36). Cependant, ces taux restent très faibles par rapport à ceux obtenus par (**Sharma et Anaud (2002a)**) (3,15-5,55, ce qui peut être due au non respect de l'application des procédures de nettoyage en place vue la mauvaise formation du personnel. Par conséquent, l'inefficacité des opérations de nettoyage et de désinfection.

Pour la deuxième laiterie, les résultats montrent qu'il n'y'avait pas de différence de contamination assez marquée avant et après NEP et les niveaux de contamination résiduelle restent élevés.

En effet, le plus haut taux de réduction (log kill) a été enregistré au niveau du réservoir du lait cru de la première laiterie. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les produits de nettoyage en place restent plus longtemps en contact avec les fonds des tanks de stockage avec un accès facile au différentes parois par contre ce même site a enregistré le plus bas taux de réduction au niveau de la deuxième laiterie ceci est due probablement soit à la contamination initiale du lait de vache collecté au niveau de ce réservoir.

Cependant, les sources de contamination sont nombreuses (**Ameur et al., 2011**) soit du fait que le nettoyage n'a pas été effectué immédiatement après vidange du réservoir soit, car la présence de vieux biofilms conduit à l'augmentation du taux de contamination des différents segments car ces biofilms semblent être plus résistants que les jeunes biofilms à la pénétration des produits de nettoyage et de désinfection (**Frank et Koffi, 1990 ; Lee et Frank, 1991**).

Les plus bas taux de réduction ont été observé au niveau des lames d'agitateur ainsi que la machine d'emballage vue la difficulté de nettoyage de ces parties (**Dolabela-Costa et al., 2006**).

4. CONCLUSION

Globalement, ces résultats révèlent forcément que les procédures du Nettoyage en place étaient peu efficaces ceci pourrait s'expliquer par la capacité de former des dépôts de souillure organique et minérale ainsi que la présence non négligeable de biofilms résistants aux agents désinfectants difficilement éradiqués tel que décrit par (**Lapidot et al., 2006**). En outre, une eau de mauvaise qualité bactériologique peut se répercuter sur le résultat du lavage des tanks et autres ustensiles (**Bonfoh et al., 2006**).

CHAPITRE II
ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES
GERMES CONTAMINANTS

Introduction
Objectifs
Matériel de Prélèvements
Méthode de prélèvement
Résultats
Discussion

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES GERMES CONTAMINANTS

L'hygiène des matériaux demeure une préoccupation constante des industriels de l'agro-alimentaire (IAA). En effet, la contamination microbiologique des équipements peut entraîner une altération de l'aliment en contact générant ainsi d'importants problèmes économiques voire des problèmes de santé publique due à la formation de biofilms.

OBJECTIFS

Cette partie de notre travail traite la recherche des microorganismes contaminants par : Isolement et identification des principales bactéries responsables de la formation de biofilms adhérents à l'acier inoxydable (équipements) et étude comparative entre la composition de la flore de contamination isolée à partir des équipements de deux laiteries.

1. MATERIEL

- Microscope optique (grossissement x 10 et x 40)
- Gélose Mac Conkey et gélose Chapman
- Bouillon BHIB et galeries API 20 E/ API 10 S (Biomérieux, France)
- Plasma oxalaté, Fushine, Violet de gentiane, Bleu de méthylène et Lugol
- Alcool 70°, Eau oxygénée et eau physiologique
- Disque d'ONPG et Kovacs, TDA, VP1, VP2

2. METHODES**2.1. Prélèvements**

D'autres écouvillonnages ont été réalisés après NEP à partir des deux laiteries avec un total de 54 et 44 isolats, respectivement. Les prélèvements ont concerné plusieurs sites des équipements laitiers à savoir ; le réservoir du lait cru, tanks de stockage du lait recombinaison avant et après pasteurisation, coudes et machine d'emballage en vue de l'isolement des principales bactéries contaminantes.

Les colonies ont été identifiées et caractérisées en utilisant les techniques microbiologiques et biochimiques standards : coloration de Gram, tests de catalase et de

coagulase (**Dunsmore et al., 1981 ; Marshall, 1992**). L'identification a été complétée par l'utilisation des galeries API 20E et API Staph 10S (BioMérieux).

2.2. Isolement et purification

Entérobactéries : Les prélèvements sont ensemencés sur milieu Mac-Conkey et incubés à 37°C pendant 24 h. La purification des colonies bactériennes est effectuée par ré isolement sur milieu Mac-Conkey afin d'obtenir des souches pures à identifier.

L'identification est réalisée par les galeries API 20E(Annexe 03) :

- Principe :

La galerie API 20E est un système standardisé pour l'identification des *Entérobacteriaceae* et autres bacilles à gram négatif, utilisant 20 tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données spécifiques. Ce système comporte 20 cupules tests qui contiennent un milieu réactionnel déshydraté, les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

- Technique :

Préparation de l'inoculum : faire une suspension bactérienne dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé dans 5 ml d'eau distillée.

Inoculation de la galerie :

- Homogénéiser la suspension bactérienne
- Pour les tests CIT, VP, GEL, remplir tubes et cupules
- Pour les autres tests remplir uniquement les tubes
- Recouvrir les tests ODC, ADH, LDC, H₂S, URE avec 2 gouttes d'huile de paraffine.
- Mettre le couvercle de la galerie.
- Incuber à 35-37°C pendant 18 à 24 h

Lecture et interprétation : Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture et l'identification est obtenue à partir du profil numérique, elle est réalisée à partir de la base de données à l'aide du catalogue analytique.

Staphylocoques : La culture a été réalisée sur gélose Chapman à 37°C pendant 48h. La purification des souches a été effectuée grâce à des repiquages successifs en bouillon BHIB incubés à 37°C pendant 18-24 h afin de confirmer leur pureté.

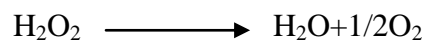
L'identification du genre *Staphylococcus* a été effectuée par les méthodes conventionnelles : la coloration de Gram (figure 23), la recherche de la catalase (figure 20) et la mise en évidence de la coagulase libre (figure 21), celle de l'espèce par la galerie API Staph (BioMérieux) (figure 17) .



Figure 17 : Utilisation de la galerie API Staph dans l'identification des bactéries isolées.

Examen microscopique : Les Staphylocoques se présentent sous forme de cocci Gram positifs, arrondis, groupés en grappes après réalisation de la coloration de Gram.

Test de la catalase : La catalase est utilisée en bactériologie pour l'identification des bactéries. Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie à étudier en présence d'eau oxygénée (à 10 volumes) sur une lame. Une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase (**Garnier et Denis, 2007**) (figure 20).



Test de coagulase : La coagulase ou staphylocoagulase est une enzyme capable de coaguler le plasma sanguin. La coagulase libre est présente chez *Staphylococcus aureus*, mais aussi peut être produite par *S. intermedius* ou *S. hyicus*.

La détection de cette coagulase s'effectue en ajoutant dans un tube à hémolyse stérile 0,5 ml de plasma humain et 0,5ml d'une culture de Staphylocoques de 24 h en bouillon. Le mélange est placé à l'étuve à 37C° et est incubé pendant 24h. Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma le plus souvent dans les trois premières heures.

Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum (**Garnier et Denis, 2007**) (figure 21).

Identification par les galeries API Staph : La galerie API Staph comporte 20 micro tubes contenant des substrats déshydratés qui sont inoculés par des substances bactériennes qui constituent les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de lecture (**Annexe 4**) et l'identification est obtenue à partir du profil numérique, elle est réalisée à partir de la base de données à l'aide du catalogue analytique (figure 17).

2.3. Conservation des souches

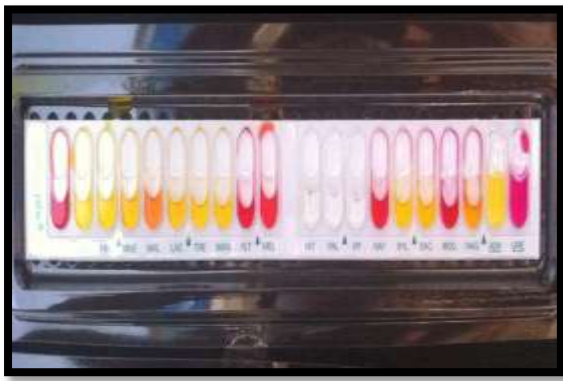
Les souches sont conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinée à une température de 4°C (les bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendues donc dans des conditions peu favorables pour leur développement).

3. RESULTATS

Les figures suivantes retracent quelques étapes du processus d'identification (Figures 17-20)



Figure 18 : Isolement des bactéries



(a)

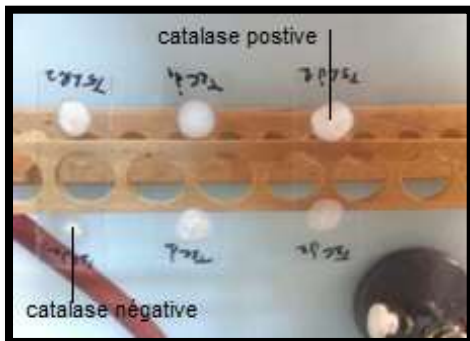


(b)

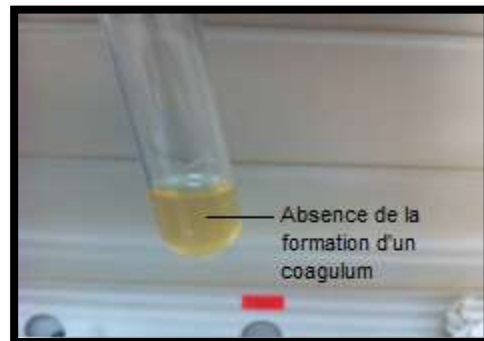


(c)

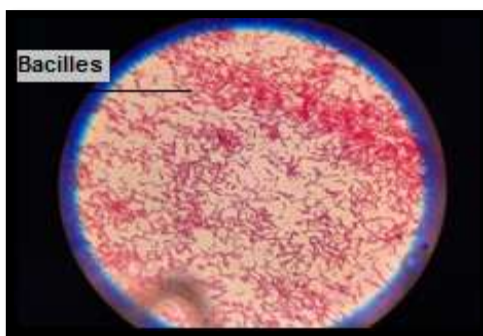
Figure 19 : Identification par les galeries API Staph (a), API 20E (b) et (c) Aspect de la galerie API 20 E avec la souche *Escherichia. Coli*.



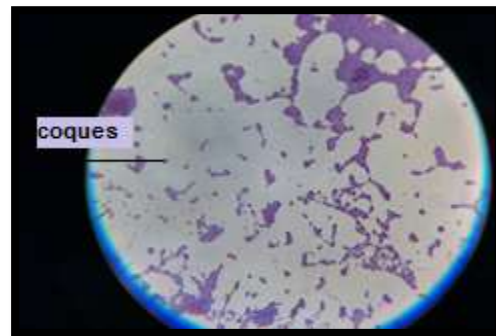
a



b



c



d

Figure 20 : Test de catalase (a) ; test de coagulase (b), coloration Gram (c et d)

3.1. Etude de la composition de la microflore

La présente étude montre que la composition de la microflore varie selon les sites de prélèvement. L'isolement et l'identification des germes contaminants révèlent la présence des bactéries pathogènes et non pathogènes (**Figure 21 et 22**).

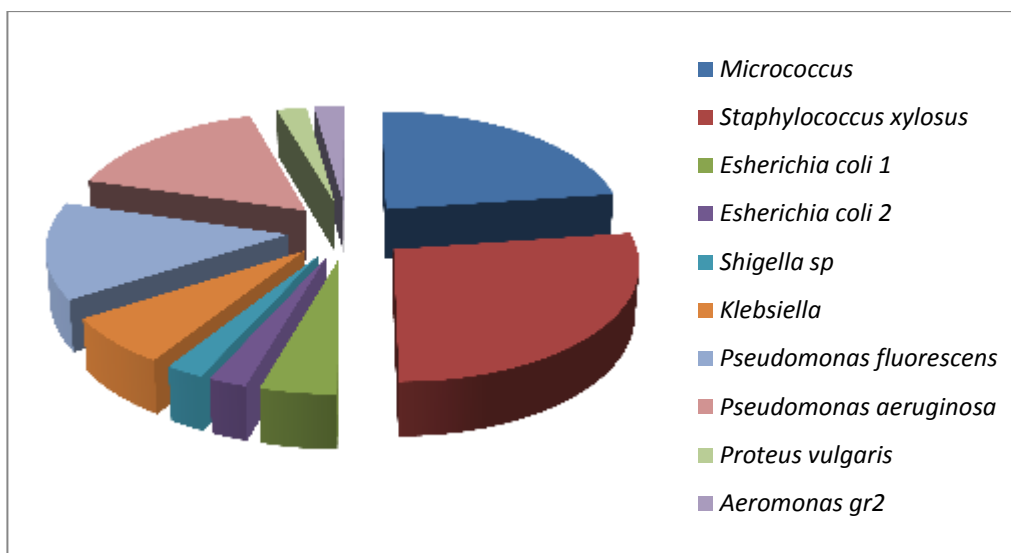


Figure 21 : Distribution des isolats selon leur nature (Laiterie 01).

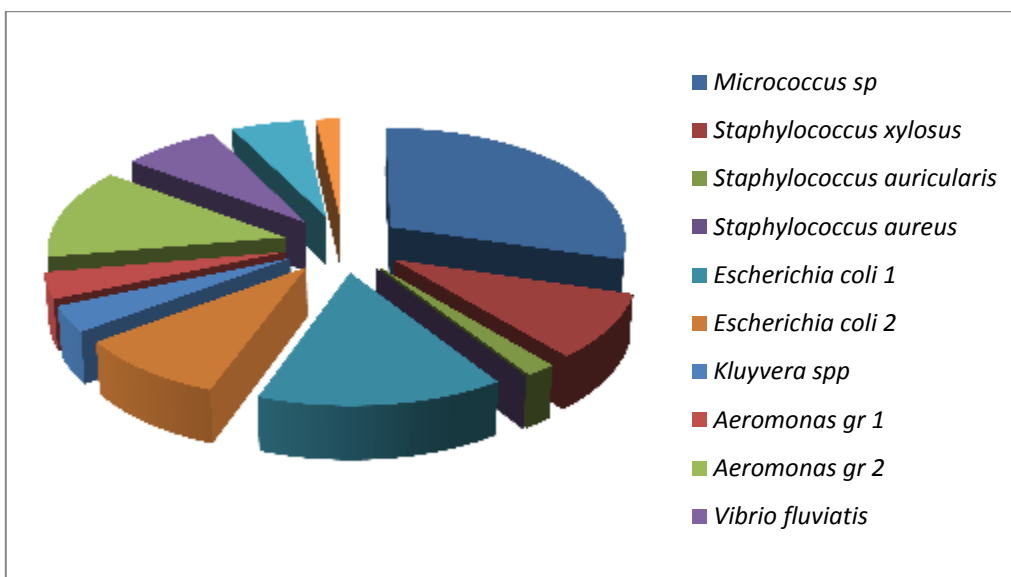


Figure 22 : Distribution des isolats en fonction de leur nature (Laiterie 02).

3.2. Etude de la distribution des isolats selon les sites des prélèvements

Les tableaux 12 et 13 montrent que la microflore varie selon les sites des prélèvements des équipements laitiers des deux laiteries ; concernant la laiterie 02, les tanks de stockage du lait cru présentent un nombre important d'isolat (83,33%) avec prédominance du genre *Micrococcus sp* (29,62%) et le genre *Escherichia coli* (24,06%) tandis que *Staphylococcus* et *Shigella* représentent (11,06 %) et (1,85 %) respectivement. Les autres isolats sont non pathogènes tandis que les coudes de la laiterie 01 présentent un nombre important d'isolats (40.90%) avec prédominance du genre *Staphylococcus. Xylosus* (27,27%).

Tableau 12 : Distribution des isolats selon les sites des prélèvements (laiterie 01)

Sites des prélèvements	Tanks de stockage du lait cru	Tanks de stockage		machine d'emballage	Coudes	Total	%
		Avant pasteurisation	Après pasteurisation				
Type de microflore	Nombre des isolats						
<i>Micrococcus sp</i>	---	02	---	02	06	10	22,72%
<i>Staphylococcus xylosus</i>	02	04	01	02	03	12	27,27%
<i>Escherichia coli 1</i>	---	---	---	01	01	02	04,54%
<i>Escherichia coli 2</i>	---	---	---	---	01	01	02,27%
<i>Shigella sp</i>	---	---	---	01	---	01	02,27%
<i>Klebsiella</i>	---	---	---		03	03	06,81%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	---	---	01	01	04	06	13,63%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	02	---	04	01	---	07	15,90%
<i>Proteus vulgaris</i>	---	---	01	---	---	01	02,27%
<i>Aeromonas gr2</i>	---	01	---	---	---	01	02,27%
TOTAL	04	07	07	08	18	44	100%

Tableau 13 : Distribution des isolats selon les sites des prélèvements (laiterie 02)

Site des prélèvements	Tanks de stockage du lait cru	Tank de stockage		machine d'emballage	Total	%
		avant pasteurisation	après pasteurisation			
Type de microflore	Nombre des isolats					
<i>Micrococcus sp</i>	02	06	07	01	16	29,62%
<i>Staphylococcus xylosus</i>	---	03	02	---	05	9,25%
<i>Staphylococcus auricularis</i>	---	---	01	---	01	1,85%
<i>Staphylococcus aureus</i>	---	---	---	---	---	---
<i>Escherichia coli 1</i>	---	02	06	---	08	14,81%
<i>Escherichia coli 2</i>	02	02	01	---	05	9,25%
<i>Kluyvera spp</i>	---	01	01	---	02	3,70%
<i>Shigella sp</i>	---	01	---	---	01	1,85%
<i>Aeromonas gr1</i>	01	---	01	---	02	3,70%
<i>Aeromonas gr2</i>	---	05	02	---	07	12,96%
<i>Vibrio fluvialis</i>	01	01	02	---	04	7,40%
<i>Providencia</i>	---	---	01	02	03	5,55%
TOTAL	06	21	24	03	54	100%

4. DISCUSSION

La présente étude montre que la composition de la microflore varie selon les sites des prélèvements. L'isolement et l'identification des germes de contamination révèlent la présence des bactéries pathogènes et non pathogènes.

Les tanks de stockage du lait cru de la laiterie 02 présentent un nombre important d'isolat (83,33%) avec prédominance du genre *Micrococcus sp* (29,62%) et le genre *Escherichia coli* (24,06%) tandis que *Staphylococcus* et *Shigella* représentent (11,06 %) et (1,85 %) respectivement. Les autres isolats sont non pathogènes.

Il est à noter que d'autres études (**Wiedmann et al., 2000 ; Sharma et Anaud, 2002 ; Salo et al., 2006, Aarnisalo et al., 2007**) ont montré que dans le milieu laitier la plupart des germes appartiennent aux genres ; *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Pseudomonas*.

La présence du genre *Micrococcus* après CIP (29,66%) au niveau de plusieurs sites des équipements laitiers pourrait s'expliquer par le fait que la peau des mammifères est considérée, à ce jour, comme l'habitat principal de *Micrococcus* alors que les aliments constituent un habitat secondaire de *Micrococcus* surtout au niveau des déchets laitiers (**Abdel-Malek et Gibson, 1948; Kocur, 2006**).

D'un coté, la présence d'*Escherichia. coli* dans nos résultats peut être consécutive à une recontamination des surfaces des équipements laitiers par du lait contaminé à la ferme par les déjections des bovins qui constituent le principal réservoir des coliformes thermo-tolérants en particulier l'espèce *Escherichia coli* (**Fédération internationale de laiterie, 1993 ; Aggad et al., 2010**).

D'un autre coté, plusieurs facteurs interviennent dans la croissance et dans la survie des *E. coli* dans les produits laitiers. Ces facteurs concernent les caractéristiques du produit fabriqué (composition, Aw, acidité), le traitement thermique appliqué et le taux initial de contamination du lait cru (**Kornacki et Marth, 1982**). Ces hypothèses sont contredites par les résultats observés dans notre étude ou nous avons enregistré la présence de ces germes au niveau des équipements laitiers même après pasteurisation d'autant plus qu'une pasteurisation à 72 °C durant 15 secondes est suffisante pour éliminer *E. coli* (**Fédération internationale de laiterie, 1993**). **Sharma et Anaud (2002a)** ont révélé au niveau des canalisations du lait

pasteurisé un nombre important de microorganismes appartenant aux différents genres à savoir ; *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia coli* et *Shigella*.

Le développement des biofilms bactériens à la surface des joints peut aussi constituer une source de contamination des lignes de post-pasteurisation (**Austin et Bergeron, 1995**).

Donc, il peut s'agir soit d'une contamination post-pasteurisation (matériel de fabrication, personnel), soit d'une contamination excessive du lait cru.

Des travaux minutieux montrent que les équipements de la transformation du lait peuvent être contaminés lorsqu'ils sont en contact direct avec les germes contaminants se trouvant au niveau des fermes laitières telle que la contamination fécale à partir des animaux atteints soit à partir de l'eau utilisée dans le processus de la transformation du lait ce qui explique la présence de *Shigella* au niveau des équipements laitiers (**Oliver et al., 2005**).

Nos résultats révèlent la présence des *Staphylocoques* au niveau des tanks de stockage du lait avant et après pasteurisation, ce qui peut témoigner un défaut d'hygiène, mais il faut rappeler que dans le cas des produits au lait cru, la principale source de contamination est la mammite bovine (**Asperger, 1994**).

Les *Staphylocoques* à coagulase négative sont considérés comme des agents pathogènes émergents de la mammite bovine. Les espèces les plus fréquentes comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus auricularis* et *Staphylococcus warneri* appartiennent à la flore bactérienne normale de la peau du trayon, tandis que d'autres espèces comme *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus sciuri* semblent provenir de l'environnement (**Pyörälä, 2009**).

L'absence de *Staphylococcus aureus* des surfaces des équipements laitiers est rassurante mais n'implique pas forcément leur absence dans les produits laitiers, Cependant il peut y avoir une formation des entérotoxines qui sont remarquablement stables. Ces dernières, résistent à l'irradiation, aux enzymes protéolytiques et surtout à la chaleur. Alors que la bactérie est détruite lors de la pasteurisation du lait mais les entérotoxines ne sont que partiellement inactivées (**Tibana et al., 1987**). Plus important, elles pourraient former des complexes entre elles ou avec l'aliment, empêchant leur détection après traitement thermique alors que leur activité biologique persiste (**Schwabe et al., 1990**).

Les résultats obtenus par la présente étude montrent la présence du genre *Pseudomonas* isolés à partir des équipements laitiers de la laiterie 02 en comparaison avec les isolats obtenus à partir de la laiterie 01.

Dans le milieu laitier, les bactéries les plus rencontrées appartiennent aux genres ; *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Wiedmann., 2000 ; Sharma et Anand, 2002 ; Waak et al., 2002 ; Salo et al., 2006). *Pseudomonas* est l'une des plus importantes bactéries causant l'altération des produits issus du lait pasteurisé de deux manières différentes ; la première, elles produisent la majorité des enzymes lipolytiques et protéolytiques secrétées dans le lait cru avant le début de la transformation, même dans des conditions psychrophiles. La plus part de ces enzymes peuvent survivre après une pasteurisation et même après un traitement à ultra haute température et peut réduire la qualité sensorielle et la durée de vie des produits laitiers pasteurisés. *Pseudomonas spp* peut agir aussi lors de la post- pasteurisation causant la contamination du lait pasteurisé durant la réfrigération (Wiedmann et al., 2000 ; Dogan et Boor, 2003).

CHAPITRE III.

DETECTION DE LA CAPACITE DE LA FORMATION DE BIOFILMS

Introduction

Objectifs

Matériel de prélèvement

Méthode de prélèvement

Résultats

Discussion

DETECTION DE LA CAPACITE DE LA FORMATION DE BIOFILMS

La formation de biofilm constitue une source de contamination critique dans l'industrie alimentaire. Dans certains cas, ils sont responsables de graves contaminations des produits finis. Un biofilm est une communauté multicellulaire plus au moins complexe de micro-organismes adhérant entre eux et à une surface et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice et de polymères organiques très solides.

OBJECTIFS

La présente étude a été menée afin de détecter la capacité de la production de biofilm des souches isolées à partir des équipements laitiers en utilisant deux méthodes différentes à savoir ; la méthode de culture de tissus en plaque (TCP) et la méthode en tube (TM) avec étude de la corrélation entre les deux méthodes de détection de la formation de biofilm utilisées.

1. MATERIEL

- Microplaque en polystyrène à 96 puits
- Etuve (37 °C)
- Micropipette électronique
- Spectrophotomètre (630 nm)
- Lecteur d'absorbance ELISA type ELx800 (630 nm)
- Bouillon cœur-cerveille stérile (BHIB).
- TPS (Tampon Phosphate Salin) à pH 7.2, Crystal violet 0.1% (Annexe 05)
- Acétate de sodium 2%,

1.1. Echantillons

Des isolats ont été sélectionnés pour le dépistage de la production de biofilm, isolées à partir des équipements laitiers.

Ces souches provenaient des prélèvements à partir des différents équipements laitiers à savoir ; le réservoir du lait cru, les tanks de stockage du lait avant et après pasteurisation, les coudes et la machine d'emballage (Tableau 14).

Les isolats ont été identifiés par les méthodes microbiologiques standards (coloration de Gram, examen macroscopique des colonies, test de catalase, test de coagulase, oxydase

réaction, mobilité sur frotti frais). L'identification a été complétée par l'utilisation des galeries API 20E et galeries API 10S (Biomérieux, France) permettant de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques de chaque genre.

Le tableau ci-dessous résume la distribution des isolats sélectionnés pour la détection de la formation de biofilm selon les sites de prélèvements.

Tableau 14 : Distribution des isolats sélectionnés pour la détection de la formation de biofilm selon les sites de prélèvements.

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Micrococcus spp</i>
Réservoir du lait cru	02	/	/	/	/
Coude tank «D»	/	02	/	/	/
Machine d'emballage	01	01	01	/	01
Tank « E »	/	/	/	01	/
Tank «D »	01	01	/	/	01
Tank « A »	02	/	/	/	/
Tank « B »	01	/	/	/	/
Coude Réservoir	/	02	02	03	/
Total	07	06	03	04	02

2. METHODES

La détection de la capacité de la formation de biofilm a été réalisée par les méthodes couramment décrites dans ce contexte à savoir ;

2.1. Méthode en tube

Telle que décrite par **Christensen et al.,1982**, il s'agit d'une méthode qualitative pour la détection de la formation de biofilm.

Une quantité de microorganismes prélevée par anse est inoculée dans un volume de (10 ml) de bouillon cœur cervelle puis incubée à 37°C pendant 24 heures .Au lendemain de la

culture, les tubes ont été lavés avec du TPS (pH 7, 2) et séchés. La couche de biofilm adhérente dans chaque tube est colorée avec du Crystal violet (0,1 %). Les tubes sont ensuite lavés avec de l'eau distillée stérile et séchés toute la nuit en position renversée à température ambiante.

La formation de biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible borde la paroi et le fond du tube. Les résultats sont exprimés selon un score :

1-Non- adhérent, 2-Modéré 3-fortement adhérent.

Les expériences ont été réalisées en triples.

2.2. Méthode de culture de tissu sur plaque

Les souches isolées sur gélose nutritive ont été développées sur des microplaques en polystyrène à 96 puits selon le protocole décrit par **(Christensen et al., 1985)** :

- Les souches sont inoculées dans 3ml de BHIB et incubées pendant 24h à 37°.
- Après incubation des dilutions appropriées sont effectuées afin d'obtenir une suspension bactérienne équivalente à 10^8 UFC/ml par ajustement de l'absorbance à 0.08 -0.1 à une longueur d'onde de 630 nm.
- On dépose 200 µl d'une culture de nuit diluée auparavant (1/20) de milieu BHIB (trois cultures indépendantes pour chaque espèce).
- Les puits de la colonne 12 de la microplaque sont inoculés avec 200 µl de BHIB stérile et sont utilisés comme témoin négatif.
- Après incubation de la microplaque inoculée pour une période de 24h à 37°, le contenu de cette dernière est vidé en tapotant les fonds des puits.
- Les puits sont par la suite lavés quatre fois avec 200 µl de Tampon Phosphate Salin (TPS) à pH 7,2 afin de les débarrasser de la phase planctonique.
- La microplaque est inversée sur un papier absorbant et laissée sécher à l'air libre pendant 15 minutes.
- Les cellules adhérentes à la microplaque dans chacun des puits sont fixées avec l'acétate de sodium (2 %) et colorées avec du cristal violet (0,1%) **(Borucki et al., 2003 ; Mathur et al., 2006)** puis incubées à température ambiante pendant 15 minutes.
- Les puits par la suite ont été lavés trois fois avec de l'eau distillée stérile et séchés toute la nuit à température ambiante.

- A la fin, tous les puits ont été remplis de 200 µl d'éthanol (95 %) afin de les débarrasser du reste du colorant.
- La densité optique (DO) des cellules adhérentes a été mesurée à l'aide d'un lecteur d'absorbance des microplaques ELISA Type (EL×800) à une longueur d'onde de 630 nm.
Les valeurs de chacun des 8 puits témoins sont calculées en moyenne et soustraite de chaque valeur obtenue pour chaque souche.
- L'expérience est réalisée en triple et les valeurs moyennes sont calculées avec l'écart type.
- L'interprétation des résultats de la production de biofilms a été réalisée selon les critères décrits par (Stepanovic et al., 2007) (tableau 15).

Tableau 15 : Interprétation de l'adhérence (Stepanovic et al., 2007).

La densité optique seuil (OD_c) = la moyenne OD du témoin négatif + 3x écart type du témoin négatif.

Valeurs de la densité optique DO	Production de biofilm
$\leq \text{DOc} / \text{DOc} < \sim \leq 2x \text{ DOc}$	Non / Faible
$2x \text{ DOc} < \sim \leq 4x \text{ DOc}$	Modérée
$> 4x \text{ DOc}$	Forte

3. RESULTATS

Des isolats appartenant aux différentes espèces ont été isolés et identifiés après traitement des différents échantillons prélevés à partir de plusieurs sites des équipements laitiers dont 22 isolats seulement ont été sélectionnés afin de dépister leur capacité de former des biofilms (Tableau 14).

3.1. Production de biofilm par la méthode TM

Le dépistage de la formation de biofilm a montré que parmi les 22 isolats, 13,63 % (n=03) ont été forts producteurs de slime, 27,27% (n=06) présentaient une production de biofilm modérée et 36,36% (n=08) étaient de faibles producteurs de slime par contre 22,72 % (n=05) ont été considérés comme non producteurs de biofilms.

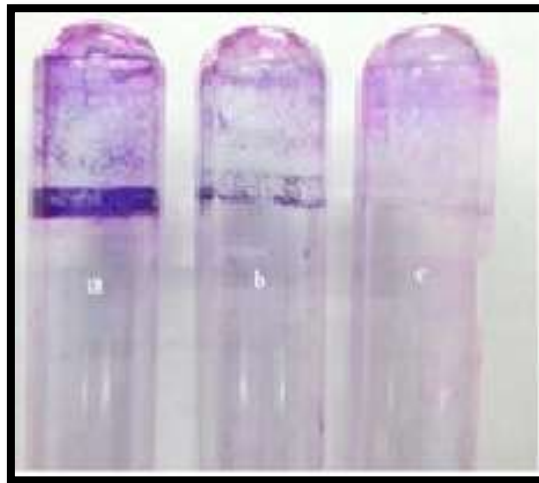


Figure 23 : Détection de la production de biofilm par la méthode en tube (TM).
a : Elevé, b : Modéré, c : Non producteur de biofilm

3.2. Production de biofilm par la méthode de tissu en plaque

Après 24h d'incubation à 37°C sur microplaque à puits en polystyrène, la formation de biofilm a été exprimée en absorbance mesurée à 630 nm à l'aide d'un lecteur ELISA type (ELx800)

Les résultats de la présente étude ont permis de classer les différents isolats sélectionnés afin de tester leur capacité de produire des biofilms en quatre catégories selon les critères décrits par (Stepanovic et al., 2007) ;

$$ODc = (0,06025 + 3 \times 0,00613) = 0,078 \longrightarrow \text{Valeur seuil}$$

Non producteur de biofilm ($DO \leq 0,078$), faible producteur ($0,078 < DO \leq 0,156$), producteur modéré ($0,156 < DO \leq 0,312$) et fort producteur de biofilm ($DO > 0,312$)

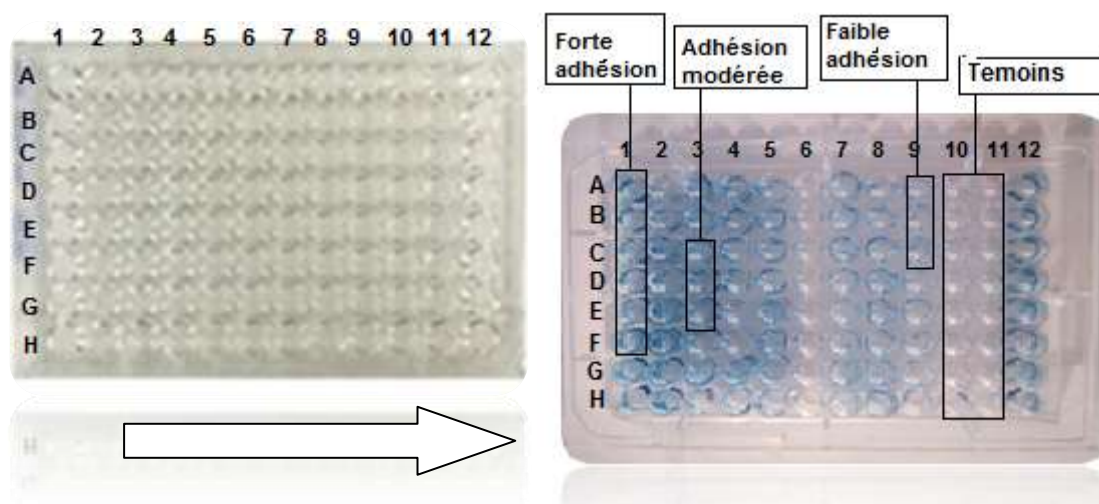


Figure 24 : Détection de la production de biofilm par la méthode de tissu en plaque (TCP) Fort, modéré et non producteur de slime sont distingués par la coloration au cristal violet dans les 96 puits de la microplaque.

3.3. Corrélation entre les deux méthodes

La méthode en tube et la méthode de culture de tissus en plaque variaient dans leur capacité de détecter les biofilms (**Tableau 16**). Les résultats de la présente étude sont détaillés en **annexe 10**.

Tableau 16 : Production de biofilm par les deux méthodes TM et TCP

Formation de biofilm	Méthode de détection	
	TM	TCP
Forte	03	03
Modérée	06	03
Faible	08	06
Non producteur	05	10
Total	22	22

4. DISCUSSION

Plus de soixante ans après le premier rapport sur les biofilms (**Zobell, 1943**), les biofilms sont encore présents dans plusieurs sites et constituent un problème majeur en particulier de l'environnement alimentaire tel que le domaine de l'industrie laitière (**Chen et al., 2007**). Généralement, lorsqu'il s'agit d'une contamination des produits laitiers, la source de problème est liée aux biofilms.

Plusieurs études ont révélé la persistance de certains germes sur les surfaces en contact avec les aliments ainsi que des biofilms causant l'altération de la qualité hygiénique et sont liés à certaines maladies dues à la contamination des produits alimentaires qui peuvent même être responsables de fortes mortalités (**Borucki et al., 2003**). L'étude de ces germes associés à la production de biofilms a montré la présence de *Salmonella spp*, *Staphylococcus spp* et *Escherichia coli O157:H7* (**Sharma et Anand, 2002a; Waak et al., 2002; Dykes et al., 2003; Lapidot et al., 2006 ; Aarnela et al., 2007**). Ces micro-organismes peuvent former des biofilms qui seront par la suite difficiles à éliminer et peuvent même augmenter la probabilité de survie d'autres germes pathogènes et leur dissémination durant la production (**Lapidot et al., 2006**).

Il a été révélé aussi que les germes les plus rencontrés dans l'environnement laitier appartiennent aux genres : *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Streptococcus* et *Pseudomonas* (**Wiedmann et al., 2000 ; Sharma et Anand, 2002 ; Waak et al., 2002; Salo et al., 2006**).

Le temps nécessaire à la formation de biofilm dépend de la fréquence de nettoyage et de la désinfection et du temps de contact avec les surfaces nettoyées telle que les machines des industries laitières qui doivent être nettoyées plusieurs fois par jours car les surfaces en contact avec le produit peuvent le contaminer directement : Le contact direct du produit ou son passage à travers ces surfaces peut potentiellement le contaminer (**Gibson et al., 1995**).

Dans notre étude, les résultats sont obtenus à l'issue de l'observation visuelle des tubes et celle de la mesure de la DO₆₃₀ nm, il est à noter que les isolats obtenus à partir des coudes, réservoir du lait cru et la machine d'emballage peuvent être considérés comme de forts producteurs de biofilm appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Micrococcus* par rapport aux autres isolats qui se sont révélés soit des producteurs modérés, faibles ou même des non producteurs (Annexe 10).

Toutes les bactéries en général et *Pseudomonas. aeruginosa* en particulier résident de manière prédominante sous la forme d'un biofilm (**Nagant, 2013**). Cette bactérie est l'une des bactéries les plus étudiées dans le contexte des biofilms (**Musk et al., 2005**). Dans ce contexte, *Pseudomonas* est l'une des plus importantes bactéries causant l'altération des produits issus du lait pasteurisé (**Wiedmann et al., 2000 ; Dogan et Boor, 2003**).

Ces observations sont en accord avec celles rapportées par **Nagant (2013)**, qui indique que lors de la détection de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* en fonction du temps, la formation de biofilm varie entre souches et les valeurs d'absorbance de toutes les souches étudiées augmentent après une longue incubation en particulier 48 heures.

Dans notre étude nous avons réalisé le dépistage de la production de biofilm par les isolats sélectionnés en se basant sur deux méthodes de détection : la méthode en tube TM et la méthode de culture de tissu en plaque TCP.

L'analyse de nos résultats montre que les deux méthodes utilisées ont permis de mettre en évidence une formation de biofilm variable chez l'ensemble des isolats étudiés.

La méthode en microplaque nous a permis d'apprécier l'adhérence en déterminant quantitativement quatre catégories de souches. Cependant, la méthode en tubes nous a permis seulement de décrire l'adhérence des souches. Il est difficile de distinguer les souches adhérentes faibles, des souches adhérentes modérées. Cette technique demeure limitée à une détection qualitative.

D'autres résultats ont été obtenus par **Mathur et al. (2006)** qui ont révélé que le test TCP est très satisfaisant en termes de détection de phénotype biofilm-positif.

Il est à noter que l'inconvénient majeur de la méthode en tube réside dans la difficulté à distinguer une formation modérée d'une formation faible de biofilm (**Bakir et Ali, 2016**). Des études ont montré que la méthode en tubes n'est pas proposée comme étant un test de choix pour cribler et identifier les souches formatrices de biofilm (**Christensen et al., 1995; Hassan et al., 2011**), mais la méthode TM reste quand même utilisée comme une méthode pour la détection de la formation de biofilm par les bactéries.

Cependant, les producteurs faibles étaient difficiles à distinguer pour les isolats qui ne forment pas de biofilm. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés dans plusieurs travaux traitant les biofilms où les auteurs ont conclu que la méthode TCP est la méthode de sélection la plus sensible et la plus précise montrant une bonne reproductibilité pour la détection de la formation de biofilms (**Mathur et al., 2006**).

CONCLUSION

CONCLUSION

Nous avons constaté à travers cette étude que les procédures du nettoyage en place et de désinfection appliquées au niveau des deux laiteries étaient peu ou pas efficaces, soit du fait que le nettoyage en place ne s'effectue pas immédiatement après vidange des tanks ce qui entraîne la formation des dépôts de souillures organiques et minérales favorisant la formation de biofilms. En outre, une eau de mauvaise qualité bactériologique peut se répercuter sur le résultat du lavage des tanks.

A travers notre travail, nous avons pu constater que la composition de la flore de contamination varie selon le site de prélèvements, ainsi que la présence des germes pathogènes et non pathogènes. La majorité des germes (83,33%) étaient présents au niveau des tanks de stockage du lait avant et après pasteurisation de la (laiterie 01) avec prédominance du genre *Micrococcus* et *Escherichia. Coli*. Concernant la deuxième laiterie, le genre *Pseudomonas* a été isolé à partir de plusieurs sites des équipements laitiers et a présenté (29,53%) de la flore de contamination. Le genre *Pseudomonas* est connu comme le plus important germe causant l'altération des produits issus du lait pasteurisé

En dernier lieu, cette étude nous a permis aussi d'évaluer la capacité des germes isolés de ré-adhérer aux surfaces des équipements et de produire des biofilms en utilisant deux méthodes de détection de la production de slime ; la méthode en tube (TM) et la méthode de culture en plaque (TCP). Les résultats de l'observation visuelle des tubes et de la mesure de la $DO_{630\text{ nm}}$ des microplaques ont révélé que les isolats provenant des coudes, réservoir du lait cru et la machine d'emballage peuvent être considérés comme de forts producteurs de biofilm et appartiennent aux genres *Pseudomonas* et *Micrococcus* par rapport aux autres isolats qui se sont révélés soit des producteurs modérés, faibles ou même des non producteurs.

Il est important de noter que la lutte et l'éradication d'un biofilm bactérien posent de gros problèmes dans les industries laitières car les procédures de nettoyage et de désinfection semblent être peu efficaces face à ces nouvelles structures du moment où l'hygiène des matériaux demeure une préoccupation constante et constitue un vrai challenge pour les industriels de l'agro-alimentaire. C'est pour cette raison qu'il devient essentiel de développer et d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes et les conditions impliquées dans la formation de biofilms afin de pouvoir les éradiquer ou les prévenir efficacement.

Il serait important aussi d'élargir le champ de cette recherche en étudiant la relation entre la formation de biofilms et les sites de prélèvements en explorant leur mode de vie à travers des recherches microbiologiques plus avancées afin de trouver de nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms.

Enfin, quelques recommandations sont proposées au personnel des deux laiteries étudiées afin de limiter ou de minimiser le risque de la formation de biofilm :

- ✓ Pratiquer le nettoyage et la désinfection des surfaces périodiquement, pour éviter que des bactéries indésirables ne s'implantent durablement car plus un biofilm prend de l'âge, plus il résiste aux désinfectants, en insistant sur les endroits les plus propices à la concentration de micro-organismes qui sont généralement peu accessibles au nettoyage. Par exemple dans les laiteries (coudes de tuyauterie, sols, joints de circuits de pasteurisation, etc.),
- ✓ Nettoyer les surfaces avant de les désinfecter au lieu de mener ces opérations simultanément car le nettoyage vise à détacher les souillures (organiques, minérales et microbiennes) et la désinfection a pour objectif d'inactiver les micro-organismes qui n'ont pas été éliminés par le nettoyage,
- ✓ Prendre des mesures préventives, le nettoyage et la désinfection n'étant pas toujours suffisants pour limiter la concentration microbienne à un niveau acceptable par :
 - Concevoir les locaux et les équipements en appliquant des règles de conception hygiénique,
 - Choisir des matériaux résistants à l'usure, faciles à nettoyer et à désinfecter (acier inoxydable),
 - Quand seuls des matériaux fragiles peuvent être utilisés (joints souples par exemple), les remplacer dès qu'ils sont abîmés.
 - Bien s'assurer de la qualité hygiénique de l'eau car elle favorise non seulement la croissance microbienne, mais elle peut aussi être un vecteur de contamination en s'écoulant sur un biofilm, elle emporte et diffuse une partie des microorganismes qui le composent.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. **Aarnela K., Lunden J., Korkeala H., and Wirtanen G., 2007.** Suceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. LWT-Food Science Technologie. 40:1041-1048.
2. **Aarnisalo K., Lunden J., Korkeala H., Wirtanen G., 2007.** Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. LWT. Food Science and Technology, 40(6) :1041-1048.
3. **Abd-el-Malek Y., Gibson T., 1948.** « The *Staphylococci* and *Micrococci* of milk », Journal of Dairy Research, vol. 15, n° 3, 1948, p. 249-260
4. **AFNOR. Microbiologie des aliments., 1999.** Dénombrement des microorganismes par comptage des colonies obtenues à 30 degrés Celsius- Méthode de routine. NF V08051. Paris, 8 p.
5. **Aggad H., Mahouz F., Ahmed Ammar Y., Kihal M., 2009.** Évaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'Ouest algérien. Rev. Méd. vét., 160 (12), 590–595.
6. **Aggad H., Bridja M., Aek B., Benaouali M., Djebli., 2010.** Some quality aspects of pasteurized milk in Algeria. World Journal of Dairy Food Sciences, 5, 21-24.
7. **Allison, D.G. 2003.** The Biofilm Matrix. Biofouling, 19, 139-150.
8. **Alnasouri M., 2010.** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
9. **Ameur A., Rahal K., Bouyoucef A., 2011.** Evaluation du nettoyage des tanks de réfrigération dans les fermes laitières de la région de Freha (Algérie). Nature et Technologie, 80-84.
10. **Anderson GG, O'Toole GA., 2008.** Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. Current Topics in Microbiolgy and Immunology. 2008;322:85–105
11. **Asperger H., 1994.** *Staphylococcus aureus*. In The significance of pathogenic microorganisms in raw milk (G. Hahn, édit.). Monographie, Document n° 9405, Fédération internationale de laiterie, Bruxelles, 24-42.
12. **Augustin M., Ali-Vehmas T., Atroshi F., 2004.** Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 18, 55–64.
13. **Austin J. W ; Bergeron G., 1995.** Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. Journal of Dairy Research, 62, 509-519.

B

-
14. **Bakir S. H. et Ali F.A., 2016.** Comparaison of different Methods for detection of biofilm Production in Multi-Drug Resistance Bacteria in multi drug resistance bacteria causing pharyngotonsillitis. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, 3(2): 13-22.
 15. **Barakat R, Goubet I, Manon S, Berges T and Rosenfeld ., 2014.** Unsuspected Pyocyanin Effect in Yeast under Anaerobiosis , *Microbiology open* 3, 2014, 1-14.
 16. **Bellifa S, Hassaine H, Balestrino D, Charbonnel N., 2013.** Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. *African Journal of Microbiology Research* 7(49):5558-5564.
 17. **Bellon-Fontaine M N., Rault J., Van oss C J., 1996.** Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol 7: 47-53.
 18. **Ben Haj Khalifa A., Moissenet D., Vu Thien H., Khedher M., 2011.** Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. *Annale de Biologie Clinique* 69(3): 393-403.
 19. **Ben-Mahdi M.H., Ouslimani S., 2009.** Mise en évidence de résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'Algérois. *European. Journal of science Research*, 36 (3), 357–362.
 20. **Besassier R., Califano J., Carrette M., Lombardo M., 2005.** La lutte antibactérienne. *Université Nice Sophia Antipolis.*
 21. **Bonfoh B., Roth C., Traore A.N., Fane A., Simbe C.F., Alfaroukh I.O., Nicolet J., Farah Z., Zinsstag J., 2006.** Effect of washing and disinfecting containers on the microbiological quality of fresh milk sold in Bamako (Mali). *Food control*, 17: 153-161.
 22. **Borucki M. K., Peppin J. D., White D., Loge F., Call D. R., 2003.** Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7336–7342.
 23. **Boulangé-Petermann L., 1996.** Process of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability : a review with special reference to the food industry. *Biofouling* 10(4): 275-300.

- 24. Boulangé-Petermann., 1997.** Adhesion of *Streptococcus Thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling*, 1997. 11(13): p201-216.
- 25. 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. *International Journal of Food Microbiology*, 106(3): 254-262.
- 26. Briandet R., Meylhouse T., Maher C., Bellon-Fontaine C., 1999.** *Listeria monocytogenes* ScottA, ; cell surface charge, hydrophobicity, electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied Environmental Microbiology*.65(12):28-33.
- 27. Bridier A., Briandet R., Thomas V, Dubois-Brissonnet F. 2011.** Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 27(9):1017-1032
- 28. Bridier A., Sanchez-Vizueté P., Guilbaud M., Piard, J.-C., Naïtali M., Briandet R., 2015.** Biofilm associated persistence of food-borne pathogens. *Food microbiology* 45, 167-178.

C

- 29. Cappitelli F., Polo A., Villa F., 2014.** Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Engineering Reviews* 6, 29-42.
- 30. Carpentier, B., A.C.L. Wong, O. Cerf. 1998.** Biofilms on dairy plants surfaces: what's new. *Bulletin of the IDF* 329.
- 31. Carpentier B., Cerf O., 1993.** A review: Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. 75: 499–511.
- 32. Carpentier B., Chassing D., 2004.** Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 111–122.
- 33. Ceri H., Olson M.E., Turner R.J.2010.** Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother*, 2010,11, 1233-1237.
- 34. Characklis, W. G., 1989.** Microbial biofouling control. In W. G. Characklis and K. C. Marshall (Eds.), *Biofilms* (Vol. 15, pp. 585–631). New York: Wiley.
- 35. Charpentier J., 1999.** L'inspection du nettoyage et de la désinfection. In : J. Y. Leveau, M. Bouix M. (Eds). *Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries*. Paris : Lavoisier Tec & Doc, 374-382.

36. **Chemiellewski R A N., et Frank J F., 2003.** Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety- Vol 2*.PP.22-32.
37. **Chen J., Rossman M. L., Pawar D. M., 2007.** Attachment of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 249–254.
38. **Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachy E.H., 1982.** Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity* 37: 318-326.
39. **Christensen G.D., Simpson W.A., et Younger J.A., 1995.** Adherence of coagulase negative *Staphylococci* to plastic tissue cultures : a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *Journal Clinical Microbiology*, 22 : 996-1006
40. **Christieans S., 2015.** Nouvelles technologies alternatives à la désinfection chimique : Intérêts, limites, avenir. In "Workshop EcoSec", Clermont-Ferrand (France).
41. **Clutterbuck AL., Woods EJ., Knottenbelt DC., Clegg PD., Cochrane CA., Percival SL., (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 121 (1-2), 1-17.
42. **Conibear T.C.R., S. L. Collins, J.S. Webb., 2009.** Role of Mutation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *Development. PLoS ONE* 4(7): e6289.
43. **Costerton J. W., Geesey G. G., Cheng K. J., 1978.** How bacteria stick. *Scien. Amer.* 238: 86-95.
44. **Costerton J.W., Stewart P.S ., Greenberg E.P., 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. **284**, 1318-1322.

D

45. **Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997).** Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47–64.
46. **Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D’Orio V., Vergara A., Conter M., Ianieri A., 2008.** Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology* 104 (2008) 1552–1561.

47. **Djelloul Daouadji S., 2010.** Détection de biofilm a *staphylocoques* sur cathéters veineux. Mémoire de Magister. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
48. **Dogan B., Boor K. J., 2003.** Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas spp.* isolated from fluid milk products and dairy processing plants. Applied and Environmental Microbiology, 69, 130–138.
49. **Dolabela-Costa., Nélio J. A., Sebastião C. C. B., Frederico J. V. P., Nilda D.F., Ferreira S, 2006.** Brazilian Journal Microbiology. vol.37 no.3 São Paulo July/Sept. 2006.
50. **Donlan R.M., 2002 .**Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8 (9). 881-890.
51. **Drenkard E et Ausubel F M., 2002.** *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature, 416,740-743.
52. **Dunsmore D. G., Thomson M. A., Murray G., 1981.** Bacteriological control of food equipment surfaces by cleaning systems. III. Complementary cleaning. Journal of food protection, 44(2):100-108.
53. **Dunstall G., Rowe M. T., Wisdom G. B., Kilpatrick D., 2005.** Effect of quorum sensing agents on the growth kinetics of *Pseudomonas spp.* of raw milk origin. Journal of Dairy Research, 72, 276–280.
54. **Dupuis C., Tardif R., Verge J., Drapeau R., Hebert J., 2003.** Ouvrage : Sciences et technologies du lait.
55. **Dykes G. A., Sampathkumar B., Korber ., 2003.** Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. International Journal of Food Microbiology. 2003 Dec 15;89(1):1-10.

F

56. **Faille C., Jullien c., Parent C., Fontaine F., Bénézech T. 2002.** Influence of heat treatments on the surface properties and adhesion of *B. cereus* and *B. subtilis* spores. Fouling, cleaning and disinfection in food Processing, Cambridge, UK, 3-5 April
57. **Fédération internationale de laiterie., 1993.** F 40 microbiological safety of raw and unpasteurized milk and milk products. Document n° 223, supplément, Fédération internationale de laiterie, Bruxelles, 32 pp.
58. **Ferreira V., Wiedmann M., Teixeira P., Stasiewicz M. J., 2014.** *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics and implications for public health. *Journal of Food Protection* 77, 150-170.

- 59. Filloux, A., Vallet, I. (2003).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Journal of Medecine Science (Paris)*19, 77-83.
- 60. Flemming HC, J Wingender. 2010.** The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology*, 8: 623-633.
- 61. Fletcher M., 1988.** The application of reflection microscopy to the study of bacterial adhesion to solid surfaces. *Applied Science*. 31-35.
- 62. Flint S. H., Bremer P. J., Brooks J. D., 1997.** Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11(1): 81-97.
- 63. Frank J. F; Koffi R. A.,1990.** Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increases resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 53, 550-554.
- 64. Freeman D.J., Falkiner FR., Keane CT., 1989.** New method of detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 42: 87-84.

G

- 65. Garnier F., Denis F., 2007.** Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. Chapitre 29 .251, 254.
- 66. Gauthier Y. et Isoard P., 1989.** L'adhésion des bactéries sur les surfaces, *Industries alimentaires et agricoles*, 106, (1-2), p. 31-33.
- 67. Gibson H., Taylor J. H., Hall K. E., Holah J. T. 1995.** Biofilms and their detection in the food industry. In: Campden and Chorleywood Food Research Association.R&D Report No. 1.
- 68. Gibson H. J., Taylor H., Hall K. E., Holah J. T., 1999.** Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 41-48.
- 69. Goller C.C, Romeo T., 2008.** Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology. Immunol.* 322: 37- 66.
- 70. Golovlev., 2002.** The Mechanism of Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Type of Structured Population. *Microbiology volume 71*, pages 249-254
- 71. Gottenbos B., Grijsmad., et Van de Mei H C., 2001.** *Journal of Antimicrobial chemotherapy*, 48,7-13.
- 72. Gymoese P., Vogel B. F., 2007.** Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. **18**: 1165-1171.

H

-
73. **Hall- Stoodley L., Costerton J. W, Stoodley P., 2004.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature. Review Microbiology*, 2, 95-108.
74. **Hall-Stoodley L, Stoodley P., 2009.** Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*. 2009;11:1034–1043
75. **Hamiroune M., Berber A., Boubekeur S., 2014.** Contribution to the study of *Staphylococcus* contamination of cows' milk on a number of farms in Algiers: its impact on human health, *Rev. Sci. Tech.*
76. **Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M., 2011.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates, *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4) : 305-311.
77. **Heiermann G., et Thut W, 2007.** Prevention de la formation de biofilms par le traitement physique de l'eau. *Nutztierpraxis Aktuell* 23..
78. **Helke D.M., Somers E.B., Wong A.C.I., 1993.** Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. *Journal of Food Protection*, 56, 479-484.
79. **Harbron R S et Kent C A., 1988.** Aspects of cell adhesion. In L F. Melo, T. R. Bott et C.A. bernardo (eds). *NATO ASI series*. Vol, 145: 125-140.
80. **Hou W., Sun X., Wang Z., 2012.** Investigative Ophthalmology & Visual Science, the Association for Research in Vision and Ophthalmology. (53) : 9.5624.5631. ISBN : 978-2 -84444-558 -2.
81. **Hughes K.A., Sutherland I.W., Jones M.V., 1998.** Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*, 144, 3039–3047.

I

-
82. **ISO 6887-1:1999.** Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales. Edition 1 ; ISO/TC 34/SC 9 Microbiologie alimentaire.
83. **ISO 14159.** Sécurité des machines -- Prescriptions relatives à l'hygiène lors de la conception des machines) et **EN 1672-2** (Machines pour les produits alimentaires - Notions fondamentales - Partie 2 : prescriptions relatives à l'hygiène.

J

-
- 84. Jaudon P., Leitao J., Lellouche-Gillièrè M., Ravary Y., Grand Millorat O., Moulin S. 2000.** "Hygiène et propreté des surfaces en milieu agro-alimentaire - Produits humides," pp. 159. Inhni/Ministère de l'Education Nationale/FEP, France.
- 85. Jayaraman A., Wood T. K., 2008.** Bacterial quorum qensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. Annual Review of Biomedical Engineering 10, 145-167.
- 86. Jessen B., Lammert L., 2003.** Biofilm and disinfection in meat processing plants. International Biodeterioration and Biodegradation, 51(4) : 265-269.
- 87. Jones K.1., Bradshaw S.B., 1996.** Biofilm formation by the Enterobacteriaceae : a comparison between *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. J Appl Bacteriol. 1996 Apr ;80(4) :458-64.

K

-
- 88. Kabir J., Umoh VJ., Audu-Okoh E., Umoh JU., Kwaga JKP., 2004.** Veterinary drug use in poultry farms and determination of antimicrobial drug residues in commercial eggs and slaughtered chicken in Kaduna State, Nigeria. Food Control. 15, 99-105
- 89. Kara Terki., I., 2014.** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de *staphylocoques* isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- 90. Kives J., Guadarrama D., Orgaz B., Rivera-sem A., Vazquez J et Sanjose C. , 2005.** Interactions in biofilms of lactococcus lactissp cremoris and Pseudomonas fluorecens cultured in cold UHT milk. Journal of Dairy Science, 88, 4165-4171.
- 91. Klinger C., 2005.** Les biofilms, forteresses bacteriennes. La recherche 389 :42-46.
- 92. Kocur M., 2006.** *The Genus Micrococcus , Prokaryotes*, vol. 3, p. 961-971.
- 93. Kornacki L., Marth E.H., 1982.** Foodborne illness caused by *Escherichia coli*. Journal of. *Food Protection*, **45** (11), 1051-1067.
- 94. Kuda T., Yano T and Kuda M. T., 2008.** Resistances to benzolkonium chloride of bacteria dried with food elements on Stainless Steel surface. LWT-Food Science Technology. 41:988-993.

L

-
95. **Lapidot A., Romling U., Yaron S., 2006.** Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. International Journal of Food Microbiology, 109 (3):229-233.
96. **Lee S. H; Frank J. F., 1991.** Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. Journal of Food Protection, 54, 4-6.
97. **Le Gentil C., Sylla Y., Faille C., 2010.** Bacterial contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. Journal of Food Engineering, 96: 37-42.
98. **Lerebour G., Cupferman S., Bellon-Fontaine M. N., 2004.** Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. Journal of Applied Microbiology,. 2004;97(1):7-16..
99. **Leriche V., Carpentier B., 2000.** Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. Journal of Applied Microbiology, 88, 594–605.
100. **Lewis K., 2008.** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2008;322:107–131
101. **Lister L., Alexander R., 2014.** *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front. Cellular and Infection Microbiology.

M

-
102. **MADR., 2004.** Ministère de l'Agriculture et de Développement Rural. Archive évolution de la production laitière et la collecte du lait(1982-2012).
103. **Mah TF, O'Toole GA., 2001.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology., 9:34-39.
104. **Malek F., Moussa-Boudjemâa B., Khaouani-Yousfi F., Kalai A., Kihel M., 2012.** Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. African J. Microbiology, 6(17): 3836-3844.
105. **Manuel Simoes, Lucia. C. Simoes, Maria J. Vieira., 2009.** A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT- Food Sci. Technology, 43: 573-583.

106. **Mariam Ibrahim ; Romain Briandet, Michel Yves Mistou Agnes. Chretien, Josselyne Tremblay ; 2004.** Immobilisation des lactocoques. Le Lait, INRA Editions, 2004, 84 (1-2), pp.103-114.
107. **Marshall R. T., 1992.** Standard methods for the examination of dairy products (16th ed.) American Public Health Association. New York, 159-164.
108. **Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A., 2006.** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24: 25-29.
109. **McDonnell G., and Russell A.D., 1999.** Antiseptics and disinfectants Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 147-179.
110. **Mensah S.E.P., Koudandé O.D., Sanders P., Laurentie M., Mensah G.A., Abiola F.A., 2014.** Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique : risques de santé publique. *Revue scientifique et technique Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2014, 33 (3)
111. **Mercier-Bonin, M., Ouazzani, K., Schmitz, P. and Lorthois, S. (2004).** Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *Journal of Colloid and Interface Science*. 271, 342-50.
112. **Mittelman M. W., 1998.** Structure and functional characteristics of bacteria biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81, 2760–2764.
113. **Moreau J., 2008,** Les biofilms inhibent l'adhésion de *Listeria monocytogenes* *Process* 1250:71
114. **Mosteller T.M., Bishop J. R., 1993.** Sanitizer efficacy against bacteria in milk biofilm. *Journal of Food Protection*, 56.34-41.
115. **Musk D.J., Banko D.A., and Hergenrother P.J., 2005.** Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*; Vol. 12: 789– 796.

N

116. **Nagant C., 2013.** Contribution à la recherche de nouveaux agents antibactériens actifs sur les biofilms de *Pseudomonas. aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.
117. **Nagaveni S., Rajeshwari H., Ajay Kumar Oli., Patil S.A., Kelmani Chandrakanth R., 2010.** Evaluation of biofilm forming ability of the multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Bioscan*; 5(4): 563-566.

118. **Nitschke M., et Costa SG.VA.O, 2007.** Biosurfactants in food industry. Trends in Food Science and Technology, 18, 252-259.
119. **Norbert., Goulois., 2003.** Nettoyage et désinfection en restauration collective. DIFOP de Lyon 2003, P 1-35.

O

120. **Oliver S. P., Jayarao B. M., Almeida R. A., 2005.** Food borne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. Food borne Pathogens and Disease, 2, 115–129.
121. **Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria., 2002.** Formation and comparative susceptibility to antibiotics. Canadian Journal of Veterinary Research. 2002;66:86–92.
122. **O'Toole G. A., Kaplan H.B., Kolter R., 2000.** Biofilm formation as microbial development. The Annual Review of Microbiology. 54: 49- 79.

P

123. **Pamula, E., De Cupere, V., Dufrene, Y. F. and Rouxhet, P. G. (2004).** Nanoscale organization of adsorbed collagen: influence of substrate hydrophobicity and adsorption time. Journal of Colloid Interface Science. 271, 80-91.
124. **Pardon B., Catry B., Dewulf J., Persoons D., Hostens M., De Bleecker K., Deprez P, 2012.** Prospective study on quantitative and qualitative antimicrobial and anti-inflammatory drug use in white veal calves. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 67 (4), 1027–1038.
125. **Parsek M. R ., 2000.** Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature, 12;407(6805):762-4.
126. **Parsek M.R., 2008.** Quorum sensing and microbial biofilms. Current. Microbiology and Immunology. 322 : 67- 84.
127. **Pederson K., 1990.** Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. Water research 24:239-343.
128. **Perrin C., 2009.** Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'*Escherichia coli* K-12. L'Université Lyon I -Claude Bernard, France.

129. **Persoons D, 2011.** Antimicrobial use and resistance in Belgian broiler production. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
130. **Pradier C. M ., Rubio C., Poleunis C., Bertrand P., Marcus P., Compere C., 2005.** Surface Characterization of Three Marine Bacterial Strains by Fourier Transform IR, X-ray Photoelectron Spectroscopy, and Time-of-Flight Secondary-Ion Mass Spectrometry, Correlation with Adhesion on Stainless Steel Surfaces. *Journal of Physical Chemistry B.* 2005/05 Vol.109. iss.19
131. **Pyörälä S ., Taponen S ., 2009.** Coagulase-negative staphylococci- Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology, Elsevier, 2009, 134 (1-2), pp.3.*

R

132. **Rasmussen T.B., Skindersoe M.E ., Bjarnsholt T., Phipps R. K., Christensen K. B., Jensen P. O., et al. 2005.** Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology, 151, 1325-1340.*
133. **Reguera G, Nevin KP, Nicoll JS, Covalla SF, Woodard TL, Lovley DR..2007.** Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied Environment and Microbiology 72: 7345-7348*
134. **Regula G, Torriani K, Gassner B, Stucki F, Müntener CR, 2009.** Prescription patterns of antimicrobials in veterinary practices in Switzerland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 63 (4), 805–811.*
135. **Rewatkar A R and Wadher B J. 2013.** *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-. Biofilm formation Methods. *Journal of Pharmacy and Biological Science . 2013;8(5):36–40.*
136. **Ricardo Murga., Rodney Donlan., 2002.** Polymicrobial biofilm grown on a stainless steel surface in a laboratory potable water biofilm reactor. "Biofilms: Microbial Life on Surfaces". *Centers for Disease Control and Prevention.*
137. **Rodrigues L. R., Van der Mei H.C., Teixeira J.A., et Oliveira R. 2004.** Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Applied Microbiology and Biotechnology, 66,306-311.*
138. **Rubio C., 2002.** Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Thèse de l'université de Paris

S

-
139. **Salo S., Ehavald H., Raaska L., Vokk R., Wirtanen G., 2006.** Microbial surveys in Estonian dairies. *LWT - Food Science and Technology*; 39(5): 460-471.
140. **Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G.2002.** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*. 184, 1140-1154.
141. **Schwabe M., Notermans S., Boot R., Tatini S.R. & Kramer J., 1990.** - Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. *International Journal of Food Microbiology.*,10, 3-42.
142. **Sharma M., Anand S. K., 2002.** Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, 19, 627–636.
143. **Sharma M., Anand S. K., 2002.** Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy industry- a case. *Food Control*. 2002; 13: 469-477.
144. **Sillankorva S., Oliveira D R., Vieira M J., Sutherland I W., et Azeredo J., 2004.** Bacteriophage infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. *Biofouling*, 20, 133-138.
145. **Simões M., Bennett R. N., Rosa E. A. S., 2009.** Understanding antimicrobial activities of phyto chemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*. 26: 746–757.
146. **Simões M., and Vieira M. J., 2009.** Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide in proceedings of international conference Process in biofilms: Fundamentals to Applications. PP.(58-62).
147. **Simões M., Simões L. C., Vieira M. J., 2010.** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43, 573-583.
148. **Souki H., 2007.** Les stratégies industrielles et la construction de la filière lait en Algérie: portée et limites. *Revue Campus*. 15
149. **Speranza G., GottardiG., Pederzoli C. 2004.** Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials*, 25, 2029-2037.
150. **Stepanovic S., Vukovi D., Hola V ., 2007.** Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS*, 115:891-9.
151. **Sutherland IW., 2001.** The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology.*, 9 (5): 222-7.

152. **Sutherland, Hughes, Skillman et Tait, 2004.** The interaction of phage and biofilms. FEMS Microbiology Letters. 12;232(1):1-6.

T

153. **Tarzaali D., Dechicha A., Gharbi S., Bouaissa M.K., Yammine N., Guetarni D., 2008.** Recherche des résidus des tétracyclines et des bêta-lactamines dans le lait cru par le MRL Test (ROSA TEST) à Blida, Algérie. In 6e Journées scientifiques vétérinaires sur le médicament vétérinaire : nouvelles approches thérapeutiques et impact sur la santé publique, École nationale vétérinaire, Algérie, 23–24.
154. **Terada A., Yuasa A., et Tsuneda S, 2005.** Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion into polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization. Colloids and surfaces B, 43, 99-107.
155. **Thomson K., Rantala M., Hautala M., Pyorala S., Kaartinen L., 2008.** Cross-sectional prospective survey to study indication –based usage of antimicrobials in animals: results of use in cattle. BMC Veterinary Research., 4,15.
156. **Tibana A., Rayman K., Akhtar M., Szabo R., 1987.** - Thermal stability of staphylococcal enterotoxins A, B and C in a buffered system. Journal of *Food Protection*., 50, 239-242.
157. **Tompkin R. B., 2002.** Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. Journal of Food Protection 65, 709-725.
158. **Tremblay Y.D., Hathroubi S. Jacques M., 2014.** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. Canadian Journal of Veterinary Research, 78, 110– 116.

V

159. **Valle J Re, D. S., Henry N., Fontaine T., Balestrino D., Latour-Lambert P., 2006.** Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted biofilm polysaccharide. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 103, 12558-12563.
160. **Van de Weyer A., Devleeschouwer M. J., Dony J., 1993.** Bactericidal activity of disinfectants on *Listeria*. Journal of Applied Bacteriology, 74, 480-483.
161. **Van Houdt R, Michiels CW., 2005.** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Research Microbiolgy 156: 626-633.

- 162. Vilar M. J., Yus E., Sanjuan M. L., Dieguez F. J., Rodriguez-Otero J. L., 2007.** Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 90, 5083–5088.

W

- 163. Waak., 2002.** Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Applied and environmental Microbiology*. 68(7): 3366-70.
- 164. Wanner O., Bauchrowitz M., 2006.** Les biofilms sont omniprésents. *EAWAG News*, 60:f, pp 4-7.
- 165. Wiedmann M., Weilmeir D., Dineen S. S., Ralyea R., Boor K. J., 2000.** Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas sp.* Isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology* ; 66(5) : 2085-2095.

Z

- 166. Zhao T., Doyle M.P., et Zhao p., 2004.** Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive exclusion microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3996-4003.
- 167. Zobell, C. E., 1943.** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46, 39–56.
- 168. Zufferey J., Rime B., Francioli P., Bille J., 1988.** Simple method for rapid diagnosis of Catheter-associated infection by direct Acridine orange staining of catheter tips. *Journal of Clinical Microbiology* .26:175–7.

ANNEXES

Annexe 01

Fiche d'évaluation d'un établissement de manipulation et de transformation des produits laitiers

Lignes directrices sur le HACCP, les BPF et BPH pour les PME de l'ASEAN Ed1, 2005
Programme CE-ASEAN de coopération économique sur les normes, la qualité et l'évaluation de conformité (Asia/2003/069-236)

Nom de l'établissement :
Propriétaire :
Adresse :
Téléphone : Fax :
E-mail :
Agrément sanitaire N°
Type de production :
Volume de production :

Principes généraux

- les portes de l'établissement doivent être au minimum au nombre de 4 :
 - une porte pour l'entrée des matières premières
 - une porte pour l'entrée du personnel de production
 - une porte pour la sortie des produits finis
 - une porte pour la sortie des déchets

- les sols doivent être :
 - lisses
 - imperméables
 - antidérapants
 - résistants
 - lavables
 - imputrescibles

- les murs doivent être :
 - lisses
 - clairs
 - lavables
 - imputrescibles
 - résistants aux chocs jusqu'à 2 mètres de hauteur
 - articulés avec le sol ainsi qu'entre eux, par des joints en gorges arrondies

- les plafonds doivent être :
 - clairs
 - lisses
 - lavables
- la ventilation passive ou active doit assurer l'extraction des vapeurs et des fumées
- l'éclairage doit être :
 - intense
 - ne modifiant pas les couleurs des produits alimentaires travaillés

Conformité du matériel

le mobilier doit être :

- lisse
- lavable
- imputrescible
- inoxydable

les plans de travail doivent être conçus en matériaux :

- lisses
- clairs
- lavables
- imputrescibles
- résistants
- imperméables

le petit matériel doit être :

- inaltérable dans toutes ses parties

****Interdiction de l'utilisation du bois même pour les manches d'outils. Les matériaux les plus souvent utilisés sont l'acier inoxydable, l'aluminium, les matières plastiques**

les machines doivent être :

- inaltérables
- facilement démontables
- facilement nettoyables

****Les matériels de production ne doivent pas être implantés contre les murs afin de faciliter leur nettoyage et leur inspection ainsi que pour optimiser la lutte contre les nuisibles.**

Nettoyage et désinfection :

- Protocole de NEP utilisé ? Action chimique/mécanique
- Fiche technique du produit utilisé ?
- Fréquence d'utilisation ?
- Concentration/Temps de contact/Température
- Le personnel :
- est-il qualifié ? Formé ?
- L'autocontrôle est-il pratiqué ? À quelle fréquence ?

Annexe 02

Contamination des sites de prélèvements après nettoyage en place et comparaison entre les deux laiteries

Site de prélèvement	Laiterie 01			Laiterie 02		
	Nombre	n Log ₁₀ (UFC/cm ²)	Log kill Log N-Log n	Nombre	n Log ₁₀ (UFC/cm ²)	Log kill Log N-Log n
Reservoir du lait cru	03	2,06± 0,39	1,79	04	4,44±0,11	0,05
Tank de stockage	09	2,31± 0,52	1,61	10	3,81±0,50	0,51
Lames d'agitateur	04	2,73± 0,62	0,57	/	/	/
Coude	04	2,74± 0,23	0,95	05	4,22±0,02	0,10
Machine d'emballage	02	2,81±0,58	0,44	02	4,05±0,73	0,29
Total	26			21		

Annexe 03

Tableau de lecture du catalogue analytique API 20E

api 20 E

07584 C - 09/2000

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	SUBSTRATS	QTE	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	ortho-nitro-phényl-β-D-galactopyranoside (ONPG) isopropylthiogalactopyranoside (IPTG)	0,23 mg 7,6 µg	beta-galactosidase	incoloré	jaune (1)
ADH	arginine	1,9 mg	arginine dihydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
LDC	lysine	1,9 mg	lysine décarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
ODC	ornithine	1,9 mg	ornithine décarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
[CIT]	citrate de sodium	0,83 mg	utilisation du citrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
H ₂ S	thiosulfate de sodium	76,0 µg	production d'H ₂ S	incoloré / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76 mg	uréase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	tryptophane	0,38 mg	tryptophane désaminase	TDA / immédiat jaune marron-rougeâtre	
IND	tryptophane	0,19 mg	production d'indole	JAMES / immédiat incoloré rose vert pâle / jaune	
[VP]	créatine pyruvate de sodium	0,38 mg 1,9 mg	production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 min incoloré rose / rouge (5)	
[GEL]	gélatine de Kohn	0,17 mg	gélatinase	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	glucose	1,9 mg	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	mannitol	1,9 mg	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9 mg	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	sorbitol	1,9 mg	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	rhamnose	1,9 mg	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	saccharose	1,9 mg	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	melibiose	1,9 mg	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57 mg	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	arabinose	1,9 mg	fermentation / oxydation (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	
Réduction des nitrates tube GLU	nitrate de potassium	76,0 µg	production de NO ₂ réduction au stade N ₂	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min jaune rouge Zn / 5 min orange rouge jaune	
MOB	API M Medium ou microscope		mobilité	immobile	mobile
McC	milieu de MacConkey		culture	absence	présence
OF-F OF-O	glucose (API OF Medium)		fermentation : sous huile oxydation : à l'air	vert vert	jaune jaune

- (1) Une très légère couleur jaune est également positive.
(2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 H d'incubation doit être considérée négative.
(3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).
(4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.
(5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

Produit enregistré à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
Fabricant : bioMérieux sa



bioMérieux sa
au capital de 77 421 420 F
673 620 399 RCS LYON
69280 Marcy-l'Étoile / France
tél. (33) 04 78 87 20 00 / fax (33) 04 78 87 20 90
http://www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc.
595 Anglum Road, Hazelwood,
Missouri 63042-2320 / USA
tel. (1) 314.731 8500 / fax (1) 314.731 8700

Imprimé en France

Annexe 04

Tableau d'identification du catalogue analytique API Staph

API STAPH V4.1	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	KYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0
<i>Staphylococcus caprae</i>	0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	80	0
<i>Staphylococcus carnosus</i>	0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0
<i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i>	0	100	99	86	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0
<i>Staph. cohnii ssp urealyticum</i>	0	100	100	99	98	98	100	94	84	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0
<i>Staphylococcus lentus</i>	0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	100	89	88	99	68	99	0	0	0	99	16	99	0	0	100	0	90	1	60	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0	100	80	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	99	99	60	98	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0
<i>Staphylococcus xylosus</i>	0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0
<i>Kocuria kristinae</i>	0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97
<i>Kocuria variens/rosea</i>	0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	28	95
<i>Micrococcus spp</i>	0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91

Annexe 05

Composition du tampon phosphate salin (TPS)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,76 mM
Eau distillée	1000 ml
pH	7,4

Annexe 06

Composition et préparation du milieu PCA (Plate Count Agar)

Tryptone.....	5g
Extrait de levure.....	2.5g
Glucose.....	4g
Gélose (Agar).....	9g
Eau distillée	1 dm ³
pH final :	7,0±0,2.

Mettre 23,5 g de poudre dans un litre d'eau distillée.

Attendre 5 minutes, puis mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène.

Chauffer lentement en agitant fréquemment puis porter à l'ébullition jusqu'à dissolution complète.

Stériliser et répartir en boîte Pétr.

Annexe 07

Composition et préparation du T.S.E

Tryptone	1g
NaCl.....	8.5g
Eau	1 litre
pH	7

Répartir en tubes à essais (09-10 ml) et stériliser.

Annexe 08

Lecture de la microplaque après 24h d'incubation Lecteur ELISA

EL x 80

Gen5 Reader Control - TCP IMAN2 SP*

File Plate Protocol Window System Help

Com6

Plate 1

Matrix Statistics

Date: 630 Edit Matrix Read #: Show

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,439	0,247	0,167	0,173	0,144	0,056	0,070	0,072	0,159	0,068	0,066	0,393
B	0,355	0,290	0,141	0,276	0,472	0,062	0,071	0,055	0,173	0,068	0,051	0,410
C	0,397	0,311	0,259	0,174	0,185	0,058	0,083	0,067	0,053	0,072	0,069	0,412
D	0,474	0,456	0,282	0,103	0,523	0,080	0,081	0,095	0,058	0,085	0,059	0,412
E	0,377	0,072	0,253	0,185	0,059	0,058	0,082	0,072	0,059	0,076	0,058	0,407
F	0,471	0,069	0,074	0,110	0,062	0,061	0,090	0,072	0,062	0,092	0,065	0,414
G	0,339	0,078	0,069	0,192	0,063	0,058	0,080	0,067	0,061	0,065	0,060	0,410
H	0,359	0,172	0,070	0,187	0,060	0,058	0,070	0,122	0,096	0,064	0,054	0,406

Read from reader

Reader Type: ELx800

Reader Serial Number: Unknown

Reading Type: Reader

Procedure Details

Plate Type: 96 WELL PLATE

Read: Absorbance Endpoint

Full Plate

Wavelengths: 630

Read Speed: Normal

Results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,439	0,247	0,167	0,173	0,144	0,056	0,07	0,072	0,159	0,068	0,066	0,393
B	0,355	0,29	0,141	0,276	0,472	0,062	0,071	0,055	0,173	0,068	0,051	0,41
C	0,397	0,311	0,259	0,174	0,165	0,058	0,083	0,067	0,053	0,072	0,069	0,412
D	0,474	0,456	0,282	0,103	0,523	0,06	0,081	0,095	0,058	0,085	0,059	0,412
E	0,377	0,072	0,253	0,185	0,059	0,058	0,082	0,072	0,059	0,076	0,058	0,407
F	0,471	0,069	0,074	0,11	0,062	0,061	0,09	0,072	0,062	0,092	0,065	0,414
G	0,339	0,078	0,069	0,192	0,063	0,058	0,08	0,067	0,061	0,065	0,06	0,41
H	0,359	0,172	0,07	0,187	0,06	0,058	0,07	0,122	0,096	0,064	0,054	0,406

Annexe 09

Lecture de la microplaque après calcul de la Do-Blanc

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,37875	0,18675	0,10675	0,11275	0,08375	- 0,00425	0,00975	0,01175	0,09875	0,00775	0,066	0,393
B	0,29475	0,22975	0,08075	0,21575	0,41175	0,00175	0,01075	- 0,00525	0,11275	0,00775	0,051	0,41
C	0,33675	0,25075	0,19875	0,11375	0,10475	- 0,00225	0,02275	0,00675	- 0,00725	0,01175	0,069	0,412
D	0,41375	0,39575	0,22175	0,04275	0,46275	- 0,00025	0,02075	0,03475	- 0,00225	0,02475	0,059	0,412
E	0,31675	0,31675	0,19275	0,12475	- 0,00125	- 0,00225	0,02175	0,01175	- 0,00125	0,01575	0,058	0,407
F	0,41075	0,00875	0,01375	0,04975	0,00175	0,00075	0,02975	0,01175	0,00175	0,03175	0,065	0,414
G	0,27875	0,01775	0,00875	0,13175	0,00275	- 0,00225	0,01975	0,00675	0,00075	0,00475	0,06	0,41
H	0,29875	0,11175	0,00975	0,12675	- 0,00025	- 0,00225	0,00975	0,06175	0,03575	0,00375	0,054	0,406

Annexe 10

Détection de la production de biofilm pour les souches isolées
par méthodes TCP et TM

Isolat	Méthode TCP		Méthode TM
	DO	Interprétation	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.336	Forte	Forte
	0.114	Faible	Non
	0.204	Modérée	Modérée
	0.106	Faible	Modérée
	0.014	Non	Faible
	0.024	Non	Faible
	0.013	Non	Forte
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.335	Forte	Modérée
	0.107	Faible	Modérée
	0.147	Faible	Faible
	0.072	Non	Faible
	-0.0035	Non	Faible
	0.009	Non	Non
<i>Escherichia coli</i>	0.237	Modérée	Non
	0.010	Non	Forte
	0.024	Non	Non
<i>Staphylococcus xylosus</i>	0.012	Non	Modérée
	0.083	Faible	Faible
	0.012	Non	Non
	0.292	Modérée	Faible
<i>Micrococcus spp</i>	0.326	Forte	Modérée
	0.102	Faible	Faible

PUBLICATION

PUBLICATION

PREDOMINANT BACTERIAL BIOFILM AND EFFICIENCY OF CLEANING AND DISINFECTION IN A DAIRY INDUSTRY

I. AHMED AMMAR^{1,2}, H. AGGAD²

¹Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), Université de Tlemcen, Algérie

²University of Tiaret, Institute of Veterinary Science, Laboratory of Hygiene and Animal Pathology, BP 78, Tiaret, 14000 Algeria

Email: h_aggad@yahoo.com

Summary

Cleaning and disinfection are important tools in maintaining and improving quality of dairy products. In order to assess this protocol, we studied a dairy located in western Algeria. We conducted periodic visits to follow program practices and to complete a comprehensive questionnaire. We collected several swabs samples at different points before and after cleaning in place procedures. The samples were then submitted to microbiological tests in order to evaluate protocol efficiency and to determine the dominant bacteria in different sites before and after pasteurization. Results showed that the cleaning in place practice was followed as recommended by the manufacturer. However, its effectiveness on depletion of bacteria was low, as the reduction of bacteria was comprised between Log 0.41 and Log 0.86. Even after pasteurization, many bacteria were found, mainly *Micrococcus* sp and *Escherichia coli*. Indeed, there is a need to implant a rigorous and efficient HACCP program to ensure a quality product.

Keywords: cleaning in place, evaluation, hygiene, milk, pasteurization

In food-processing industries, adherence of contaminant microorganisms to surfaces led to adverse effects not only on hygiene quality and public health (32) but also to economic losses (13).

Milk, highly perishable item, is subject to contamination by various microorganisms attached to contact surfaces in dairy plants and subsequent biofilm formation poses a secondary contamination risk in milk and dairy products (12, 31). The major sources of this contamination are usually equipment improperly cleaned and sanitized (16).

This explains that in dairy industry the classical operations of cleaning and disinfection are essential parts of milk production. The efficiency with which these operations were performed, affects greatly the final products quality (31, 8).

In Algeria, the implementation of cleaning and disinfection program in dairy industry is a relatively recent practice (4) implemented with the appearance of the first dairy industries during the 70s, knowing that incorrect application of such a program plays an essential role in determining hygienic quality of milk and dairy products.

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. LI(3), 2018, TIMIȘOARA

Moreover, the main part of the demand for milk is covered by imports and the locally produced milk (3 billion liters) (23) is often highly contaminated (11).

Contamination can occur throughout the milk production chain: hygiene in milking, maintaining the cold chain and delivery deadlines (7), cleaning and disinfection of equipment in contact with milk and refrigeration (28).

Therefore, material not properly cleaned and disinfected becomes favorable to microbial biofilm formation which can contaminate milk (22).

This work was undertaken to identify main biofilm bacteria and to evaluate efficiency of cleansing and disinfection practices in a dairy western Algeria.

Materials and methods

Sampling site:

Located at Sougueur (Governorate of Tiaret), the dairy produces recombined milk from powders imported from various countries (Germany, France; Belgium, Argentina), as well as milk from thirty two (32) surrounding cattle farms and transported to dairy by private collectors in isothermal tanks for pasteurization. The total daily production was around 30000 liters including the 5000 liters collected. This study was conducted in June 2016.

Audit of cleaning in place procedure:

Eight periodic visits were conducted to record handling practices of dairy products in dairy as well as to implement and perform cleaning program. A questionnaire was prepared including several parameters following HACCP Guidelines (14); equipment conformity, cleaning and disinfection.

Samples collection:

Several handling sites of dairy products have been sampled using swabbing method before and after cleaning in place (CIP). Sampling sites were tank of raw milk, storage tanks of recombined milk before and after pasteurization, agitator's blades, elbows and packaging machine. Subsequently, the collected samples were kept cool until further bacteriological analysis.

Evaluating the cleaning in place effectiveness (Enumeration of total flora):

Samples were taken and prepared according to ISO 6887-1 (15) using wet swabbing technique on a surface of 10 cm² bounded by a sterile template using aseptic technique (9).

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. LI(3), 2018, TIMIȘOARA

These samples were enumerated for total mesophilic flora using Plate Count Agar (PCA) media for 72 hours of incubation at 30 °C according to AFNOR standard (3).

Results were expressed in colony-forming unit by cm² (CFU/cm²). The Log Kill before and after Cleaning in Place (CIP) was determined by using the following equation:

$$\text{Log Kill} = \text{Log } N - \text{Log } n \quad (1)$$

Where N is the count of cells of untreated surface (before CIP) and n is the count of cells after sanitizer treatment (after CIP) (34).

Isolation and identification of contaminant microorganisms:

Others swabbing were realized from following sites: raw milk tank, recombined milk storage tanks before and after pasteurization and packaging machine in order to isolate main contaminant bacteria.

Colonies were identified and biochemically characterized using standard and conventional microbiological techniques including Gram stain, catalase and coagulase tests (3). The identification was completed with API 20E and API Staph gallery (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (25).

Results and discussions

The cleaning in place practice was realized by the same operator, according to following protocol: a pre-rinsing with hot water followed by alkaline cleaning, inter-rinsing then an acid cleaning followed by a finally rinsing (Table 1).

Table 1

Composition and conditions of use of registered detergents

Detergent	Composition	Application	Conditions of application			
			Time (Min)	pH	C (%)	T (C°)
Alcalin Detergent (Proflow®)	Soda rich in chelating and surfactants	Soaking or circulation	15-20	≥12	1.5	60
Acide Detergent (Steriflow-P310®)	Strong acides and surfactants	Soaking or circulation	15-20	≤ 3	1.5	50

C = concentration ; T= temperature

The highest contamination was observed at milk tank (3.92 and 3.85 Log UFC/ml) probably partially explained by the fact this dairy received milk throughout the day that prevented the most effective form of the cleaning (Table 2).

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. LI(3), 2018, TIMIȘOARA

The highest rate of reduction (Log Kill) was recorded in milk tank, due the easy access but also by the fact that cleaning products stay longer in touch with the funds of storage tanks.

Bacteria isolates were mainly present in storage tanks (83.33 %). However, no difference was observed in number of bacteria before and after pasteurization. This clearly reveals that pasteurization was inefficient, probably due the misuse of heat but also cause the inefficacy of the CIP. This indicates that a detailed audit is necessary to undertake to determine exactly the cause of such a risk and to correct critical points.

Table 2

Enumeration of total flora before and after CIP

Sampling site	Total flora before CIP		Total flora after CIP		Log Kill (Log N-Log n)	Reduction (Log n/Log N)
	Samples Nb	Log N (UFC/cm ²)	Samples Nb	Log n UFC/ cm ²		
Raw milk tank	06	3.85± 0.59	03	2.06± 0.39	1.79	0.53
Storage tanks	13	3.92±0.54	09	2.31±0.52	1.61	0.41
Agitator's blades	04	3.30± 0.13	04	2.73±0.62	0.57	0.82
Bends	05	3.69± 0.54	04	2.74±0.23	0.95	0.74
Wrapping machine	02	3.25± 0.07	02	2.81± 0.58	0.44	0.86
Total	30		22			

The study showed composition of the microflora varied according to sampling sites. Isolation and identification of the contaminant germs revealed presence of common bacteria as well as pathogenic bacteria (Table 3).

Evaluation of CIP efficiency:

The results obtained after CIP (2.06-2.81 Log UFC/ cm²) were low compared with those revealed by Aneur et al. (4) (3.7-5.5), however they remain close to those obtained in India where values after CIP ranged from 1.25 Log UFC/cm² to 2.23 Log UFC/ cm² (4) (Table 2).

The reduction (Log Kill) varied between 0.44 and 1.79, remains close to those obtained by Malek et al. (01.23-2.36) (24) but were very low compared with those obtained by Sharma and Anand (31) (3.15-5.55) after recommended sanitation.

However, the lowest rates of reduction were observed at packaging machine followed by agitator's blades due to difficulty to clean these parts (10, 20).

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. LI(3), 2018, TIMIȘOARA

The presence of older biofilms led to increased contamination rates of various segments because older biofilms appear to be more resistant to the penetration of the cleaning and disinfection products than younger (6, 21).

It is recommended that an effective sanitizer should reduce the initial planktonic cell count by five or more Log units and attached cell counts by three or more Log units (34, 26). Therefore, these results show undertaken procedures of CIP were less effective, this could be explained by bacteria capacity to form deposits of organic and mineral stain as well as significant presence of biofilm resistant to disinfecting agents (19). Poor water bacteriological quality has effects on the results of the wash of tanks and other utensils (26).

Table 3

Type of microflora	Raw milk tank	Storage tank		Wrapping machine	Total (%)
		Before pasteurisation	After pasteurisation		
	Number of isolates				
<i>Micrococcus sp</i>	02	06	07	01	16 (29.62)
<i>Escherichia coli</i> 1	*	02	06	*	08 (14.81)
<i>Escherichia coli</i> 2	02	02	01	*	05 (9.25)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	*	03	02	*	05 (9.25)
<i>Staphylococcus auricularis</i>	*	*	01	*	01 (1.85)
<i>Staphylococcus aureus</i>	*	*	*	*	*
<i>Kluyvera spp</i>	*	01	01	*	02 (3.7)
<i>Shigella sp</i>	*	01	*	*	01 (1.85)
<i>Aeromonas gr1</i>	01	*	01	*	02 (3.7)
<i>Aeromonas gr2</i>	*	05	02	*	07 (12.96)
<i>Vibrio fluvialis</i>	01	01	02	*	04 (7.4)
<i>Providencia</i>	*	*	01	02	03 (5.55)
TOTAL	06 (11.11)	21 (38.88)	24 (44.44)	03 (5.55)	54 (100)

*: absence

Isolation and identification of contaminants germs:

Among isolated bacteria *Micrococcus sp* was predominant (29.62%) followed by *Escherichia coli* (24.07%) species while *Staphylococcus auricularis* and

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. LI(3), 2018, TIMIȘOARA

Shigella represent 1.85 %. Other isolates are non-pathogenic. . In this case, certain bacteria can persist, multiply in milk causing both economic and hygienic effects.

Several studies have shown that in dairy environments, the most commonly encountered bacteria belonged to *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Pseudomonas* genus (31, 35,29,1).

Persistence of *Micrococcus* sp in several dairy equipment can be explained not only by insufficient pasteurization but also by the fact that skin of mammals and food (especially dairy waste) are considered, as the main housing environment of *Micrococcus* (17, 2).

Several factors are involved in the growth and survival of *Escherichia coli* in dairy products: product characteristics (composition, A_w , acidity), heat treatment applied and initial rate of contamination in the unpasteurized milk (18).

Growth of bacterial biofilm on joints surface can also constitute a contamination source of the pasteurization lines (5). Thus, it can be either a post-pasteurization contamination (manufacturing equipment, personal), or an excessive contamination of the unpasteurized milk.

Several works reveal foodborne pathogens can enter the milk processing equipment by direct contact with contaminants in the dairy farm environment e.g. fecal contamination and udders of infected animal and through the water used in the milking machines what can explain presence of *Shigella* in dairy equipment (27).

Absence of *Staphylococcus aureus* of the surfaces of the dairy equipment is a good sign but does not imply necessarily their absence in dairy products. Indeed, enterotoxins that are remarkably stable can be present, resisting to irradiation, proteolytic enzymes and especially to the heat while the bacteria is destroyed (33). More important, these toxins could form complexes between them or with the food, preventing their detection after heat treatment while their biological activity persists (30).

Conclusions

Cleaning in place procedures in dairy processing aim the reduction or the eradication of microbes in most of the segments of processing lines. This work revealed presence of contaminant germs in dairy equipment even after performance procedures of Cleaning In Place. This indicates either microorganism's persistence in production lines and their capacity to form biofilms resistant to disinfecting agents or protocol of cleaning in place was not respected. Some recommendations were suggested to improve the efficiency of cleaning in place procedure; such compliance with main CIP parameters (temperature, contact time, mechanic action and concentration) as well as the hygiene of the operators,

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. LI(3), 2018, TIMIȘOARA

which must be irrefragable. Further studies are needed in order to estimate biofilms importance in production lines and their resistance to disinfecting agents.

References

1. **Aarnisalo, K., Lunden, J., Korkeala, H., Wirtanen, G.**, Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT- Food Sci Technol*, 2007, 40, 1041-1048.
2. **Abd-El-Malek, Y., Gibson, T.**, The staphylococci and micrococci of milk, *J Dairy Res*, 1948, 15, 249-260.
3. **AFNOR**. Microbiologie des aliments : dénombrement des microorganismes par comptage des colonies obtenues à 30 degrés Celsius- Méthode de routine, NF V08051, Paris, 1999, 8 p.
4. **Ameur, A., Rahal, K., Bouyoucef, A.**, Evaluation du nettoyage des tanks de réfrigération dans les fermes laitières de la région de Freha (Algérie), *Nat Technol*, 06, 2012, 80-84.
5. **Austin, J. W., Bergeron, G.**, Development of bacterial biofilms in dairy processing lines, *J Dairy Res*, 1995, 62, 509-519.
6. **Bolton, K. J., Dodd, C. E. R., Mead, G. C., Waites, W. M.**, Chlorine resistance of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants, *Lett Appl Microbiol*, 1988, 6, 31-34.
7. **Bonfoh, B., Roth, C., Traore, A. N., Fane, A., Simbe, C. F., Alfaroukh, I. O., Nicolet, J., Farah, Z., Zinsstag, J.**, Effect of washing and disinfecting containers on the microbiological quality of fresh milk sold in Bamako (Mali), *Food control*, 2006, 17, 153-161.
8. **Bremer, P. J., Fillery, S., Mcquillan, A.J.**, 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*, 2005, 106, 254-262.
9. **Charpentier, J.**, L'inspection du nettoyage et de la désinfection. In: J. Y. Leveau & M. Bouix M (Eds). *Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries*. Paris : Lavoisier Tec & Doc, 1999, 374-382.
10. **Dolabela-Costa, P., José Andrade, N., Cardoso Brandão, S. C., Vieira Passos, F. J., Ferreira Soares, N. F.**, ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless-steel milk contact surfaces. *Braz J Microbiol*, 2006, 37, 345-349.
11. **Feknous, N., Rahal, K., Bouyoucef, A.**, 2008. Contamination des citernes de collecte du lait cru, dans la région de la Mitidja. *Salon International des Biotechnologies Agro-alimentaires*, Algiers. Algeria, 2008.
12. **Flint, S. H., Bremer, P. J., Brooks, J. D.**, Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control, *Biofouling*, 1997, 11(1), 81-97.

13. **Gram, L., Bagge-Ravne, D., Ng, Y. Y., Gyomoese, P., Vogel, B. F.**, Influence of food spoiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*, *Food Control*, 2007, 18, 1165-1171.
14. **HACCP**. Guidelines, Lignes directrices sur le HACCP, les BPF et BPH pour les PME de l'ASEAN. Ed1. Programme CE-ASEAN de coopération économiques sur les normes, la qualité et l'évaluation de conformité. 2005.
15. **ISO 6887-1**. Microbiologie des aliments: préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique- Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales. Genève. 1999.
16. **Jessen, B., Lammert, L.**, Biofilm and disinfection in meat processing plants, *Int Biodeterior Biodegradation*, 2003, 51, 265-269.
17. **Kocur, M., Kloos, W.E., Schleifer, K.H.**, The Genus *Micrococcus*. In: *The Prokaryotes* (Editors: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E.), Springer, New York, 2006, 961-971.
18. **Kornacki, J. L., Marth, E. H.**, Foodborne illness caused by *Escherichia coli*: A review, *J Food Prot*, 1982, 45, 1051-1067.
19. **Lapidot, A., Romling, U., Yaron, S.**, Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley, *International J Food Microbiol*, 2006, 109, 229-233.
20. **Le Gentil, C., Sylla, Y., Faille, C.**, Bacterial contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures, *J Food Eng*, 2010, 96, 37-42.
21. **Lee, S. H., Frank, J. F.**, Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat, *J Food Prot*, 1991, 54, 4-6.
22. **Leefrileux, Y., Le Mens, P.**, Evaluation du pouvoir contaminant d'une machine à traire : Comparaison de 4 méthodes. PEP. Rhône Alpes, caprins, 2004, 26 p.
23. **M.A.D.R.** Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (Alger, Algérie). Le renouveau agricole et rural en marche : revue et perspectives, 2012, 95 p.
24. **Malek, F., Moussa-Boudjemâa, B., Khaouani-Yousfi, F., Kalai, A., Kihal, M.**, Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk, *Afr J Microbiol Res*, 2012, 6, 3836-3844.
25. **Marshall, R. T.** Standard methods for the examination of dairy products (16th ed.). American Public Health Association. New York, 1992, 159-164.
26. **Mosteller, T. M., Bishop, J. R.**, Sanitizer efficacy against bacteria in milk biofilm, *J Food Prot*, 1993, 56, 34-41.
27. **Oliver, S. P., Jayarao, B. M., Almeida, R. A.**, Food borne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications, *Foodborne pathog dis*, 2005, 2, 115-129.
28. **Ruegg, L., Reinemann, D., Hohmann, K.**, The Effect of Milking Management on Microbial Quality, XII Curso Novos Enfoques Na Producao e Reproducao de Bovinos. Uberlandia, Brazil, 2008, 6-8.

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. LI(3), 2018, TIMIȘOARA

29. **Salo, S., Ehavald, H., Raaska, L., Vokk, R., Wirtanen, G.**, Microbial surveys in Estonian dairies, *LWT - Food Science and Technology*, 2006, 39, 460-471.
30. **Schwabe, M., Notermans, S., Boot, R., Tatini, S. R., Kramer, J.**, Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment, *Int J Food Microbiol*, 1990, 10, 3-42.
31. **Sharma, M., Anand, S. K.**, Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy industry- a case, *Food Control*, 2002, 13(6-7), 469-477.
32. **Simoës, M. L., Simoës, C., Vieira, M. J.**, A review of current and emergent biofilm control strategies, *LWT- Food Sci Technol*, 2010, 43, 573-583.
33. **Tibana, A., Rayman, K., Akhtar, M., Szabo, R.** Thermal stability of staphylococcal enterotoxins A, B and C in a buffered system, *J Food Prot*, 1987, 50, 239-242.
34. **Van de Weyer, A., Devleeschhouwer, M. J., Dony, J.**, Bactericidal activity of disinfectants on *Listeria*, *J Appl Bacteriol*, 1993, 744, 480-483.
35. **Wiedmann, M., Weilmeir, D., Dineen, S. S., Ralyea, R., Boor, K. J.**, Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* sp. isolated from milk. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 2085-2095.

ملخص

في صناعة الألبان ، تكوين الأغشية الحيوية على الأسطح يمكن أن يؤدي ليس فقط إلى خسائر اقتصادية ولكن أيضًا إلى مشاكل صحية خطيرة وصحة الإنسان. ركزت الدراسة على منتجين للألبان يقعان في غرب الجزائر (منطقة تيارت) وكانت لها أهداف: كفاءة التنظيف في المكان، وعزل وتحديد الجراثيم الملوثة وكذلك تقييم القدرة على تكوين الأغشية الحيوية لهذا الغرض تم اتباع المنهجية التالية: التدقيق وأخذ العينات قبل التنظيف وبعده من أجل تقييم التلوث من مجموع الجراثيم، والبحث عن الجراثيم الملوثة وتحديد ما قبل التنظيف وبعده وتقييم القدرة على تكوين الأغشية الحيوية بشكل نهائي لبعض البكتريات باستخدام طريقتين (الزراعة الصفيحة وطريقة الأنبوب)

أظهرت دراسة كفاءة التنظيف أن الصودا والأحماض القوية تستخدم للتنظيف ، بينما كانت الإجراءات غير فعالة مع انخفاضات ميكروبية ملحوظة على مستوى الملينة الأولى (لوغاريتمات 0.44 إلى 1.79) مقارنة بالثانية (لوغاريتم 0.05 إلى 0.29)

اختلفت تركيبة البكتيريا الملوثة وفقًا لموقع أخذ العينات ، حيث غلبت البكتيريا الدقيقة (22.72٪) تليها المكورات العنقودية (27.27٪) والمكورات الدقيقة (29.62٪) تليها الإشريكية القولونية (24.06٪) ، على التوالي بالنسبة للملينة 1 و 2 ، 22 عزلت تم اختبارها ، 13.63٪ وجدت منتجة قوية للوحل ، تنتمي إلى جنس *Micrococcus* و *Pseudomonas* .

يجب أن يؤدي تطبيق إجراءات تنظيف أكثر صرامة إلى تقليل حدوث ذلك ، وبالتالي تقليل الإزعاج والمخاطر الكامنة

الكلمات المفتاحية: البيوفيلم ، البكتيريا ، صناعة الألبان ، التنظيف في المكان ، التطهير

RESUME

En industrie laitière, la formation de biofilms sur les surfaces peut conduire non seulement à des pertes économiques mais également à des sérieux problèmes d'hygiène et de santé humaine. L'étude a porté sur deux laiteries localisées à l'ouest Algérie (région de Tiaret) et visait 3 objectifs : efficacité du nettoyage en place, isolement et identification des germes contaminants ainsi que l'évaluation de la capacité de formation de biofilm. Pour ce faire la méthodologie suivante a été suivie : audit et prélèvement d'échantillons avant et après nettoyage en place en vue d'évaluer la contamination par la flore mésophile totale, recherche et identification des germes contaminants avant et après nettoyage en place et enfin évaluer la capacité de formation de biofilms de certains isolats par deux méthodes (culture en plaque et méthode en tube). L'étude de l'efficacité du nettoyage a montré que la soude et des acides forts sont utilisés pour le nettoyage, alors que procédures étaient peu efficaces avec des réductions microbiennes plus marquées au niveau de la première laiterie (Log 0,44 à Log 1,79) par rapport à la seconde (Log 0,05 à Log 0,29). La composition de la microflore de contamination variait selon le site de prélèvement, avec prédominance de *Micrococcus* (22,72%) suivi par *staphylococcus* (27,27 %) et *Micrococcus* (29,62%) suivi par *Escherichia coli* (24,06%), respectivement pour les laiteries 1 et 2. Parmi les 22 isolats testés, 13,63 % étaient forts producteurs de slime, appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Micrococcus*.

L'application de procédure de nettoyage plus rigoureuse devrait réduire l'occurrence et par conséquent, les inconvénients et les dangers inhérents.

Mots clés : Biofilm, bactéries, industrie laitière, nettoyage en place, désinfection.

ABSTRACT

In dairy industry, formation of biofilms on surfaces can lead not only to economic losses but also to serious hygiene and human health problems. The study focused on two dairies located in western Algeria (Tiaret region) and aimed 3 objectives: efficiency of cleaning in place, isolation and identification of contaminating germs as well as evaluation of the capacity for biofilm formation. For this, the following methodology was followed: audit and sampling before and after cleaning in place in order to assess the contamination by the total mesophilic flora, search and identification of contaminating germs before and after cleaning in place and finally assess the biofilm-forming capacity of some isolates using two methods (plate culture and tube method).

The study of the efficiency of cleaning showed that soda and strong acids are used for cleaning, while procedures were inefficient with more marked microbial reductions at the level of the first dairy (Log 0.44 to Log 1.79) compared to the second (Log 0.05 to Log 0.29). The composition of contaminating microflora varied according to sampling site, with predominance of *Micrococcus* (22.72%) followed by *staphylococcus* (27.27%) and *Micrococcus* (29.62%) followed by *Escherichia coli* (24.06%) , respectively for dairies 1 and 2. Among the 22 isolates tested, 13.63% were found strong producers of slime, belonging to *Pseudomonas* and *Micrococcus* genders. Applying more rigorous cleaning procedures should reduce the occurrence and therefore the inherent inconvenience and dangers.

Keywords: Biofilm, bacteria, dairy industry, cleaning in place, disinfection