



**République Algérienne Démocratique et Populaire**

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITE ABOUBAKR BELKAÏD – TLEMCE**

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



**Département de Biologie**

**MEMOIRE**

Présenté par :

***SOUIER Aymen***

En vue de l'obtention du diplôme de **MASTER en Sécurité agro alimentaire et assurance qualité**

**Thème**

***Effet Antimicrobien de *Cymbopogon winterianus* et *Juniperus phoenicea* sur *Bacillus cereus****

Soutenu le : 23 Juin 2024, devant le jury composé de :

**Présidente : Bey Fayza**

**Examinatrice : Boumediene Karima**

**Encadrante : Didouh Nassima**

**Année universitaire : 2023 – 2024**

## ***Remerciements***

La réalisation de ce travail a bénéficié du soutien combien inestimable de plusieurs personnes. Que ces personnes trouvent ici l'expression de notre plus grande reconnaissance.

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde gratitude à notre encadrante, **Didouh Nassima**, Maître de conférences classe A au département de Biologie à l'Université de Tlemcen, pour son encadrement, sa patience et sa confiance tout au long de ce travail de recherche. Ses précieux conseils, son expertise et son soutien inébranlable ont été d'une aide inestimable et ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail. Nous espérons que la confiance qu'elle nous a accordée et ce mémoire soient à la hauteur de ses espérances.

Nos remerciements s'adressent aux membres de notre honorable jury, pour avoir accepté d'expertiser et d'évaluer notre travail. Nous sommes honorées de l'a considération qu'ils ont apporté à cette étude.

De peur d'en avoir oublié, on souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de notre parcours universitaire.

## *Dédicaces*

Je dédie entièrement ce travail à **Ma Mère**, mon pilier, mon exemple, ma première supportrice et ma plus grande force. Merci pour ta présence, ton soutien inconditionnel et surtout ton amour, merci de n'avoir jamais douté de moi

À **Mon Père**, même si tu es parti trop tôt, ta présence et ta bienveillance continuent de guider chacun de mes pas. Tu restes à jamais dans mon cœur.

Tout ce que j'espère, c'est que vous soyez fiers de moi aujourd'hui.

À ma grande soeur **KAWTAR**, je tenais à t'exprimer toute ma gratitude pour ton incroyable soutien tout au long de la rédaction de mon mémoire

Un grand merci à mon frère **ABDELILAH**, à ma petite sœur **Hadjer** et pour leur amour et présence chaleureuse qui ont rendu cette période si précieuse.

A mon cher cousin : **Younes**

A mes amis : **Wail, Mourad, Islam, Rima, Romaiassa, lakhdar**

A toute ma famille **Souier**

## Résumé :

L'adhésion des spores de *Bacillus cereus* aux équipements de l'industrie laitière est un problème grave, qui entraîne la détérioration des aliments et, parfois, des épidémies de maladies d'origine alimentaire. Les huiles essentielles antimicrobiennes ont été proposées comme alternative aux désinfectants synthétiques en raison de leurs propriétés respectueuses de l'environnement. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet des huiles essentielles de *Cymbopogon winterianus* et de *Juniperus phoenicea* sur les spores planctoniques et adhérentes de *B. cereus* sur les surfaces en acier inoxydable. Onze souches de *B. cereus* ont été utilisées dans cette étude. La composition chimique des huiles de *C. winterianus* et de *J. phoenicea* a été analysée par chromatographie en phase gazeuse (GC)/spectrométrie de masse (MS). Quarante-deux composants ont été identifiés pour *C. winterianus*, les constituants les plus abondants étant le géranium (37 %), le néral (29 %), le bêta-myrcène (16 %) et le géraniol (4 %). Douze composants ont été identifiés pour *J. phoenicea*, l'alpha-pinène (65 %) étant le constituant le plus abondant. Les résultats de la concentration minimale inhibitrice et de la concentration minimale bactéricide ont révélé que *C. winterianus* était l'HE la plus efficace ( $p < 0,05$ ) contre les onze souches. En outre, il y a eu une forte réduction de  $\log_{10}$  (de 4,93 à 2,42 ;  $p < 0,05$ ) entre les spores sous forme planctonique et les spores adhérent à la surface en acier inoxydable. *C. winterianus* peut être utilisé pour détacher efficacement les spores de *B. cereus* capables d'adhérer et de former des biofilms sur les surfaces en acier inoxydable, ce qui constitue une alternative valable pour le développement d'un désinfectant naturel susceptible de réduire les effets négatifs des désinfectants chimiques synthétiques.

**Mots-clés :** *Bacillus cereus*, biofilm, citronnelle de Java, genévrier, huile essentielle, spores bactériennes, acier inoxydable.

## **Abstract**

Adherence of *Bacillus cereus* spores to dairy industry equipment is a serious problem, causing food spoilage and, occasionally, outbreaks of foodborne diseases. Antimicrobial essential oils (EOs) have been proposed as an alternative to synthetic disinfectants due to their environmentally friendly properties. The aim of this study was to assess the effect of *Cymbopogon winterianus* and *Juniperus phoenicea* EOs on planktonic and adherent *B. cereus* spores to stainless steel surfaces. Eleven strains of *B. cereus* were used in this study. The chemical composition of the *C. winterianus* and *J. phoenicea* oils was analyzed by gas chromatography (GC)/mass spectrometry (MS). Ninety components were identified for *C. winterianus*, being geranial (37%), geraniol (4%), beta-myrcene (16%) and neral (29%) the most abundant constituents. Twelve components were identified for *J. phoenicea*, being alpha-pinene (65%) the most abundant constituent. The results of the minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration revealed that *C. winterianus* was the most effective EO against all eleven strains. In addition, there was a large log<sub>10</sub> reduction (from 4.93 to 2.42) between spores in planktonic form versus spores adhered to stainless steel surface. *C. winterianus* can be used for effective detachment of *B. cereus* spores capable to adhere and form biofilms on stainless steel surfaces, being a valid alternative for the development of natural disinfectant that may reduce negative effects of synthetic chemical disinfectants.

**Keys word:** *Bacillus cereus*, biofilm, *Cymbopogon winterianus*, *Juniperus phoenicea*, essential oil, bacterial spores, stainless steel

## ملخص

يعد التصاق جراثيم العصيات الشمعية بالمعدات في صناعة الألبان مشكلة خطيرة ، مما يؤدي إلى تلف الطعام ، وفي بعض الأحيان ، تفشي الأمراض المنقولة بالغذاء. تم اقتراح الزيوت الأساسية المضادة للميكروبات كبديل للمطهرات الاصطناعية بسبب خصائصها الصديقة للبيئة. كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير الزيوت الأساسية لسيمبوجون وينتريانوس وجونيبيروس فينيسيا على جراثيم العوالم والالتصاق ب. سيربوس على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ. تم استخدام أحد عشر سلالة من ب.سيربوس في هذه الدراسة. تم تحليل التركيب الكيميائي لزيوت سي وينتريانوس و ج. فينيسيا بواسطة كروماتوغرافيا الغاز (غ/مطياف الكتلة (مس)). تم تحديد مكونات سي وينتريانوس ، المكونات الأكثر وفرة هي إبرة الراعي (37٪) ، نيرال (29٪) ، بيتا ميرسين (16٪) وجيرانبول (4٪). تم تحديد اثني عشر مكوناً لـ ج.فينيسيا ، ألفا بينين (65٪) كونها المكون الأكثر وفرة. كشفت نتائج الحد الأدنى من التركيز المثبط والحد الأدنى من تركيز الجراثيم أن سي وينتريانوس كان الأكثر فعالية هو ( $0.05 > \text{ص}$ ) ضد السلالات الإحدى عشرة. بالإضافة إلى ذلك ، كان هناك انخفاض قوي في اللوغار10 (من 4.93 إلى 2.42 ؛  $0.05 > \text{ص}$ ) بين الجراثيم في شكل العوالم والجراثيم الملتصقة بسطح الفولاذ المقاوم للصدأ. يمكن استخدام وينتريانوس لفصل جراثيم ب بشكل فعال. سيربوس قادر على الالتصاق وتشكيل الأغشية الحيوية على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ ، مما يشكل بديلاً صالحاً لتطوير مطهر طبيعي قادر على تقليل الآثار السلبية للمطهرات الكيميائية الاصطناعية.

**الكلمات الرئيسية:** عصية سيربوس ، جافا الليمون ، العرعر ، ، الجراثيم البكتيرية ، الفولاذ المقاوم للصدأ

## Table de matière

<b>Introduction generale</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b>	
1 Introduction .....	5
2 Le genre <i>Bacillus</i> et sa pathogénicité .....	5
3 Spores de <i>Bacillus cereus</i> : .....	6
4 Le biofilm de <i>Bacillus cereus</i> .....	7
5 Moyen d'élimination des biofilm (Nettoyage et désinfection).....	10
5.1 Nettoyage .....	10
5.2 Désinfection .....	10
5.3 Traitements Physiques : .....	10
5.4 Approches Combinées.....	11
6 Elimination des biofilm de <i>Bacillus cereus</i> par les huiles essentielles : .....	11
<b>Matériel et méthodes</b>	
1 Origine des souches bactériennes : .....	13
2 Les huiles essentielles : .....	13
2.1 .Matériel végétal : .....	13
2.2 Extraction .....	13
2.3 Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (CG/SM) ....	14
3 Activité antimicrobienne .....	15
4 Préparation de la suspension de spores.....	16
5 Test antispoires .....	16
6 Coupons en acier inoxydable.....	17
7 Préparation des spores attachées.....	17
8 Dénombrement des spores adhérentes viables .....	17
9 Traitement des spores adhérentes avec des huiles essentielles.....	17
10 Données et analyses statistiques : .....	18
<b>Résultats et discussion</b>	
1 Analyse GC-MS des huiles essentielles de <i>C. winterianus</i> et de <i>J. phoenicea</i> ....	20
2 Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	20
3 Activité anti-spoires des HE .....	21
4 Traitements des spores adhérentes avec des huiles essentielles .....	21
<b>Conclusion générale</b> .....	28
<b>Références bibliographiques</b> .....	30
<b>Annexes</b> .....	43

## Liste des abreviations :

ATP : Adénosine triphosphate  
*B. cereus* : *Bacillus cereus*  
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute  
CMB : Concentration minimale bactéricide  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice  
FID : ionisation de flamme  
GC : Chromatographie en phase gazeuse  
HBL : hemolysine BL  
HE : huile essentielle  
HNO<sub>3</sub> : Acide nitrique  
K : la cytosine  
LR : la réduction logarithmique  
MS : Spectrométrie de Masse  
NaOH : Hydroxyde de sodium  
NHE : lenterosine non hemolytique  
NIST : National Institute of Standards and Technology  
NRPS : Protéine Synthase non Ribosomale  
PCR : réaction de polymérase en chaîne  
UFC : Unité Formant Colonie  
UV : ultra violet

### Liste des figures :

- Figure 1:a)Formation de spores par *B. cereus* formant des endospores. En cas de conditions d'environnement défavorable, la cellule végétative se différencie et permet la morphogenèse des spores. Les spores matures sont libérées et germé pour donner naissance à une cellule végétative dans des conditions favorables.b)shéma diagramme de la structure des sporés bactériennes(Vidic *et al* .,2020)..... 7
- Figure 2:La synergie entre la formation de biofilm, la production de toxine et la formation de sopes de *Bacillus cereus* (Huang *et al.*, 2022). .....9

### Liste des tableaux :

Tableau 1:Composition d'huile essentielle de Cymbapagonwinterianus d'Algérie identifiée par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. ....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 2:Composition d'huile essentielle de Genévrier Phénique d'Algérie identifiée par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 3:Inhibition de la zone (mm  $\pm$ écart type) des souches bactériennes en présence d'huiles essentielles. ....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 4:Concentration minimale inhibitrice (MIC $\pm$  écart-type) et concentration minimale bactéricide (MBC $\pm$  écart-type) des huiles essentielles de Cymbapagon, d'hiver et de Genévrier phénique. ....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 5:Activité antispore (réduction log<sub>10</sub> des spores viables $\pm$  écart type) des huiles essentielles de Cymbapagon, d'hiver et de Genévrier phénique (à concentration minimale inhibitrice) sur les spores de Bacillus cereus. ....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 6:Activité anti spores (réduction log<sub>10</sub> des spores viables = écart type) de l'huile essentielle de Cymbapagonwinterianus (à concentration minimale inhibitrice) sur les spores de Bacillus cereus ajoutées aux coupons en acier inoxydable. ...**Erreur ! Signet non défini.**



---

## **Introduction generale**

---

**L**es intoxications alimentaires sont souvent causées par la bactérie sporulée *Bacillus cereus*. En raison de ses taux de contamination élevés et de sa capacité à produire des toxines, comme le céréulide, *B. cereus* présente un risque pour la sécurité de l'industrie laitière (Zhao *et al.*, 2020 ; Jessberger *et al.*, 2020 ; Malek, 2023). Les spores de *B. cereus* sont tellement dispersées et résistantes à la chaleur qu'elles ne peuvent pas être complètement éliminées de l'environnement. Elles pourraient donc perdurer dans les installations de transformation (Majed *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2024). La possibilité de formation de céréulides dans l'environnement de transformation est accrue par la capacité des spores survivantes à se transformer en cellules végétatives (Yang *et al.*, 2023). La contamination croisée entre l'équipement de transformation des aliments et les produits alimentaires se produit lorsque les spores bactériennes sont maintenues sur les surfaces en acier inoxydable utilisées dans la transformation des aliments. Les laiteries et d'autres industries du secteur alimentaire utilisent des surfaces sur lesquelles les cellules végétatives et les spores bactériennes peuvent adhérer (Fan *et al.*, 2021). Les bactéries peuvent développer des biofilms comme structures de croissance d'autodéfense, ce qui augmente le risque de contamination post-traitement, d'épidémies et d'autres problèmes de santé publique. Étant donné que les biofilms fonctionnent comme des barrières empêchant ou réduisant le contact avec les contraintes environnementales et les produits chimiques antimicrobiens, il est difficile d'éradiquer les biofilms apparaissant sur les surfaces et les équipements utilisés dans les industries alimentaires (Zhu *et al.*, 2022).

Le taux d'épidémies liées au lait et aux produits laitiers a considérablement diminué au cours des dernières décennies grâce à l'amélioration des pratiques d'assainissement et de désinfection. Dans la pratique, les technologies basées sur la lumière, le traitement thermique, les UV pulsés et la lumière pulsée peuvent tous être mentionnés comme de bonnes alternatives (Koutchma *et al.*, 2020). D'autre part, avec la prise de conscience environnementale dans le monde entier, les technologies et procédures vertes ont commencé à se développer de manière significative. Plusieurs secteurs choisissent les huiles essentielles (HE) d'origine végétale et leurs composants bioactifs comme désinfectants en raison de leurs puissantes propriétés antimicrobiennes, antivirales, antimycosiques, antitoxigènes, antiparasitaires et antibiofilm (Orhan-Yanikan *et al.*, 2019). La compréhension des

composants bioactifs des HE et de leur activité antibactérienne contre les microbes nécessite une recherche à la fois quantitative et qualitative (de Araújo *et al.*, 2021).

Une technique courante pour analyser le contenu des HE est la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (GC-MS) (Mothana *et al.*, 2013). Les composants volatils actifs des extraits d'huile sont principalement responsables de leur activité biologique, et l'analyse de la composition clarifie l'activité biologique (Spyridopoulou *et al.*, 2019).

En conséquence, l'approche analytique GC-MS peut être utilisée pour prédire les biomolécules actives des HE, telles que le docosane, les esters, les terpènes et les terpénoïdes, avec une activité antimicrobienne. Le mode d'action des HE a été principalement associé à leur capacité à adhérer aux membranes des cellules bactériennes et à les déstabiliser grâce aux composés phénoliques qu'elles contiennent. On a observé que les HE et leurs ingrédients actifs pénètrent et s'accumulent facilement dans la bicouche lipidique des membranes cytoplasmiques en raison de leur caractère lipophile. Par la destruction du système de transport d'électrons ou l'inactivation de mécanismes enzymatiques, elles s'alignent entre les chaînes d'acides gras des membranes cellulaires, provoquant la déstabilisation et la dégradation des différentes couches (Bhavaniramya *et al.*, 2019 ; Burt, 2004 ; Dhifi *et al.*, 2016 ; de Oliveira *et al.*, 2010 ; Swamy *et al.*, 2016). Selon Sumayya *et al.* (2020), les effets bactéricides des terpénoïdes peuvent être causés par le blocage de la création de molécules vitales telles que les protéines, les acides nucléiques, les composants de la paroi cellulaire, la perturbation de la membrane cellulaire, la réplication de l'ADN bactérien ou la suppression des processus métaboliques. On sait également que les terpènes peuvent provoquer la rupture de l'assemblage des lipides de la paroi cellulaire bactérienne, ce qui peut entraîner la dénaturation des protéines cellulaires, la désintégration de la membrane cellulaire et la fuite de matériel cytoplasmique, tous ces phénomènes pouvant conduire à la lyse et à la mort de la cellule (Fisher *et al.*, 2008).

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette étude était double. Le premier objectif était de déterminer la composition chimique et d'évaluer l'activité antimicrobienne des HE de *Cymbopogon winterianus* (communément appelé citronnelle de Java) et de *Juniperus phoenicea* (communément appelé genévrier) par GC-MS. Ces plantes sont faciles à trouver dans la région méditerranéenne, y compris en Algérie, et dans d'autres régions du monde. Le deuxième objectif était de développer une stratégie

efficace pour détacher les spores de *B.cereus* des surfaces en acier inoxydable à l'aide d'HE pour des applications potentielles de désinfection des surfaces alimentaires par des composés non synthétiques. À ce jour, aucune étude n'a été menée sur l'activité antispores des huiles essentielles de *C. winterianus* et de *J.phoenicea* contre les spores de Bacillus adhérent aux surfaces alimentaires en acier inoxydable.

Le manuscrit sera organisé en trois parties.

Dans la première partie relative à la synthèse bibliographique nous aborderons après un historique, sur le biofilm de *Bacillus cereus*, la spore, et l'élimination des biofilms

La deuxième partie sera consacrée à la description de la méthodologie et la dernière partie sera consacrée aux résultats et leurs discussions

---

# **Synthèse bibliographique**

---

### 1 Introduction

Le groupe *Bacillus cereus* (*B. cereus sensu lato*) se compose de plusieurs espèces bactériennes sporulées à Gram-positives, largement répandues dans la nature sous forme de spores et de cellules végétatives (Liu *et al.*, 2017; Bianco *et al.*, 2021). Les spores contribuent grandement à la large distribution de ces bactéries dans de nombreux environnements pour leur résistance aux températures extrêmes et au pH, aux rayonnements UV et à la présence d'enzymes lytiques et de produits chimiques toxiques. La spore au repos germe lorsque les conditions environnementales permettent la croissance cellulaire et donne naissance à de nouvelles cellules végétatives capables de croître par fission binaire et éventuellement sporuler à nouveau (McKenney *et al.*, 2013).

### 2 Le genre *Bacillus* et sa pathogénicité

La taxonomie du groupe de *B. cereus* est complexe et évolue rapidement. Basé sur des études récentes (Liu *et al.*, 2017; Carrol *et al.*, 2021), le groupe comprend trois espèces bien caractérisées et plusieurs espèces beaucoup moins étudiées. *B. cereus sensu stricto* (*B. cereus*), responsable de deux types de maladies d'origine alimentaire, *B. thuringiensis*, produisant des inclusions cristallines parasporales constituées de protéines à activité insecticide et *B. anthracis*, l'agent de l'anthrax chez l'homme et l'animal. Les espèces moins étudiées du groupe comprennent *B. mycoides* et *B. pseudomycoides*, formant des colonies rhizoïdales sur milieux solides, le psychrotolérant *B. weihenstephanensis*, le probiotique animal *B. toyonensis*, le psychrotolérant et cytotoxique *B. wiedmannii*, le thermotolérant et occasionnellement pathogène *B. cytotoxicus* et plusieurs autres espèces récemment identifiées (Liu *et al.*, 2017; Carrol *et al.*, 2021).

*B. cereus* est une cause majeure d'épidémies d'origine alimentaire (Glasset *et al.*, 2016) et responsable de deux types d'intoxications : le syndrome gastro-intestinal émétique et le syndrome diarrhéique. De plus, *B. cereus* est également impliqué dans les infections nosocomiales non gastro-intestinales chez les patients immunodéprimés (Messelhäuser et Ehling-Schulz, 2018). Ces infections sont souvent causées par la formation de biofilms sur les dispositifs biomédicaux (Lin *et al.*, 2022) et comprennent la septicémie, la méningite, les abcès cérébraux, les infections de type

gangrène gazeuse, la pneumonie, les infections oculaires graves et la bactériémie chez les nouveau-nés prématurés (Jovanovic *et al.*, 2021). La gravité des maladies causées par certaines souches de *B. cereus* rend important de faire la distinction entre les souches pathogènes et non pathogènes. Cette discrimination repose généralement sur l'analyse de plusieurs locus génétiques qui codent pour des toxines et ont été sélectionnés comme marqueurs. Il s'agit notamment de la toxine émétique céréulide résistante à la chaleur, synthétisée par une Protéine Synthase Non ribosomale (NRPS) codée par le locus du gène *ces*, la hémolysine BL codée par les gènes *hbl*, l'entérotoxine non hémolytique codée par les gènes *nhe* et la cytotoxine K codée par le gène *cytK* (Owusu-Kwarteng *et al.*, 2017; Jovanovic *et al.*, 2021).

### **3 Spores de *Bacillus cereus* :**

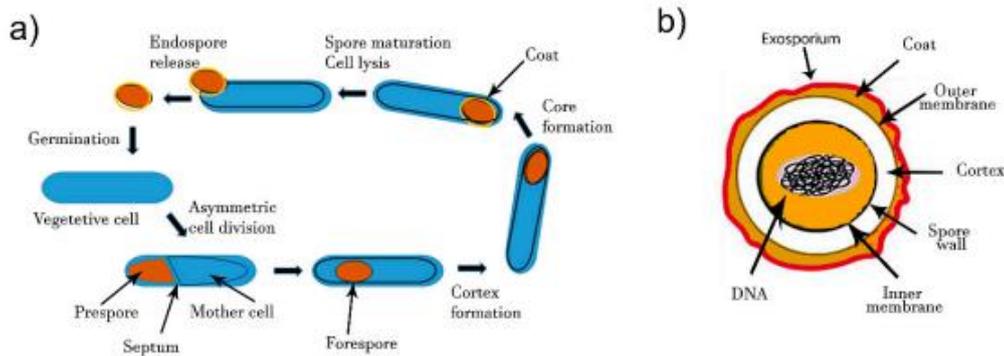
La réponse adaptative des cellules de *Bacillus* aux contraintes environnementales inclut la formation d'endospores, une stratégie vitale pour leur survie (Sonenshein *et al.*, 2000). Ces structures, produites à l'intérieur des cellules mères, permettent à la bactérie de passer en état de dormance prolongée en absence de nutriments, jusqu'à ce que les conditions favorables pour la germination se présentent (Luu *et al.*, 2015).

Le processus de sporulation débute par la phosphorylation du régulateur transcriptionnel clé, *spo0A*, en réaction à des signaux de privation alimentaire. Cette cascade de phosphorylation, amorcée par l'auto-phosphorylation de la kinase *Spo0F* et suivie par *spo0A*, conduit à l'activation de *spo0A*, qui régule l'expression d'une multitude de gènes essentiels à la sporulation.

Outre les facteurs génétiques, la composition minérale du milieu joue un rôle déterminant dans ce processus, le manganèse étant crucial pour la sporulation chez les bactéries du genre *Bacillus* (Charney, 1951)

La formation des endospores commence par une division cellulaire asymétrique et l'isolement de l'ADN, formant ainsi un précurseur appelé *axospore*. Le dipicolinate de calcium stabilise cette structure. Ensuite, la synthèse du cortex peptidoglycane entre les couches et la formation de la couche externe de spores complètent le processus. L'ensemble de cette maturation, suivie de la libération des spores par la lyse des cellules mères, prend environ 8 heures.

Les endospores sont caractérisées par plusieurs couches protectrices, (figure 1), notamment une couche de cortex peptidoglycane leur conférant une résistance accrue aux températures élevées. (Setlow, 2003). De plus, les protéines présentes dans les spores, telles que les protéases, les lyases, les endonucléases et les protéines de choc thermique, contribuent également à leur résilience face aux conditions environnementales adverses (Zheng *et al.*, 2016).



**Figure 1:a)Formation de spores par *B. cereus* formant des endospores. En cas de conditions d'environnement défavorable, la cellule végétative se différencie et permet la morphogenèse des spores. Les spores matures sont libérées et germé pour donner naissance à une cellule végétative dans des conditions favorables.b) schéma diagramme de la structure des spores bactériennes(Vidic *et al.*,2020)**

La structure et les propriétés fonctionnelles de la spore sont également fortement affectées par d'autres conditions de croissance et de sporulation telles que la composition du milieu, la température, le pH et l'activité de l'eau (Abee *et al.*, 2011). Chez *B. cereus*, cela se produit généralement dans une plage de températures de 10 à 50°C avec une température optimale comprise entre 30 et 40°C, et la température de croissance influence la taille et la morphologie des spores. La taille et la morphologie, à leur tour, influencent les propriétés fonctionnelles de la spore, les plus grandes présentant moins de résistance aux produits chimiques et celles entourées de longs appendices apparaissant plus adhésives que celles dépourvues de telles structures (Tauveron *et al.*, 2006).

#### 4 Le biofilm de *Bacillus cereus*

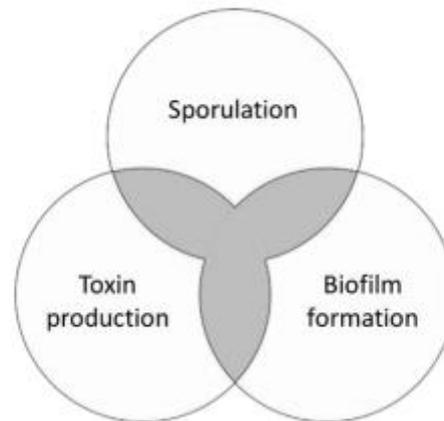
Les souches productrices de toxines de *B. cereus* sont particulièrement préoccupantes pour la santé publique en raison de leur capacité à former des biofilms et des spores. Le biofilm et la formation de spores sont tous deux des stratégies de survie pour *B.*

*cereus* face à des conditions environnementales défavorables. Le biofilm augmente à la fois les propriétés de résistance des cellules et des spores et leur adhérence aux surfaces, jouant ainsi un rôle important dans la contamination des aliments, la transformation des aliments et les équipements cliniques (Huang *et al.*, 2020).

*Bacillus cereus* est célèbre pour former des biofilms, qui servent de source de contamination alimentaire lors de la production et de la transformation des aliments (Shaheen *et al.*, 2010). *B. cereus* peut former différents types de biofilms dans différentes conditions de croissance (Wijman *et al.*, 2007) et généralement composé de protéines, de glucides et d'ADN (Wagner *et al.*, 2009; Karunakaran et Biggs, 2011). Les cellules des biofilms établis peuvent produire des spores (Ryu et Beuchat, 2005; Wijman *et al.*, 2007; Faille *et al.*, 2014) et celles-ci présentent des propriétés distinctes par rapport aux spores dérivées de cellules planctoniques (Abee *et al.*, 2011), apparaissant plus grandes, plus résistantes à la chaleur (Van der Voort et Abee, 2013). Les biofilms sont des colonies microbiennes adhérentes à des surfaces (Flemming *et al.*, 2016), souvent décrits comme une stratégie de survie pour *B. cereus* en réponse aux stress environnementaux défavorables (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). D'autres éléments, comme un métabolisme réduit et des taux élevés de transfert d'ADN intracellulaire, procurent plusieurs avantages aux biofilms par rapport aux cellules planctoniques (Chmielewski et Frank, 2003; Davies, 2003). *B. cereus* est capable de former différents types de biofilms, que ce soit dans des conditions statiques ou de flux, comprenant les biofilms à interface air-liquide, les biofilms immergés et les pellicules flottantes (Wijman *et al.*, 2007; Hayrapetyan *et al.*, 2015) Hussain et Oh, 2017). Des méthodes physiques et chimiques peuvent être employées pour perturber et décomposer la matrice du biofilm afin d'éliminer les biofilms de la surface (Gopalet *et al.*, 2015), en combinaison avec l'utilisation de désinfectants pour éliminer tous les micro-organismes restants sur la surface (Simões *et al.*, 2010; Galié *et al.*, 2018).

La sporulation, la production de toxines et la formation de biofilm chez *B. cereus* ont été l'objet de plusieurs recherches approfondies. Cependant, il existe un manque d'informations sur le rôle de la formation de biofilm, de la production de toxines et de la formation de spores et leur possible corrélation chez *B. cereus*, comme décrit dans la Fig. 2. Une meilleure compréhension de la synergie potentielle entre la formation

de biofilm, la production de toxines et la formation de spores peut être essentielle pour évaluer les risques dans le domaine de la production alimentaire.



**Figure 2: La synergie entre la formation de biofilm, la production de toxine et la formation de spores de *Bacillus cereus* (Huang et al., 2022).**

Les biofilms de *B. cereus* sont principalement composés de cellules végétatives, mais ils peuvent également générer des spores pendant leur maturation et leur vieillissement. Ces biofilms pourraient agir comme un réservoir de spores, ce qui pourrait contaminer les produits alimentaires. Néanmoins, des incertitudes persistent quant au rôle exact des biofilms dans la promotion de la sporulation par rapport à la croissance planctonique. Les niveaux de sporulation dans les biofilms varient selon les études, allant de 0,01 à 90% des cellules totales, ce qui peut dépendre de facteurs tels que la souche et les conditions environnementales telles que l'humidité relative et la densité cellulaire.

Les spores dérivées des biofilms présentent des caractéristiques distinctes de celles des cellules planctoniques, telles qu'une résistance accrue à la chaleur et des capacités de germination différentes. Cependant, les mécanismes sous-jacents à ces différences ne sont pas entièrement compris. Les spores de *B. cereus* issues de biofilms peuvent être plus résistantes aux stress environnementaux, tels que les désinfectants utilisés dans l'industrie alimentaire, et peuvent avoir une germination plus lente, ce qui pourrait contribuer à la résistance des biofilms aux processus de nettoyage et de désinfection.

En résumé, bien que les biofilms de *B. cereus* puissent représenter une source potentielle de contamination alimentaire par les spores, les mécanismes précis

régissant la sporulation dans les biofilms et les caractéristiques des spores produites nécessitent une étude plus approfondie (Hung *et al.*, 2020).

### **5 Moyen d'élimination des biofilm (Nettoyage et désinfection)**

La lutte contre les biofilms représente un défi majeur dans différents domaines tels que l'industrie alimentaire, médicale et industrielle. Les biofilms désignent des groupes de micro-organismes qui se fixent sur des surfaces et sont entourés d'une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS), ce qui les rend difficiles à éliminer par les méthodes traditionnelles de nettoyage et de désinfection (Donlan *et al.*, 2002).

#### **5.1 Nettoyage**

Le nettoyage est une combinaison d'actions visant à éliminer les contaminants des surfaces de l'équipement ou des matériaux, en utilisant des moyens chimiques et physiques (Sansebastiano *et al.*, 2007a).

Il est possible d'utiliser des détergents et des agents enzymatiques afin de détruire la matrice des biofilms et de faciliter l'action des désinfectants (Simões *et al.*, 2010). Les enzymes telles que les protéases et les DNases se distinguent par leur capacité à décomposer les éléments de la matrice EPS (Flemming *et al.*, 2010).

#### **5.2 Désinfection**

La désinfection consiste à éliminer les microorganismes pathogènes, les virus et les bactéries présents sur un substrat spécifique, que ce soit sous forme végétative ou chimique, en utilisant des produits chimiques ou physiques (Sansebastiano *et al.*, 2007b).

On utilise fréquemment des désinfectants tels que le chlore, les peroxydes, les quats (ammoniums quaternaires) et les alcools afin de détruire les micro-organismes présents dans les biofilms (Mah *et al.*, 2001). Néanmoins, leur performance peut être restreinte en raison de leur pénétration à travers la matrice EPS (Stewart *et al.*, 2001).

#### **5.3 Traitements Physiques :**

Il est possible d'utiliser des méthodes telles que l'ultrason, les rayons UV et les traitements thermiques afin de perturber les biofilms et de les rendre plus vulnérables

aux désinfectants (Wang *et al.*, 2017). Les ultrasons ont la capacité de dissoudre la matrice des biofilms, tandis que les rayons UV ont la capacité de tuer les micro-organismes en altérant leur ADN (Park *et al.*, 2018).

### 5.4 Approches Combinées

La combinaison de techniques mécaniques et chimiques est généralement la plus performante (Bremer *et al.*, 2006). Par exemple, il est possible de procéder à un nettoyage mécanique afin de retirer une partie du biofilm, puis de procéder à un traitement chimique pour éliminer les micro-organismes restants (van Houdt *et al.*, 2010).

## 6 Élimination des biofilm de *Bacillus cereus* par les huiles essentielles :

L'élimination des biofilms de *Bacillus cereus* par les huiles essentielles est l'utilisation de composés volatils extraits de plantes pour décomposer et éliminer les agrégations cellulaires formées par les bactéries *Bacillus cereus*. Les huiles essentielles sont des mélanges concentrés d'extraits de plantes, souvent utilisés pour leurs propriétés antimicrobiennes.

Des études ont montré que certaines huiles essentielles, telles que l'huile essentielle de thym, de cannelle, de teatree (arbre à thé), de menthe poivrée et d'eucalyptus, peuvent avoir des effets inhibiteurs sur la croissance des biofilms bactériens, y compris ceux formés par *Bacillus cereus*. Ces huiles essentielles peuvent perturber la formation du biofilm, détruire les cellules bactériennes et empêcher leur adhésion aux surfaces.

Il convient de noter que l'efficacité des huiles essentielles dans l'élimination des biofilms peut varier en fonction de divers facteurs tels que la concentration de l'huile essentielle, le type de biofilm et les conditions environnementales. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les mécanismes exacts d'action des huiles essentielles sur les biofilms bactériens et pour optimiser leur utilisation dans des applications pratiques telles que le contrôle des contaminations alimentaires et des infections nosocomiales (Renata *et al.*, 2009).

---

## **Matériel et méthodes**

---

### **1 Origine des souches bactériennes :**

Onze souches de *B. cereus* ont été obtenues à partir de la collection du Laboratoire de microbiologie alimentaire et environnementale (Université de Tlemcen, Algérie).

Elles sont issues de notre collection de *Bacillus* isolés des chaînes de transformation des produits laitiers algériens et ont été caractérisées précédemment en présentant des caractéristiques physicochimiques de surface distinctes des spores et une capacité à former des biofilms sur des surfaces en acier inoxydable (Didouh *et al.*, 2015).

Les gènes du potentiel pathogène codant pour l'hémolysine, l'entérotoxine non hémolytique, la cytotoxine K et la toxine émétique ont été analysés par PCR. La phylogénie et les marqueurs génétiques de la résistance aux antimicrobiens et de la virulence ont été analysés à partir des données de séquençage du génome entier à l'aide de la technologie Illumina MiSeq®, confirmant des caractéristiques génomiques distinctes pour chaque souche (Didouh *et al.*, 2023a).

### **2 Les huiles essentielles :**

#### **2.1 .Matériel végétal :**

Les plantes de citronnelle de Java et de genévrier ont été identifiées par des botanistes experts de l'autorité régionale de conservation des forêts. Les spécimens de *Cymbopogon winterianus* Jowitt, récoltés en mars 2022 à Masr, Boussada, Algérie, ont été transportés vers l'installation d'extraction d'huile essentielle de Bordj Bou Arreridj, Algérie.

La méthode recommandée consiste à utiliser 90 % de la partie aérienne (feuilles) de la citronnelle de Java. En ce qui concerne la récolte de *Juniperus phoenicea*, effectuée en février 2022 à L'Ache, Bordj Bou Arreridj, Algérie, les échantillons ont également été acheminés vers l'unité d'extraction d'huile essentielle de la même région. Dans ce cas, 60% des touffes (branches, feuilles) ont été utilisées pour l'extraction.

#### **2.2 Extraction**

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée sur les parties aériennes des branches de citronnelle de Java (*Cymbopogon winterianus*) et de genévrier (*Juniperus phoenicea*) à la distillerie située à Bordj Bou Arreridj en utilisant la technique de distillation à la vapeur d'eau. L'unité de distillation était composée d'une chaudière à vapeur (Smir 01300 Ref 09077347 ) séparée de l'alambic, d'une cuve contenant les plantes à distiller, d'un condenseur avec refroidisseur, et d'un séparateur d'essences

pour récupérer les produits de la distillation (HE et hydrolat) pendant 2h et 6h pour la citronnelle de Java et le genévrier respectivement.

La durée de la distillation a été prolongée pour permettre la collecte complète des molécules aromatiques à une pression variant entre 0,05 et 0,10 bars. Il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée pour extraire les molécules volatiles des plantes aromatiques (Baser & Buchbauer, 2015).

La matière végétale n'est pas séparée de l'eau, mais la vapeur générée par une chaudière traverse la matière végétale de bas en haut, provoquant la rupture des cellules et entraînant avec elle les molécules volatiles. L'intérêt de cette technique réside dans le fait qu'elle évite l'utilisation de solvants, ce qui permet d'obtenir des HE pures, sans résidus de solvants potentiellement nocifs. En outre, la distillation à la vapeur d'eau préserve les propriétés aromatiques et thérapeutiques des plantes puisqu'elle n'utilise que la vapeur d'eau pour extraire les composés volatils.

Cette méthode est donc respectueuse de l'environnement et peut être utilisée en toute sécurité dans diverses applications, notamment l'aromathérapie, les cosmétiques et la parfumerie (Launay & Bruneton, 2016).

### **2.3 Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (CG/SM)**

Les analyses ont été effectuées à l'aide de deux instruments différents : un GC/MS Agilent 7890 / 5977 avec une colonne VF WAX (polaire) de 60 m \* 0,25 mm \* 0,25 µm (cet instrument est équipé d'un détecteur MS couplé au GC), et un GC/FID Agilent 6890 avec la même colonne (cet instrument est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID)).

Le détecteur MS a été utilisé pour la correspondance des fragments MS avec la bibliothèque interne et la liste MS du National Institute of Standards and Technology (NIST) et le second détecteur a été utilisé pour sa bonne sélectivité, sa linéarité et les valeurs supérieures élevées de la plage de travail, de sorte que les zones de pics du FID ont servi à la quantification.

Le programme de température consistait en une phase initiale de 5 minutes à 60°C, suivie d'une rampe de 2°C/min jusqu'à 250°C, et d'une phase finale de 15 minutes à 250°C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur, à une pression de 23 psis pour le MS et de 30 psis pour le FID.

L'injection a été réalisée avec 1 µl d'une solution à 10% dans l'hexane. La gamme de masse analysée allait de 30 à 350, et les composés ont été identifiés en combinant les temps de rétention et les spectres de masse à l'aide d'une bibliothèque interne et de la bibliothèque commerciale du NIST.

Les deux identifications ont offert un niveau de confiance élevé lorsque les spectres de masse correspondaient aux composés étudiés avec un score supérieur

A 95 %. Les pourcentages ont été calculés sans recourir à des facteurs de correction, sur la base des surfaces des pics fournies par le GC/FID. La limite d'identification des pics était de 0,01 %.

### **3 Activité antimicrobienne**

L'activité antimicrobienne de l'HE a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion sur disque d'agar (Valková *et al.*, 2021). Brièvement, 11 souches de *B. cereus* ont été cultivées dans le bouillon Mueller-Hinton (Liofilchem, Italie) à 30°C pendant une nuit et la gélose Mueller-Hinton (MHA) a été inoculée avec une suspension microbienne des souches testées à 0,5 McFarland (Fluka, Suisse).

Les disques de papier filtre (6 mm) ont ensuite été imprégnés de 10 µl d'HE. Les bactéries ont été incubées en aérobiose pendant 24 h à 30°C. Les diamètres des zones d'inhibition (en mm ; la distance du diamètre entier a été prise en compte) ont été mesurés immédiatement après l'incubation à l'aide d'un double décimètre et l'intensité de l'activité antimicrobienne a été exprimée comme suit : activité antimicrobienne faible (5-10 mm) ; activité antimicrobienne modérée (5-10 mm) ; et activité antimicrobienne très forte (zone > 15 mm) (figure supplémentaire S1).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque HE a été étudiée par la méthode de dilution en micropuits selon les directives du CLSI (2012, 9e édition). Chaque puits a été inoculé avec 100 µl de bouillon de Muller-Hinton. Ensuite, 100 µl pour chaque HE ont été mélangés à 100 µl de bouillon de Muller-Hinton déposés dans 1 puits pour obtenir une dilution de 1/2. Ensuite, 100 µl du premier puits ont été déposés dans le deuxième puits pour obtenir 1/4. Ces dilutions ont été répétées jusqu'au dernier puits. Enfin, 100 µl de chaque inoculum ( $5 \times 10^5$  UFC/ml pour les bactéries) ont été ajoutés dans chaque puits pour obtenir 200 µl comme volume final. La plaque a été scellée et incubée en aérobiose à 30°C pendant 24 h.

Des contrôles négatifs et positifs, avec respectivement du bouillon de Muller Hinton ou du bouillon de Muller Hinton plus des cellules bactériennes, ont été inclus dans tous les tests.

La CMI a été définie comme la faible concentration de chaque EH pour laquelle les lignées bactériennes n'ont pas montré de croissance visible dans le puits (CLSI, 2012). Tous les tests ont été effectués en trois exemplaires.

La concentration bactéricide minimale (CBM) a été évaluée à partir des puits de CMI sous 24 cultivés.

Un volume de 100 µl de chaque puits a été déposé sur de la gélose Muller Hinton incubée en aérobiose à 30 °C pendant 24 h. La concentration la plus faible ne présentant pas de croissance visible sur la plaque a été enregistrée comme la CMB.

#### **4 Préparation de la suspension de spores**

Comme recommandé par Leguerinel *et al.* (2000), la sporulation a été induite par l'addition de sulfate de magnésium (40 ppm, w/v) et de chlorure de calcium (100 ppm, w/v) à la gélose nutritive à 30°C, suivie d'une observation microscopique. Lorsqu'au moins 90% des spores étaient présentes (généralement après 4 à 6 jours), la culture a été récoltée, lavée (trois fois) et centrifugée (10 000 rpm) pendant 15 minutes dans une centrifugeuse Eppendorf 5810 R.

Les suspensions de spores ont été conservées à 4°C dans de l'eau stérile jusqu'à leur utilisation. Deux lavages supplémentaires ont été effectués avant chaque expérience.

#### **5 Test antispoires**

Après avoir mélangé la concentration CMI de l'huile essentiel à 5 mL de suspension de spores ( $10^8$  unités formatrices de colonies (UFC)/mL), le mélange a été incubé à 30°C pendant 24 h. Après le traitement, les spores ont été extraites par centrifugation à  $14\,500 \times g$  pendant 5 min, et elles ont subi trois cycles de lavage dans une solution saline stérile pour éviter que les l'huile essentiel restant n'influence pas la formation de cellules végétatives (Cho *et al.*, 2008).

Pour déterminer le nombre final de spores viables, le culot de spores obtenu a été dilué en série, suspendu dans 1 ml de solution saline et placé sur de la gélose nutritive (Sigma, Espagne). Comme indiqué précédemment, les l'huiles essentiels ont été cultivées avec des spores à 30°C pendant 24 heures.

### 6 Coupons en acier inoxydable

La surface expérimentale, constituée de coupons en acier inoxydable (AISI 304L) de 15 × 45 mm, a été nettoyé et désinfecter selon la technique décrite par Peng *et al.* (2001).

Les coupons ont été trempés pendant au moins 1 heure dans une solution d'éthanol et d'acétone (v/v) pour les nettoyer.

Après un rinçage rapide à l'eau distillée stérile, les coupons ont été immergés dans une solution de NaOH à 2 % à 70 °C pendant 5 minutes et rincés à l'eau distillée stérile.

Les coupons ont été rincés une dernière fois avec de l'eau distillée stérile après avoir été immergés dans une solution de HNO<sub>3</sub> 1 % à 70 °C pendant 5 minutes. Les coupons ont ensuite été scellés avec de l'aluminium et stérilisés à 120°C pendant 1 h.

### 7 Préparation des spores attachées

Des coupons (15 × 45 mm, acier inoxydable AISI 304L) ont été déposés par immersion verticale dans une suspension aqueuse de spores (10<sup>8</sup> spores par mL) pendant 4 h, puis ils ont été rapidement rincés à l'eau stérile (Faille *et al.*, 2013). Ce test a été réalisé pour déterminer l'adhérence des spores de *B. cereus* à l'acier inoxydable.

### 8 Dénombrement des spores adhérentes viables

Après quatre heures d'adhésion, le nombre de spores a été compté selon la méthode suivante :

(i) les coupons en acier inoxydable ont été rincés avec de l'eau distillée stérile avant d'être placés dans des tubes en verre contenant 5 mL de tampon PBS contenant 0,5 % de Tween 80 ;

(ii) les coupons ont été vortexés pendant 30 s puis soniqués (70 W, 47 kHz, Wise Clean) pendant 2,5 min ; (iii) les spores détachées ont été comptées par ensemencement sur la gélose nutritive après 24 h d'incubation à 30°C (Faille *et al.*, 2013).

### 9 Traitement des spores adhérentes avec des huiles essentielles

Pour déterminer les effets antispores de *C. winterianus*, les coupons en acier inoxydable ont été plongés dans 5 ml de suspension de spores contenant de l'huile essentielle à des concentrations minimales inhibitrices (CMI), 2xCMI, 3xCMI, 4xCMI et 5xCMI à température ambiante (30 ± 1°C) pendant 24 h. Ensuite, les coupons ont

été transférés dans 5 ml de solution neutralisante (3 % de polysorbate 80 v/v, 3 % de saponine w/v, 0,3 % de lécithine w/v) pendant 2 min. La réduction logarithmique (LR) a été estimée à l'aide de l'équation suivante :

$$LR = \log (N/N_0) = (\log N) - (\log N_0) ;$$

Où  $N_0$  sont les cellules adhérentes initiales et  $N$  les spores adhérentes viables restantes après la désinfection (UFC/mL) aux temps  $t$  et zéro, respectivement (Shahbazi, 2020).

### **10 Données et analyses statistiques :**

Toutes les analyses de données ont été effectuées à l'aide de Microsoft Excel et d'IBM SPSS Statistiques for Windows version 23.0 (IBM Corp, NY, US). Trois tests indépendants ont été effectués pour toutes les expériences en laboratoire. La valeur moyenne a été calculée et l'écart-type ajouté pour chaque résultat.

Le test T pour les échantillons indépendants (ou dépendants) a été utilisé pour les variables continues, en utilisant le test de Levene pour les variances égales. Un niveau de signification ( $p$ ) de 0,05 a été considéré.

---

# Résultats et discussion

---

### 1 Analyse GC-MS des huiles essentielles de *C. winterianus* et de *J. phoenicea*

Les compositions chimiques de *C. winterianus* et de *J. phoenicea* sont présentées dans les tableaux 1 et 2, respectivement. En ce qui concerne la composition chimique des HE testées, il s'est avéré qu'il s'agissait de mélanges complexes de nombreux composants.

Les tableaux 1 et 2 présentent les composés identifiés (90 composés de *C. winterianus* et un total de 12 composés de *J. phoenicea*) et les pourcentages obtenus par GC-MS. *C. winterianus* était principalement composé de monoterpènes aldéhydes (37,2 %), tandis que *J. phoenicea* contenait principalement des composés terpéniques (73,2 %). Le citral représentait 66 % de l'HE de citronnelle *C. winterianus* dans notre étude, le géranium et le néral représentant respectivement 37 % et 29 % du total des composants volatils. Le bêta-myrcène (16,1 %) et le géraniol (4,1 %) étaient les constituants les plus abondants pour *C. winterianus*, tandis que l'alpha-pinène (64,8 %) était le constituant le plus abondant pour *J. phoenicea*.

### 2 Activité antibactérienne des huiles essentielles.

L'activité antibactérienne in vitro des deux HE contre les souches bactériennes de *B. cereus* a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion par disque en mesurant les diamètres des zones d'inhibition (tableau 3). Les HE ont montré des effets antibactériens élevés d'après les zones d'inhibition observées ( $p < 0,05$  pour tous les isolats). *C. winterianus* s'est révélé extrêmement efficace sur toutes les souches testées, avec une inhibition totale de la croissance bactérienne pour toutes les souches de *B. cereus*. Pour *J. phoenicea*, les zones d'inhibition variaient de 29,3 à 60 mm ; la croissance de deux souches de *B. cereus* (80 et 82) a été complètement inhibée.

Les valeurs CMI et CMB ont également été testées pour cette série de souches de *B. cereus*.

Le tableau 3 présente un résumé de ces concentrations. Confirmant les résultats observés avec les zones inhibitrices (tableau supplémentaire S2), l'HE de *C. winterianus* a montré l'activité antibactérienne la plus forte. L'HE de *C. winterianus* a démontré une efficacité bactéricide contre toutes les souches testées avec les valeurs CMI les plus faibles allant de 0,048 à 0,08  $\mu\text{L/ml}$  et des valeurs CMB allant de 0,064

$\mu\text{L}/\text{mL}$  à  $0,08 \mu\text{L}/\text{mL}$ . L'HE de *J. phoenicea* a également montré des activités bactériostatiques et bactéricides avec des valeurs CMI allant de  $0,195 \mu\text{L}/\text{mL}$  à  $12,5 \mu\text{L}/\text{mL}$  et des valeurs MBC allant de  $0,195 \mu\text{L}/\text{mL}$  à  $25 \mu\text{L}/\text{mL}$ . On a constaté une différence dans les valeurs de la CMI et de la CMB de l'HE de *C. winterianus* ( $p=0,01$ ), alors qu'une telle différence n'a pas été constatée pour l'HE de *J. phoenicea* ( $p=0,06$ ).

### 3 Activité anti-spoires des HE

Le tableau 4 montre que l'HE de *C. winterianus* a montré les propriétés antispoires les plus élevées sur les spores (spores planctoniques) et sur l'acier inoxydable (les spores non adhérentes n'ont pas été testées à ce stade). Les HE de *C. winterianus* et de *J. phoenicea* ont démontré une efficacité antispoires contre toutes les souches de *B. cereus*.

Les valeurs de réduction  $\log_{10}$  étaient comprises entre 4,64 et 5,53 pour *C. winterianus*, tandis que l'HE de *J. phoenicea* présente des valeurs de réduction  $\log_{10}$  légèrement inférieures, comprises entre 3,34 et 5,12. Il y avait une différence significative ( $p=0,02$ ) entre les valeurs de réduction  $\log_{10}$  des spores de *B. cereus* observées avec les HE de *C. winterianus* et de *J. phoenicea*.

### 4 Traitements des spores adhérentes avec des huiles essentielles

Comme décrit ci-dessus, l'HE de *C. winterianus* a montré une plus grande activité antispoires (à une concentration plus faible) que celle de *J. phoenicea*. Par conséquent, les expériences sur les spores adhérentes ont été réalisées uniquement pour l'HE de *C. winterianus*. Le tableau 6 montre que l'HE de *C. winterianus* a montré un effet de réduction de  $\log_{10}$  sur les spores adhérent à l'acier inoxydable par rapport au contrôle et entre plusieurs concentrations CMI ( $p<0,05$ ). Comme prévu, des concentrations CMI plus élevées d'HE de *C. winterianus* ont entraîné une activité antispoires plus importante (valeurs de réduction  $\log_{10}$ ). L'HE de *C. winterianus* a démontré une efficacité antispoires contre toutes les souches de *B. cereus*, avec des valeurs de réduction  $\log_{10}$  allant de 0,14 à 3,99 à la CMI de l'HE. Un détachement total a été

observé pour certaines souches de *B. cereus* à 4xCMI et pour toutes les souches après exposition à 5xCMI d'HE de *C. winterianus*.

D'après nos résultats, il y a eu une réduction log<sub>10</sub> beaucoup plus importante (de 4,93 à 2,42) entre les spores sous forme planctonique et la réduction observée sur les spores adhérees à la surface de l'acier inoxydable. Il n'y avait pas de différence significative ( $p=0,14$ ) entre les valeurs 3\*CMI de réduction log<sub>10</sub> des spores de *B. cereus* adhérees par rapport aux spores planctoniques traitées avec l'HE de *C. winterianus* (valeurs dans le tableau 4). Inversement, il y avait une différence significative ( $p<0,05$ ) entre les valeurs de réduction log<sub>10</sub> observées pour les spores planctoniques par rapport à toute autre concentration CMI de l'HE de *C. winterianus*.

Certaines bactéries, principalement les clostridies et les bacilles, peuvent produire des spores métaboliquement inactives comme stratégie adaptative de survie dans des environnements de croissance défavorables (Setlow, 2014). En raison de leur composition et de leur structure distinctes, les spores sont plus résistantes à divers traitements physiques, chimiques et environnementaux que leurs homologues végétatifs (Setlow, 2014 ; Trunet *et al.*, 2017).

Même les traitements les plus extrêmes, tels que la perturbation mécanique, le chauffage et/ou l'exposition à une série de toxines, sont incapables de détruire ces spores (Burgess *et al.*, 2010).

Selon Mallozzi *et al.* (2010), les spores peuvent adhérer de manière tenace aux surfaces biotiques et abiotiques et se disperser pour contaminer d'autres surfaces. Il a été démontré que les HE et leurs composants sont actifs contre une variété de bactéries, de levures et de moisissures et qu'ils sont liés aux composants chimiques et à la structure des HE, ainsi qu'au type et à la structure des micro-organismes ciblés (Kalagatur *et al.*, 2018 ; Al-Maqtari *et al.*, 2021). Les HE sont marginalement plus efficaces contre les bactéries à Gram positif que contre les bactéries à Gram négatif, selon la majorité des recherches (Bazargani & Rohloff, 2016 ; de Medeiros Barbosa *et al.*, 2016 ; Vidacs *et al.*, 2018).

En raison des extrémités lipophiles de l'acide lipotéichoïque, les bactéries à Gram positif peuvent être plus sensibles aux HE, ces huiles étant capables de pénétrer les membranes cellulaires (Chouhan *et al.*, 2017).

Selon nos résultats, il y avait une différence dans les valeurs de la CMI et de la CBM de l'HE de *C. winterianus*, mais cette différence n'a pas été observée pour l'HE de *J. phoenicea*.

L'activité antibactérienne des HE est probablement attribuée aux composants volatils. Les HE de plantes médicinales ont le potentiel d'être des sources antibactériennes, mais leur activité peut être influencée par la souche bactérienne (Widelska *et al.*, 2018). Par conséquent, plusieurs souches de *B. cereus* (avec des caractéristiques phénotypiques et génotypiques distinctes) ont été testées dans cette étude.

Nous supposons que diverses raisons peuvent être à l'origine de ces variations. L'activité antibactérienne des HE dépend également de la composition et des composants volatils de chaque HE, qui peuvent varier en fonction des variations génétiques, du lieu d'origine, de la technique d'extraction, du stade de maturation ou de la saison de récolte, de la partie de la plante utilisée, du type de biomasse (feuilles ou feuilles avec ramifications terminales), du chimiotype et de la méthode de production (distillation commerciale à la vapeur d'eau ou préparation par hydrodistillation en laboratoire à l'aide d'un appareil de type Clevenger) (Samson *et al.*, 2002 ; Ekpenyong *et al.*, 2014 ; de Groot *et al.*, 2016). Le citral représentait 66 % de l'HE de citronnelle *C. winterianus* dans notre étude, le géraniol et le néral représentant respectivement 37 % et 29 % des composants volatils totaux. La concentration en citral était similaire à celle décrite précédemment par Lulekal *et al.* (2019) et Soliman *et al.* (2017). À l'inverse, 397 Abegaz&Yohannes (1983) ont observé seulement 13 % de citral dans l'HE de *Cymbopogon* originaire d'Éthiopie.

En fonction de leurs composants et de leur structure, plusieurs mécanismes de l'activité antibactérienne des HE et de leurs ingrédients actifs ont été proposés. Leurs premières voies d'action se limitaient à la destruction des membranes cytoplasmiques des cellules, mais d'autres mécanismes ont été proposés depuis.

On a observé qu'une partie du mécanisme d'action de plusieurs HE et de composés phénoliques similaires consistait à s'accrocher aux membranes des cellules bactériennes et à les perturber. Les HE et leurs composants actifs étant lipophiles, on a découvert qu'ils pénètrent et s'accumulent facilement dans la bicouche lipidique des membranes cytoplasmiques. Elles perturbent et détériorent les différentes couches de

la membrane en se positionnant entre les chaînes d'acides gras des membranes cellulaires et en oblitérant le système de transport d'électrons ou en désactivant l'activité enzymatique (Bakkali *et al.*, 2008 ; Valeriano *et al.*, 2012).

En fin de compte, l'intégrité de la bicouche phospholipidique est rompue et sa perméabilité augmente.

La perturbation de la force motrice des protons, la réduction du potentiel membranaire, l'épuisement de l'adénosine triphosphate (ATP), la perturbation de la fonction cellulaire normale et la fuite du contenu intracellulaire essentiel (ions, protéines et acides nucléiques) sont autant de conséquences de la perméabilité accrue, qui facilite la pénétration des agents antimicrobiens (Zhang *et al.*, 2017 ; Pathania *et al.*, 2018).

Il existe une limite à la perte de composants intracellulaires qui peut être tolérée sans compromettre la survie (Ju *et al.*, 2019) et une corrélation a été décrite entre la durée du contact entre l'HE et le micro-organisme et la quantité de contenu intracellulaire perdue, ce qui entraîne finalement la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Bakkali *et al.*, 2008 ; Valeriano *et al.*, 2012).

Dans cette étude, deux HE ont été étudiées pour leur capacité à réduire la viabilité des spores de *B. cereus*. D'après nos résultats, les deux huiles essentielles ont été efficaces contre toutes les souches testées et ont montré des valeurs MIC et MBC différentes. Ces observations suggèrent que les composants volatils des HE ont pu contribuer à leur activité antibactérienne.

En outre, les résultats de la diffusion sur gélose en disque ont montré que les deux HE ont fortement inhibé la croissance de toutes les souches de *B. cereus*. La technique de diffusion sur gélose en disque a été utilisée pour de telles recherches préliminaires sur l'activité antibactérienne des HE (Rota *et al.*, 2004 ; Derwich *et al.*, 2010).

Dans cette étude, nous avons constaté une bonne corrélation entre les valeurs de la CMI ou de la CMB et les résultats de la diffusion sur gélose en disque. Cependant, de nouveaux résultats suggèrent que le citral pourrait être le principal responsable de la valeur de l'activité antimicrobienne des HE de *C. winterianus*. Les faibles valeurs de CMI et de CMB de l'HE de *C. winterianus* peuvent également être liées à sa forte teneur en citral (66 %), cette activité étant transversale à tous les *B. cereus* testés. Des activités similaires ont été décrites précédemment par d'autres chercheurs (Millezi *et al.*, 2012 ; Nait Irahah *et al.*, 2020).

L'HE de *J. phoenicea* a été précédemment décrite comme étant principalement composée d' $\alpha$ - pinène, de  $\beta$ -phellandrène et d'acétate d' $\alpha$ -terpinyle (Ait-Ouazzou *et al.*, 2012), mais ces rapports n'ont pas été confirmés par nos résultats. En outre, ces substances chimiques se situaient dans les fourchettes rapportées dans la littérature pour des échantillons de plusieurs sous-espèces de *J. phoenicea* collectés autour de la région méditerranéenne, comme en Espagne et au Portugal (Adams, 1996), en Corse (Rezzi *et al.*, 2001) ou en Algérie (Bouyahyaoui *et al.*, 2016). Derwich *et al.* (2010) ont étudié la composition chimique de l'HE extraite des feuilles de *J. phoenicea* cueillies au Maroc (région de Boulmane), rapportant 49% pour l' $\alpha$ -pinène. La quantité obtenue dans notre étude pour l' $\alpha$ -pinène (65%) est supérieure à celle observée par Ait-Ouazzou *et al.* (2012) et Bouyahyaoui *et al.* (2016), 25% et 30% respectivement, justifiant ainsi les propriétés antibactériennes de l'HE de *J. phoenicea*. Selon des rapports antérieurs, l' $\alpha$ -pinène possède des propriétés antibactériennes, principalement contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et *Streptococcus pyogenes* (Demirci *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2015 ; de Sousa Eduardo *et al.*, 2018 ; Utegenova *et al.*, 2018). En outre, d'autres rapports décrivent les HE contenant des terpènes comme ayant une activité antibactérienne (Dorman&Deans, 2000). Bien que la composition chimique de *J. phoenicea* ait été étudiée précédemment, on sait peu de choses sur sa capacité à agir sur les micro-organismes alimentaires.

En fait, l'HE de *J. phoenicea* a montré une efficacité puissante contre toutes les souches de *B. cereus* examinées dans cette étude. Des études antérieures ont confirmé ces activités bactériostatiques et bactéricides modérées à fortes contre les bactéries Gram-positives (Ait-Ouazzo *et al.*, 2012).

Les spores bactériennes sont structurellement et chimiquement très différentes de celles des cellules végétatives. Ces variations expliquent principalement la résistance des spores au stress environnemental, comme les désinfectants (Leggett *et al.*, 2012). Ce fait explique également pourquoi la CMI de la cellule végétative et la réduction  $\log_{10}$  des cellules spores dans notre étude étaient différentes. La CMI représente la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui empêche la croissance visible d'un micro-organisme dans un antibiogramme en gélose ou en bouillon de culture, mais cette concentration a éliminé environ 50 % des cellules sporulées planctoniques.

Le détachement des spores bactériennes de l'environnement de transformation des aliments est essentiel car elles s'accumulent souvent dans des zones difficiles à nettoyer (Austin *et al.*, 1995 ; Sharma & Anand, 2002). Les HE testées ont montré un degré variable d'activité antispores, *C. winterianus* étant l'HE la plus efficace (avec les concentrations les plus faibles) et montrant une activité antispores remarquable. En 2015, une réduction de 50 % de la germination des spores de *Bacillus sp.* et de *Geobacillus stearothermophilus* a été constatée pour l'HE de *Drypetesgossweileri* (Voundi *et al.*, 2015).

La thymoquinone (substance active naturelle), le macélignan (substance chimique bioactive dérivée de la noix de muscade, *Myristicafragrans*Houtt.), l'eugénol et l'asaronaldéhyde ont également inhibé la germination des spores de *B. cereus*, suggérant son potentiel en tant que conservateur antimicrobien efficace dans le contrôle de la contamination des aliments et des maladies d'origine alimentaire (Rukayadi *et al.*, 2009 ; Alquadeeri *et al.*, 2019 ; Wang *et al.*, 2021 ; Zhang *et al.*, 2024).

L'élimination des spores adhérentes est facilitée par la turbulence élevée de la solution de nettoyage et la présence de substances oxydantes (Kumar & Anand, 1998). Ces faits confirment l'efficacité de *C. winterianus* contre les spores bactériennes adhérentes, car le citral peut cooxyder le substrat en raison de son auto-terminaison et de sa terminaison croisée rapides de la chaîne oxydative (Baschieri *et al.*, 2017).

A notre connaissance, aucune donnée sur l'effet quantitatif de l'HE de *C. winterianus* sur les spores adhérentes de *B. cereus* aux surfaces en acier inoxydable n'était disponible dans la littérature. D'après nos résultats, il y a eu une forte réduction des spores adhérentes (plusieurs ordres de  $\log_{10}$ ), les spores adhérentes étant plus résistantes que les spores planctoniques.

Cette réduction des spores adhérentes et non adhérentes peut potentiellement être expliquée par les caractéristiques physicochimiques et de surface des spores telles que le potentiel zêta, le point isoélectrique, la surface de l'exosporium, la longueur et le nombre des appendices (Didouh *et al.*, 2015). En 2020, Shahbazi a étudié les effets des HE de *Ziziphora clinopodioides* et de *Menthaspicata* sur les biofilms de 6 pathogènes d'origine alimentaire développés à la surface de coupons en acier inoxydable.

Après exposition aux solutions désinfectantes à base d'HE, le nombre de cellules adhérent à la surface (biofilms) a été considérablement réduit, l'activité la plus élevée

étant observée chez *B. cereus*, suivi de *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, et *Salmonella typhimurium*.

La capacité de l'HE de *C. winterianus* à réduire la croissance des spores et des végétations est pertinente et nouvellement décrite. La sensibilité de *B. cereus* aux deux HE, à la fois sous forme de spores adhérentes et sous forme planctonique, est une recommandation forte pour son application dans les programmes d'élimination des surfaces laitières et autres surfaces de transformation, dont l'Algérie et d'autres pays ont grand besoin (Didouh *et al.*, 2023b).

Nos résultats sont conformes à ceux de Kalai *et al.* (2018) qui ont constaté une éradication complète du biofilm de *B. cereus* en utilisant des solutions d'assainissement à base d'huile de thym.

---

## **Conclusion générale**

---

En conclusion, cette étude a montré l'activité inhibitrice et bactéricide des HE de *C. winterianus* ou de *J. phoenicea* contre *B. cereus* planctonique et a confirmé l'activité antispores des composants actifs de *C. winterianus* contre les spores adhérentes de *B. cereus*.

L'une des applications proposées est le développement de formulations désinfectantes à base d'HE de *C. winterianus* ou de *J. phoenicea* qui seraient utiles pour réduire les spores adhérentes dans les pipelines et autres équipements utilisés dans l'industrie laitière.

Ces désinfectants pourraient être utilisés sur une base hebdomadaire tout en conservant l'équipement et les canalisations pendant tout le week-end jusqu'au début de la production suivante la semaine d'après, ce qui offre plus de temps de contact (Cramer, 2006).

Les effets négatifs des HE sur les qualités sensorielles des produits alimentaires peuvent constituer une limite à cette stratégie. Selon Calo *et al.* (2015), les effets négatifs des HE sur les qualités sensorielles des produits alimentaires peuvent être réduits en diminuant la quantité d'ingrédients actifs utilisés. L'encapsulation est l'un des meilleurs moyens de réduire leur impact sur les qualités sensorielles des aliments grâce à des méthodes telles que le séchage par pulvérisation, la coacervation et l'utilisation de nanoparticules lipidiques solides, qui peuvent améliorer l'activité biologique des HE et leur libération contrôlée (Al-Maqtari *et al.*, 2021 ; Bakry *et al.*, 2016 ; Veiga *et al.*, 2019).

En outre, le développement de désinfectants naturels contribuera à réduire les effets négatifs des désinfectants chimiques synthétiques, notamment en ce qui concerne leur impact sur l'environnement et l'apparition de résistances bactériennes. Ces résultats apportent une contribution significative aux industries laitières, en offrant de nouvelles alternatives pour l'utilisation de désinfectants efficaces sur les équipements de transformation des aliments.

---

## **Références bibliographiques**

---

- Abee, T., Groot, M. N., Tempelaars, M., Zwietering, M., Moezelaar, R., & van der Voort, M. (2011). Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food microbiology*, 28(2), 199-208.
- Abegaz, B., Yohannes, P. G., & Dieter, R. K. (1983). Constituents of the essential oil of Ethiopian *Cymbopogon citratus* Stapf. *Journal of Natural products*, 46(3), 424-426.
- Adams, R. P. (1996). Comparisons of the leaf essential oils of *Juniperus phoenicea*, *J. phoenicea* subsp. *eu-mediterranea* Lebr. & Thiv. and *J. phoenicea* var. *turbinata* (Guss.) Parl. *Journal of Essential Oil Research*, 8(1), 367-371.
- Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagan, R., & Conchello, P. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45(1), 313-319.
- Al-Maqtari, Q. A., Rehman, A., Mahdi, A. A., Al-Ansi, W., Wei, M., Yanyu, Z., Mon Phy, H., Galeboe, O., & Yao, W. (2021). Application of essential oils as preservatives in food systems: challenges and future perspectives—a review. *Phytochemistry Reviews*, 1-38.
- Alqadeeri, F., Rukayadi, Y., Abbas, F., & Shaari, K. (2019). Antibacterial and antifungal activities of isolated compounds from *Piper cubeba* L. *Molecules*, 24(17), 3095.
- Austin, J. W., & Bergeron, G. (1995). Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of Dairy Research*, 62(3), 509-519.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(1), 143-182.
- Baschieri, A., Ajvazi, M. D., Tonfack, J. L. F., Valgimigli, L., & Amorati, R. (2017). Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. *Food Chemistry*, 232, 656-663.
- Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2015). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* (2nd edition). CRC Press. 1128.
- Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food control*, 61, 156-164.
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Bacterial biofilms*, 249-289.
- Bhavanirama, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), 49-55.

Bianco, A., Capozzi, L., Monno, M. R., Del Sambro, L., Manzulli, V., Pesole, G., ... & Parisi, A. (2021). Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from human bacteremia by whole-genome sequencing. *Frontiers in microbiology*, *11*, 599524.

Bouyahyaoui, A., Bahri, F., Romane, A., Höferl, M., Wanner, J., Schmidt, E., & Jirovetz, L. (2016). Antimicrobial activity and chemical analysis of the essential oil of Algerian *Juniperus phoenicea*. *Natural product communications*, *11*(4), 1934578X1601100426.

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.

Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, *27*(9), 1017-1032.

Burgess, S. A., Lindsay, D., & Flint, S. H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International journal of food microbiology*, *144*(2), 215-225.

Burmølle, M., Thomsen, T. R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., ... & Bjarnsholt, T. (2010). Biofilms in chronic infections—a matter of opportunity—monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *59*(3), 324-336.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223-253.

Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food control*, *54*, 111-119.

Carroll, L. M., Cheng, R. A., Wiedmann, M., & Kovac, J. (2022). Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. *Critical reviews in food science and nutrition*, *62*(28), 7677-7702.

Charney, J., Fisher, W. P., & Hegarty, C. P. (1951). Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. *Journal of bacteriology*, *62*(2), 145-148.

Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *2*(1), 22-32.

Cho, W. I., Choi, J. B., Lee, K., Chung, M. S., & Pyun, Y. R. (2008). Antimicrobial activity of torilin isolated from *Torilis japonica* fruit against *Bacillus subtilis*. *Journal of food science*, *73*(2), M37-M46.

Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, *4*(3), 58.

CISI. (2012). M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. [www.clsi.org](http://www.clsi.org).

Clutterbuck, A. L., Woods, E. J., Knottenbelt, D. C., Clegg, P. D., Cochrane, C. A., & Percival, S. L. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 121(1-2), 1-17.

Cramer, M. M. (2006). Food plant sanitation: design, maintenance, and good manufacturing practices. CRC Press.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery*, 2(2), 114-122.

de Araújo, A. C. J., Freitas, P. R., dos Santos Barbosa, C. R., Muniz, D. F., de Almeida, R. S., Alencar de Menezes, I. R., Ribeiro-Filho, J., Tintino, S. R., & Coutinho, H. D. M. (2021). In vitro and in silico inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pump NorA by  $\alpha$ -pinene and limonene. *Current Microbiology*, 78, 3388-3393.

de Medeiros Barbosa, I., da Costa Medeiros, J. A., de Oliveira, K. Á. R., Gomes-Neto, N. J., Tavares, J. F., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2016). Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in leafy vegetables. *Food control*, 59, 468-477.

de Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., do Nascimento, J. A., Batista, N. N., & Piccoli, R. H. (2012). Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. *European Food Research and Technology*, 234, 821-832.

de Sousa Eduardo, L., Farias, T. C., Ferreira, S. B., Ferreira, P. B., Lima, Z. N., & Ferreira, S. B. (2018). Antibacterial activity and time-kill kinetics of positive enantiomer of  $\alpha$ -pinene against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(11), 917-924.

de Groot, A. C., & Schmidt, E. (2016). Teatree oil: contact allergy and chemical composition. *Contact dermatitis*, 75(3), 129-143.

Demirci, B., Koşar, M., Demirci, F. A. T. İ. H., Dinc, M., & Başer, K. H. C. (2007). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. *Food chemistry*, 105(4), 1512-1517.

Derwich, E., Benziane, Z., & Boukir, A. (2010). Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(2), 199-204.

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25.

Didouh, N., Achek, R., Celandroni, F., Ghelardi, E., Mazzantini, D., Postollec, F., Moussa-boudjemaa, B., Ouoba, L. I. I., Tamasso, H., Lind, J., & El-Adawy, H. (2023a). Genomic diversity and virulence genes characterization of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from processing equipment of an Algerian dairy plant. *Journal of Food Quality*, 2023.

- Didouh, N., Cherif-Antar, A., Benamar, I., & Moussa-Boudjemaa, B. (2015). Physico-chemical surface characterization of *Bacillus cereus* spores isolated from an Algerian dairy plant. *African Journal of Microbiology Research*, 9:57–65.
- Didouh, N., Medjahdi, K., Campos, C., Sampaio-Maia, B., Moussa-boudjemaa, B., & Araujo, R. (2023b). Assessment of biofilm, enzyme production and antibiotic susceptibility of bacteria from milk pre- and post-pasteurization pipelines in Algeria. *International Journal of Food Microbiology*, 407, 110389.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Ekpenyong, C. E., Akpan, E. E., & Daniel, N. E. (2014). Phytochemical constituents, therapeutic applications and toxicological profile of *Cymbopogon citratus* Stapf (DC) leaf extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1), 133-141.
- Faille, C., Benezech, T., Blel, W., Ronse, A., Ronse, G., Clarisse, M., & Slomianny, C. (2013). Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. *Food microbiology*, 33(2), 149-157.
- Faille, C., Benezech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., ... & Slomianny, C. (2014). Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. *Food microbiology*, 40, 64-74.
- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M. N., Slomianny, C., & Benezech, T. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian journal of microbiology*, 48(8), 728-738.
- Fan, L., Ismail, B. B., Hou, F., Guo, M., Ding, T., & Liu, D. (2021). Thermosonication pretreatment enhances the killing of germinated *Bacillus* spores adhered to stainless steel surface. *LWT*, 136, 110248.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in food science & technology*, 19(3), 156-164.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Flemming, H., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Publ. Gr.* 8, 623–633.
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in microbiology*, 9, 315815.
- Glasset, B., Herbin, S., Guillier, L., Cadel-Six, S., Vignaud, M. L., Grout, J., ... & Brisabois, A. (2016). *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Eurosurveillance*, 21(48), 30413.

Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., & Cotter, P. D. (2015). The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in microbiology*, 6, 1418.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95-108.

Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., Høiby, N., Moser, C., William Costerton, J., ... & Bjarnsholt, T. (2012). Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 127-145.

Hayrapetyan, H., Muller, L., Tempelaars, M., Abee, T., & Groot, M. N. (2015). Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 72-79.

Hu, J. Y., Fan, Y., Lin, Y. H., Zhang, H. B., Ong, S. L., Dong, N., ... & Zhang, L. H. (2003). Microbial diversity and prevalence of virulent pathogens in biofilms developed in a water reclamation system. *Research in microbiology*, 154(9), 623-629.

Huang, Y., Flint, S. H., & Palmer, J. S. (2020). *Bacillus cereus* spores and toxins—The potential role of biofilms. *Food microbiology*, 90, 103493.

Hussain, M. S., & Oh, D. H. (2017). Substratum attachment location and biofilm formation by *Bacillus cereus* strains isolated from different sources: Effect on total biomass production and sporulation in different growth conditions. *Food Control*, 77, 270-280.

Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P. E., & Märtlbauer, E. (2020). The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. *Toxins*, 12(11), 701.

Jovanovic, J., Ornelis, V. F., Madder, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719-3761.

Ju, J., Chen, X., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2019). Application of essential oil as a sustained release preparation in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 22-32.

Kalagatur, N. K., Mudili, V., Kamasani, J. R., & Siddaiah, C. (2018). Discrete and combined effects of Ylang-Ylang (*Cananga odorata*) essential oil and gamma irradiation on growth and mycotoxins production by *Fusarium graminearum* in maize. *Food Control*, 94, 276-283.

Kalai, A., Malek, F., & Bousmaha-Marroki, L. (2017). Effect of *Thymus ciliatus* soil-based disinfectant solutions against biofilms formed by *Bacillus cereus* strains isolated from pasteurized-milk processing lines in Algeria. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 7(6).

Karunakaran, E., & Biggs, C. A. (2011). Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 1161-1175.

- Kobayashi, K., & Ikemoto, Y. (2019). Biofilm-associated toxin and extracellular protease cooperatively suppress competitors in *Bacillus subtilis* biofilms. *PLoS Genetics*, *15*(10), e1008232.
- Koutchma, T., Bissonnette, S., & Popović, V. 2020. An update on research, development and implementation of UV and pulsed light technologies for nonthermal preservation of milk and dairy products. *Innovative Food Processing Technologies: A Comprehensive Review*. Elsevier, pp. 256-276
- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology*, *42*(1-2), 9-27.
- Launay, A., & Bruneton, J. (2016). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *J. Bruneton*, Ed, 15, 1.
- Lauzon, H. L., Magnússon, H., Sveinsdóttir, K., Gudjónsdóttir, M., & Martinsdóttir, E. (2009). Effect of brining, modified atmosphere packaging, and superchilling on the shelf life of cod (*Gadus morhua*) loins. *Journal of Food Science*, *74*(6), M258-M267.
- Leggett, M. J., McDonnell, G., Denyer, S. P., Setlow, P., & Maillard, J. Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of applied microbiology*, *113*(3), 485-498.
- Leguerinel, I., Couvert, O., & Mafart, P. (2000). Relationship between the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores and the pH and NaCl concentration of the recovery medium. *International journal of food microbiology*, *55*(1-3), 223-227.
- Li, Y., Luo, L., Wang, W., Hong, B., Ma, Y., & Wang, J. (2024). Characterization of a cell wall hydrolase with high activity against vegetative cells, spores and biofilm of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 110617.
- Liaqat, I., Ahmed, S. I., & Jahan, N. (2013). Biofilm formation and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Int J Microbiol Res Rev*, *4*, 061-067.
- Lin, Y., Briandet, R., & Kovács, Á. T. (2022). *Bacillus cereus* sensu lato biofilm formation and its ecological importance. *Biofilm*, *4*, 100070.
- Liu, Y., & Zhao, Q. (2005). Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. *Biophysical chemistry*, *117*(1), 39-45.
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., & Shao, Z. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(8), 2499-2508.
- Lulekal, E., Tesfaye, S., Gebrechristos, S., Dires, K., Zenebe, T., Zegeye, N., Feleke, G., Kassahun, A., Shiferaw, Y., & Mekonnen, A. (2019). Phytochemical analysis and evaluation of skin irritation, acute and sub-acute toxicity of *Cymbopogon citratus* essential oil in mice and rabbits. *Toxicology reports*, *6*, 1289-1294.
- Luu, S., Cruz-Mora, J., Setlow, B., Feeherry, F. E., Doona, C. J., & Setlow, P. (2015). The effects of heat activation on *Bacillus* spore germination, with nutrients or under

high pressure, with or without various germination proteins. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2927-2938.

Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.

Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., & Gohar, M. (2016). *Bacillus cereus* biofilms—same, only different. *Frontiers in microbiology*, 7, 203805.

Malek, F. (2023). Flow of spore-forming bacteria between suppliers of dairy powders and users in some developing countries: challenges and perspectives. *Journal of Food Science and Technology*, 60(8), 2132-2142.

Mallozzi, M., Viswanathan, V. K., & Vedantam, G. (2010). Spore-forming Bacilli and Clostridia in human disease. *Future microbiology*, 5(7), 1109-1123.

Merzougui, S., Lkhider, M., & Cohen, N. *Bacillus cereus*, un réel problème pour l'industrie agro alimentaire? *Bacillus cereus*, a real problem for food industry?.

Messelhäußer, U., & Ehling-Schulz, M. (2018). *Bacillus cereus*—a multifaceted opportunistic pathogen. *Curr Clin Microbiol Rep* 5: 120–125.

Millezi, A. F., Caixeta, D. S., Rossoni, D. F., Cardoso, M. D. G., & Piccoli, R. H. (2012). In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. *Food Science and Technology*, 32, 167-172.

Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S. H., Hassett, D. J., & Sauer, K. (2006). BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 188(21), 7335-7343.

Mothana, R. A., Al-Said, M. S., Al-Yahya, M. A., Al-Rehaily, A. J., & Khaled, J. M. (2013). GC and GC/MS analysis of essential oil composition of the endemic *Soqotraen Leucas virgata* Balf. f. and its antimicrobial and antioxidant activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 23129-23139.

Nait Irahali, I., Hmimid, F., Lahlou, F.A., Errami, A., Guenaou, I., Diawara, I., Kettani-Halabi, M., Fahde, S., Ouafik, H., & Bourhim, N. (2020). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria. *European Journal of Integrative Medicine*, 35, 101074.

Orhan-Yanikan, E., da Silva-Janeiro, S., Ruiz-Rico, M., Jiménez-Belenguer, A. I., Ayhan, K., & Barat, J. M. (2019). Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains present in the meat industry. *Food Control*, 101, 29-38.

Owusu-Kwarteng, J., Wuni, A., Akabanda, F., Tano-Debrah, K., & Jespersen, L. (2017). Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from dairy farms and traditional dairy products. *BMC microbiology*, 17, 1-8.

Pace, J. L., Rupp, M. E., & Finch, R. G. (Eds.). (2005). *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy*. CRC Press.

Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 27-33.

, J. S., Tsai, W. C., & Chou, C. C. (2001). Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1-2), 105-111.

Rezzi, S., Cavaleiro, C., Bighelli, A., Salgueiro, L., da Cunha, A. P., & Casanova, J. (2001). Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *Turbinata* from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(2), 179-188.

Rota, C., Carraminana, J. J., Burillo, J., & Herrera, A. (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of food protection*, 67(6), 1252-1256.

Ruhi Pathania, R. P., Huma Khan, H. K., Ravinder Kaushik, R. K., & Khan, M. A. (2018). Essential oil nanoemulsions and their antimicrobial and food applications. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 6(3), 626-643.

Rukayadi, Y., Lee, K. H., Han, S. H., Kim, S. K., & Hwang, J. K. (2009). Antibacterial and sporicidal activity of macelignan isolated from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) against *Bacillus cereus*. *Food Science and Biotechnology*, 18(5), 1301-1304.

Ryu, J. H., & Beuchat, L. R. (2005). Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *Journal of food protection*, 68(12), 2614-2622.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). Introduction to food- and airborne fungi (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Sansebastiano, G., Zoni, R., & Bigliardi, L. (2007). Cleaning and disinfection procedures in the food industry: general aspects and practical applications. In *Food Safety: A Practical and Case Study Approach* (pp. 253-280). Springer US.

Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology*, 6(6), 550-556.

Setlow, P. (2014). Spore Resistance Properties. The bacterial spore: from molecules to systems. *Microbiology Spectrum*, 2, 201-215.

Shahbazi, Y. (2020). Antibacterial effects of *Ziziphora clinopodioides* and *Mentha spicata* essential oils against common food-borne pathogen biofilms on stainless steel surface. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 23(1).

Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M. A., Christiansson, A., & Salkinoja-Salonen, M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food microbiology*, 27(3), 347-355.

Sharma, M., & Anand, S. K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairyprocessingindustry—a case. *Food control*, 13(6-7), 469-477.

Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.

Soliman, W. S., Salaheldin, S., & Amer, H. M. (2017). Chemical composition evaluation of Egyptian lemongrass, *Cymbopogon citratus*, essential oil. *International Journal of Scientific Engineering and Research*, 8(11), 630-634.

Sonenshein, A. L. (2000). Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*, 3(6), 561-566.

Spyridopoulou, K., Fitsiou, E., Bouloukosta, E., Tiptiri-Kourpeti, A., Vamvakias, M., Oreopoulou, A., Papavassilopoulou, E., Pappa, A., & Chlichlia, K. (2019). Extraction, chemical composition, and anticancer potential of *Origanum onites* L. essential oil. *Molecules*, 24(14), 2612.

Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food control*, 31(2), 572-585.

Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet*, 358(9276), 135-138.

Sumayya, S. S., Lubaina, A. S., & Murugan, K. (2020). Bactericidal potentiality of purified terpenoid extracts from the selected seaweeds and its mode of action. *Journal of tropical life science*, 10(3), 197.

Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2016, 3012462.

Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., & Faille, C. (2006). Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International journal of food microbiology*, 110(3), 254-262.

Thormann, K. M., Duttler, S., Saville, R. M., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y., & Spormann, A. M. (2006). Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *Journal of bacteriology*, 188(7), 2681-2691.

- Trunet, C., Carlin, F., & Coroller, L. (2017). Investigating germination and outgrowth of bacterial spores at several scales. *Trends in food science & technology*, 64, 60-68.
- Utegenova, G. A., Pallister, K. B., Kushnarenko, S. V., Özek, G., Özek, T., Abidkulova, K. T., Kirpotina, L. N., Schepetkin, I. A., Quinn, M. T., & Voyich, J. M. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Ferula L.* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 23(7), 1679.
- Valeriano, C., De Oliveira, T. L. C., De Carvalho, S. M., das Graças Cardoso, M., Alves, E., & Piccoli, R. H. (2012). The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*, 25(2), 673-677.
- Valková, V., Ďúranová, H., Galovičová, L., Vukovic, N. L., Vukic, M., & Kačaniová, M. (2021). In Vitro antimicrobial activity of lavender, mint, and rosemary essential oils and the effect of their vapours on growth of *Penicillium* spp. in a bread model system. *Molecules*, 26(13), 3859.
- Van der Voort, M., & Abee, T. (2013). Sporulation environment of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains determines spore size, heat resistance and germination capacity. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1201-1210.
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1117-1131.
- Veiga, R. D. S. D., Aparecida Da Silva-Buzanello, R., Corso, M. P., & Canan, C. (2019). Essential oils microencapsulated obtained by spray drying: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 31(6), 457-473.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., & Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in microbiology*, 16(10), 496-506.
- Vidács, A., Kerekes, E., Rajkó, R., Petkovits, T., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Vágvölgyi, C., & Krisch, J. (2018). Optimization of essential oil-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surfaces. *Journal of Molecular Liquids*, 255, 257-262.
- Vidic, J., Chaix, C., Manzano, M., & Heyndrickx, M. (2020). Food sensing: Detection of *Bacillus cereus* spores in dairy products. *Biosensors*, 10(3), 15.
- Vilain, S., Pretorius, J. M., Theron, J., & Brözel, V. S. (2009). DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), 2861-2868.
- Voundi, S. O., Nyegue, M., Lazar, I., Raducanu, D., Ndoye, F. F., Stamate, M., & Etoa, F. X. (2015). Effect of essential oils on germination and growth of

some pathogenic and spoilage spore-forming bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(6), 551-559.

Wagner, M., Ivleva, N. P., Haisch, C., Niessner, R., & Horn, H. (2009). Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): investigations on EPS-matrix. *Water research*, 43(1), 63-76.

Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International journal of nanomedicine*, 1227-1249.

Wang, S., Deng, H., Wang, Y., Rui, W., Zhao, P., Yong, Q., Guo, D., Liu, J., Guo, X., Wang, Y., & Shi, C. (2021). Antimicrobial activity and action mechanism of thymoquinone against *Bacillus cereus* and its spores. *Foods*, 10(12), 3048.

Widelska, G., Stelmasiewicz, M., Skalicka-Woźniak, K., Oniszczyk, A., & Ludwiczuk, A. (2018). Antioxidant activity of lemongrass essential oil and its constituents. *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology*, 16(1), 132.

Wijman, J. G., de Leeuw, P. P., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and environmental microbiology*, 73(5), 1481-1488.

Yang, C., Hu, D. H., & Feng, Y. (2015). Antibacterial activity and mode of action of the *Artemisia capillaris* essential oil and its constituents against respiratory tract infection-causing pathogens. *Molecular medicine reports*, 11(4), 2852-2860.

Yang, S., Wang, Y., Ren, F., Wang, X., Zhang, W., Pei, X., & Dong, Q. (2023). The sources of *Bacillus cereus* contamination and their association with cereulide production in dairy and cooked rice processing lines. *Food Quality and Safety*, fyad023.

Zhang, J., Ye, K. P., Zhang, X., Pan, D. D., Sun, Y. Y., & Cao, J. X. (2017). Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 7, 2094.

Zhang, J., Ye, K. P., Zhang, X., Pan, D. D., Sun, Y. Y., & Cao, J. X. (2017). Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2094.

Zhang, Y., Yang, Z., Huang, Q., Zhan, X., Liu, X., Guo, D., Wang, S., Rui, W., Lü, X., & Shi, C. (2024). Antimicrobial activity of eugenol against *Bacillus cereus* and its application in skim milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 21(3), 147-159.

Zhao, S., Chen, J., Fei, P., Feng, H., Wang, Y., Ali, M. A., Li, S., Jing, H., & Yang, W. (2020). Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from dairy products in China. *Journal of dairy science*, 103(5), 3994-4001.

Zheng, L., Abhyankar, W., Ouwerling, N., Dekker, H. L., van Veen, H., van der Wel, N. N., ... & de Koster, C. G. (2016). Bacillus subtilis spore inner membrane proteome. *Journal of proteome research*, 15(2), 585-594.

Zhu, T., Yang, C., Bao, X., Chen, F., & Guo, X. (2022). Strategies for controlling biofilm formation in foodindustry. *Grain & Oil Science and Technology*, 5(4), 179-186.

---

---

## **Annexes**

---

---

**Gélose nutritive**

Peptone	15
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	02g
Chlorure de sodium	05g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
Ph	6.8-7.4

**Gélose Mueller- Hinton**

Infusion de Viande de Bœuf	300ml
Peptone de Caséine	17.5g
Amidon de Mais	1.5g
Agar	17g
PH	7.5

**Bouillon de Mueller-Hinton**

Infusât de Viande	2g
Hydrolysât de Caséine	17.5g
Amidon	1.5g

## Résumé :

L'adhésion des spores de *Bacillus cereus* aux équipements de l'industrie laitière est un problème grave, qui entraîne la détérioration des aliments et, parfois, des épidémies de maladies d'origine alimentaire. Les huiles essentielles antimicrobiennes ont été proposées comme alternative aux désinfectants synthétiques en raison de leurs propriétés respectueuses de l'environnement. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet des huiles essentielles de *Cymbopogon winterianus* et de *Juniperus phoenicea* sur les spores planctoniques et adhérentes de *B. cereus* sur les surfaces en acier inoxydable. Onze souches de *B. cereus* ont été utilisées dans cette étude. La composition chimique des huiles de *C. winterianus* et de *J. phoenicea* a été analysée par chromatographie en phase gazeuse (GC)/spectrométrie de masse (MS). Quarante-deux composants ont été identifiés pour *C. winterianus*, les constituants les plus abondants étant le géraniol (37 %), le néral (29 %), le bêta-myrcène (16 %) et le géraniol (4 %). Douze composants ont été identifiés pour *J. phoenicea*, l'alpha-pinène (65 %) étant le constituant le plus abondant. Les résultats de la concentration minimale inhibitrice et de la concentration minimale bactéricide ont révélé que *C. winterianus* était l'HE la plus efficace ( $p < 0,05$ ) contre les onze souches. En outre, il y a eu une forte réduction de  $\log_{10}$  (de 4,93 à 2,42 ;  $p < 0,05$ ) entre les spores sous forme planctonique et les spores adhérents à la surface en acier inoxydable. *C. winterianus* peut être utilisé pour détacher efficacement les spores de *B. cereus* capables d'adhérer et de former des biofilms sur les surfaces en acier inoxydable, ce qui constitue une alternative valable pour le développement d'un désinfectant naturel susceptible de réduire les effets négatifs des désinfectants chimiques synthétiques.

**Mots-clés :** *Bacillus cereus*, citronnelle de Java, genévrier, huile essentielle, spores bactériennes, acier inoxydable.

## Abstract

Adherence of *Bacillus cereus* spores to dairy industry equipment is a serious problem, causing food spoilage and, occasionally, outbreaks of foodborne diseases. Antimicrobial essential oils (EOs) have been proposed as an alternative to synthetic disinfectants due to their environmentally friendly properties. The aim of this study was to assess the effect of *Cymbopogon winterianus* and *Juniperus phoenicea* EOs on planktonic and adherent *B. cereus* spores to stainless steel surfaces. Eleven strains of *B. cereus* were used in this study. The chemical composition of the *C. winterianus* and *J. phoenicea* oils was analyzed by gas chromatography (GC)/mass spectrometry (MS). Ninety components were identified for *C. winterianus*, being geraniol (37%), geraniol (4%), beta-myrcene (16%) and neral (29%) the most abundant constituents. Twelve components were identified for *J. phoenicea*, being alpha-pinene (65%) the most abundant constituent. The results of the minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration revealed that *C. winterianus* was the most effective EO against all eleven strains. In addition, there was a large  $\log_{10}$  reduction (from 4.93 to 2.42) between spores in planktonic form versus spores adhered to stainless steel surface. *C. winterianus* can be used for effective detachment of *B. cereus* spores capable to adhere and form biofilms on stainless steel surfaces, being a valid alternative for the development of natural disinfectant that may reduce negative effects of synthetic chemical disinfectants.

**Keys word:** *Bacillus cereus*, biofilm, *Cymbopogon winterianus*, *Juniperus phoenicea*, essential oil, bacterial spores, stainless steel

## ملخص

يعد التصاق جراثيم العصيات الشمعية بالمعدات في صناعة الألبان مشكلة خطيرة ، مما يؤدي إلى تلف الطعام ، وفي بعض الأحيان ، تفشي الأمراض المنقولة بالغذاء. تم اقتراح الزيوت الأساسية المضادة للميكروبات كبديل للمطهرات الاصطناعية بسبب خصائصها الصديقة للبيئة. كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير الزيوت الأساسية لسيمبوبوجون وينتريانوس وجونيبيروس فينيسيا على جراثيم العوالم والالتصاق ب. سيريروس على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ. تم استخدام أحد عشر سلالة من ب. سيريروس في هذه الدراسة. تم تحليل التركيب الكيميائي لزيوت سي وينتريانوس و ج. فينيسيا بواسطة كروماتوغرافيا الغاز (غ)/مطياف الكتلة (مس). تم تحديد مكونا لسي وينتريانوس ، المكونات الأكثر وفرة هي إبرة الراعي (37٪) ، نيرال (29٪) ، بيتا ميرسين (16٪) وجيرانول (4٪). تم تحديد اثني عشر مكونا لـ ج. فينيسيا ، ألفا بينين (65٪) كونها المكون الأكثر وفرة. كشفت نتائج الحد الأدنى من التركيز المثبط والحد الأدنى من تركيز الجراثيم أن سي وينتريانوس كان الأكثر فعالية هو ( $0.05 > \text{ص}$ ) ضد السلالات الإحدى عشرة. بالإضافة إلى ذلك ، كان هناك انخفاض قوي في اللوغار 10 (من 4.93 إلى 2.42 ؛  $\text{ص} > 0.05$ ) بين الجراثيم في شكل العوالم والجراثيم الملتصقة بسطح الفولاذ المقاوم للصدأ. يمكن استخدام وينتريانوس لفصل جراثيم ب بشكل فعال. سيريروس قادر على الالتصاق وتشكيل الأغشية الحيوية على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ ، مما يشكل بديلا صالحا لتطوير مطهر طبيعي قادر على تقليل الآثار السلبية للمطهرات الكيميائية الاصطناعية.

**الكلمات الرئيسية:** عصية سيريروس ، جافا الليمون ، العرعر ، من الضروري النفط ، الجراثيم البكتيرية ، الفولاذ المقاوم للصدأ