



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche

جامعة ابوبكر بلقايد تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID-TLEMCEM

كلية علوم الطبيعة والحياة

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

Département d'agronomie



## Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de **MASTER** en

**Sécurité agro-alimentaire et assurance qualité**

**Thème :**

**Caractérisation d'une microflore bactérienne isolée à partir d'une industrie laitière et son pouvoir de formation de biofilm**

Présenté par :

BENDJEBARA Yassamine

BOUZIANI Sarra

Soutenu le : 29 juin 2025, devant le jury composé de :

Présidente	DIDOUH Nassima	MCA	Université Tlemcen
Examinatrice	BOUMEDIENE Karima	MAA	Université Tlemcen
Encadrante	BEY Faiza	MAA	Université Tlemcen

**Année universitaire 2024 -2025**

# Remerciements

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Madame BEY Faiza, notre encadrante, pour sa disponibilité, ses conseils précieux, son accompagnement rigoureux et sa bienveillance tout au long de ce travail.*

*Nous remercions sincèrement les membres du jury de soutenance pour avoir accepté d'évaluer notre travail, ainsi que pour l'intérêt qu'elles y ont porté et les remarques constructives qu'elles nous ont apportées.*

*Nous exprimons également notre reconnaissance à l'ensemble du personnel du laboratoire pédagogique de microbiologie de la faculté SNV, pour leur accueil et leur aide précieuse tout au long de nos travaux pratiques.*

*Nos sincères remerciements vont aussi à tous les enseignants et enseignantes de la spécialité Sécurité Agro-alimentaire et Assurance Qualité, pour les connaissances et les compétences qu'ils nous ont transmises tout au long de notre formation.*

*À toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire, nous disons un grand merci*

# DEDICACES

*J'ai le plaisir de dédier ce mémoire :*

*À Dieu, source de force, de paix et de persévérance, je rends grâce pour chaque souffle, chaque pas, chaque réussite.*

*À mon grand-père et ma tante qu'ont laissé un grand vide.*

*À mon très cher père et ma très chère mère, mes piliers, mes repères, mes refuges. Merci pour votre amour inconditionnel, vos sacrifices silencieux, vos prières qui m'ont portée plus loin que je ne l'imaginais. Ce travail est le fruit de votre dévouement.*

*À ma sœur Kawther et mes deux frères Kacem et Mouayad, pour leur affection sincère, leur écoute et leurs encouragements constants. Merci d'avoir cru en moi, même dans mes silences et mes doutes.*

*À mes grands-parents pour leur sagesse, leurs bénédictions et leur tendresse, qui m'ont toujours guidée avec amour.*

*À la famille BENDJEBARA et la famille BELHADJ TAHER,*

*À tous mes amis, surtout mes copines pour leur soutien moral, leurs mots réconfortants et leur énergie bienveillante tout au long de ce parcours.*

*À mon binôme, complice dans cette belle aventure, avec qui j'ai partagé chaque étape, chaque difficulté et chaque réussite. Ce mémoire est le symbole de notre travail, de notre patience et de notre détermination commune.*

*Et enfin, à moi-même. Pour ne pas avoir abandonné. Pour avoir continué malgré les incertitudes, mais aussi les petites victoires. Ce mémoire est un hommage à ma propre résilience.*

*À vous tous, ce travail vous appartient autant qu'à moi.*

**YASSAMINE.**

# DEDICACES

*Avant tout, je rends grâce à Dieu, source de paix et de lumière, qui m'a guidée, soutenue et donné la force de croire en moi, même dans les moments d'incertitude.*

*Je dédie ce travail à moi-même, à cette version de moi qui a persévéré, malgré les doutes, les fatigues et les larmes. Je suis fière de ce chemin parcouru.*

*À ma maman chérie, ma source d'amour inépuisable, mon refuge et mon inspiration aucune parole ne saurait exprimer toute ma gratitude pour ton amour, tes sacrifices et tes prières silencieuses.*

*À mon père, dont le regard plein de fierté m'a donné confiance et courage. Merci pour ta force tranquille et ton soutien discret mais essentiel.*

*À mon frère et ma sœur, mes premiers compagnons de vie, pour leur affection, leur humour et leur présence qui m'ont tant réconfortée.*

*À la mémoire de mon cher oncle MOHAMMED ton absence me pèse mais ton souvenir m'inspire que ce modeste travail soit un hommage à ton âme.*

*À ma famille toute entière, pour l'amour qui m'a portée, même à distance.*

*À mes précieuses amies, qui ont été mon pilier dans les moments de doute, mes éclats de rire dans les journées grises, et mon soutien constant.*

*Et à mon binôme, ma sœur de cœur dans cette aventure académique, merci pour ta complicité, ta patience et ta présence indéfectible à chaque étape.*

**SARRA.**

## Résumé

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la sécurité sanitaire des produits laitiers, en s'intéressant à la microflore bactérienne présente dans une industrie laitière et à son potentiel de formation de biofilms. Les biofilms sont des structures complexes constituées de cellules microbiennes adhérant entre elles et à des surfaces, enveloppées dans une matrice extracellulaire. Leur présence dans les équipements industriels représente un risque significatif, car ils favorisent la persistance des agents pathogènes et altèrent la qualité microbiologique des produits. L'objectif principal de ce travail a été d'isoler et de caractériser les bactéries présentes sur différents sites de l'environnement industriel laitier, et d'évaluer leur aptitude produire des enzymes d'altération, du slim bactérien et à former des biofilms, notamment sur des surfaces en acier inoxydable, les résultats ont révélé une diversité morphologique et physiologique importante parmi les souches isolées, incluant des Bacilles Gram négatif et des Cocci Gram positif. Certaines souches ont montré une activité enzymatique élevée : notamment la production de protéases (3/6 souches), de lipases (3/6) et de lécithinases (2/6). De plus, quatre souches sur six ont produit du slim détectable sur gélose Rouge Congo, indiquant la présence de substances polymériques extracellulaires. Concernant l'adhésion sur l'acier inoxydable, les valeurs de colonisation variaient de 0,7 à 7,093 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>. Ces données offrent une meilleure compréhension des mécanismes de colonisation bactérienne dans les industries laitières, et soulignent la nécessité de stratégies de nettoyage et de désinfection ciblées pour prévenir la persistance des biofilms.

**Mots clés :** Biofilm, slim, enzymes d'altération, acier inoxydable, industrie laitière.

## **Abstract**

This study focuses on the health safety of dairy products, examining the bacterial microflora present in the dairy industry and its potential for biofilm formation. Biofilms are complex structures consisting of microbial cells adhering to each other and to surfaces, enveloped in an extracellular matrix. Their presence in industrial equipment poses a significant risk, as they promote the persistence of pathogens and alter the microbiological quality of products. The main objective of this work was to isolate and characterize the bacteria present at different sites in the industrial dairy environment and to evaluate their ability to produce spoilage enzymes, bacterial slime, and to form biofilms, particularly on stainless steel surfaces. The results revealed significant morphological and physiological diversity among the isolated strains, including Gram-negative bacilli and Gram-positive cocci. Some strains showed high enzymatic activity, particularly the production of proteases (3/6 strains), lipases (3/6), and lecithinases (2/6). In addition, four out of six strains produced slime detectable on Congo red agar, indicating the presence of extracellular polymeric substances. Regarding adhesion to stainless steel, colonization values ranged from 0.7 to 7.093 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup>. These data provide a better understanding of the mechanisms of bacterial colonization in the dairy industry and highlight the need for targeted cleaning and disinfection strategies to prevent the persistence of biofilms.

**Keywords:** Biofilm, slime, degradation enzymes, stainless steel, dairy industry.

## ملخص

تندرج هذه الدراسة في إطار السلامة الصحية لمنتجات الألبان، حيث تركز على البكتيريا الموجودة في صناعة الألبان وقدرتها على تكوين أغشية بيولوجية. الأغشية البيولوجية هي هياكل معقدة تتكون من خلايا جرثومية تلتصق ببعضها البعض وبالأسطح، وتغليفها مصفوفة خارج الخلية. ويمثل وجودها في المعدات الصناعية خطرًا كبيرًا، لأنها تساعد على استمرار وجود العوامل الممرضة وتؤثر على الجودة الميكروبيولوجية للمنتجات. كان الهدف الرئيسي من هذا العمل هو عزل وتوصيف البكتيريا الموجودة في مواقع مختلفة من البيئة الصناعية للألبان، وتقييم قدرتها على إنتاج إنزيمات التلف، والهلام البكتيري، وتشكيل الأغشية الحيوية، لا سيما على الأسطح المصنوعة من الفولاذ المقاوم للصدأ، وهو مادة شائعة الاستخدام في خطوط الإنتاج. أظهرت النتائج تنوعًا مورفولوجيًا وفسولوجيًا كبيرًا بين السلالات المعزولة، بما في ذلك العصيات سالبة الجرام والمكورات موجبة الجرام. أظهرت بعض السلالات نشاطًا إنزيميًا مرتفعًا: لا سيما إنتاج البروتياز (6/3 سلالات)، الليباز (6/3) والليسيثيناز (6/2). بالإضافة إلى ذلك، أنتجت أربع سلالات من أصل ست سلالات مادة لزجة يمكن اكتشافها على أجيلوز كونغو الأحمر، مما يشير إلى وجود مواد بوليمرية خارج الخلية. فيما يتعلق بالالتصاق على الفولاذ المقاوم للصدأ، تراوحت قيم الاستعمار بين 0.7 و  $7.093 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ . توفر هذه البيانات فهمًا أفضل لآليات الاستعمار البكتيري في الصناعات الألبانية، وتؤكد على الحاجة إلى استراتيجيات تنظيف وتطهير موجهة لمنع استمرار الأغشية الحيوية.

**الكلمات المفتاحية:** الأغشية الحيوية، الهلام، إنزيمات التغيير، الفولاذ المقاوم للصدأ، الصناعة الألبانية.

## Liste des abréviations

- **ADH** : Arginine dihydrolase.
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- **ADNe** : acide désoxyribonucléique extracellulaire.
- **AMY** : Amygdalin.
- **AP** : après pasteurisation.
- **API 20<sup>E</sup>** : Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries).
- **ARA** : Arabinose.
- **ARN** : Acide Ribonucléique.
- **AV** : avant pasteurisation.
- **BHIB** : Bouillon cœur-cervelle  
Rpm : rotation per minute.
- **C°** : Degrés Celsius.
- **CIT** : Citrate de sodium.
- **DO** : densité optique.
- **ECM** : Une matrice extracellulaire.
- **EDS** : Eau distillée stérile.
- **EPS** : Substances polymères extracellulaires.
- **GEL** : Gélatine.
- **GLU** : Glucose.
- **H<sub>2</sub>S** : Sulfure d'hydrogène.
- **HGT** : Transfert horizontal de gènes.
- **IND** : Indole.
- **INO** : Inositol.
- **LDC** : Lysine décarboxylase.
- **LR** : lait recombinaison.
- **MAN** : D-mannitol.
- **MEL** : Mélibiose.
- **mL** : millilitre.
- **ODC** : Ornithose décarboxylase.
- **ONPG**: Ortho-Nitrophényl-β-galactoside.
- **PS** : Polysaccharides extracellulaires.
- **QS** : Quorum sensing.
- **RCA**: Rouge Congo Agar.
- **RHA**: Rhamnose.
- **SAC** : Saccharose.
- **SF** : saison froide.
- **SOR** : Sorbitol.
- **UHT** : ultra haute température.
- **URE** : Uréase.
- **VP** : Vogues Proskauer.
- **μL**: microlitre.

## Liste des figures

Figure 1: Etape de formation des biofilms (Douarche et al., 2018) .....	7
Figure 2: Préparation de galerie. ....	20
Figure 3: Ajout les réactifs .....	21
Figure 4: Les étapes de formation de biofilm en acier inoxydable .....	23
Figure 5: Les étapes de dénombrement des bactéries adhérentes .....	24
Figure 6: L'aspect macroscopique des isolats.....	26
Figure 7: Observation microscopique des isolats après coloration de Gram. ....	27
Figure 8: Résulta de protéase. ....	28
Figure 9: Résultat de lipase. ....	29
Figure 10: Résultat de lécithines .....	30
Figure 11: Résultat de RCA. ....	31
Figure 12: Résultat de galerie API 20E.....	32

## Liste des tableaux

Tableau 1: Résultats de l'observation macroscopique. ....	26
Tableau 2: Résultats de coloration de Gram des isolats. ....	27
Tableau 3: Résultats de la recherche de protéase. ....	28
Tableau 4: Résultats de la recherche de lipase. ....	29
Tableau 5: Résultat de la recherche de lécithines. ....	30
Tableau 6: Résulta de RCA. ....	31
Tableau 7: Résultats de nombre de bactéries adhérees à l'acier inoxydable. ....	33

## Table des matières

DEDICACES .....	
Résumé .....	
Abstract .....	
ملخص .....	
Liste des abréviations .....	
Liste des figures .....	
Liste des tableaux .....	
Table des matières .....	
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<i>Synthèse bibliographique</i>	
1- Composition du biofilm : .....	4
1.1. Les polysaccharides : .....	4
1.2 Les protéines extracellulaires : .....	5
1.3 L'eau : .....	5
2- Formation de biofilm : .....	5
2.1 Attachement initial : .....	6
2.2 Formation de petites colonies (microcolonie) : .....	6
2.3 Maturation : .....	6
2.4 Dispersion : .....	7
3. Les composants de la matrice du biofilm : .....	7
3.1 Les polysaccharides : .....	8
3.2 Les protéines : .....	10
3.3 Les lipides et les biosurfactants : .....	10
3.4 ADN extracellulaire : .....	10
4. Facteurs influençant la formation du biofilm : .....	10
4.1 Caractéristiques de la surface : .....	11
4.1.1 Rugosité de la surface : .....	11
4.1.2 Propriétés physico-chimiques de la surface : .....	11
4.1.3 Présence de films protéiques sur la surface : .....	11

4.2	Caractéristiques du milieu :	11
4.2.1	Température :	11
4.2.2	Le PH :	12
4.2.3	Présence de substrats :	12
5.	Les biofilms dans les industries agroalimentaires :	12
	<b>Matériel et méthodes</b>	14
1.	Origine des souches	15
2.	Revivification et vérification de la pureté des souches	15
3.	Caractérisation phénotypique des isolats :	15
3.1	Caractères macroscopiques :	15
3.2	Caractères microscopiques :	15
4.	Identification biochimique des bactéries :	16
4.1	Les protéases :	16
4.2	La lipase :	16
4.3	Le lécithines :	17
4.4	Détection de production de slim sur gélose Rouge Congo (RCA) :	18
4.5	Identification par Galerie API 20 E :	18
5	Capacité à former un biofilm en acier inoxydable :	22
	<b>Résultats et discussion</b>	25
1.	Caractérisation des souches isolées :	26
1.1.	Aspect macroscopique (Morphotypes) des isolats :	26
1.2.	Aspect microscopique des isolats :	27
2.	La caractérisation biochimique des isolats :	28
2.1	Recherche de protéase :	28
2.2	Recherche de lipase :	29
2.3	Recherche de lécithines :	30
2.4	. Détection de production de slim sur gélose Rouge Congo :	31
2.5	Résulta de galerie API 20 <sup>E</sup> :	32
	<b>Conclusion</b>	37
	<b>Références bibliographiques</b>	39
	<b>Annexes</b>	47

---

# *Introduction*

---



Une microflore est toujours présente sur les équipements laitiers avec sa capacité à former un biofilm, elle constitue une grande préoccupation pour les pertes économiques qu'elle occasionne et pour le risque de santé publique qu'elle présente (**Didouh et al., 2013**).

La plupart des biofilms bactériens présents dans les milieux naturels et industriels sont composés d'espèces bactériennes multiples et souvent génétiquement et métaboliquement diverses qui interagissent entre elles de plusieurs manières, allant de la coopération à la compétition, pour la coexistence et une meilleure survie sous contraintes environnementales (**Giri et al., 2022 ; Sadiq et al., 2021**).

Les biofilms peuvent se former rapidement dans les environnements de l'industrie alimentaire. Les deux premières étapes sont le conditionnement de la surface des matériaux et la liaison réversible des cellules à cette surface. Ensuite, la liaison devient irréversible et le développement des microcolonies commence. Finalement, la structure tridimensionnelle du biofilm se forme, donnant naissance à un écosystème complexe prêt à être dispersé (**Coughlan et al., 2016**).

La présence de biofilms est un phénomène répandu dans de nombreux écosystèmes, y compris les usines laitières (**Latorre et al., 2010**). Dans les entreprises de production laitière, les biofilms peuvent se former facilement en raison de la présence de résidus de lait et de la capacité spécifique des microorganismes à coloniser presque tous les matériaux, en particulier les aciers inoxydables largement utilisés en industries laitière. Les bactéries organisées en biofilms forment une matrice extracellulaire protectrice qui les rend difficiles à être éliminer, et peuvent persister sur les équipements et de ce fait contaminer le lait ou les produits laitiers (**Dallagi et al., 2023**).

Le but de cette étude est d'acquérir une connaissance approfondie de la microflore bactérienne spécifique présente dans une industrie laitière en mettant l'accent sur la capacité à former des biofilms dont l'objectif est d'une part identifier et caractériser la diversité de la microflore bactérienne présente dans l'industrie laitière, et d'autre part évaluer le potentiel de formation de biofilm des souches bactériennes isolées.

Le manuscrit est organisé en trois parties.

La première partie relative à la synthèse bibliographique nous aborderons un historique sur les biofilms en générale.

La deuxième partie sera consacrée à la description de la méthodologie.

Et enfin la dernière partie sera consacrée aux résultats et leurs discussions.

---

*Synthèse*  
*bibliographique*

---

Les biofilms microbiens sont définis comme une communauté de micro-organismes qui adhèrent les uns aux autres et aux surfaces, généralement dans une matrice mucilagineuse ou gélatineuse composée de substances polymères extracellulaires, notamment des polysaccharides, des protéines, des lipides et de l'ADN (**Olaimat et al., 2024**). Les biofilms peuvent se former sur des surfaces vivantes ou non vivantes et sont donc très répandus dans les milieux biologiques, naturels, industriels (**Shineh et al., 2023**).

Les biofilms peuvent être constitués d'espèces microbiennes individuelles ou de différentes combinaisons d'espèces de protozoaires, de bactéries, d'archées, de champignons filamenteux, de levures et d'algues qui forment un microbiome tridimensionnel complexe ou forment des structures polymères extracellulaires telles que des floccs ou des granules (**accepte et al., 2014 ; ragypathi et al., 2018**).

### 1- Composition du biofilm :

Le biofilm est une structure hétérogène composée principalement de cellules microbiennes (10 à 25 %) et d'une matrice EPS autoproduite (75 à 90 %) (**Plutôt et al., 2021**). De plus, dans un biofilm hétérogène, les vides interstitiels ou canaux d'eau du biofilm sont nécessaires pour séparer les microcolonies les unes des autres (**Evans, 2003**). L'EPS forme un échafaudage qui maintient le biofilm ensemble et, ainsi, aide à la communication intercellulaire et fournit les forces d'adhésion et de cohésion nécessaires à la formation du biofilm. L'EPS aide au cycle des nutriments, au maintien de la disponibilité de l'acide désoxyribonucléique (ADN) pour le transfert horizontal de gènes (HGT) et agit comme une barrière protectrice contre les biocides oxydants, les antibiotiques, les radiations ultraviolettes, la dessiccation et le système de défense immunitaire de l'hôte (**Flemming et al., 2000**).

Les principaux constituants de l'EPS peuvent être classés comme suit.

#### 1.1. Les polysaccharides :

La plupart des polysaccharides sont hétérogènes, mais certains sont également homogènes, comme la cellulose, les fructanes dérivés du saccharose et les glucanes (**Flemming et Wingender, 2010**). Diverses interactions telles que les interactions de van der Waals, les forces d'attraction et de répulsion électrostatiques, les forces d'attraction ioniques et les liaisons hydrogène favorisent l'interaction des polysaccharides avec eux-mêmes ou avec les

protéines et les ions nécessaires au maintien de la structure et de la stabilité de la matrice du biofilm (**Lembre et al., 2012**). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, trois exopolysaccharides, contribuent principalement à la formation du biofilm et au maintien de son architecture (**Rehm, 2010**). Le rôle des polysaccharides est d'agir comme une colle moléculaire nécessaire à l'adhésion des bactéries entre elles et aux surfaces biotiques et abiotiques pour la colonisation, en plus de jouer un rôle protecteur contre le système immunitaire et d'autres stress externes (**Limoli et al., 2015**).

### 1.2 Les protéines extracellulaires :

Les protéines extracellulaires sont des composants clés de la matrice des biofilms, sécrétées par les micro-organismes. Elles jouent un rôle structural et fonctionnel en facilitant l'adhésion des cellules entre elles et à la surface, en stabilisant la matrice, et en contribuant à la protection contre les agents antimicrobiens. Elles peuvent inclure des enzymes, des protéines de liaison et des protéines amyloïdes (**Kjelleberg S, Givskov 2007**).

### 1.3 L'eau :

L'eau c'est le composant le plus important de la matrice EPS du biofilm. Elle maintient le biofilm hydraté et le protège de la dessiccation même lors des fluctuations de la teneur en eau de l'environnement (**Flemming et Wingender, 2010**). Le flux et le maintien des nutriments essentiels dans un biofilm sont attribués à la quantité d'eau disponible (**Sutherland, 2001**).

## 2- Formation de biofilm :

En général, le cycle de vie du biofilm comprend quatre étapes principales (Figure1), à partir de la fixation initiale d'une cellule bactérienne sur une surface biotique ou abiotique, ce qui produit une microcolonie contenant uniquement des cellules non mobiles. Après la formation de la microcolonie, le cycle se poursuit jusqu'à la formation d'un biofilm mature, limité en taille par la diffusion des nutriments dans la matrice du biofilm et des déchets métaboliques hors de celle-ci. En cas d'épuisement des nutriments ou d'autres conditions environnementales défavorables, des cellules bactériennes planctoniques mobiles se formeront, se détacheront, puis coloniseront une surface pour former un autre biofilm (**Bai et al., 2021 ; Tasneem et al., 2018**).

### 2.1 Attachement initial :

La cellule bactérienne utilise ses organites extracellulaires, tels que le pilet les flagelles, en combinaison avec des interactions électrostatiques et hydrophobes, ainsi que des forces de van der Waals, pour s'accrocher aux surfaces. À ce stade, la cellule bactérienne peut être facilement détachée par des forces de cisaillement et commencer à sécréter des EPS, ce qui initie une forte interaction avec la surface (**Olaimat et al., 2024**).

Une fixation irréversible se produit après la formation d'une monocouche d'EPS et les cellules s'agrègent pour former une microcolonie. En revanche, les cellules à ce stade adhèrent fermement à la surface et nécessitent une forte intervention chimique ou une force de cisaillement pour être éliminées. (**O'toole et al., 2000**).

### 2.2 Formation de petites colonies (microcolonie) :

Après la fixation, les cellules bactériennes continuent leur reproduction et sécrètent davantage de matériel polymère extracellulaire pour devenir une microcolonie dans des conditions de croissance appropriées. Le biofilm continue son expansion et à l'intérieur de celui-ci, les cellules se divisent et développent des structures complexes en utilisant la signalisation de cellule à cellule ou la détection de quorum (**Rabin et al., 2015**).

Le quorum sensing (QS) est un système de communication intercellulaire utilisé lorsque la densité de population bactérienne atteint un certain seuil, ce qui, dans ce cas, conduit à la sécrétion de molécules qui régulent l'expression de ou des gènes responsables de la production d'EPS (**Olaimat et al., 2024**).

### 2.3 Maturation :

Une fois la première couche de biofilm établie pour créer une microcolonie, la cellule bactérienne continue la sécrétion de composants EPS et avec le développement de pores et de canaux au sein de la communauté, le biofilm se transforme en une structure tridimensionnelle (3D) semblable à un champignon (**Zhao et al., 2017**).

Le rôle des pores et des canaux est de transporter l'eau, les nutriments et l'oxygène, ainsi que d'agir comme des conduits pour l'élimination des déchets (Klausen *et al.*, 2003 ; Tolker-Neilsen *et al.*, 2000).

Il est apparu que la communauté mature contient trois couches : la première est représentée par une structure en réseau à la surface, la couche intermédiaire existe comme membrane basale pour les cellules bactériennes compactes et non mobiles, et la couche supérieure contient des cellules planctoniques. Dans l'ensemble, le biofilm est composé d'une communauté stable caractérisée par une résistance antimicrobienne élevée et résiste à l'élimination (Rabin *et al.*, 2015).

### 2.4 Dispersion :

Finalement, certaines cellules planctoniques des couches externes acquièrent de la motilité, s'éloignent de la colonie mère par des canaux dans le biofilm et se fixent à une autre surface pour recommencer le processus. Le processus de détachement est affecté par plusieurs facteurs, notamment la limitation des nutriments, la répression des cataboliques et les protéines sécrétées (Zhao *et al.*, 2017).

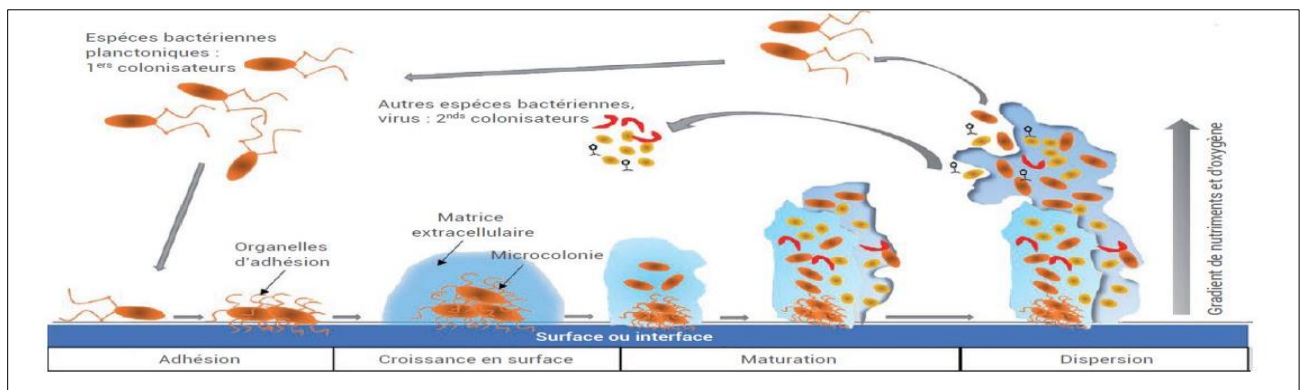


Figure 1: Etape de formation des biofilms (Douarche *et al.*, 2018)

### 3. Les composants de la matrice du biofilm :

La matrice du biofilm joue un rôle essentiel dans l'amélioration de la virulence et de la résilience des biofilms bactériens, en particulier des agents pathogènes d'origine alimentaire

réputés pour leurs capacités de formation de biofilms dans les environnements de transformation et de distribution des aliments. (**Bai et al., 2021 ; Lepuschitz et al., 2019**).

Cette matrice est un mélange complexe d'EPS, comprenant des polysaccharides, des protéines, des lipides et de l'ADN extracellulaire (ADNe), servant collectivement de barrière protectrice pour les cellules bactériennes enfermées. La matrice du biofilm fournit non seulement une stabilité mécanique, mais agit également comme une formidable barrière contre les facteurs de stress environnementaux et les agents antimicrobiens, augmentant considérablement le défi de l'éradication du pathogène des surfaces en contact avec les aliments industriels (**Flemming et al., 2022 ; Solomon et al., 2005**).

De la même manière, reconnu pour sa ténacité à persister dans les environnements où sont fabriquées les préparations en poudre pour nourrissons, exploite la matrice pour assurer sa survie pendant la fabrication et le stockage de ces produits, soulignant le rôle critique joué par la matrice dans sa survie (**Lepuschitz et al., 2019**).

Une compréhension complète de la composition et des fonctions de la matrice du biofilm produit par ces agents pathogènes est essentielle pour le développement de stratégies ciblées visant à perturber la formation du biofilm et à améliorer la sécurité des aliments (**Solomon et al., 2005**).

L'EPS produit par la cellule bactérienne est considéré comme la caractéristique la plus critique de la matrice du biofilm. C'est « la maison » qui recouvre et entoure les cellules bactériennes et qui représente  $\geq 90$  % de la masse sèche totale du biofilm. En revanche, les cellules bactériennes ne représentent qu'environ 10 % de la masse dans la plupart des cas (**Bai et al., 2021 ; Flemming et Wingender, 2010**).

### 3.1 Les polysaccharides :

Les polysaccharides des biofilms, également connus sous le nom de polysaccharides extracellulaires (PS), représentent un composant important des biofilms bactériens, exerçant une influence multiforme sur la formation, l'intégrité et la résilience de ces communautés microbiennes structurées (**Flemming et Wingender, 2010**).

Les PS sont constitués de longues chaînes de molécules de sucre sécrétées par les cellules bactériennes, formant une matrice complexe qui encapsule et lie les cellules constitutives du biofilm (**Limoli et al., 2015**).

L'importance des PS de biofilm dans les biofilms bactériens peut être démontrée par leurs fonctions de soutien structurel et de stabilité, où les polysaccharides servent d'échafaudage architectural du biofilm, créant un réseau complexe qui confère une intégrité structurelle au biofilm (**Singh et al., 2021**).

Cette matrice confère au biofilm sa structure 3D caractéristique, améliorant sa résistance aux perturbations mécaniques et aux forces de cisaillement (**Limoli et al., 2015**).

De plus, l'adhésion et la fixation des PS favorisent la fixation initiale des cellules bactériennes aux surfaces et aux cellules hôtes lors de la formation du biofilm. Ces polysaccharides peuvent également interagir avec les surfaces, facilitant la fixation réversible initiale des cellules bactériennes par des mécanismes tels que les forces de van der Waals et les interactions électrostatiques (**Flemming et Wingender, 2010**).

Un troisième aspect de la fonction des PS est leur rôle essentiel dans la protection des cellules bactériennes contre divers facteurs de stress environnementaux. Les PS agissent comme une barrière physique, empêchant la dessiccation ainsi que la pénétration de désinfectants chimiques et d'agents antimicrobiens dans le biofilm. Les PS améliorent la rétention d'eau et le piégeage des nutriments grâce à leur grande capacité de rétention d'eau, maintenant ainsi un microenvironnement hydraté au sein du biofilm (**Limoli et al., 2015**).

Ceci est particulièrement avantageux pour les cellules bactériennes dans des environnements où la disponibilité des nutriments est limitée et peut contribuer à leur survie à long terme car elles sont protégées dans le biofilm (**Flemming et Wingender, 2010**).

Enfin, elles peuvent jouer un rôle dans le détachement du biofilm si nécessaire. Certaines bactéries formant des biofilms produisent des enzymes qui ciblent et dégradent la matrice polysaccharidique, facilitant la libération des cellules et permettant la dispersion du biofilm et la colonisation de nouveaux environnements (**Lear et al., 2010**).

### 3.2 Les protéines :

Les protéines des biofilms comprennent des protéines d'adhésion et des protéines enzymatiques. Les protéines d'adhésion améliorent la fixation microbienne aux produits alimentaires ou aux surfaces en contact avec les aliments (**Bai et al., 2021**), tandis que les protéines enzymatiques, telles que les protéases, jouent un rôle essentiel dans l'acquisition des nutriments et la dégradation des substances au sein de la matrice du biofilm. Les protéines du biofilm peuvent également participer aux voies de signalisation (par exemple, la détection du quorum) qui régulent le développement et le maintien du biofilm (**Rather, 2021**).

### 3.3 Les lipides et les biosurfactants :

Les lipides et les biosurfactants présents dans les biofilms, notamment les phospholipides, la surfactine lipidique A, l'émulsane, la viscosine et les rhamnolipides, contribuent à la structure et à la fonction de la matrice du biofilm en adhérant à certaines surfaces hydrophobes, telles que le Téflon et les surfaces cireuses, et en les colonisant. De plus, ils jouent un rôle dans la liaison des métaux lourds, la production de facteurs de virulence et contribuent à la résistance des biofilms aux solvants, aux désinfectants et aux détergents (**Adetunji et Olaniran, 2021**).

### 3.4 ADN extracellulaire :

En général, l'ADN environnemental est libéré par les systèmes de sécrétion bactérienne en raison de la lyse cellulaire qui peut se produire en raison de l'autolyse des cellules bactériennes, de la présence de bactériophages ou de sa libération dans les vésicules de la membrane externe. L'ADN environnemental joue un rôle essentiel dans l'initiation de la formation de biofilms, principalement via la motilité et en facilitant l'interaction des cellules dans les biofilms via la liaison avec les charges positives des protéines. En outre, il joue un rôle dans la stabilité du biofilm, la résistance aux antibiotiques et le transfert horizontal de gènes (**Ibáñez et al., 2017 ; Tolker-Nielsen, 2000**).

## 4. Facteurs influençant la formation du biofilm :

Plusieurs facteurs associés aux surfaces ou aux bactéries peuvent influencer l'adhésion de la phase planctonique et l'évolution du biofilm, tels que :

### 4.1 Caractéristiques de la surface :

#### 4.1.1 Rugosité de la surface :

La texture de la surface accroît l'espace disponible pour que les bactéries s'attachent et offre une base propice à leur adhésion. En outre, la texture rugueuse offre une protection aux bactéries contre les forces de cisaillement et les empêche de se détacher. En général, on considère que l'accroissement de la rugosité de la surface stimule l'adhésion des bactéries et la création de biofilm (**Characklis et al., 1990**).

#### 4.1.2 Propriétés physico-chimiques de la surface :

Le taux et l'étendue de l'adhésion microbienne sont régis par les caractéristiques physicochimiques de la surface. Les surfaces non polaires et hydrophobes facilitent l'adhésion microbienne par rapport aux surfaces hydrophiles. Les cellules sont capables de dépasser les forces répulsives exercées par la matrice via des interactions hydrophobes (**Bendinger et al., 2003**).

#### 4.1.3 Présence de films protéiques sur la surface :

Un matériau exposé à un environnement aqueux sera rapidement traité ou couvert par les polymères présents dans cet environnement. Les modifications chimiques qui en découlent influenceront la vitesse et l'étendue de l'attachement microbien. Effectivement, différentes membranes régulatrices générées par l'hôte comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le fluide interstitiel et les sécrétions respiratoires participent à l'adhésion des bactéries aux biomatériaux. (**Redney, 2002**).

### 4.2 Caractéristiques du milieu :

#### 4.2.1 Température :

L'adhérence bactérienne et le processus de formation du biofilm sont influencés par la température et le temps de contact, et il est essentiel d'élargir la formulation des modèles

mathématiques pour examiner comment ces deux éléments, ainsi que leurs interactions, affectent le processus (Castro *et al.*, 2018).

### 4.2.2 Le PH :

Le pH de l'environnement influence la charge de surface des microorganismes et celle des substrats solides, à cause des variations d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupes fonctionnels exposés, selon leur pKa. Ces changements peuvent provoquer une diminution ou une amplification des interactions électrostatiques de répulsion, ce qui peut faciliter ou nuire à l'adhésion des bactéries (Boutaleb, 2007).

### 4.2.3 Présence de substrats :

La présence d'un substrat introduit une dimension supplémentaire à l'étude de l'adsorption, où les interactions entre les composants de l'électrolyte, les particules (le cas échéant), les tensioactifs, et la surface du substrat dictent le comportement interfacial et les propriétés macroscopiques du système (Spormann, 2008)

## 5. Les biofilms dans les industries agroalimentaires :

Les applications positives du biofilm dépendent de la flexibilité et de la résistance du biofilm, de sa solubilité dans l'eau et de sa perméabilité à la vapeur d'eau. Il est intéressant de savoir que le biofilm pourrait éventuellement protéger les aliments de l'oxydation des lipides, des gaz, de l'eau et des odeurs (Kim *et al.*, 2012).

Les biofilms sont une source de préoccupation pour l'industrie laitière en tant que sources possibles de contamination par des bactéries pathogènes et des bactéries de détérioration, entraînant de graves pertes économiques dues à la détérioration des aliments, aux épidémies de maladies d'origine alimentaire et aux défaillances ou détériorations des équipements (Sealeet *et al.*, 2015).

L'acier inoxydable, qui est largement utilisé dans les équipements et les surfaces de transformation des produits laitiers, fournit une couche adhérente sur laquelle la formation de

biofilm peut commencer. L'adhérence est encore exacerbée par le contact constant des surfaces de l'équipement avec le lait (**Gebreyohannes et al., 2019**).

La formation de biofilms dans les conduites de ces équipements entraîne une diminution du débit de liquide le long de la conduite tandis que le transfert de chaleur peut également être réduit. De plus, les biofilms peuvent contaminer le produit et provoquer la corrosion de la surface de l'équipement en raison de la formation d'acide dans le biofilm. (**Hebbishy et al., 2024**).

---

# Matériel et méthodes

---

### 1. Origine des souches

Cette étude s'appuie sur des isolats issus d'une collection de souches bactériennes prélevés sur des canalisations de lait de vache cru à partir de la laiterie située à Ain Defla, (Nord de l'Algérie), La collection a été maintenue à une température de -20°C dans un Bouillon Nutritif additionné de 25% de glycérol (v/v). On les identifie en se basant sur les codes suivants : (1 pré L.R/A.V SF1, 1 pré L.R/A.V SF3, 1 pré L.R/A.P SF1, 1 pré L.R/A.P SF2, 1 pré L.R/A.P SF3', 1 pré L.R/A.P SF5, 1 pré L.R/A.P SF5').

### 2. Revivification et vérification de la pureté des souches

En utilisant les suspensions bactériennes conservées, 200 µL ont été inoculés dans 5 mL de Bouillon cœur-cerveau (BHIB). Les cultures ont par la suite été incubées à 30°C jusqu'à l'apparition d'un trouble par la suite, un repiquage a été réalisé sur de la gélose Plate Count Agar (PCA), puis les boîtes ont été mises en incubation à une température de 30°C pendant une durée de 24 heures. Afin de vérifier la pureté des isolats, des repiquages successifs ont été effectués à l'aide de la méthode d'épuisement sur Gélose PCA.

### 3. Caractérisation phénotypique des isolats :

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

#### 3.1 Caractères macroscopiques :

Après une incubation de 24 heures à une température de 30°C sur Gélose PCA, les caractères culturels des isolats (taille, forme, coloration, transparence, relief, texture et élévation des colonies) ont été déterminés.

#### 3.2 Caractères microscopiques :

Les caractères microscopiques des isolats ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose PCA.

- Après avoir effectué une coloration de Gram, nous avons déterminé la morphologie, l'organisation cellulaire et le type de paroi. Les observations se font en utilisant un microscope photonique à objectif 100 en immersion.
- L'examen de la mobilité a été effectué en observant des cellules vivantes entre une lame et une lamelle à l'aide d'un microscope photonique doté d'un objectif 40.

#### 4. Identification biochimique des bactéries :

##### 4.1 Les protéases :

###### Principe :

Les protéases hydrolysent les protéines en petits fragments peptidiques et acides aminés. Les liaisons sont cassées par l'addition de l'eau entre les groupes adjacents carboxyliques et amines (**Gupta et al., 2002**).

###### Technique :

L'activité protéolytique est révélée sur gélose nutritive contenant 10% de poudre de lait (p/v). Une colonie de chaque souche à étudier estensemencée par une strie avec une anse. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24h.

###### Lecture :

La présence de caséinase se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour des colonies. Par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (**Jay, 2000**).

##### 4.2 La lipase :

###### Principe :

Le principe de la lipase repose sur une activité lipolytiques et estérasique qui décompose les graisses en acide gras et alcool.

###### Technique :

L'activité lipolytique est réalisée sur gélose nutritive additionnée de 1% de tween 80 (v/v). L'ensemencement se fait par une seule strie pour chaque souche. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h (**Castro et al., 2005**).

Lecture :

La présence de lipase se présente par l'apparition d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de lipolyse.

### 4.3 La lécithines :

Principe :

Le principe du test repose sur l'observation de la dégradation de la lécithine par l'enzyme lécithinase produite par le micro-organisme testé. La lécithine est insoluble dans l'eau, et son hydrolyse par la lécithinase produit des composés plus solubles, entraînant un changement d'aspect du milieu de culture.

Technique :

Ce test a été réalisé en ajoutant 10 mL de l'émulsion du jaune d'œuf stérile aux 90 mL du milieu de culture. Après incubation, l'apparition d'une zone claire autour de la culture témoigne la production de la lécithines par les isolats (**De Vos et al., 2009**).

Lecture :

L'analyse du test s'effectue en examinant la région autour de la prolifération bactérienne.

Test positif : La présence de lécithines est indiquée par l'émergence d'une zone floue ou sombre entourant la colonie. Cette opacité est causée par la formation de diglycérides insolubles qui sont libérés lors de l'hydrolyse de la lécithine. Dans certaines situations, un halo initial clair peut être noté à cause d'une lipoprotéine (responsable de la dégradation des lipoprotéines présentes dans le jaune d'œuf), suivi par une opacification provoquée par la lécithines.

Test négatif : L'absence de lécithines est indiquée par l'absence de halo trouble ou opaque autour de la colonie. La gélose conserve sa transparence ou montre un changement dû à la prolifération bactérienne, sans toutefois présenter d'opacité spécifique associée à l'hydrolyse de la lécithine.

### 4.4 Détection de production de slim sur gélose Rouge Congo (RCA) :

Principe :

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

Technique :

Dissoudre les composants du RCA (saccharose, BHIB, Rouge Congo Agar) dans l'eau distillée. L'ensemencement se fait par une seule strie pour chaque souche. L'incubation se fait à 37°C Pendant 5 jour.

Lecture :

Les souches à phénotype variable donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (**Mathur et al., 2006 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; Bellifa, 2013**).

### 4.5 Identification par Galerie API 20 E :

Principe et technique

Le système d'identification API 20E est conçu pour identifier les entérobactéries et autres bacilles Gram négatif à croissance facile. Il repose sur une galerie de 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Ces micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne afin d'évaluer différentes réactions biochimiques (**Koumba, 2007**).

Préparation de la galerie (figure 2).

Assembler le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation, puis répartir 5 ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour maintenir une atmosphère humide.

Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

Retirer la galerie de son emballage.

Déposer la galerie stérilement dans la boîte d'incubation (**Debabza, 2014**).

Préparation de l'inoculum

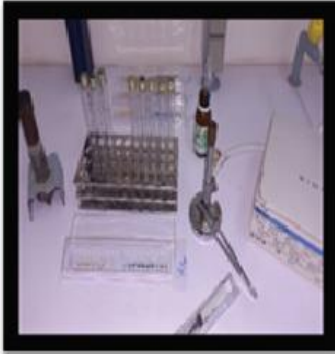
Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d'eau physiologique stérile, à partir d'une culture pure et jeune âgée de 18 à 24 heures sur GN.

Ensemencement de la galerie API 20E

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, en veillant à appuyer la pointe contre l'intérieur du tube pour éviter la formation de bulles d'air.
- Pour les tests soulignés (ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE), ensemercer le tubule avec la suspension et la cupule avec de l'huile de vaseline stérile.
- Pour les tests encadrés (VP, CIT, GEL), ensemercer à la fois le tubule et la cupule avec la suspension.
- Pour les tests non encadrés et non soulignés, ensemercer uniquement le tubule avec la suspension.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Lecture de la galerie Après incubation, la lecture des résultats se fait en suivant le tableau de lecture. (Voir annexe)

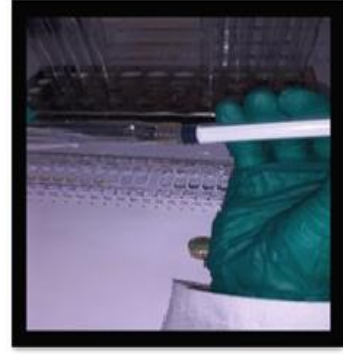
- Ajouter les réactifs nécessaires pour révéler certains tests (figure 3):
  - Tryptophane désaminase TDA : Ajouter une goutte de réactif TDA. Une coloration marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
  - Test de l'indole IND : une colore rouge à la surface, production d'indole à partir du tryptophane.
  - Test de Voges-Prockauer VP : Détecte l'acétoïne, coloration rouge indique une réaction positive.



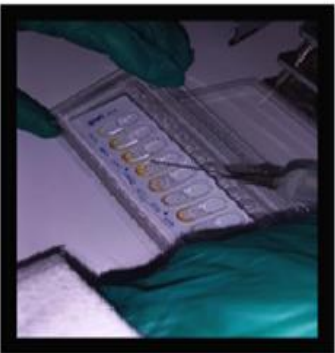
Préparation de la galerie



Préparation de la suspension bactérienne



Prélèvement d'un tube



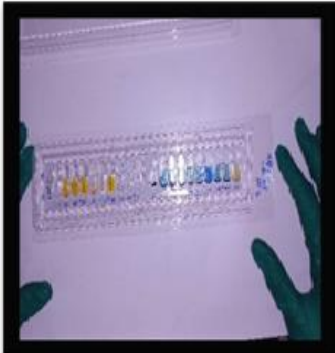
Inoculé les micro tube



Remplir les cupules de l'huile de paraffine



Remplir les alvéoles avec l'eau distillée



Mettre la galerie dans la boîte



La galerie API20E après l'ensemencement



Incubation à 37°C

**Figure 2: Préparation de galerie.**

Après 24h d'incubation ajouter les réactifs suivants :

TDA, IND, VP1, VP2



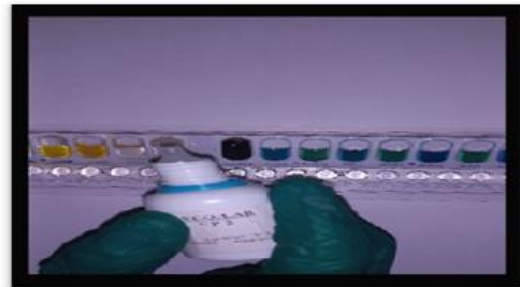
L'ajout du réactif TDA



L'ajout du réactif IND



L'ajout du réactif VP1



L'ajout du réactif VP2

**Figure 3: Ajout les réactifs**

### 5 : Capacité à former un biofilm en acier inoxydable :

Des coupons en acier inoxydable (15x 45 mm, type AISI 316 L) ont été utilisés comme surfaces d'essai, ils ont été nettoyés. L'acier inoxydable nettoyé a été placé horizontalement dans un tube contenant 5 ml de lait écrémé pour obtenir le film de conditionnement. Les coupons ont ensuite été retirés et rincés trois fois avec de l'eau distillée. Ensuite, les coupons ont été plongés individuellement dans des tubes contenant une culture bactérienne à une densité optique de 0,08 à 0,1 de souche testée. Chaque coupon a ensuite été incubé pendant 24 heures à 37 °C avant d'être retiré à l'aide de pinces stériles.

Les cellules non adhérentes ont été éliminées en rinçant le coupon trois fois avec l'eau physiologique. Les cellules adhérentes ont été détachées du coupon à l'aide d'un écouvillon trempé dans une solution de tween80, (**Kruszewski et al., 2013**) ce dernier est vortexé pendant 1 min pour détacher les micro-organismes et former la solution mère qui a ensuite été utilisée pour préparer d'autres dilutions décimales (**Faile et al., 2013**). Les dilutions ont étéensemencées sur PCA et incubées pendant 24 h. Les tests ont été réalisés en trois exemplaires.



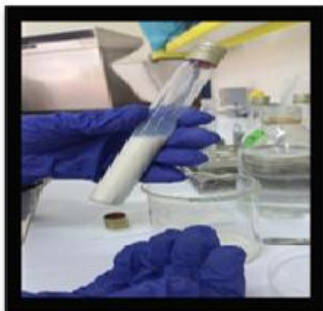
Les tubes contenant l'acier inoxydable et 5 mL du lait



Mesure de la Do



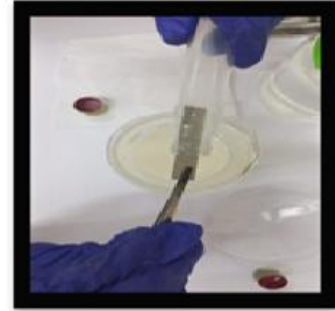
La Do entre 0.08 et 0.1



Tube après l'incubation pendant 1h



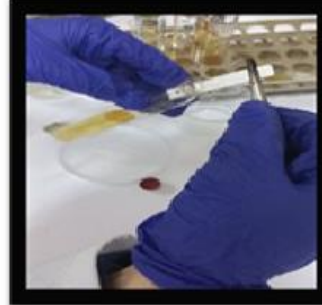
Elimination du lait



Retirer les coupons d'acier inoxydable

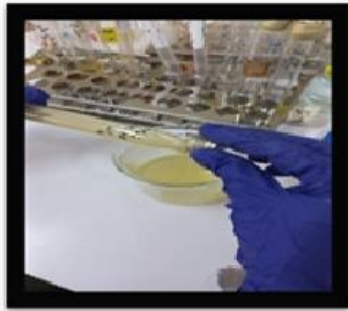


Rinçage par l'eau distillée stérile

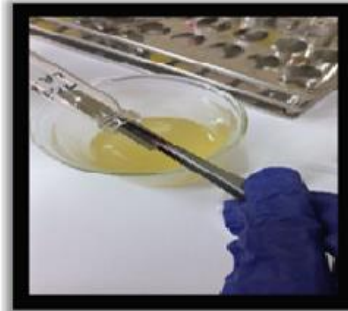


Mettre les coupons dans la suspension bactérienne

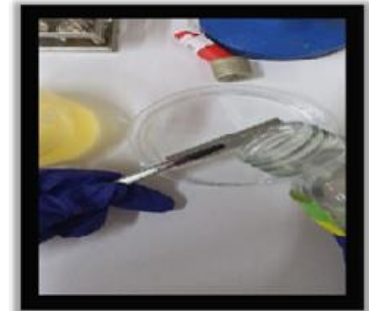
**Figure 4: Les étapes de formation de biofilm en acier inoxydable**



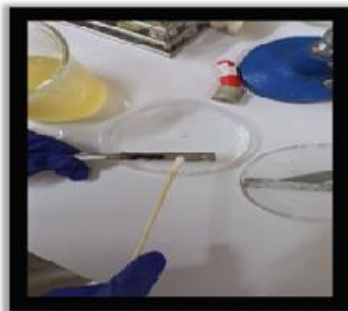
Eliminer la suspension bactérienne



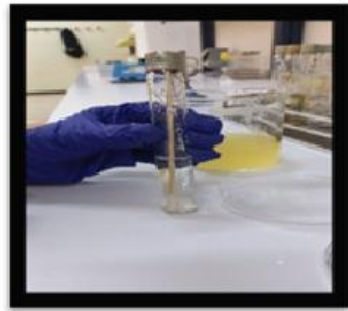
Retirer les coupons



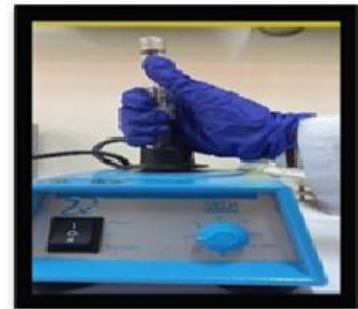
Rinçage par l'eau physiologie



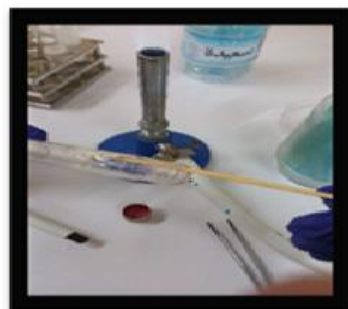
Gratter les coupons



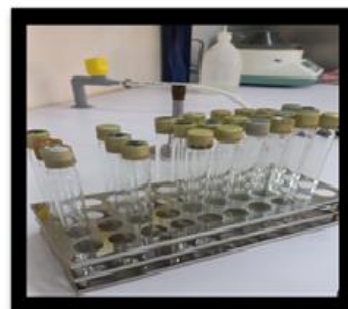
Ecouvillon imbibé dans une solution tween 80



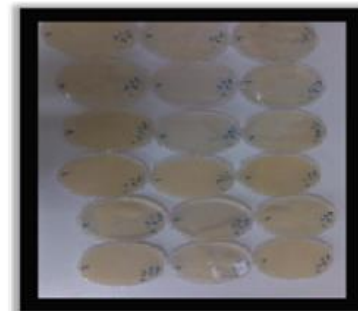
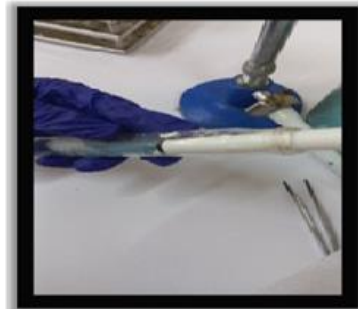
Vortex pendant 1 min



Retirer l'écouvillon



Dilutions en série



Ensemencement des boites en profondeur avec la gélose PCA après les incubé 24H à 37°C

**Figure 5: Les étapes de dénombrement des bactéries adhérentes**

---

# **Résultats et discussion**

---

**1. Caractérisation des souches isolées :**

L'objectif de cette étude était d'évaluer la diversité du microbienne fixé aux surfaces en acier inoxydable dans une usine laitière.

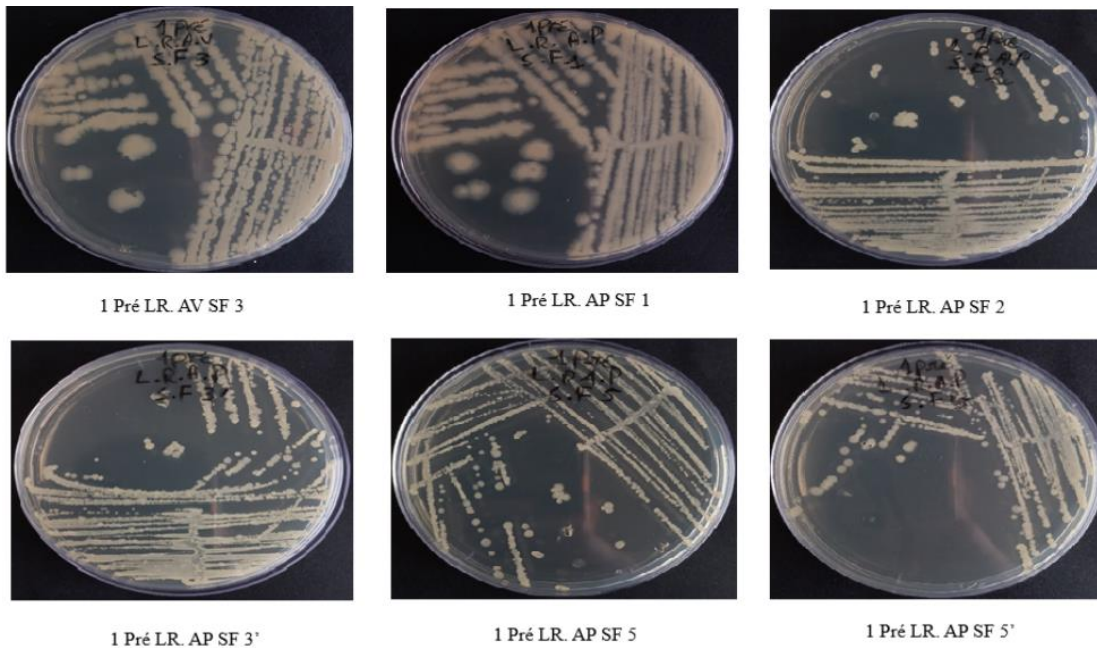
**1.1. Aspect macroscopique (Morphotypes) des isolats :**

Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies isolées à partir des surfaces des canalisations d'une industrie laitière présentent des aspects macroscopiques variées (voir tableau 1 et figure 6).

**Tableau 1: Résultats de l'observation macroscopique.**

Les souches	La forme	Le relief	Le contour	La taille	La surface
1 pré L.R/A.V SF3	Irrégulière	Plate	Irréguliers	Grosse colonie (9mm)	Rugueuse
1 pré L.R/A.P SF1	Irrégulière	Plate	Irréguliers	Grosse colonie (1cm)	Rugueuse
1 pré L.R/A.P SF2	Ronde	Bombé	Régulière	Colonie moyenne (3mm)	Rugueuse
1 pré L.R/A.P SF3'	Irrégulière	Plate	Irréguliers	Petit colonie (1mm)	Rugueuse
1 pré L.R/A.P SF5	Ronde	Bombé	Régulière	Colonie moyenne (3mm)	Lisse
1 pré L.R/A.P SF5'	Ronde	Bombé	Régulière	Colonie moyenne (3mm)	Lisse

LR : lait reconstitué, AV : avant pasteurisation, AP : après pasteurisation, SF : saison froide.



**Figure 6: L'aspect macroscopique des isolats**

L'observation des colonies isolées a révélé une diversité morphologique remarquable. Cette diversité macroscopique indique probablement la présence de plusieurs genres ou espèces bactériennes, reflétant la richesse microbienne. Dans les industries alimentaires, les surfaces et les équipements en contact avec les aliments et non avec ceux-ci sont régulièrement contaminés par des micro-organismes pouvant former des biofilms (Alvarez *et al.*, 2019).

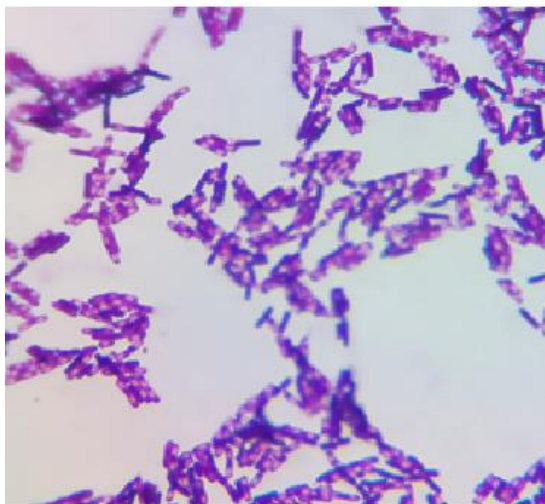
### 1.2. Aspect microscopique des isolats :

Les caractères microscopiques des isolats ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 37°C sur Gélose Nutritive.

L'observation de l'état frais a mis en évidence le caractère mobilité des isolats. L'examen microscopique après coloration de Gram a révélé que les isolats possèdent un type de paroi à Gram positif et à Gram négatif (voir tableau 2 et figure 7).

**Tableau 2: Résultats de coloration de Gram des isolats.**

Les souches	Gram coloration
1 pré L.R/A.V SF3	Bacille -
1 pré L.R/A.P SF1	Bacille -
1 pré L.R/A.P SF2	Cocci +
1 pré L.R/A.P SF3'	Bacille -
1 pré L.R/A.P SF5	Cocci +
1 pré L.R/A.P SF5'	Cocci +



Gram +



Gram -

**Figure 7: Observation microscopique des isolats après coloration de Gram.**

La motilité à l'état frais suggère la présence de structures locomotrices telles que des flagelles. Cette caractéristique est utile pour différencier certains genres et espèces bactériennes. Les résultats montrent clairement la présence de deux groupes distincts : des bacilles à Gram négatif et des Cocci à Gram positif.

### 2. La caractérisation biochimique des isolats :

#### 2.1 Recherche de protéase :

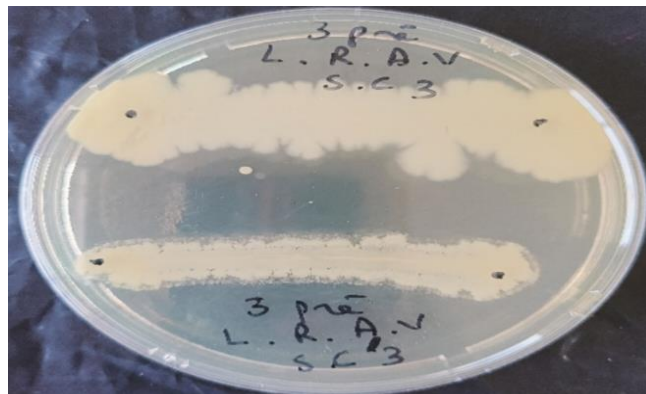
La recherche des protéases a été effectuée sur gélose au lait afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de l'enzyme protéase (voir tableau 3 et figure 8).

**Tableau 3: Résultats de la recherche de protéase.**

Les souches	Résultat
1 pré L.R/A.V SF3	+
1 pré L.R/A.P SF1	-
1 pré L.R/A.P SF2	+
1 pré L.R/A.P SF3'	-
1 pré L.R/A.P SF5	-
1 pré L.R/A.P SF5'	+

Les souches du **1 pré L.R/A.V SF3**, **1 pré L.R/A.P SF2**, et **1 pré L.R/A.P SF5'** présentent une activité protéasique détectable. Cela suggère que ces souches produisent des enzymes capables de dégrader les protéines.

En revanche, les souches **1 pré L.R/A.P SF1**, **1 pré L.R/A.P SF3'** et **1 pré L.R/A.P SF5** ne montrent pas d'activité protéasique. Cela pourrait indiquer que ces souches ne produisent pas de protéases.



**Figure 8: Résultats de protéase.**

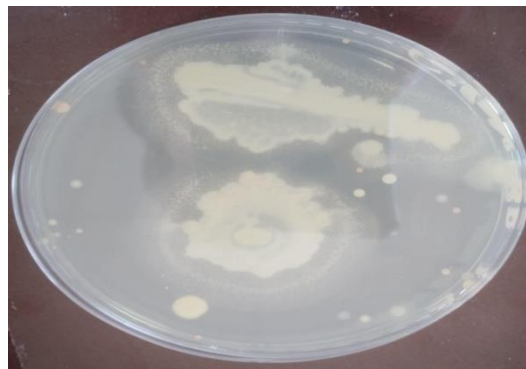
### 2.2 Recherche de lipase :

La recherche des lipases a été effectuée sur gélose au Tween 80 afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de l'enzyme lipase (voir tableau 4 et figure 9).

**Tableau 4: Résultats de la recherche de lipase.**

Les souches	Résultat
1 pré L.R/A.V SF3	-
1 pré L.R/A.P SF1	+
1 pré L.R/A.P SF2	-
1 pré L.R/A.P SF3'	+
1 pré L.R/A.P SF5	+
1 pré L.R/A.P SF5'	-

Le tableau présente les résultats de la recherche de l'activité lipasique pour différentes souches microbiennes isolées. On observe une variabilité significative dans la production de lipase entre les différentes souches testées. Notamment, au sein du groupe "1 pré L.R/A.P SF", certaines souches (SF1 et SF5) présentent une activité lipasique positive, tandis que d'autres (SF2 et SF5') sont négatives. Il est intéressant de noter que des souches apparemment similaires dans leur désignation (par exemple, SF5 et SF5') montrent des capacités enzymatiques différentes. Cela suggère une diversité métabolique même au sein de souches isolées d'une même source ou ayant une désignation proche.



**Figure 9: Résultat de lipase.**

**2.3 Recherche de lécithines :**

L'identification de lécithines a été réalisée sur milieu gélose (Annex), afin de démontrer la présence ou l'absence de l'enzyme lécithines (voir tableau 5 et figure 10).

**Tableau 5: Résultat de la recherche de lécithines.**

Les souches	Résultat
1 pré L.R/A.V SF3	+
1 pré L.R/A.P SF1	-
1 pré L.R/A.P SF2	-
1 pré L.R/A.P SF3'	+
1 pré L.R/A.P SF5	-
1 pré L.R/A.P SF5'	-



**Figure 10: Résultat de lécithines**

Le tableau présente les résultats de l'activité lécithines pour plusieurs souches bactériennes, D'après les résultats, nous observons des activités lécithines à la fois positives (+) et négatives (-) parmi les souches testées :

**Activité lécithines positive :** Les souches **1pré L.R/A.P SF3'** et **1pré L.R/A.V SF3** ont montré une activité lécithines positive. Cela indique que ces souches produisent l'enzyme capable de dégrader la lécithine.

**Activité lécithines négative :** Les souches **1pré L.R/A.P SF1**, **1pré L.R/A.P SF2**, **1pré L.R/A.P SF5** et **1pré L.R/A.P SF5'** ont montré une activité lécithines négative. Cela suggère que ces souches ne produisent pas de quantités significatives de cette enzyme spécifique dans les conditions testées.

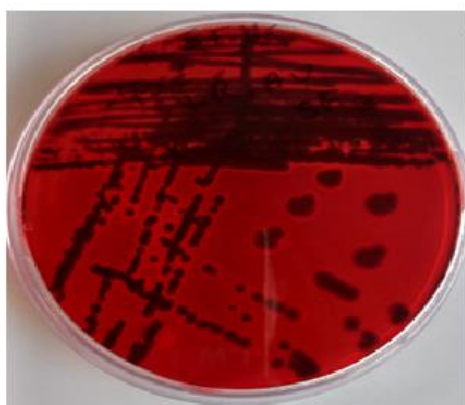
**2.4 . Détection de production de slim sur gélose Rouge Congo :**

La mise en évidence de la production de slim bactérien des souches a été réalisée sur gélose Rouge Congo. (Voir tableau 6 et figure 11).

**Tableau 6: Résultats de RCA.**

Les souches	Résultat
1 pré L.R/A.V SF3	+
1 pré L.R/A.P SF1	+
1 pré L.R/A.P SF2	+
1 pré L.R/A.P SF3'	-
1 pré L.R/A.P SF5	+
1 pré L.R/A.P SF5'	-

D'après les résultats obtenus, nous observons la majorité (4/6) des souches produisent le slim. Cela suggère que ces souches ne produisent pas d'EPS dans les conditions de culture utilisées. Une production d'EPS faible ou absente peut indiquer une capacité limitée ou différente à former des biofilms, ou que la formation de leur biofilm repose sur d'autres mécanismes que la production d'EPS détectable par ce test. (Flemming & Wingender, 2010). Sur les six souches testées, quatre (1 pré L.R/A.V SF3, 1 pré L.R/A.P SF1, 1 pré L.R/A.P SF2 et 1 pré L.R/A.P SF5) ont montré un résultat positif pour la production de slim. Cela signifie que deux tiers (environ 66,7 %) des souches ont produit du slim. Les deux autres souches (1 pré L.R/A.P SF3' et 1 pré L.R/A.P SF5') n'ont pas produit de slim.



RCA positive



RCA négative

**Figure 11: Résultats de RCA.**

### 2.5 Résultats de galerie API 20E :

Les résultats de galerie API 20 Eobtenus après incubation ont permis d'avoir les biotype suivants :la souche la souche LR.AV.SF<sub>3</sub> (2126003) ; la souche LR.AP.SF<sub>1</sub> (6122002) ;la souche LR.AP.SF<sub>2</sub> (6323473) ; la souche LR.AP.SF<sub>3</sub> (2112002) ;la souche LR.AP.SF<sub>5</sub> (2102022) ;la souche LR.AP.SF<sub>5</sub> (6122002).la figure 11 Ci-dessous présente le resultat de la galerie API 20E.



**Figure 12: Résultat de galerie API 20E**

Nos résultats sont similaires à ceux des travaux de (Didouh et al., 2015) qui a montré que La caractérisation biochimique des isolats de *B. cereus* avec les galeries Api 20<sup>E</sup>, a montré que les quatre profils numériques trouvés ont les caractères communs suivants : ne possèdent pas à  $\beta$ -galactosidase, ni la Lysine décarboxylase, ni l'Ornithose décarboxylase, ni l'uréase ni la Tryptophane désaminase. *B. cereus* n'utilisent pas le citrate comme source de carbone, ne produisent ni le H<sub>2</sub>S ni l'indole, ni l'actylmethylcarbinol. Et n'assimilent pas le mannitol, l'inositol, le sorbitol, le rhamnose, le melibiose, et l'arabinose (Didouhet al., 2015).

**3. Capacité des souches à former un biofilm sur des surfaces en acier inoxydable :**

Le tableau 7 Ci-dessous présente les résultats du nombre de bactéries qui sont adhérees à l'acier inoxydable.

**Tableau 7: Résultats de nombre de bactéries adhérees à l'acier inoxydable**

Les souches	Nombre des souches adhérees (Log <sub>10</sub> )
1 pré L.R/A.V SF3	2,52
1 pré L.R/A.P SF1	7,093
1 pré L.R/A.P SF2	6,5
1 pré L.R/A.P SF3'	3,66
1 pré L.R/A.P SF5	6,60
1 pré L.R/A.P SF5'	0,7

Les résultats montrent que les souches de notre collection ont un pouvoir d'adhérer aux surfaces d'acier inoxydable avec des degrés différents allant de 0.7 log<sub>10</sub> à 7.093 Log<sub>10</sub>. Cette variance est dû à plusieurs paramètres.

Afin de former des biofilms, les bactéries viables et non viables adhèrent de manière réversible et irréversible aux surfaces et produisent des substances polymères extracellulaires pour leur protection (**Donlan et Costerton, 2002**). Par conséquent, les bactéries présentes dans le lait peuvent généralement former des biofilms dans la canalisation de l'industrie laitière (**Marchand et al., 2012**). Il a été prouvé que les caractéristiques de surface de l'acier inoxydable changent suite à un traitement au lait écrémé, créant une pellicule protéique sur l'acier, ce qui peut influencer l'adhésion des bactéries (**Hamadi et al, 2014**). Par conséquent, la qualité et la sécurité du lait et de ses produits peuvent être influencées négativement par les biofilms bactériens établis lorsque le nouveau lait passe dans les canalisations (**Austin et Bergeron, 1995**). De ce fait, l'adhérence bactérienne sur les surfaces d'acier constitue un sujet de préoccupation majeur pour le secteur laitier.

L'amélioration de l'adhésion bactérienne et la création de conditions propices à la formation de biofilms dépendent grandement des caractéristiques de l'acier inoxydable (énergie de surface, hydrophobicité, rugosité de surface, topographie), des types de matières premières alimentaires utilisées et des conditions préétablies pour leur transformation (**Dula et al., 2021**).

La majorité des bactéries sporulées sont identifiées comme des agents de détérioration qui génèrent des enzymes extracellulaires entraînant la dégradation de la qualité du lait (**Finton et al., 2024**) ce qui est en concordance avec nos résultats.

Des tests biochimiques ont révélé que certaines souches exhibaient une activité enzymatique notable, en particulier pour la production de protéases, lipases et lécithines. Ces enzymes contribuent à la décomposition des éléments du lait (protéines, graisses, phospholipides), tout en ayant aussi un rôle dans la formation du biofilm. Par exemple, les protéases favorisent la dissémination cellulaire, alors que les lipases ont la capacité de transformer les interactions hydrophobes en surface. Cela appuie l'hypothèse selon laquelle les souches dotées d'une forte activité enzymatique sont également celles qui ont une grande capacité à former du biofilm (**Modi et al., 2017**).

Nos observations montrent que les souches 1 pré L.R/A.V SF3, 1 pré L.R/A.P SF2, et 1 pré L.R/A.P SF5' possèdent une activité protéasique détectable, indiquant leur capacité à dégrader les protéines. En revanche, les souches 1 pré L.R/A.P SF1, 1 pré L.R/A.P SF3' et 1 pré L.R/A.P SF5 ne présentent pas cette activité. On connaît bien le rôle des protéases dans la dégradation des protéines en peptides et acides aminés. Dans un milieu tel que le lait, ces enzymes jouent un rôle déterminant dans la libération de nutriments indispensables à la prolifération bactérienne (**Nair et al., 2016**). En outre, l'activité protéasique peut influencer de manière significative la structure et la composition des biofilms. Quelques recherches indiquent que les protéases pourraient aider à la dissémination des cellules d'un biofilm mature, participant de ce fait à l'expansion de l'organisme (**Rumbaugh et al., 2014**).

Nous avons mis en évidence une variabilité importante dans l'activité lipasique, même au sein de souches désignées de manière similaire, comme SF5 et SF5' du groupe "1 pré L.R/A.P SF". Alors que certaines souches (SF1 et SF5) sont positives, d'autres (SF2 et SF5') sont négatives. Cette diversité métabolique au sein de souches proches est une observation clé. Les lipases sont des enzymes responsables de l'hydrolyse des triglycérides et d'autres lipides, transformant ces derniers en acides gras et glycérol. Dans les matrices alimentaires à forte teneur en graisses, elles contribuent de manière significative à la transformation des caractéristiques sensorielles et de la texture (**Liu et al., 2020**). En ce qui a trait aux biofilms, l'action de la lipase peut modifier les caractéristiques de surface des bactéries ainsi que du substrat. Les lipases ont la capacité d'agir sur l'adhésion initiale des bactéries en modifiant l'hydrophobie de la surface cellulaire, un moment crucial dans le processus de formation du

biofilm (**Sheng et al., 2011**). Il est donc possible que les souches ayant une activité lipasique prononcée puissent générer des biofilms aux propriétés distinctes.

Nos données révèlent que les souches 1 pré L.R/A.P SF3' et 1 pré L.R/A.V SF3 présentent une activité lécithinasique positive, indiquant leur capacité à dégrader la lécithine. Inversement, les souches 1 pré L.R/A.P SF1, 1 pré L.R/A.P SF2, 1 pré L.R/A.P SF5 et 1 pré L.R/A.P SF5' montrent une activité négative. Ces enzymes également connues sous le nom de phospholipases, ont la capacité d'hydrolyser les phospholipides, dont la lécithine. Ces phospholipides constituent des éléments essentiels des membranes cellulaires et sont aussi présents dans des environnements nutritifs tels que le lait. La dégradation de la lécithine peut libérer des éléments nutritifs et nuire à la solidité des membranes (**Dennis et al., 2011**). Même si le lien direct entre l'activité de la lécithine et la création du biofilm est moins exploré que pour les protéases et les lipases, il est envisageable que le changement des phospholipides environnementaux ou membranaires puisse affecter les interactions entre les cellules et avec la surface, qui sont des aspects cruciaux pour la formation et le développement du biofilm.

La diversité enzymatique que nous avons remarquée reflète la diversité métabolique et écologique des souches microbiennes. La faculté de générer diverses combinaisons d'enzymes extracellulaires offre aux bactéries des atouts adaptatifs au sein d'écosystèmes complexes. Ces enzymes ne se limitent pas à la dégradation des nutriments ; elles participent également de manière essentielle aux interactions entre les bactéries, ainsi qu'entre celles-ci et leur environnement, particulièrement en ce qui concerne la création et l'entretien des biofilms.

Nos résultats suggèrent que les souches présentant une activité enzymatique notable (par exemple, 1 pré L.R/A.V SF3 pour les protéases et lécithines, 1 pré L.R/A.P SF1 et SF5 pour les lipases, 1 pré L.R/A.P SF3' pour la lécithines) pourraient posséder des stratégies distinctes pour la colonisation des surfaces et la persistance via la formation de biofilm.

Pour La production de slim Le fait que 66,7 % de nos souches (4 sur 6) en l'occurrence 1 pré L.R/A.V SF3, 1 pré L.R/A.P SF1, 1 pré L.R/A.P SF2 et 1 pré L.R/A.P SF5 aient produit du slim suggère qu'elles possèdent les mécanismes génétiques et physiologiques nécessaires à la synthèse d'EPS dans les conditions de culture spécifiées. Cela indique un potentiel significatif pour la formation de biofilms robustes, ce qui peut avoir des implications importantes selon l'origine et la nature de ces souches bactériennes. Toutes les bactéries formant des biofilms ne dépendent pas principalement d'une production abondante d'EPS. Certaines souches peuvent

utiliser d'autres mécanismes pour l'adhésion et l'agrégation, tels que les fimbriae, les flagelles ou les protéines de surface (**Limoli et al., 2015**).

En ce qui concerne la formation de biofilms en acier inoxydable, le nombre de cellules récupérées à partir de biofilms en acier inoxydable variait de 3,52 à 6,92  $\log_{10}$ , étant le nombre maximum détecté pour *Enterococcus casseliflavus* (**Didouh et al., 2023**). Ceci suggère que les mécanismes fondamentaux d'adhésion des souches de notre collection ne sont pas similaires à ceux étudiés précédemment. La variabilité observée dans nos résultats (0,7 à 7,093  $\log_{10}$ ) est même légèrement plus étendue que celle de la référence citée (3,52 à 6,92  $\log_{10}$ ).

La pasteurisation du lait s'avère inefficace face à *Bacillus cereus*, en raison de la forte résistance thermique de ses endospores (**Sinnelä et al., 2021**). Ce qui est en corcordance avec nos résultats. Après traitement, ces spores peuvent germer, entraînant la croissance bactérienne et la production d'enzymes, compromettant ainsi la qualité du lait pasteurisé (**Gopal et al., 2015**). Les bactéries sporulées les plus courantes appartiennent au genre *Bacillus* et à des groupes apparentés (**Malek, 2019**).

*B. cereus* est à l'origine de la création de biofilms sur les surfaces en interaction avec les aliments, tels que les tuyaux en acier inoxydable, les cuves de stockage. Il est aussi capable de produire des biofilms suspendus ou submergés, qui ont la capacité de sécréter une diversité de bactériocines, de métabolites, de tensioactifs et d'enzymes, comme les protéases et les lipases. Ces substances peuvent influencer les propriétés sensorielles des aliments (**Grigore et al., 2019**).

Par conséquent, certaines stratégies ont été employées pour éliminer, prévenir ou retarder la formation de biofilm de *Bacillus* dans l'industrie laitière, mais avec un succès limité. Un manque de compréhension de la structure et du comportement du biofilm de *Bacillus* dans des conditions propres aux environnements laitiers peut être en partie responsable de cette situation (**Shemesh et Ostrov, 2020**).

---

# *Conclusion*

---

Cette recherche a été menée dans le but de mieux appréhender la diversité microbienne existant dans les milieux industriels laitiers, ainsi que le potentiel des souches de bactéries isolées à constituer des biofilms. Grâce à une démarche expérimentale minutieuse qui allie des techniques d'isolement, d'identification microbiologique et d'appréciation de la capacité à former un biofilm, cette étude a su révéler des éléments cruciaux relatifs au comportement des bactéries dans un contexte industriel vulnérable à la contamination.

L'analyse de la microflore isolée a révélé une diversité bactérienne significative, incluant à la fois des bactéries d'origine environnementale et des micro-organismes potentiellement pathogènes ou altérants. Ces résultats corroborent les données de la littérature selon lesquelles les industries laitières constituent des milieux complexes, exposés à de multiples sources de contamination.

La capacité de diverses bactéries pathogènes à adhérer à l'acier inoxydable est due à leurs flagelles, curli, pili et adhésines membranaires, mais aussi à des substances extra polymères et à des protéines de surface utilisées dans l'industrie agroalimentaire et qui produisent des biofilms. Les conditions environnementales favorables (température, pression, fluctuations climatiques), les propriétés de l'acier inoxydable (énergie de surface, hydrophobicité, rugosité de surface, topographie), le type de matières premières alimentaires, ainsi que les conditions de prétraitement et de transformation jouent un rôle important dans l'amélioration de l'adhésion bactérienne et la création de conditions favorables à la formation de biofilms.

La caractérisation de la microflore bactérienne isolée d'une industrie laitière et l'étude de son pouvoir de formation de biofilm permettent de mieux appréhender les enjeux microbiologiques auxquels sont confrontés les industriels. La mise en évidence de souches à fort potentiel à former des biofilms justifie une vigilance accrue et la mise en œuvre de stratégies de contrôle innovantes. Ainsi, cette étude s'inscrit dans une démarche d'amélioration continue de la qualité et de la sécurité des produits laitiers, en cohérence avec les exigences actuelles en matière de santé publique et de développement durable.

Des études futures pourraient cibler l'identification génétique des souches formant des biofilms et tester de nouvelles méthodes de nettoyage plus efficaces. L'élargissement de cette recherche à d'autres sites industriels permettrait de mieux comprendre et prévenir les contaminations microbiennes.

---

**Références**

**bibliographiques**

---

- Acker HV., Dijck PV., Coenye PV. (2014).** Mécanismes moléculaires de la tolérance et de la résistance aux antimicrobiens dans les biofilms bactériens et fongiques. *Tendances Microbiol.*
- Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2021).** Treatment of industrial oily wastewater by advanced technologies: a review. *Applied Water Science*, 11(6), 98.
- Bai, X., Nakatsu, C. H., & Bhunia, A. K. (2021).** Bacterial biofilms and their implications in pathogenesis and food safety. *Foods*, 10(9), 2117.
- Bellifa, S., Hassaine, H., Balestrino, D., Charbonnel, N., M'hamedi, I., Terki, I. K., ... & Forestier, C. (2013).** Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. *Afr J Microbiol Res*, 7(49), 5558-64.
- Bendinger B., Rijnaarts H. H., Altendorf K., Zehnder A. J (2003).** Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*.
- Boutaleb, N. (2007).** *Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable* (Doctoral dissertation, Lorient).
- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021).** Microbial biofilms in the food industry—A comprehensive review. *International journal of environmental research and public health*, 18(04), 2014.
- Castro, G. A., Medina, R., Rodrigues, L., Teixeira, J., & Lima, N (2005).** Production and partial characterization of lipase from *Candida rugosa* grown in solid-state fermentation.
- Castro, M. S. R., Fernandes, M. S., Kabuki, D. Y., & Kuaye, A. Y (2018).** Formation d'un biofilm d'*Enterococcus faecium* sur des surfaces en acier inoxydable : modélisation et contrôle par des agents désinfectants. *Journal of Food Process Engineering*.
- Characklis WG, McFeters GA, Marshall KC, (1990).** Écologie physiologique dans les systèmes de biofilms.
- Cherif antar, a., Didouh nassima, n., Flórez belene, b., Mayo, b., & Boudjemaa moussa, b. (2013).** caractérisation de la microflore bactérienne inféodée aux équipements laitiers et moyens de lutte.
- Conrado Carrascosa, Dele Raheem, Fernando Ramos, Ariana Saraiva et la fourmiouniño Raposo, 2021.** Biofilms microbiens dans l'industrie alimentaire : une étude approfondie.
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2016).** New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 7, 1641.

- Dallagi, H., Jha, P. K., Faille, C., Alain, L. B., Rawson, A., & Benezech, T (2023).** Impact of bacterial biofilm architecture on the efficacy of cleaning-in-place procedures in the food industry: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 132, 311-326.
- Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (2009).** *The firmicutes* (Vol. 3). P. De Vos (Ed.). New York, NY, USA:: Springer.
- Debabza, L (2014).** *Techniques de microbiologie clinique : Identification des bactéries*.
- Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y. H., Magriotti, V., & Kokotos, G. (2011).** Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical reviews*, 111(10), 6130-6185.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Essam hebbishy, Jennifer M, Asli A ,Donnes N , Oktay Y, Derya S, Jerry. (2024).** Aspects microbiologiques et défis des poudres laitières II : Biofilm/bioencrassement.
- Evans LV (2003).** Biofilms : avancées récentes dans leur étude et leur contrôle, 1ère édition. Fabriqué à partir de gélatine de peau de thon à nageoires jaunes (*Thunnus albacares*).
- Faille, C., Benezech, T., Blél, 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.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Griegbe, T., & Mayer, C. (2000).** Physico-chemical properties of biofilms. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000, 19-34.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Flemming, H. C., van Hullebusch, E. D., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., Stoodley, P., ... & Wuertz, S. (2022).** The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nature Reviews Microbiology*, 21(2), 70-86.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989).** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, 42(8), 872-874.

- Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C., & Sbhatu, D. B. (2019).** Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon*, 5(8).
- Giri, S., Yousif, G., Shitut, S., Oña, L., & Kost, C. (2022).** Prevalent emergence of reciprocity among cross-feeding bacteria. *ISME communications*, 2(1), 71.
- Grigore, M., Toader, G., & Chifiriuc, M. C. (2019).** Biofilm formation and antibiotic resistance in bacterial strains isolated from food industry environments. *Romanian Biotechnological Letters*
- Grigore-Gurgu, L., Bucur, F. I., Borda, D., Alexa, E. A., & Neagu, C. (2019).** Biofilms Formed by Pathogens in Food and Food Processing. *Bacterial biofilms*, 213.
- Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 15-32.
- Ibunñez de Aldecoa, A. L. (2017). I, Zafra O, Gonzalez-Pastor JE.** Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Front Microbiol*, 8, 1390.
- Jay, J. M. (2000).** *Modern Food Microbiology*, Aspen Publ. Inc., Gaithersburg, MD, 410.
- Kara Terki, I. K., Hassaine, H., Bellifa, S., M'hammedi, I., Lachachi, M., & Didi, W. (2014).** O-01 : Détection des gènes ica A et ica D et production de biofilm par les staphylocoques isolés de cathéter urinaire au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (Algérie). *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(6), 78.
- Kim, J. Y., Jung, C. K., Kim, D. H., & Kim, S. B. (2012).** Properties of edible biofilm manufactured from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 29, 786-791.
- Kjelleberg S., Givskov M. (2007).** *Le mode de vie biofilm : mécanismes et adaptations*, première éd. Horizon Scientific Press.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003).** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular microbiology*, 48(6), 1511-1524.
- Koumba, B. L. (2007).** *La reconstruction chez Ludovic Emane Obiang : essai de lecture d'Et si les crocodiles pleuraient pour de vrai...*
- Kruszewski, KM, Nistico, L, Longewell, MJ, Hynes, MJ, Maurer, JA, Hallstoodley, L, Gaawalt, ES, 2013.** Réduire *Staphylococcus aureus* formation de biofilms sur acier inoxydable 316L à l'aide de monocouches auto-assemblées fonctionnalisées.

- Latorre, A. A., Van Kessel, J. A. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., ... & Schukken, Y. H. (2010).** Increased in vitro adherence and on-farm persistence of predominant and persistent *Listeria monocytogenes* strains in the milking system. *Applied and environmental microbiology*, 77(11), 3676-3684.
- Lear, G.; Lewis, GD; Cenci, G (2010).** Caractérisation rhéologique des substances polymères extracellulaires produites par cinq espèces de bactéries aérobies environnementales formant des biofilms.
- Lembré, P., Di Martino, P., & Vendrely, C. (2012).** Amyloid peptides derived from CsgA and FapC modify the viscoelastic properties of biofilm model matrices. *Biofouling*, 30(4), 415-426.
- Lepuschitz, S., Ruppitsch, W., Pekard-Amenitsch, S., Forsythe, S. J., Cormican, M., Mach, R. L., ... & EUCRONI Study Group. (2019).** Multicenter study of *Cronobacter sakazakii* infections in humans, Europe, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 25(3), 515.
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015).** Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbial Biofilms*, 223-247.
- Liu, W. J., Xu, Z., Zhao, D., Pan, X. Q., Li, H. C., Hu, X., ... & Yu, H. Q. (2020).** Efficient electrochemical production of glucaric acid and H<sub>2</sub> via glucose electrolysis. *Nature communications*, 11(1), 265.
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., & Rattan, A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian journal of medical microbiology*, 24(1), 25-29.
- Modi, S. R., Collins, J. J., & Relman, D. A. (2017).** Antibiotics and the gut microbiota. *The Journal of clinical investigation*, 124(10), 4212-4218.
- Modi, S. R., Kumar, A., & Patel, H. J. (2017).** Biofilm formation and spoilage potential of dairy-associated bacteria.
- Nagaveni, N., Bharath, R., & Rao, V (2010).** *Detection of slime production and biofilm formation in Staphylococcus epidermidis isolated from clinical samples.*
- Nair, G., Panicker, G., & Kumar, R. P. (2016).** Proteolytic enzymes: An overview. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*.
- Nikolaev, Y. A., & Plakunov, V. K. (2007).** Biofilm—"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms?. *Microbiology*, 76, 125-138.
- Olaimat, A. N., Ababneh, A. M., Al-Holy, M., Al-Nabulsi, A., Osaili, T., Abughoush, M., ... & Holley, R. A. (2024).** A Review of Bacterial Biofilm Components and Formation,

Detection Methods, and Their Prevention and Control on Food Contact Surfaces. *Microbiology Research*, 15(4), 1973-1992.

**Olanbiwoninu AA., Popoola BM.2022.** Les biofilms et leur impact sur l'industrie alimentaire.

**Tolker-Nielsen, T., & Molin, S. (2000).** Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial ecology*, 40, 75-84.

**O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.

**Plutôt M.A., Kuldeep.,Mandal de Manabendra.2021.** Biofilm microbien : formation, architecture, résistance aux antibiotiques et stratégies de contrôle.

**Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015).** Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future medicinal chemistry*, 7(4), 493-512.

**Raghupathi, P. K., Liu, W., Sabbe, K., Houf, K., Burmølle, M., & Sørensen, S. J. (2018).** Synergistic interactions within a multispecies biofilm enhance individual species protection against grazing by a pelagic protozoan. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2649.

**Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021).** Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-18.

**Rehm BH. (2010).** Polymères bactériens : biosynthèse, modifications et applications. *Nat Rev Microbiol.* Removal of biocontamination in the food industry using physical methods; an overview.

**Rewatkar, A. R., & Wadher, B. J. (2013).** Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa-Biofilm formation Methods. *J Pharm Biol Sci*, 8(5), 36-40.

**Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., & Handley, P. S. (2003).** Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in microbiology*, 11(2), 94-100.

**Rodney M. Donlan. (2002).** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.

**Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2014).** Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571-586.

**Sadiq, F. A., Burmølle, M., Heyndrickx, M., Flint, S., Lu, W., Chen, W., ... & Zhang, H. (2021).** Community-wide changes reflecting bacterial interspecific interactions in multispecies biofilms. *Critical reviews in microbiology*, 47(3), 338-358.

- Seale, B., Bremer, P., Flint, S., Brooks, J., & Palmer, J. (2015).** Overview of the problems resulting from biofilm contamination in the dairy industry. *Biofilms in the dairy industry*, 49-64.
- Shemesh, M., & Ostrov, I. (2020).** Role of *Bacillus* species in biofilm persistence and emerging antibiofilm strategies in the dairy industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2327-2336.
- Sheng, X., & Liu, C. T. (2011).** Phase stability in high entropy alloys: Formation of solid-solution phase or amorphous phase. *Progress in Natural Science: Materials International*, 21(6), 433-446.
- Shineh, G., Mobaraki, M., Perves Bappy, M. J., & Mills, D. K. (2023).** Biofilm formation, and related impacts on healthcare, food processing and packaging, industrial manufacturing, marine industries, and sanitation—a review. *Applied Microbiology*, 3(3), 629-665.
- Silva, V. O., Soares, L. O., Silva Júnior, A., Mantovani, H. C., Chang, Y. F., & Moreira, M. A. S. (2014).** Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis. *Applied and environmental microbiology*, 80(19), 6136-6145.
- Singh, A., Bhardwaj, R., Mishra, R. K., Sundramoorthy, A. K., Gupta, V., & Arya, S. (2023).** Potential of functional gel polymers as electrolytes for supercapacitors. *Ionics*, 29(10), 3831-3851.
- Singh, S., Datta, S., Narayanan, K. B., & Rajnish, K. N. (2021).** Bacterial exopolysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 1-19.
- Solomon, E. B., Niemira, B. A., Sapers, G. M., & Annous, B. A. (2005).** Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *Journal of food protection*, 68(5), 906-912.
- Spormann, A. M. (2008).** Physiology of microbes in biofilms. *Bacterial Biofilms*, 17-36.
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013).** Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food control*, 31(2), 572-585.
- Sutherland, I. W. (2001).** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.
- Tasneem, U. ; Yasin, N. ; Nisa, moi; Shah, F. ; Rasheed, U. ; Momin, F. ; Zaman, S. ; Qasim, M.2018.** Bactéries productrices de biofilms : une menace sérieuse pour la santé publique dans les pays en développement.

**Tolker-Nielsen, T., & Molin, S. (2000).** Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial ecology*, 40, 75-84.

**Young, D., Hussain, H., Malone, C., & Curtis, M. A. (2012).** *Stress and biofilm formation in bacterial pathogens.*

**Yuan L., Sadiq FA., Burmølle M., Liu T.(2018).** Aperçu de la détérioration bactérienne du lait, en mettant l'accent sur le rôle des enzymes.

**Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N.(2017).** Formation de biofilm et stratégies de contrôle des agents pathogènes d'origine alimentaire : perspectives de sécurité alimentaire.

---

# **Annexes**

---

**Eau physiologique**

Eau distillée	1000ml
Nacl	9g

**Composition et préparation du milieu PCA (Plate Count Agar)**

Tryptone	5g
Extrait de levure	2.5g
Glucose	4g
Gélose (Agar)	9g
Eau distillée	1000ml
PH final	7,0+/_0.2

**Bouillon cœur cervelle : (BHIB) : Brain heart infusion broth**

Composition chimique du milieu de culture la formule théorique de ce milieu de culture en g/l d'eau purifiée est :

Extrait de cœur	5g
Extrait de cervelle	12.5g
Peptone	10g
Glucose	2g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	2.5g
PH	25°C = 7.4

**Gélose nutritive**

Peptone	15
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	2g
Chlorure de sodium	5g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

**Milieu pour la recherche lécithines**

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

G90	90ml
Jaune d'œuf	10ml

**Rouge Congo Agar**

Saccharose	50g
BHIB	37g
Rouge Congo	0.8g
Agar	10g
Eau distillée	1000ml
PH	7.4















**Protéase**

GN	90ml
Lait en poudre	10g

**Lipase**

GN	99ml
Tween80	1ml

**Tableau des Caractères de la Galerie API20E****TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E**

Abréviation	Substrat / Milieu	Caractère recherché	Lecture	Résultat +	Résultat +	Résultat -
ONPG	o-Nitrophényl-β-D-galactopyranosi	β-galactosidase	Lecture directe	Jaune		Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Lecture directe	Rouge		Jaune
LDC	Citrate	Utilisation de H <sub>2</sub> S	Lecture directe	Bleu		Jaune
CIT	Citrate	Production de H <sub>2</sub> S	Lecture directe	Blanc		Jaune
URE	Tryptophane	Uréase	Lecture directe	Rose		Jaune
IND	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Après ajout de FeCl <sub>3</sub>	Rouge		Alocune
VP	Glucose	Fermentation	Après ajout de Kovacs	Rouge		Oincune
MAN	Mannitol	Fermentation	Après ajout de	Jaune		Jaune
INO	Inositol	Fermentation	Après ajout de	Jaune		Jaune
SOR	Rhamnose	Fermentation	Fermentation	Jaune		Jaune
RHA	Saccharose	Fermentation	Fermentation	Jaune		Jaune
SAC	Méllobiose	Fermentation	Fermentation	Jaune		Jaune
MEL	Amygdaline	Fermentation	Fermentation	Jaune		Jaune
OK (facultatif)	Activité oxydase	Activité oxydase	Lecture directe on bandelette	Bleu		Oincore

**Résultat de galerie API 20<sup>E</sup>****Tableau 01** : Résultat de galerie API 20E de la souche (1pré LR.AP.SF<sub>1</sub>).

Tests	OPNG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Tests	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

**Tableau 02** : Résultat de galerie API 20E de la souche (1pré LR.AP.SF<sub>2</sub>).

Tests	OPNG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Tests	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+

**Tableau 03** : résultat de galerie API 20E de la souche (1pré LR.AV.SF<sub>3</sub>).

Tests	OPNG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Tests	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+

**Tableau 04** : résultat de galerie API 20E de la souche (1pré LR.AP.SF<sub>3'</sub>).

Tests	OPNG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Tests	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

**Tableau 05** : résultat de galerie API 20E de la souche (1pré LR.AP.SF<sub>5</sub>).

Tests	OPNG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Tests	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+

**Tableau 06** : résultat de galerie API 20E de la souche (1pré LR.AP.SF<sub>5'</sub>).

Tests	OPNG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
Résultat	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Tests	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Résultat	+	-	-/+	-	-/+	-	-	-	-	+

## ملخص

تندرج هذه الدراسة في إطار السلامة الصحية لمنتجات الألبان، حيث تركز على البكتيريا الموجودة في صناعة الألبان وقدرتها على تكوين أغشية بيولوجية. الأغشية البيولوجية هي هياكل معقدة تتكون من خلايا جرثومية تلتصق ببعضها البعض وبالأسطح، وتغلفها مصفوفة خارج الخلية. ويمثل وجودها في المعدات الصناعية خطرًا كبيرًا، لأنها تساعد على استمرار وجود العوامل الممرضة وتؤثر على الجودة الميكروبيولوجية للمنتجات. كان الهدف الرئيسي من هذا العمل هو عزل وتوصيف البكتيريا الموجودة في مواقع مختلفة من البيئة الصناعية للألبان، وتقييم قدرتها على إنتاج إنزيمات التلف، والهلام البكتيري، وتشكيل الأغشية الحيوية، لا سيما على الأسطح المصنوعة من الفولاذ المقاوم للصدأ، وهو مادة شائعة الاستخدام في خطوط الإنتاج. أظهرت النتائج تنوعًا بكتيريًا كبيرًا، بما في ذلك سلالات من البكتيريا *Bacillus* المعروفة بقدرتها على تكوين أغشية حيوية. أظهرت العديد من العزلات إنتاجًا قويًا للأغشية الحيوية في ظروف المختبر، خاصة على الفولاذ المقاوم للصدأ، بالإضافة إلى نشاط إنزيمي مرتفع (بروتيازات، ليبازات). كما لوحظ إنتاج مواد بوليميرية خارج الخلية في بعض السلالات، مما يشير إلى قدرتها العالية على البقاء على الأسطح الصناعية. أظهرت النتائج تنوع السلالات المعزولة، حيث أظهرت بعضها قدرة عالية على الالتصاق الحيوي وإنتاج مصفوفة خارج الخلية. توفر هذه البيانات فهمًا أفضل لآليات الاستعمار البكتيري في الصناعات الألبانية، وتؤكد على الحاجة إلى استراتيجيات تنظيف وتطهير موجهة لمنع استمرار الأغشية الحيوية.

**الكلمات المفتاحية:** الأغشية الحيوية، الهلام، إنزيمات التغيير، الفولاذ المقاوم للصدأ، الصناعة الألبانية

## Résumé

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la sécurité sanitaire des produits laitiers, en s'intéressant à la microflore bactérienne présente dans une industrie laitière et à son potentiel de formation de biofilms. Les biofilms sont des structures complexes constituées de cellules microbiennes adhérant entre elles et à des surfaces, enveloppées dans une matrice extracellulaire. Leur présence dans les équipements industriels représente un risque significatif, car ils favorisent la persistance des agents pathogènes et altèrent la qualité microbiologique des produits. L'objectif principal de ce travail a été d'isoler et de caractériser les bactéries présentes sur différents sites de l'environnement industriel laitier, et d'évaluer leur aptitude produire des enzymes d'altération, du slim bactérien et à former des biofilms, notamment sur des surfaces en acier inoxydable, matériau couramment utilisé dans les lignes de production. Les résultats ont révélé une diversité bactérienne importante, incluant notamment des souches de *Bacillus* connues pour leur capacité à former des biofilms. Plusieurs isolats ont montré une forte production de biofilm en condition in vitro, en particulier sur l'acier inoxydable, ainsi qu'une activité enzymatique élevée (protéases, lipases). La production de substances polymériques extracellulaires a également été observée chez certaines souches, indiquant leur potentiel élevé à persister sur les surfaces industrielles. Ces données offrent une meilleure compréhension des mécanismes de colonisation bactérienne dans les industries laitières, et soulignent la nécessité de stratégies de nettoyage et de désinfection ciblées pour prévenir la persistance des biofilms.

**Mots clés :** Biofilm, slim, enzymes d'altération, acier inoxydable, industrie laitière.

## Abstract

This study focuses on the health safety of dairy products, examining the bacterial microflora present in the dairy industry and its potential for biofilm formation. Biofilms are complex structures consisting of microbial cells that adhere to each other and to surfaces, enveloped in an extracellular matrix. Their presence in industrial equipment poses a significant risk, as they promote the persistence of pathogens and alter the microbiological quality of products. The main objective of this work was to isolate and characterize the bacteria present at different sites in the industrial dairy environment and to evaluate their ability to produce spoilage enzymes, bacterial slime, and to form biofilms, particularly on stainless steel surfaces, a material commonly used in production lines. The results revealed significant bacterial diversity, including *Bacillus* strains known for their ability to form biofilms. Several isolates showed high biofilm production in vitro, particularly on stainless steel, as well as high enzymatic activity (proteases, lipases). The production of extracellular polymeric substances was also observed in some strains, indicating their high potential to persist on industrial surfaces. The results highlighted the diversity of the isolated strains, some of which showed a strong capacity for bioadhesion and extracellular matrix production. These data provide a better understanding of the mechanisms of bacterial colonization in the dairy industry and highlight the need for targeted cleaning and disinfection strategies to prevent the persistence of biofilms.

**Keywords:** Biofilm, slime, degradation enzymes, stainless steel, dairy industry.