



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITE ABOUBAKR BELKAÏD – TLEMCE

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

Département d'agronomie

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en Sécurité Agro-
Alimentaire et Assurance Qualité

• *Le thème :*

L'effet de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur *Bacillus cereus*

Présenté par : Aliane Ayat Elrahmene

Aina Farah

Membres de jury :

- | | |
|------------------------------------|-----|
| • Président : Bey Faiza | MAA |
| • Examinatrice : Boumediene Karima | MCB |
| • Promotrice : Didouh Nassima | MCA |

Année universitaire : 2025 – 2026

Remerciements :

Avant tout, nous remercions **ALLAH** le Tout-Puissant de nous avoir donné la force, la patience et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre encadrante **Mme Didouh Nassima** pour son accompagnement, sa disponibilité, ses précieux conseils ainsi que sa confiance tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nos remerciements s'étendent également à tous les enseignants du parcours Master Sécurité Agroalimentaire et Assurance Qualité pour la qualité de leur enseignement et leur soutien durant notre cursus universitaire.

Nous remercions aussi le laboratoire **LAMAABE** pour les moyens mis à notre disposition afin de réaliser ce travail dans de bonnes conditions.

Nous exprimons notre gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer notre travail et de consacrer leur temps à la lecture de ce mémoire.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et qui nous ont soutenues tout au long de cette aventure universitaire.

Dédicaces

(فَرِحِينَ بِمَا آتَاهُمُ اللَّهُ مِنْ فَضْلِهِ)

C'est un rêve que j'ai longtemps attendu, un chemin parcour avec patience, effort et espoir,
et que j'atteins aujourd'hui grâce à DIEU.

À mon cher père...

C'est qui a été mon soutien et ma force tout au long de ce parcours.
Merci pour tous les sacrifices, le soutien et l'amour inestimable que tu m'as offerts.
Qu'Allah te protège et te garde toujours comme ma fierté et mon pilier.

À ma chère mère...

Merci pour son amour infini, ses prières sincères, sa tendresse et son soutien inconditionnel.
Tu as été et restes mon plus grand pilier, celle qui m'a toujours relevée dans les moments
difficiles.

À mes chères sœurs...

Merci pour votre amour sincère et pour tous les moments de soutien et de joie partagés
ensemble. Votre présence dans ma vie est une bénédiction pour laquelle je remercie Dieu
chaque jour.

A mes chers neveux ...

Younes et Abdellatif que j'aime beaucoup et à qui je souhaite un belle avenir

A toute ma famille ...

Merci, Pour son amour, son soutien et sa bienveillance tout au long de mon parcours

À mes vrais amis...

merci Pour leur soutien, leur encouragement et les beaux moments partagés.

A ma binome Aya...

Qui m'a accompagnée à chaque étape de ce parcours, pour sa collaboration, son aide
précieuse et sa présence tout au long de la réalisation de ce tr avail.

Aina farah

Dédicaces

À mon cher père

Pilier de ma vie et source de ma force, mon refuge, qui m'a toujours soutenu et guidée,
Merci pour ton amour, ton soutien indéfectible, tes précieux conseils et les sacrifices que tu as
faits pour moi, je suis fière d'être ta fille.

À ma chère mère

À la femme qui a souffert sans jamais me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non face à mes
exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse

Merci pour ton amour, ta tendresse et tes sacrifices, et pour tout ce que tu as fait pour moi.

À mon grand-père

Je prie Allah de vous accorder la santé, paix et bénédiction. Merci pour votre amour, et vos
prières qui m'ont accompagnée

À ma chère sœur *Imene*

Qui, malgré la distance qui nous sépare, mais reste toujours présente dans mes pensées. Son
soutien m'a toujours motivée

À mes chères sœurs *Nihel Chifaa et Lamia*

Mes premiers repères et mes plus fidèles alliées, celles qui ont toujours été présentes dans
chaque étape de ma vie. Merci pour votre tendresse et votre soutien.

À toute la famille ALIANE

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à toute ma famille pour son amour, son soutien
indéfectible, sa patience et ses encouragements constants,

À mes chers amis

En témoignage de notre amitié, merci pour votre soutien et votre présence durant toutes ces
années

À ma binôme, *Farah*

Qui m'a accompagnée tout au long de ces années universitaires. Merci pour ton écoute, ton
soutien et ton investissement. Notre complicité restera l'un de mes beaux souvenirs

Aliane Aya

Sommaire

Remerciements	II
Dédicaces	III
Sommaire	V
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	VIII
Liste des abréviations	IX
Résumé	XI
Abstract	XII
ملخص	XIII
Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	3
Introduction :	4
2. Les bactéries sporulées les plus fréquemment rencontrées dans le lait et l'environnement laitier	4
2.1. Spore formants mésophiles et psychrophiles	4
2.2. Sporeformes thermotolérantes	6
3. Sources de contamination du lait	7
3.1. Contamination du lait cru par des bactéries sporulées à la ferme	7
3.1.1. Pratiques d'hygiène et stockage du lait cru	8
3.2. Contamination du lait à la laiterie	8
4. Résistance thermique des spores bactériennes	12
5. Structure des spores et leur rôle dans la résistance des spores	14
6. Adhérence des spores et formation de biofilm	17
7. Stratégies d'élimination des spores	18
7.1. Élimination des spores à la surface des équipements par nettoyage en place (CIP)	18
7.2. Nouvelles stratégies pour contrôler les micro-organismes sporulés dans l'industrie alimentaire	21
Les huiles essentielles	23

1- Généralités sur les huiles essentielles	24
2- L'activité antibactérienne des huiles essentielles	24
3- Définition	25
4- L'effet de <i>Rosmarinus officinalis</i>	26
II Matériel et méthodes	27
II. 1. L'origine des souches bactériennes :	28
II.2. Revivification et vérification de la pureté des souches	28
II. 3.Évaluation de l'activité antimicrobienne	29
II. 4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	30
II. 5. Effet de l'huile essentiel sur les spores	31
II.5.1. préparation de la suspension de spores	31
II.5.2. Test anti spores	32
III Résultats et discussion	33
III.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles	34
III.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	36
III.3.Activité anti-spores des HE	39
Conclusion générale	42
Les références	44
Les annexes	62

Liste des tableaux

Table N°	Titre	Page
Tableau 1	espace bactérienne aérobie formant des spores présentes dans différents aliments et environnement alimentaire avec les risques associés à leur présence	07
Tableau 2	présence de bactéries sporulantes a différents niveaux de la chaîne de production laitière	11
Tableau 3	zones d'inhibition ($\pm$ écar type) des souches bactérienne en présence d'huile essentielle	34
Tableau 4	concentration minimale inhibitrice (MIC $\pm$ écart types)	37
Tableau 5	Activité antispore (réduction $\log_{10}$ des spores viable)	40

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	sources de contamination du lait par des bactéries aérobies sporulantes (image créé avec bioRender)	10
02	Photo de <i>Rosmarinus officinalis</i>	25
03	Les étapes de revifification des souches bactériennes	29
04	Les étapes de l'évaluation de l'activité anti-microbienne	30
05	Les étapes de la détermination de la concentration minimal inhibitrice	31
06	Les étapes de préparation de la suspension des spores	32
07	Les étapes d'évaluation de l'activité anti-spores	32
08	les résultats de l'activité antimicrobienne	35

Liste des abréviations

°C : degré Celsius

B. cereus : *Bacillus cereus*

l'ARNr 16S : acide ribonucléique ribosomique 16S

cspA : protéines de choc froid de type A

UHT : ultra-hautes températures

Log₁₀ : logarithme décimale

UFC/mL : unités formant colonies par millilitre

PCR : réaction de polymérase en chaîne

L'ADN : Acide Désoxyribonucléique

TSC/ g : Tryptose sulfite cycloserine par gramme

MSC/g : Micro-organisme sur milieu sélectif compté par gramme

UV : ultra violet

DPA : L'acide dipicolinique

SpoVG : régulateur de la sporulation

CIP : clean in place

RA : roughness average

NaOH : hydroxyde de sodium

H₃PO₄ : l'acide phosphorique

HCl : l'acide chlorhydrique

H₂SO₄ : l'acide sulfurique

SASP : small Acid soluble spore proteins

EPS : Substance Polymérique Extracellulaire

USP : pasteurisation ultra-courte

USS : stérilisation ultra-courte

KDa : Kilo dalton

h : Heure

MPa : Méga Pascal

IM : inoculum microbien

Ca²⁺ : ion calcium

DPA : durée de pasteurisation aseptique

PEF : champs électriques pulsés

He : huile essentiel

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

PCA : Plate Count Agar

CAPP : traitement par plasma froid atmosphérique

CMI : concentration minimal inhibitrice

DMSO : Diméthyle sulfoxyde .

Résumé

La persistance de *Bacillus cereus* dans l'industrie laitière représentent un risque majeur pour la sécurité alimentaire, en raison de sa capacité à former des spores résistantes et des biofilms. Les huiles essentielles ont été proposées comme alternative naturelle aux désinfectants chimiques grâce à leurs propriétés antimicrobiennes. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur les formes végétatives et sporulées de *Bacillus cereus*. Onze souches ont été utilisées. L'activité antibactérienne a été déterminée par la méthode de diffusion sur disque et la concentration minimale inhibitrice (CMI) par microdilution. L'activité antispore a été évaluée après traitement des spores et dénombrement des cellules viables. Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* présente une activité antibactérienne avec des zones d'inhibition comprises entre 10,33 et 16,66 mm. Les valeurs de CMI varient de 0,0011 à 4,687 $\mu\text{L/mL}$, indiquant une sensibilité variable selon les souches. Une activité antispore significative a également été observée, avec des réductions logarithmiques comprises entre 1,36 et 4,38 $\log_{10}$. L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* peut être utilisée comme agent antimicrobien naturel efficace pour inhiber *Bacillus cereus*, y compris ses formes résistantes, constituant ainsi une alternative prometteuse pour améliorer la sécurité microbiologique dans l'industrie laitière.

Mots-clés : *Bacillus cereus*, huile essentielle, *Rosmarinus officinalis*, spores, activité antibactérienne, CMI.

Abstract

The adhesion and persistence of *Bacillus cereus* in the dairy industry pose a major risk to food safety, due to its ability to form resistant spores and biofilms. Essential oils have been proposed as a natural alternative to chemical disinfectants because of their antimicrobial properties. The aim of this study was to evaluate the effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil on the vegetative and spore forms of *Bacillus cereus*. Eleven strains were used. Antibacterial activity was determined using the disc diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution. Antispore activity was assessed after treatment of the spores and counting of viable cells. The results showed that *Rosmarinus officinalis* essential oil exhibits antibacterial activity with inhibition zones ranging from 10.33 to 16.66 mm. MIC values ranged from 0.0011 to 4.687 $\mu\text{L/mL}$, indicating variable susceptibility depending on the strain. Significant antispore activity was also observed, with logarithmic reductions ranging from 1.36 to 4.38 $\log_{10}$. *Rosmarinus officinalis* essential oil can be used as an effective natural antimicrobial agent to inhibit *Bacillus cereus*, including its resistant forms, thus constituting a promising alternative for improving microbiological safety in the dairy industry.

Keywords: *Bacillus cereus*, essential oil, *Rosmarinus officinalis*, spores, antibacterial activity, MIC.

ملخص :

يشكل التصاق بكتيريا العصية الشمعية واستمرارها في صناعة الألبان خطراً كبيراً على سلامة الأغذية، نظراً لقدرتها على تكوين الأبواغ المقاومة والأغشية الحيوية. وقد اقترح استخدام الزيوت العطرية كبديل طبيعي للمطهرات الكيميائية بفضل خصائصها المضادة للميكروبات. هدفت هذه الدراسة إلى تقييم تأثير الزيت العطري لنبات إكليل الجبل على الأشكال الخضرية والجرثومية لبكتيريا باسيلوس سيربوس. تم استخدام 11 سلالة، حيث تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا باستخدام بواسطة تقنية التخفيف الدقيق. كما تم تقييم النشاط القاسي طريقة الانتشار على القرص، وتحديد التركيز المثبط الأدنى أظهرت النتائج أن الزيت العطري لإكليل الجبل . على الأبواغ بعد معالجة الأبواغ مع إحصاء الخلايا الحية (العدّ الخلوي) بين يمتلك نشاطاً مضاداً للبكتيريا، حيث تراوحت مناطق التنشيط (مناطق التنشيط) بين 10.33 و 16.66 مم. كما تراوحت قيم 0.0011 و 4.687 ميكرو لتر/مل، مما يدل على اختلاف درجة الحساسية بين السلالات. إضافة إلى ذلك، لوحظت فعالية معتبرة ضد الأبواغ، مع انخفاضات لوغاريتمية (انخفاض لوغاريتمي) تراوحت بين 1.36 و 4.38 لوغ₁₀

تُظهر هذه النتائج أن الزيت العطري لإكليل الجبل يمكن أن يُستخدم كعامل طبيعي فعال مضاد للميكروبات لتنشيط العصية الشمعية ، بما في ذلك أشكاله المقاومة، مما يجعله بديلاً واعدًا لتحسين السلامة الميكروبيولوجية في صناعة الألبان.

الكلمات المفتاحية: العصية الشمعية ، الزيت العطري، إكليل الجبل، الأبواغ، النشاط المضاد للبكتيريا

Introduction générale

Les intoxications alimentaires représentent un enjeu majeur de santé publique, souvent liées à des bactéries ubiquistes telles que *Bacillus cereus*. Cette bactérie, largement présente dans l'environnement, peut contaminer une grande diversité de denrées alimentaires, notamment les produits laitiers. La contamination peut survenir à différentes étapes de la chaîne de production, de la matière première jusqu'au stockage, favorisant ainsi la persistance microbienne et la sélection de souches adaptées aux conditions industrielles. La problématique est d'autant plus importante que *B. cereus* possède la capacité de former des spores hautement résistantes. La thermo-résistance de ces spores varie selon les souches, certaines étant particulièrement résistantes aux traitements thermiques (Wells-Bennik *et al.*, 2016). De plus, cette bactérie peut produire des toxiques, notamment la toxine émétique (céréulide), stable face à la chaleur et aux conditions extrêmes, représentant ainsi un risque pour la santé humaine (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Par ailleurs, la formation de biofilms constitue un mécanisme majeur de survie et de persistance de *B. cereus*. Ces structures confèrent aux bactéries une protection accrue contre les conditions environnementales défavorables et les agents antimicrobiens, rendant leur élimination particulièrement difficile dans les environnements industriels (Echchaoui, 2018). La tolérance des biofilms aux traitements antimicrobiens représente également un défi majeur. Les bactéries incluses dans ces structures peuvent survivre à des concentrations élevées d'agents antibactériens sans présenter nécessairement une résistance classique, ce qui complique les stratégies de contrôle (Ciofu & Tolker-Nielsen, 2019). Cette situation est aggravée par l'émergence croissante de l'antibiorésistance dans les bactéries d'origine alimentaire (Davies & Davies, 2010). Face à ces limites, la recherche de solutions alternatives s'est intensifiée, notamment à travers l'utilisation de composés naturels issus des plantes médicinales et aromatiques. Les huiles essentielles suscitent un intérêt croissant en raison de leurs propriétés antimicrobiennes, antibiofilm et de leur origine naturelle (Burt, 2004 ; Nazzaro *et al.*, 2013). Parmi ces huiles, celle de *Rosmarinus officinalis* (romarin) se distingue par son potentiel biologique important. Elle est riche en composés actifs tels que le 1,8-cinéole, le camphre et les α -pinènes, responsables de son activité antimicrobienne contre plusieurs micro-organismes, dont *Bacillus cereus* (Nieto *et al.*, 2018). Dans ce contexte, l'intérêt de cette huile essentielle réside dans sa capacité potentielle à agir non seulement sur les formes végétatives de *B. cereus*, mais également sur ses formes résistantes telles que les spores et les biofilms. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne et sporocide de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* contre *Bacillus cereus*, en mettant en évidence son potentiel comme alternative naturelle pour la sécurité alimentaire.

Introduction Générale

Le manuscrit sera organisé en trois parties la première partie relative à la synthèse bibliographique. La deuxième partie sera consacrée à la description de la méthodologie et la dernière partie sera consacrée aux résultats et leurs discussions.

Synthèse bibliographique

Introduction :

Le lait pasteurisé est censé avoir une durée de conservation moyenne de 7 à 14 jours lorsqu'il est conservé au réfrigérateur ; cependant, le lait pasteurisé en Algérie et dans d'autres pays s'altère rapidement et caille après deux jours, voire un jour. Plusieurs facteurs sont directement responsables de la durée de conservation du lait, notamment la charge microbienne du lait cru, les conditions de manipulation et de préparation dans l'usine laitière, le nettoyage et l'entretien des équipements, le contrôle et la surveillance de la température tout au long de la chaîne de production et après le processus (Yalew *et al.* 2024). De plus, si la plupart des micro-organismes sont détruits par la pasteurisation, les spores sont capables de survivre aux températures généralement utilisées pour la pasteurisation. Les spores finissent par se retrouver dans le lait, contaminant ainsi l'équipement de la section post-pasteurisation et entraînant une contamination croisée supplémentaire. Même si seules quelques espèces microbiennes sont responsables de cas d'intoxication alimentaire, elles peuvent représenter un risque pour la sécurité des consommateurs, en particulier les espèces du groupe *Bacillus cereus* (Enosi Tuipulotu *et al.*, 2021). La plupart des bactéries sporulées sont reconnues comme des micro-organismes responsables de la production d'enzymes extracellulaires induisant l'altération de la qualité du lait (Finton *et al.*, 2024). On estime que les spores constituent d'énormes pertes financières malgré les techniques et technologies modernes de conservation utilisées dans l'industrie alimentaire (Gao *et al.*, 2018). Il est donc important de comprendre les sources de contamination par ces spores.

L'identification et l'étude des bactéries sporulées responsables de la détérioration du lait sont essentielles à la mise en place des processus de contrôle efficaces. Une telle tâche permettrait de prolonger la durée de conservation du lait et des produits laitiers. Cette étude vise à mettre en évidence les sources de contamination du lait, de la ferme à l'usine laitière, en mettant l'accent sur la résistance des spores à différents processus et sur les stratégies visant à réduire et à surveiller la contamination par les spores (Medjahedi *et al.*, 2025).

2. Les bactéries sporulées les plus fréquemment rencontrées dans le lait et l'environnement laitier

2.1. Spore formants mésophiles et psychrophiles

De nombreuses bactéries sporulées ont été isolées dans le lait et ses dérivés. *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* sensu lato et *Bacillus clausii* sont les principales bactéries sporulées connues pour produire des enzymes de détérioration (De Jonghe *et al.*, 2010). Les activités

protéinase, lipase et phospholipase sont responsables de l'altération du lait par la dégradation de ses composants, ce qui donne une texture défectueuse, des saveurs indésirables, un caillage sucré et des défauts de crème granuleuse dans le lait. Ces enzymes sont thermiquement stables et peuvent survivre à la pasteurisation (Deeth, 2021b).

Parmi les bactéries aérobies sporulées impliquées dans la contamination du lait et des dérivés, *B. cereus* occupe une place importante et significative en raison de la capacité de certaines souches à présenter un risque pour la santé des consommateurs par la production de deux types de toxines, à savoir les toxines diarrhéiques produites pendant la croissance végétative dans l'intestin grêle et les toxines émétiques produites dans les aliments (Enosi Tuipulotu *et al.*, 2021). Le groupe *B. cereus* comprend au moins huit espèces étroitement apparentées, à savoir *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus toyonensis* et *Bacillus weihenstephanensis* (Ehling-Schulz *et al.*, 2019). *B. anthracis* et *B. thuringiensis* sont respectivement des agents pathogènes des mammifères et des insectes. Les deux espèces *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* se distinguent phénotypiquement de *B. cereus* par l'aspect rhizoïde de leurs colonies et leur composition en acides gras (Nakamura & Jackson, 1995). *Bacillus weihenstephanensis* a été proposé (Lechner *et al.*, 1998) pour représenter un groupe de souches psychrotolérantes caractérisées par leur capacité à se développer à des températures inférieures à 7 °C mais pas à 43 °C, et par des séquences remarquables dans l'ARNr 16S et le gène *cspA* (protéines de choc froid de type A) qui semblent être phylogénétiquement distinctes des souches mésophiles de *B. cereus* (Lechner *et al.*, 1998). En 2016, Miller et ses collègues ont ajouté une nouvelle espèce au groupe, appelée *Bacillus wiedmannii*, qui est une souche psychrotolérante et cytotoxique isolée à partir de produits laitiers et d'environnements (Miller *et al.*, 2016). Les espèces *Paenibacillus* également isolées du lait se distinguent généralement des espèces *Bacillus* par leur capacité à se développer à 6 °C, en plus de leur activité B-galactosidase (hydrolyse du lactose) (Ohkubo *et al.*, 2019).

Des souches de *B. pumilus* produisant une toxine thermostable ont également été isolées à partir de mammites chez les vaches laitières (Nieminen *et al.* 2007).

2.2. Sporeformes thermotolérantes

Les bactéries appartenant à l'espèce *B. licheniformis* sont les sporières les plus contaminants couramment isolées dans le lait cru (Chauhan *et al.*, 2013). Ces micro-organismes peuvent parfois provoquer des maladies d'origine alimentaire. Des nausées, des vomissements, des diarrhées et des crampes d'estomac ont été signalés 5 à 12 heures après la consommation de divers aliments (Yeak *et al.*, 2022), y compris des épices (Mathot *et al.*, 2021). La présence de *B. licheniformis* producteur de toxines a été signalée pour la première fois en Iran comme cause de mammite bovine avec symptômes cliniques (Fasaei *et al.*, 2023).

Geobacillus stearothermophilus et *Anoxybacillus flavithermus* sont les principaux contaminants thermophiles sporulés dans la fabrication du lait entier en poudre, après *B. licheniformis* (Delaunay *et al.*, 2021). *G. stearothermophilus* est un contaminant fréquent des produits laitiers, en particulier des laits en poudre, et sa présence est souvent considérée comme un indicateur de mauvaise hygiène. Cette espèce, caractérisée par sa capacité à former des biofilms à la surface des équipements en acier inoxydable ainsi que par la capacité de ses spores à survivre au traitement thermique, pose un sérieux problème dans la fabrication des laits en poudre (Wang *et al.*, 2021). À des niveaux élevés, elle peut provoquer une altération du lait reconstitué car, après germination, les spores provenant du lait en poudre contaminé peuvent entraîner une détérioration du produit par la production d'acide et d'enzymes (Kumar *et al.*, 2021a). L'espèce *A. flavithermus* a d'abord été identifiée dans des environnements thermaux, puis isolée dans des laits en poudre où des concentrations élevées de ces bactéries peuvent réduire l'acceptabilité de la poudre sur les marchés (Karaca & Cihan, 2020). Les spores de cet organisme sont très résistantes à la chaleur, les cellules végétatives pouvant se développer et former des biofilms sur des échangeurs de chaleur à des températures pouvant atteindre 70 °C (Karaca *et al.*, 2019a). Une autre espèce pathogène capable de se développer à des températures élevées pouvant atteindre 52 °C est *B. cytotoxicus*. Cet agent responsable d'intoxications alimentaires a été isolé à partir de foyers d'intoxication alimentaire et est capable de synthétiser la cytotoxine K-1, une cytotoxine diarrhéique (Ehling-Schulz *et al.* 2019), tandis que *Bacillus sporothermodurans*, une bactérie sporulée très résistante à la chaleur, a été isolée à partir de lait UHT (ultra-hautes températures) et de plusieurs autres aliments (Owusu-Darko *et al.* 2019) (tableau 1).

3. Sources de contamination du lait :

3.1. Contamination du lait cru par des bactéries sporulées à la ferme

La première contamination du lait de vache par des spores bactériennes se produit à la ferme où elles peuvent se développer, après germination, dans le lait en vrac (Gupta & Brightwell, 2023).

Les micro-organismes peuvent être présents à plusieurs endroits de la ferme, tels que l'air, le foin, la poussière ou la surface des mamelles des vaches. *B. licheniformis* est la souche sporulée la plus isolée dans l'environnement agricole, elle est presque toujours présente dans les aliments pour animaux, la litière, les mamelles des vaches laitières et les instruments de traite. Cependant, il a été constaté que *B. cereus* est la bactérie sporulée dominante dans le lait cru, étant collectée dans ce lait à des taux allant de 2×10^2 à 2×10^8 .

Tableau 01 : espèce bactérienne aérobie formant des spores présentes dans différents aliments et environnements alimentaires avec les risques associés à leur présence.

Espèces	Origine des souches	Risque	Référence
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	Lait cru ; le traite équipement ; culture vertes et fourrage	Elevé résistance thermique Alimentation gaspillage	Scheldemanet <i>et al.</i> (2005)
<i>B. licheniformis</i> <i>Geobacillus spp.</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. pumilus</i> <i>B. cereus</i> <i>A. Flavithermus</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. Clausii</i> <i>P. Polymyxa</i>	Lait cru ; lait pasteurisé ; lait en poudre ; lait au babeurre ; fromage	Aliments altération	Chauhan <i>et al.</i> (2013)
<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. cereus group</i>	Semoule de blé dur pain Améliorateurs levure de bière	Pâte à pain filante aliments intoxication	Valerio <i>et al.</i> (2012)
<i>B. licheniforme</i>	Poudre de lait écrémé	Détérioration des aliments	Li, Hunt, <i>et al.</i> (2019)
<i>P. sanguinis</i> , <i>P.brassicae</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. circulans</i>	Fromage (requeijao cremoso)	Aliments altération	Oliveira <i>et al.</i> (2018)

3.1.1. Pratiques d'hygiène et stockage du lait cru

Un autre facteur critique dans la contamination du lait par des spores est la saleté des mamelles et des trayons (Burtscher *et al.* 2024). La surface des mamelles des vaches peut contenir diverses bactéries et spores provenant principalement du sol et des excréments. Le nombre de spores dans le lait cru pourrait être réduit en améliorant l'hygiène des trayons et en mettant en œuvre des pratiques hygiéniques dans l'exploitation, en particulier pendant la préparation de la traite (Evanowski *et al.* 2020). Dans l'étude menée par Burtscher *et al.* (2024), le nettoyage des trayons a permis de réduire de 0,6 log le nombre de spores présentes sur la peau des trayons, et une forte corrélation a été observée entre la propreté moyenne des vaches et le niveau de spores dans le lait. Les machines à traire peuvent être contaminées par des bactéries sporulées provenant de mamelles sales. Sept espèces de *Bacillus* et trois espèces de *Paenibacillus* ont été isolées à partir de machines à traire dans une étude menée par Weber *et al.*, (2019). Les micro-organismes isolés dans les exploitations agricoles peuvent facilement contaminer les ustensiles de traite et donc le lait cru, qui devient alors lui-même une source de contamination des installations de transport et des cuves de stockage (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2022). Magnusson *et al.* , (2007) ont suggéré que la litière est très probablement la source de contamination du lait cru et des cuves de stockage par *B. cereus*.

Le stockage du lait cru à des températures réfrigérées améliore sa qualité, mais il favorise la sélection de micro-organismes psychrophiles et psychrotolérants qui deviennent dominants après un stockage à basse température (Yalew *et al.*, 2024). Les genres *Bacillus* et *Paenibacillus* sont les sporiques psychrotolérants les plus courants liés à la détérioration des produits laitiers (Buehler *et al.*, 2018). Après une réfrigération prolongée, les bactéries psychrotolérantes deviennent dominantes dans le lait. Le nombre total de bactéries sporulées variait entre $0,75 \pm 0,94 \log_{10}$ UFC/mL et $5,20 \pm 1,41 \log_{10}$ UFC/mL après une réfrigération prolongée, en fonction des pratiques d'hygiène et de la propreté des vaches, selon (Masiello *et al.*, 2017).

3.2. Contamination du lait à la laiterie

Bien que la contamination du lait par des bactéries sporulées soit importante à la ferme, cette contamination pourrait être multipliée par la croissance bactérienne tout au long de la chaîne de production (Doll *et al.*, 2017 ; Flint *et al.*, 2020). Elle peut ainsi atteindre des taux alarmants, présentant un risque pour les consommateurs dans le cas d'agents pathogènes, ou entraîner une altération du produit, formant ainsi un obstacle biologique qui limite la durée de conservation du lait (Lott *et al.*, 2023). Une fois que le lait cru quitte la ferme, il est stocké

dans des cuves et transporté dans des camions qui pourraient être les premières sources supplémentaires de contamination par des spores (Nyokabi *et al.*, 2021). Les souches de *Bacillus spp.* présentes dans le lait pasteurisé proviennent de la germination des spores contenues dans le lait cru (Griep-Moyer *et al.*, 2022). Cependant, les spores peuvent être introduites dans le lait par l'environnement de l'usine laitière où le lait.

La contamination peut se produire avant ou après la pasteurisation, lorsque le lait peut être contaminé par des spores qui ne sont soumises à aucune ou presque aucune concurrence de la part des cellules végétatives (Flint *et al.*, 2020 ; Martin *et al.*, 2023).

En Algérie, une étude de la microflore de cinq usines laitières a montré que *Bacillus spp.* Était prédominant, avec une proportion comprise entre 51 et 72 %. Ces *bacillus* ont été isolés dans les canalisations des segments pré et post-pasteurisation (Malek *et al.*, 2012). Malek *et al.* (2013) ont ensuite souligné que le lait en poudre importé était la principale source de contamination initiale du lait pasteurisé reconstitué par des bactéries sporulées. Ils ont constaté que ce microbiote interne était hébergé et adapté à l'environnement laitier et aux conditions de transformation, y compris les traitements de désinfection et de chauffage appliqués. Plus tard, en 2016, Cherif-Antar et ses collègues (Cherif-Antar *et al.*, 2016) ont observé que le nombre de souches de *Bacillus* était passé de 14 % sur les tuyaux du segment avant pasteurisation à 26 % sur les tuyaux du segment après pasteurisation, ce qui indique les difficultés rencontrées par les industries laitières algériennes pour contrôler la qualité microbienne du lait pasteurisé . Cependant, ils ont conclu à une variation microbienne quotidienne dans les tuyaux laitiers, montrant que le lait cru était la principale source de micro-organismes. La contamination post-pasteurisation est principalement dominée par des bactéries Gram négatives (Murphy *et al.*, 2021) et est principalement due à de mauvaises pratiques d'hygiène. Cependant, Reichler *et al.*, (2020) ont montré que la contamination post-pasteurisation par des spores peut se produire à différents endroits, tels que la vis de la machine d'emballage, le réservoir de nivellement de la machine d'emballage et le réservoir de stockage du lait pasteurisé. On pense que les spores se trouvent à différents endroits considérés comme critiques pour le nettoyage, tels que les crevasses, les vannes, les joints, les impasses , les coins, les fissures et les joints où les spores peuvent adhérer et persister (voir section 6)

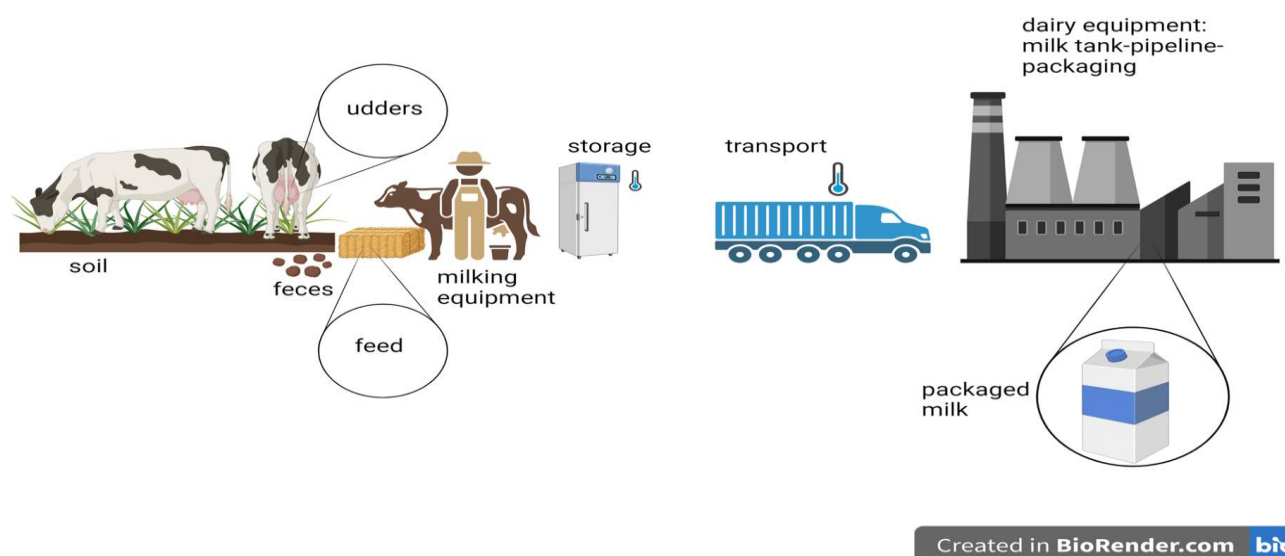


Fig. 1. Sources de contamination du lait par des bactéries aérobies sporulantes (image créée avec bioRender) (Medjahdi *et al.* , 2025).

Des études par typage moléculaire (profil des acides gras), PCR aléatoire amplifiée de l'ADN polymorphe, rep-PCR) ont montré que les génotypes dans le lait pasteurisé et ses dérivés sont différents de ceux du lait cru (Te Giffel *et al.*, 2002), ce qui suggère que la contamination provient de l'environnement de transformation des produits laitiers (tableau 2). La contamination du lait par les micro-organismes présents dans l'air doit encore être clarifiée. L'air pourrait avoir une importance mineure, les bactéries positives étant les principales bactéries non Gram-négatives de la population microbienne de l'air avec les systèmes de ventilation, les mouvements d'air à l'intérieur de l'usine, les siphons de sol et le personnel (Touch & Deeth, 2009).

Un autre point critique pour la qualité hygiénique du lait est la machine de remplissage. Si celle-ci ne fonctionne pas correctement, si le matériel d'emballage n'est pas stérilisé ou si des biofilms se forment sur les tuyaux de remplissage, le lait peut être contaminé (Fysun *et al.*, 2019). Des souches appartenant à *B. cereus* ont été isolées dans du lait pasteurisé juste après conditionnement et à la surface de la machine de remplissage après nettoyage et désinfection (Samapundo *et al.*, 2014). Ces auteurs ont conclu que des surfaces mal nettoyées sont à l'origine de la contamination du lait par *B. cereus*.

Selon Lott *et al.*, (2023), les bactéries sporulées responsables de l'altération peuvent survivre après la pasteurisation et leur détectabilité dépend principalement de la température de

stockage. De plus, le temps nécessaire pour atteindre des concentrations bactériennes (proches ou supérieures à 10^6 CFU/mL) dans le lait liquide associées à des défauts sensoriels pour les consommateurs a été estimé à 68, 27 et 10 jours pour le lait conservé à 3, 6,5 et 10 °C, respectivement. Plusieurs études ont rapporté l'isolement de bactéries sporulées dans du lait pasteurisé en ligne et emballé, en particulier du genre *Paenibacillus*. Cependant, Rush *et al.*, (2022) ont démontré que ces souches sont incapables de sporuler dans du lait liquide à haute température et à courte durée de conservation tout au long de sa durée de vie.

Ces spores germeront et proliféreront dans le lait pasteurisé. Dans ces conditions, les souches de *Bacillus spp.* sont détectées tôt dans le lait pasteurisé frais, tandis que les souches de *Paenibacillus spp.* dominent plus tardivement à différentes étapes de sa vie.

À l'exception de la contamination post-pasteurisation par des bactéries Gram-négatives, *Paenibacillus spp.* est probablement le groupe de bactéries psychrotolérantes prédominantes dans le lait réfrigéré (Beno *et al.*, 2020).

Tableau 02 présence de bactéries sporulantes à différents niveaux de la chaîne de production laitières.

Aliments	Nombre d'échantillons	Log ₁₀ UFC/ml ou /g	Souche prédominantes	Nombre d'isolat	Reference
Lait écrémé en poudre (TSC/ g)	22	2.8	<i>B. cereus</i>	207	Reginensi <i>et al.</i> (2011)
Lait entier en poudre	22	3.2	<i>B. licheniformis</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. megaterium</i>		
Silo à lait cru	36	0.64	<i>B. cereus</i>		Svensson <i>et al.</i> (2000)
lait cru (TSC/ml)	18	3.7	<i>B. licheniformis</i> <i>B. pallidus</i> <i>B. farraginis</i> <i>B. subtilis</i> group	186 152 56 301	Scheldeman <i>et al.</i> (2005)
Machine à traire (TSC/écouvillon)	64	3.67	<i>B. pallidus</i>	158	
Cultures vertes	36	5.13	<i>B. farraginis</i>	56	
Fourrage (TSC/g)	32	5.46	Groupe <i>B. subtilis</i>	301	
Lait en poudre (TSC/g)	25	3.6	<i>B. licheniformis</i>	738	Sadiq <i>et al.</i> (2016b)

Synthèse bibliographique

Fèces (TSC/g)	200 (10 bovin , quatre jours , cinq fois par jour)	4.7–6.2	<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i>	150	Wu <i>et al.</i> (2007)
Aliments (mélange de foin et de céréale) (TSC/g)	/	6.3	<i>B. subtilis</i> , <i>B.licheniformis</i>	30	
Lait cru (MSC/ml)	>200	0.3–1.8	<i>Bacillus licheniformis</i>	106	Martinez <i>et al.</i> (2017)
Sol/g	14	2.7–5.4	Groupe <i>B. cereus</i>	28	Mcauley <i>et al.</i> (2014)
Fumier (MSC/g)	34	5.87	/		
Sol (MSC/g)	33	5.68	/	/	
Composants de l'alimentation (MSC/g)	127	2.91	/	/	
Laitière (MSC/g)	36	0.64	/	/	
sedimentation de lair (MSC/ml)	31	4.62	/	/	Martin <i>et al.</i> (2019)
Ecouvillon d'extrémité de trayon (MSC/ml)	32	1.24	/	/	
Serviette utilisées lors de préparation de mamelle (MSC/ml)	30	1.56	/	/	
Lait	16	12.5%	<i>Bacillus spp.</i>	7	Vacheyrou <i>et al.</i> (2011)
Salle de traite à air	9	33.3%		10	
Foin du jour	16	43.75%		40	
Foin du mois	16	50%		55	
Poussière	16	25%		19	
Surface de trayon	16	31.25%		25	

4. Résistance thermique des spores bactériennes

Les traitements thermiques sont les méthodes de conservation les plus fréquentes dans l'industrie alimentaire. Ces procédés se sont révélés très efficaces pour tuer les micro-organismes par chaleur humide. Il existe plusieurs types de pasteurisation selon les

combinaisons temps/température appliquées. Le lait pasteurisé est un lait qui a été traité de manière uniforme à une température d'au moins 72 °C pendant 15 secondes ou selon une combinaison temps/température équivalente donnant le même effet, avec destruction de tous les micro-organismes pathogènes non sporulant et réduction à un niveau acceptable des micro-organismes non sporulant responsables de l'altération, tout en conservant les propriétés organoleptiques et nutritionnelles du lait (Dash *et al.*, 2022) . Les processus de traitement thermique sont souvent basés sur les pires scénarios possibles, en tenant compte de la composition du produit et des conditions d'utilisation. Des températures de traitement excessives ont un effet néfaste sur la qualité du produit, mais aussi sur le coût de la consommation d'énergie, sans oublier l'impact environnemental dû aux émissions de CO₂ (Van Zuijlen *et al.*, 2010).

La pasteurisation n'élimine pas les enzymes protéolytiques et lipolytiques sécrétées par les bactéries sporulées ; en outre, les spores bactériennes échappent généralement à ce traitement et peuvent persister dans les équipements laitiers, car la pasteurisation n'est pas conçue pour inactiver complètement les spores qui ne subissent que des dommages sublétaux (Wells-bennik *et al.*, 2016). En fait, ce traitement thermique peut induire la germination des spores, suivie d'une prolifération qui réduit par conséquent la durée de conservation du lait (Den Besten *et al.*, 2018 ; Wen *et al.*, 2022).

Le traitement du lait à 135 °C pendant quelques secondes (procédé appelé UHT) entraîne la destruction de tous les micro-organismes présents dans le lait, y compris les spores (Deeth, 2021a). Cependant, des cas de contamination du lait UHT ont été enregistrés, les spores incriminées étant considérées comme très résistantes à la chaleur, en particulier *B. sporothermodurans*, une bactérie mésophile formant des spores qui peut provoquer un changement de goût et de couleur vers un rose très clair ainsi que la coagulation des protéines. Cette bactérie n'a pas d'effet toxique, le lait traité par UHT est un produit sûr mais pas nécessairement stérile, ce qui le rend plus important sur le plan technologique car le lait UHT est destiné à une conservation à long terme sans réfrigération (Deeth, 2021a).

En partant du principe que la mort cellulaire suit une cinétique de premier ordre, les courbes d'inactivation des spores traitées thermiquement sont présentées sous forme de graphiques linéaires représentant la survie en fonction du temps (Deeth, 2021a). Le temps de réduction décimale, connu sous le nom de valeur D et exprimé en minutes, est une mesure largement utilisée de la résistance à la chaleur. Il est obtenu à partir de l'inverse négatif de la pente de ces

graphiques et représente le temps nécessaire pour tuer 90 % de la population de spores ou pour réduire de dix fois la concentration initiale (Reineke & Mathys, 2024). En outre, la valeur Z, qui est une mesure de la sensibilité des spores aux changements de température, représente la différence de température nécessaire pour réduire de dix fois la valeur D (Aaliya *et al.*, 2021). Ces deux valeurs sont caractéristiques de chaque souche et fournissent les informations nécessaires à l'estimation de la destruction des spores par les processus de chauffage. Une corrélation a été établie entre la température de croissance optimale de différentes espèces bactériennes formant des spores et la résistance à la chaleur de ces spores par rapport à celles des spores mésophiles. Ainsi, les spores des espèces thermophiles sont généralement plus résistantes à la chaleur que celles des espèces mésophiles (Eijlander *et al.*, 2019).

Dans l'étude de la résistance à la chaleur des spores, plusieurs facteurs sont contrôlables ou ne doivent pas être pris en compte, tels que l'historique de la souche, la composition et la texture du milieu, l'historique thermique des spores (température de pré-incubation ou de sporulation), la pré-adaptation possible à différents types de stress ainsi que l'interaction entre divers facteurs (Freire *et al.*, 2024 ; Pahala-gedara *et al.*, 2023 ; Wells-Bennik *et al.*, 2019). Outre les conditions de chauffage, la résistance à la chaleur dépend également des conditions de récupération des cellules survivantes (Setlow & Christie, 2021).

L'hétérogénéité de la réponse des spores issues d'une même population au traitement thermique est une préoccupation majeure en matière de détérioration des aliments et de maladie d'origine alimentaire ; elle pourrait s'expliquer par l'accumulation de dommages au sein de la spore (Wells-Bennik *et al.*, 2019).

5. Structure des spores et leur rôle dans la résistance des spores

La résistance des spores à la température, aux rayons UV, aux désinfectants et au dessèchement, ainsi que leurs propriétés adhésives qui leur permettent d'adhérer aux surfaces des équipements et de résister aux méthodes de nettoyage, font que les spores sont présentes dans les environnements cliniques, les chaînes de production biotechnologiques et alimentaires (Hamiot *et al.*, 2023). Plusieurs facteurs interviennent dans la résistance des spores à différentes conditions de stress, telles que celles rencontrées dans les environnements laitiers.

- i) La structure et la composition chimique des spores jouent un rôle majeur dans leur résistance,

- ii) les conditions de sporulation,
- iii) la capacité des spores à réparer les dommages accumulés (Setlow & Christie, 2023).

L'exosporium, une structure lâche en forme de ballon présente dans le groupe *B. cereus*, est la couche la plus externe des spores matures. L'exosporium assure la surface de contact primaire entre la spore et l'environnement/l'hôte et est un site d'antigènes sporulaires (Norris *et al.*, 2023). Les spores entourées d'un exosporium sont également recouvertes d'appendices protéiques morphologiquement identiques aux pili des bactéries Gram-négatives et Gram-positives (Pradhan *et al.*, 2021). Ces fibres ressemblant à des pili joueraient un rôle important dans l'auto-agrégation, l'adhésion et la formation de biofilms (Jonsmoen *et al.*, 2024). L'enveloppe est importante pour la résistance des spores à divers produits chimiques tels que la plupart des agents oxydants, notamment le dioxyde de chlore, l'hypochlorite et l'ozone, aux enzymes peptidoglycanolytiques et à la prédation par les protozoaires (P. Setlow & Christie, 2021). Le processus de maturation qui se produit après la libération des spores du sporangium, probablement dû à une augmentation des liaisons croisées des protéines de l'enveloppe par des enzymes présentes dans celle-ci, peut entraîner une augmentation substantielle de la résistance à la chaleur humide et à l'hypochlorite, ainsi qu'aux traitements par UV et lumière pulsée (Clair *et al.*, 2020 ; Setlow & Christie, 2023). L'enveloppe protège la spore contre ces produits chimiques en limitant leur accès aux couches plus profondes, car elle empêche le passage de fragments de plus de 10 kDa. De plus, les protéines de l'enveloppe peuvent jouer un rôle dans la dégradation ou la neutralisation des produits chimiques nocifs (Setlow & Christie, 2023). Sous l'enveloppe, la membrane externe n'a pas d'effet notable sur la résistance des spores à la chaleur, aux rayonnements et à certains produits chimiques (Setlow & Christie, 2021).

Le cortex est composé de peptidoglycane légèrement différent du peptidoglycane des cellules en croissance (absence d'acides téichoïques et élimination de nombreuses chaînes latérales peptidiques avec une diminution concomitante des liaisons transversales des brins glycaniques, de nombreux résidus d'acide muramique sont présents sous forme de muramique delta-lactame et d'autres sont liés à un seul résidu d'alanine, au lieu d'un muramyl-peptide avec ou sans liaison transversale (Setlow & Christie, 2023). Le cortex participe à la déshydratation et au maintien de la déshydratation du noyau des spores, où sa dégradation entraîne une réhydratation immédiate du noyau, l'activation d'enzymes et la perte des propriétés de résistance (Setlow, 2006).

La composition de la membrane interne des spores est très similaire à celle de la membrane des cellules végétatives, mais elle semble très comprimée dans la spore, les molécules lipidiques de la membrane interne étant largement immobiles, ce qui se traduit par une très faible perméabilité aux petites molécules hydrophiles et hydrophobes (Moir & Christie, 2023). Ainsi, la membrane interne de la spore constitue une barrière de perméabilité solide qui joue un rôle majeur dans la résistance des spores à de nombreux produits chimiques, en particulier ceux qui peuvent endommager l'ADN des spores (Mokashi *et al.*, 2020).

La faible teneur en eau du noyau est probablement le principal facteur responsable de l'état stationnaire enzymatique de la spore et le facteur le plus important déterminant la résistance de la spore à la chaleur humide (Setlow & Christie, 2021). La modification des conditions de sporulation peut affecter la résistance des spores, comme démontré précédemment, où des températures de sporulation plus élevées ont entraîné une résistance à la chaleur plus élevée, en partie due à la faible teneur en eau du noyau. La capacité des rayons gamma à générer des radicaux hydroxyles nocifs est probablement également réduite par la faible teneur en eau du noyau (Freire *et al.*, 2024).

Au cours de la sporulation, la teneur en eau du noyau est réduite par l'accumulation d'une grande quantité d'acide dipicolinique dans le noyau des spores.

L'acide dipicolinique (DPA) représente environ 25 % du poids sec des spores et chélate avec des cations divalents, principalement Ca^{2+} (Setlow & Christie ; 2023). La quantité et la nature des minéraux présents dans le noyau ont également une incidence sur la résistance des spores à la chaleur humide, une minéralisation plus élevée étant généralement associée à une résistance plus élevée des spores à la chaleur humide. L'acide dipicolinique remplace la teneur en eau du noyau de la spore. Ainsi, plus le noyau de la spore est riche en acide dipicolinique et en cations divalents, plus il est déshydraté (Cho & Chung, 2020), ce qui augmente la résistance des spores à la chaleur humide en protégeant les protéines du noyau contre l'inactivation ou la dénaturation par la chaleur humide (Yu *et al.*, 2023) . Le DPA contribue également à la résistance à la chaleur sèche des spores en protégeant l'ADN contre les dommages. Une autre fonction du DPA est son rôle dans la résistance des spores aux rayons UV, qui affecte à la fois la photoréactivité de l'ADN des spores et la nature des photoproduits générés (Nardi *et al.*, 2021).

6. Adhérence des spores et formation de biofilm

Les spores sont reconnues pour leur capacité à adhérer à différentes surfaces de substrats présents dans l'industrie alimentaire. Cette capacité d'adhérence est généralement liée à l'hydrophobicité des spores et à la présence d'appendices (Nilsson *et al.*, 2023). De plus, les résidus de lait déposés sur les parois internes des canalisations favorisent la fixation, la germination et la croissance des spores non inactivées par le processus de pasteurisation, et un nouveau cycle de contamination et de formation de biofilm avec sporulation est initié (Hamiot *et al.*, 2023). L'adhérence des spores aux surfaces diffère de celle des cellules végétatives, car les spores sont métaboliquement dormantes et immobiles. Des études ont montré que les spores se trouvent au fond des biofilms, mais aussi à l'interface air-liquide, ce qui permet leur élimination avec le lait qui s'écoule ou lors du rinçage final (Faille *et al.*, 2014). De plus, les bactéries du genre *Bacillus* forment des biofilms plus denses à l'interface air-liquide-paroi que sur les surfaces entièrement immergées. Cette observation pourrait s'expliquer par la disponibilité d'oxygène à cette interface, conduisant à une croissance supplémentaire sur les tuyaux partiellement remplis ou mal drainés à la fin du cycle de production (Jha *et al.*, 2020). Cela souligne l'importance du drainage et du séchage des équipements après le nettoyage. La formation de biofilms par des bactéries sporulées ou leur intégration dans des biofilms mixtes provoque une altération des produits en raison de leur capacité à produire des enzymes extracellulaires induisant la détérioration des produits (Didouh *et al.*, 2023). En outre, certaines espèces produisent des entérotoxines responsables d'épidémies d'origine alimentaire (Huang *et al.*, 2020). Ces biofilms sont connus pour être très résistants aux procédures de nettoyage et de désinfection (Maillard & Cen-teleghe, 2023). Ils constituent non seulement une source potentielle de contamination, mais peuvent également augmenter le taux de corrosion, réduire le transfert de chaleur et augmenter la résistance au frottement des fluides (Xu *et al.*, 2021). De plus, les bactéries formant des endospores sont capables de former des biofilms sur l'acier inoxydable dans une large gamme de températures allant de 5 °C à 15 °C (Pereira da Silva *et al.*, 2022) à 60-65 °C pour les bactéries thermophiles formant des spores présentes sur les plaques d'échange thermique et les évaporateurs telles que *G. stearothermophilus* et *A. flavithermus* (Karaca *et al.*, 2019b). Kumar *et al.* (2021b) ont découvert que la température affecte la formation de biofilms et de spores par les bactéries thermophiles pendant la fabrication du lait en poudre. Ce processus pourrait être retardé par le préconditionnement des surfaces en acier inoxydable avec des protéines de lait adsorbées, ce qui pourrait retarder l'apparition de biofilms et la formation de spores.

La sporulation et la formation de biofilms par les espèces *Bacillus*, en particulier *B. cereus*, sont liées entre elles (Ghosh *et al.*, 2024). La SpoVG, un régulateur important de la sporulation, pourrait être impliquée dans la formation de biofilms par *B. cereus* (Huang *et al.*, 2021). Les biofilms formés sur les surfaces en contact avec les aliments pourraient créer un environnement optimal pour la sporulation des bacilles (Huang *et al.*, 2021 ; Jha *et al.*, 2020) ont rapporté une sporulation plus élevée à l'intérieur des biofilms par rapport aux cellules planctoniques, ce qui suggère que le biofilm est la source des spores libérées par l'équipement dans le lait. Faille *et al.* (2014) ont montré que jusqu'à 90 % du biofilm de *Bacillus* formé sur l'acier inoxydable était constitué de spores, ce taux variant en fonction de la souche et des conditions de formation du biofilm.

7. Stratégies d'élimination des spores

De nombreuses mesures peuvent être prises pour réduire la charge microbienne dans le lait pasteurisé, notamment le nettoyage et l'assainissement, le refroidissement du lait pendant le stockage, l'ajout de dioxyde de carbone, l'application de bioconservateurs, les traitements thermiques et non thermiques (traitement à haute pression, technologie des champs électriques pulsés, ultrasons, centrifugation et microfiltration) ainsi que la combinaison de plusieurs de ces mesures (Neokleous *et al.*, 2022).

7.1. Élimination des spores à la surface des équipements par nettoyage en place (CIP)

Afin d'optimiser les opérations de nettoyage, il est nécessaire de préciser les objectifs, de gérer les variables et les contraintes telles que la température, le débit des agents nettoyants en plus de leur composition chimique (Palabiyik *et al.*, 2022). Il faut trouver un équilibre entre l'efficacité souhaitée du processus, les intervalles de temps entre deux opérations de nettoyage successives, le temps, la température, la concentration des produits chimiques utilisés, le coût de l'énergie et la consommation d'eau (cercle de Sinner) (Wilson *et al.*, 2022). Le nettoyage permet de maintenir la qualité et la sécurité du produit, en plus de l'efficacité de la production (Timmerman, 2024). Un CIP (cleaning in place) typique est un système de lavage circulaire qui ne nécessite ni démontage ni ouverture des équipements et des circuits de tuyauterie. Le CIP consiste également à pulvériser et à faire circuler des liquides de nettoyage sur les surfaces des équipements dans des conditions de turbulence et de vitesse d'écoulement accrues (Pant *et al.*, 2023).

Le CIP élimine les salissures alimentaires et les résidus nécessaires au développement bactérien et réduit à un niveau acceptable le nombre de micro-organismes existants, laissant

peu de micro-organismes sans nutriments ni même sans protection. Un régime CIP efficace doit éliminer le maximum de cellules du biofilm avec la meilleure combinaison temps/température (Pant *et al.*, 2023).

Les facteurs qui influencent le nettoyage sont les paramètres du processus de nettoyage (température, durée, débit, concentration de l'agent chimique), la nature des salissures (viscosité, protéines, sucres, minéraux, biofilm) et leur degré d'adhérence, ainsi que les caractéristiques physico-chimiques de la surface de l'équipement (topographie, présence de fissures, énergie libre de surface, mouillabilité, valeur moyenne de rugosité (RA) qui évalue les irrégularités de la surface, etc.) (Li *et al.*, 2019). L'efficacité du nettoyage est déterminée par l'énergie mécanique, chimique et thermique, ainsi que par le temps de contact. Ces paramètres sont liés et dépendent les uns des autres. etc.) (Li *et al.*, 2019). L'énergie mécanique, chimique et thermique, ainsi que le temps de contact, déterminent l'efficacité du nettoyage. Ces paramètres sont liés et dépendent les uns des autres. La force mécanique ou l'effet hydrodynamique qui élimine les salissures par action physique se présente dans le processus CIP sous la forme de forces de cisaillement créées par le flux (Rovira, 2016). En général, le flux doit être turbulent avec une vitesse d'au moins 1,8 m/s (Smithers, 2022). Cette vitesse est choisie sur la base d'une longue expérience et des pratiques industrielles.

Les forces de cisaillement des solutions nettoyantes à l'interface solide-liquide jouent un rôle très important dans le processus de nettoyage (Li *et al.*, 2019). Ces forces contribuent de manière significative à l'élimination des bactéries, qui ne peuvent avoir lieu que si les forces de cisaillement dépassent celles d'adhérence. L'élimination de 50 % des tapis de spores a nécessité des contraintes de cisaillement caractéristiques nettement supérieures à celles imposées par les débits industriels standard dans les tuyaux (Wang *et al.*, 2019). Bénézech et Faille (2018) n'ont constaté aucune différence dans la cinétique de détachement du biofilm sans forces de cisaillement, même en utilisant une concentration accrue d'hydroxyde de sodium (NaOH). Les forces chimiques agissent en dissolvant les salissures afin de faciliter leur élimination (Li *et al.*, 2019). Parfois, plusieurs agents chimiques sont nécessaires pour éliminer les biofilms : un agent pour tuer les organismes et d'autres pour faciliter le détachement des cellules mortes et des résidus (Landel & Wilson, 2024). En général, on utilise d'abord des détergents alcalins pour dissoudre les protéines, les sucres et tout type de contaminants organiques. Les concentrations de NaOH varient de 0,5 à 2 % (p/v) à un pH compris entre 11,5 et 13,5. L'étape suivante consiste à nettoyer à l'aide d'acides capables de dissoudre les salissures inorganiques (minéraux). L'acide nitrique, l'acide phosphorique

(H₃PO₄), l'acide chlorhydrique (HCl) et l'acide sulfurique (H₂SO₄) sont couramment utilisés dans l'industrie laitière à des concentrations comprises entre 0,5 et 1 % (p/v) pendant 5 à 20 minutes (Pant *et al.*, 2023). L'élimination totale des spores adhérentes n'a été obtenue qu'après avoir appliqué la procédure CIP complète avec un détergent anionique et un détergent acide, suivie d'une désinfection à l'hypochlorite de sodium (Ribeiro *et al.*, 2019).

Une large gamme de produits chimiques, notamment divers agents endommageant l'ADN, certaines amines et certains alcools, ainsi que des agents oxydants, des aldéhydes, des acides et des bases, sont utilisés pour tuer les spores (Setlow & Christie, 2023). La saturation de l'ADN des spores par des protéines de type α/β (SASP) les protège, au moins en partie, de la destruction par des acides tels que l'acide nitreux, largement utilisé dans l'industrie laitière (Meaney *et al.*, 2016).

L'énergie thermique vient renforcer l'effet des deux premiers facteurs (forces de cisaillement et produits chimiques). L'efficacité des détergents augmente avec la température, car les molécules se déplacent rapidement et entrent en collision à des températures élevées, où les salissures sont ramollies et fondues (Landel & Wilson, 2024). Cependant, aucune amélioration significative de l'efficacité du nettoyage n'a été observée lorsque la température était supérieure à 45 °C et que la contrainte de cisaillement sur la paroi était supérieure à 0,65 Pa (Fan *et al.*, 2023).

Le traitement des spores de *B. cereus* à l'hydroxyde de sodium à haute température entraîne la perte des appendices et l'altération de l'intégrité de l'exosporium. De plus, Faille *et al.* (2007) ont observé une altération du cortex avec une perturbation partielle des couches supérieures. Ces mêmes auteurs ont rapporté le même phénomène dans une autre étude : lors d'un nettoyage à l'aide de NaOH à 2 % à une température de 80 °C, ce traitement semble affecter la structure de l'exosporium, entraînant une destruction totale des appendices, tandis que l'enveloppe est partiellement endommagée (Faille, Sylla, *et al.*, 2010). Cette lésion de l'enveloppe sensibiliserait ensuite les spores survivantes aux étapes suivantes de désinfection par l'hypochlorite de sodium ou le peroxyde d'hydrogène (Faille, Lequette, *et al.*, 2010).

Une approche visant à limiter l'adhérence des spores a été proposée en favorisant leur germination, ce qui les rend plus sensibles aux processus CIP, car la germination est un processus rapide qui peut prendre 30 minutes pour certaines espèces (Fan *et al.*, 2023). Cependant, la couche de substances polymères extracellulaires (EPS) qui empêche la pénétration des germinants (molécules qui déclenchent la germination des spores) et le risque

qu'elle comporte en favorisant la croissance des cellules germées rendent cette approche difficile à mettre en œuvre et nécessitent des recherches plus approfondies.

L'utilisation d'enzymes dispersantes pour détruire l'EPS des biofilms s'est avérée efficace dans divers modèles d'infection animale *in vivo* et pourrait constituer une alternative possible lorsque les agents nettoyants ne donnent pas de résultats satisfaisants pour éliminer les biofilms (Sharma & Pagedar Singh, 2018 ; Wang *et al.*, 2023).

7.2. Nouvelles stratégies pour contrôler les micro-organismes sporulés dans l'industrie alimentaire

Les progrès récents dans les technologies de conservation des aliments ont permis de fournir des aliments sûrs et plus nutritifs. Les technologies physiques d'inactivation des spores, notamment le traitement thermique ultra court.

Les traitements, la pression isostatique élevée et les technologies électromagnétiques, telles que les champs électriques pulsés, la lumière UV, le plasma à pression atmosphérique froide, peuvent tous être cités (Koutchma *et al.*, 2020 ; Reineke & Mathys, 2024). Une technologie émergente permettant de préserver le goût et la valeur nutritionnelle des aliments liquides tels que le lait, basée sur le micro-ingénierie des procédés, est la pasteurisation ultra-courte (USP) et la stérilisation ultra-courte (USS) appliquées à des températures élevées, mais avec des temps de maintien de l'ordre de la milliseconde (ms), l'USP étant comprise entre 10 et 200 ms à 90-100 °C, et l'USS entre 10 ms et 1 s à 147-180 °C (Mathys, 2018). La haute pression isostatique (150 MPa-550 MPa) à des températures <80 °C est une autre technologie qui cible vraisemblablement les complexes membranaires, affectant la perméabilité IM et induisant la libération de Ca²⁺-DPA et la réhydratation du noyau des spores, ce qui entraîne le déclenchement de la germination des spores, permettant ainsi une inactivation ultérieure dans des conditions douces (Heydenreich *et al.*, 2024) . Les champs électriques pulsés (PEF) sont une technologie non thermique basée sur l'application d'un courant électrique dans un champ électrique alternatif dans une gamme d'utilisation tout en maintenant la température des aliments aussi basse que possible (Pillet *et al.*, 2016). Il a été démontré que les PEF détruisent partiellement l'enveloppe des spores en clivant les couches protéiques de l'enveloppe.

La lumière UV est utilisée pour la décontamination des surfaces afin de détruire les cellules en croissance et, dans une moindre mesure, les spores. Le spectre UVC de 200 à 280 nm correspond aux longueurs d'onde généralement utilisées dans l'industrie alimentaire et la dose d'UV est exprimée en joules par unité de surface (J/m) reçue par unité de surface (Soni *et al.*,

2016). La longueur d'onde de 254 nm était la plus utilisée pour la décontamination. Cependant, Taylor *et al.* (2020) ont montré que le rayonnement UV de 222 nm, une alternative potentiellement plus sûre au rayonnement UV de 254 nm, pouvait également être utilisé pour tuer les spores en endommageant leur ADN.

Le plasma à pression atmosphérique froide (CAPP), un gaz partiellement ionisé maintenu à basse température, est une autre technique prometteuse de traitement non thermique des aliments pour désinfecter les aliments et les surfaces en contact avec les aliments, mais aussi pour stériliser les aliments. Le plasma froid a déjà été proposé comme substitut aux procédés conventionnels de transformation du lait (Harikrishna *et al.*, 2023). Les spores sont inactivées par le CAPP en raison des dommages causés à la membrane interne des spores et aux protéines clés de germination, ainsi qu'aux dommages causés à l'ADN (Hertwig *et al.*, 2018).

Les huiles essentielles

1- Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des extraits naturels aromatiques produits par de nombreuses plantes. Elles sont constituées d'un mélange complexe de composés volatils issus du métabolisme secondaire végétal, notamment des terpènes, des alcools, des aldéhydes et des esters. Ces substances sont présentes dans différentes parties de la plante telles que les fleurs, les feuilles, les fruits, les racines et les écorces (Bakkali *et al.*, 2008). Selon la Pharmacopée Européenne, les huiles essentielles sont obtenues principalement par entraînement à la vapeur d'eau, hydrodistillation ou, dans le cas des agrumes, par expression mécanique du péricarpe frais. Après extraction, elles sont séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques adaptés (European Pharmacopoeia, 2020). Bien qu'elles soient présentes en faibles quantités dans les tissus végétaux, elles possèdent une forte volatilité et une odeur caractéristique, ce qui explique leur diffusion rapide dans l'atmosphère (Dhifi *et al.*, 2016). La richesse de leur composition chimique confère aux huiles essentielles de nombreuses propriétés biologiques telles que les activités antimicrobienne, antifongique, antioxydante et anti-inflammatoire. Ces propriétés justifient leur utilisation dans plusieurs domaines, notamment la pharmacie, la cosmétique, l'industrie agroalimentaire et la médecine traditionnelle. De plus, plusieurs études récentes soulignent leur intérêt comme alternative potentielle dans la lutte contre la résistance microbienne (Nazzaro *et al.*, 2017). Depuis l'Antiquité, les huiles essentielles occupent une place importante dans différentes pratiques thérapeutiques et culturelles. Elles sont utilisées aussi bien pour leurs propriétés médicinales que pour leurs qualités aromatiques. Actuellement, elles représentent un élément essentiel de l'aromathérapie moderne et continuent de faire l'objet de nombreuses recherches scientifiques en raison de leurs applications variées (Orchard et Van Vuuren, 2017).

2- L'activité antibactérienne des huiles essentielles :

Les huiles essentielles, extraites de plantes aromatiques et médicinales, constituent une source naturelle riche en composés bioactifs dotés d'un potentiel antibactérien important. Leur intérêt en microbiologie réside dans leur capacité à agir contre un large éventail de micro-organismes pathogènes, notamment en inhibant leur croissance et en compromettant leur survie cellulaire. Plusieurs études récentes ont confirmé que ces extraits végétaux présentent une activité antimicrobienne significative, renforçant ainsi leur intérêt comme alternatives ou compléments aux antibiotiques conventionnels, dans un contexte marqué par l'augmentation des résistances bactériennes. Cette activité est principalement attribuée à leur composition chimique complexe, dominée par des monoterpènes, des sesquiterpènes et des

composés phénoliques volatils tels que le thymol, le carvacrol et l'eugénol. Ces molécules exercent leur action en perturbant l'intégrité de la membrane cytoplasmique bactérienne, entraînant une augmentation de sa perméabilité, une perte du contenu intracellulaire ainsi qu'un déséquilibre du gradient ionique. Elles peuvent également inhiber des enzymes essentielles impliquées dans le métabolisme bactérien, conduisant ainsi à l'arrêt de la croissance microbienne. Par conséquent, les huiles essentielles représentent une piste prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies antimicrobiennes ciblant les bactéries multirésistantes (Álvarez-Martínez *et al.*, 2021 ; Mutlu-Ingok *et al.*, 2020).

3- Définition :

Le *Rosmarinus officinalis* L., connu sous le nom de romarin, est une plante aromatique et médicinale appartenant à la famille des Lamiaceae. Il s'agit d'un arbuste vivace largement répandu dans les régions méditerranéennes, caractérisé par des feuilles persistantes fortement aromatiques et riches en huiles essentielles (Nieto *et al.*, 2018). Le romarin est naturellement présent dans le bassin méditerranéen, notamment en Europe du Sud, en Afrique du Nord et en Asie occidentale. Il se développe spontanément dans des zones sèches, rocheuses et arides, et s'adapte facilement aux conditions climatiques difficiles (Borges *et al.*, 2019).



Figure 02 : *Rosmarinus officinalis*

En Algérie, *Rosmarinus officinalis* est très commun à l'état spontané, surtout dans les régions montagneuses, les maquis, les terrains pauvres et les zones côtières. Il est également utilisé de manière traditionnelle en phytothérapie, en alimentation et en cosmétique grâce à ses propriétés biologiques et à la richesse de son huile essentielle (Salehi *et al.*, 2020). L'huile essentielle de romarin est obtenue principalement par hydrodistillation des feuilles et des sommités fleuries. Elle est riche en composés bioactifs tels que le 1,8-cinéole, le camphre et l' α -pinène, responsables de ses activités biologiques diversifiées (Nieto *et al.*, 2018).

4- L'effet de *Rosmarinus officinalis* :

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* possède des activités antibactériennes et antifongiques importantes pouvant être exploitées dans le développement de produits naturels destinés au traitement des infections microbiennes ainsi qu'à la conservation des aliments. Plusieurs études ont démontré son efficacité contre différentes bactéries pathogènes, notamment *Bacillus cereus*, grâce à la présence de composés bioactifs tels que le 1,8-cinéole, le camphre et les α -pinènes (Nieto *et al.*, 2018 ; Bajalan *et al.*, 2017). Ces résultats mettent en évidence non seulement les bénéfices potentiels de cette huile essentielle pour la santé, mais suggèrent également des perspectives prometteuses pour le développement d'alternatives naturelles et durables dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire. Face à la demande croissante de solutions naturelles, l'exploration approfondie des composés dérivés de *Rosmarinus officinalis* pourrait conduire à des avancées significatives dans la lutte contre les micro-organismes pathogènes et dans l'amélioration de la conservation des aliments.

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

II. 1. L'origine des souches bactériennes :

Les onze souches de *B. cereus* utilisées ont été sélectionnées à partir de la collection du Laboratoire de microbiologie alimentaire et environnementale (Université de Tlemcen, Algérie). Ces isolats, provenant de chaînes de transformation laitière locales, ont été décrits par Didouh *et al.* (2015) pour la diversité de leurs propriétés physicochimiques de surface et leur aptitude à former des biofilms sur l'acier inoxydable. Leur potentiel pathogène, incluant les gènes de l'hémolysine, de l'entérotoxine non hémolytique, de la cytotoxine K et de la toxine émétique, a été préalablement établi par PCR. Enfin, leur profil génomique unique, incluant la phylogénie et les marqueurs de résistance aux antimicrobiens et de virulence, a été confirmé par séquençage du génome entier (Illumina MiSeq®) dans une étude ultérieure (Didouh *et al.* 2023a).

II.2. Revivification et vérification de la pureté des souches :

Afin de restaurer leur activité métabolique après une période de dormance, onze souches sous forme de suspension sporulée de *Bacillus cereus* destinées à l'expérimentation ont fait l'objet d'une procédure de revivification. Dans un premier temps, chaque souche a été ensemencée de manière aseptique dans un bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth), suivi d'une incubation de 24 heures à 30°C. La viabilité et la multiplication active des bactéries ont été confirmées par l'apparition caractéristique d'une turbidité au sein du milieu liquide. Ces cultures réactivées ont ensuite été repiquées sur une gélose PCA (Plate Count Agar) et incubées dans les mêmes conditions thermiques et temporelles, permettant ainsi le développement de colonies distinctes. Cette démarche rigoureuse constitue une phase préparatoire indispensable pour garantir la disponibilité de cultures homogènes, métaboliquement actives et parfaitement exploitables pour les étapes ultérieures de purification et d'analyse.



Figure 03 : Les étapes de revivification des souches bactérienne

II. 3.Évaluation de l'activité antimicrobienne

L'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle naturelle (*Rosmarinus officinalis*) a été déterminée par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé, selon le protocole décrit par Valková *et al.* (2021).

Brièvement, onze souches de *Bacillus cereus* ont été cultivées dans un BHIB à 30 °C pendant 24 h. La gélose Mueller-Hinton (MHA) a ensuite été ensemencée avec une suspension microbienne ajustée à 0,5 McFarland (Fluka, Suisse). Des disques de papier filtre (6 mm) ont été imprégnés de 10 µL de l'huile essentielle Romarin à cinéole et déposés sur la surface de la gélose.

Après une incubation en conditions aérobies à 30°C pendant 24 h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés au moyen d'un double décimètre. L'intensité de l'activité antimicrobienne a été interprétée comme suit : Activité faible (5-10 mm), activité modérée (11-15 mm) et activité très forte (zone > 15 mm).

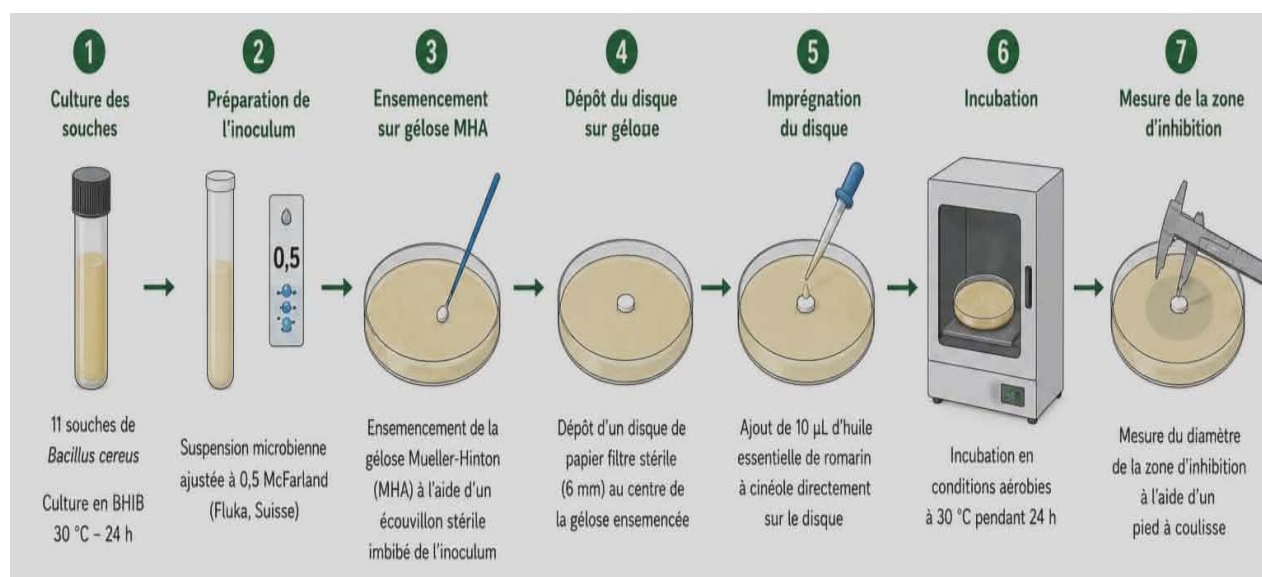


Figure 04 : Les étapes de l'évaluation de l'activité anti-microbienne

II. 4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice :

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été déterminée par la méthode de micro-dilution en milieu liquide sur plaques de 96 puits, selon les standards du CLSI (2017). L'huile essentielle (HE) de romarin a d'abord été solubilisée dans du DMSO à 1 %, puis incorporée au bouillon BHIB. Le protocole a consisté à distribuer 100 µL de milieu BHIB par puits, suivis de 100 µL d'HE dans le premier puits pour amorcer une série de dilutions géométriques de raison 2. Chaque puits a ensuite été inoculé avec 100 µL de suspension bactérienne pour atteindre une concentration finale 10^6 UFC/mL dans un volume total de 200 µL. Après une incubation de 24 heures à 30 °C en conditions aérobies, la CMI a été identifiée visuellement comme la plus faible concentration d'HE empêchant tout trouble bactérien visible. Des témoins de croissance ont parallèlement été réalisés avec du DMSO à 1 % (v/v) pour valider la viabilité des souches.

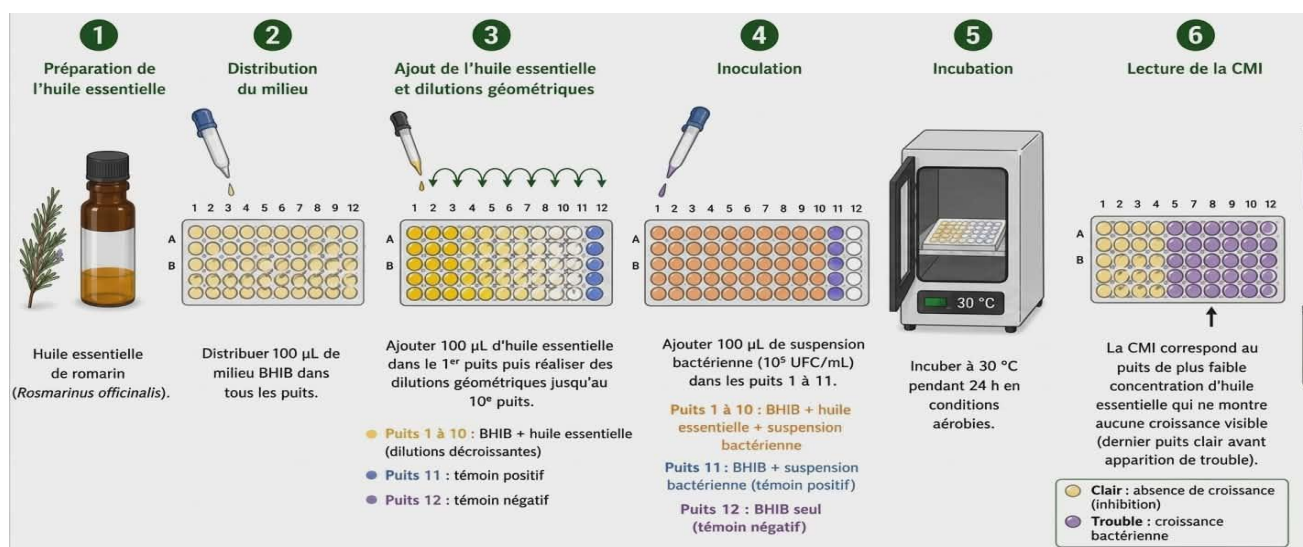


Figure 05 : Les étapes de la détermination de la concentration minimal inhibitrice

II. 5. Effet de l'huile essentiel sur les spores

II.5.1. préparation de la suspension de spores

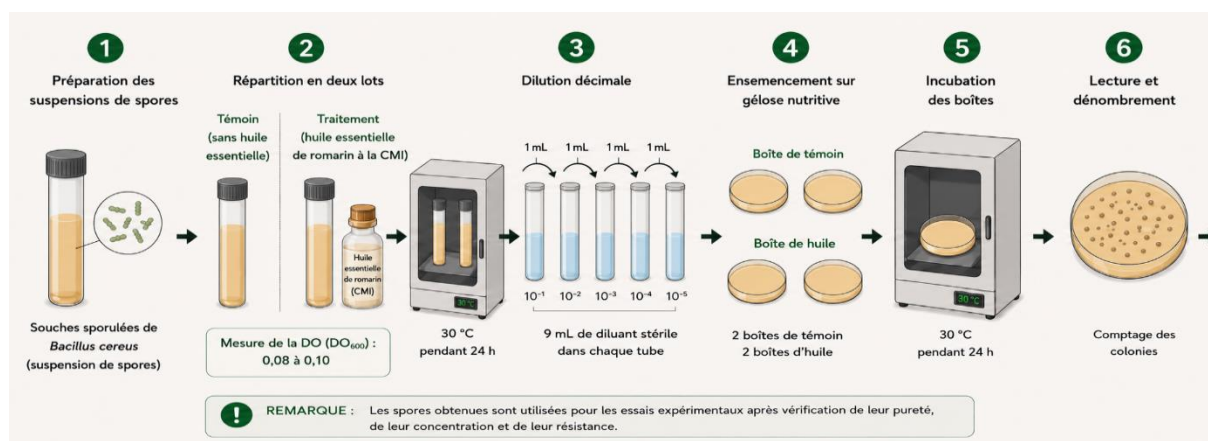
Le protocole de sporulation a été adapté de la méthode décrite par Leguerinel *et al.* (2000). La production de spores a été induite sur une gélose nutritive enrichie en sulfate de magnésium (40 ppm, w/v) et en chlorure de calcium (100 ppm, w/v), sous une incubation à 30 °C. Une surveillance microscopique a permis de confirmer la libération d'au moins 90% de spores, généralement après 4 à 6 jours. À l'issue de cette phase, la culture a été récoltée, puis purifiée par trois cycles successifs de lavage et de centrifugation (10 000 rpm, 15 min, Eppendorf 5810 R). Les suspensions ont été stockées à 4 °C dans de l'eau stérile, et deux lavages finaux ont été effectués avant chaque essai expérimental.



Figure 06 : Les étapes de préparation de la suspension des spores

II.5.2. Test anti spores

Pour tester l'efficacité de l'huile essentielle sur les spores, nous avons mélangé sa concentration minimale inhibitrice (CMI) à 5 mL d'une suspension de spores calibrée à 10^8 UFC/mL. Ce mélange a ensuite été incubé à 30°C durant 24 heures. Une fois le traitement terminé, les spores ont été récupérées par centrifugation ($14\,500 \times g$ pendant 5 min). Afin de garantir que les résidus d'huile essentielle ne faussent pas les résultats en entravant la germination future des spores, le culot a subi trois cycles de lavage successifs dans une solution saline stérile selon la méthode de Cho *et al.* 2008. Enfin, pour dénombrer les spores restées viables, le culot final a été remis en suspension dans 1 mL de solution saline, puis soumis à des dilutions en série avant d'être étalé sur un milieu de gélose nutritive. Le comptage a été effectué après une nouvelle période d'incubation à 30°C pendant 24 heures.



Figures 07 : Les étapes l'évaluation de l'activité anti-spores

Résultats et discussion

III.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles :

L'activité antibactérienne in vitro de l'huile essentielle contre les souches bactériennes de *B. cereus* a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion par disque en mesurant les diamètres des zones d'inhibition (tableau 3). Les HE ont montré des effets antibactériens élevés d'après les zones d'inhibition observées.

L'huile essentielle *Rosmarinus officinalis* présente une activité antibactérienne contre les souches de *Bacillus cereus*, avec des zones d'inhibition comprises entre 10,33 mm et 16,66 mm.

Les souches les plus sensibles sont *B. cereus* 123, 110 et 14 indiquant une efficacité du romarin sur cet isolat, tandis que les souches 100 et 80 montrent une sensibilité plus faible. Cette variation indique une réponse hétérogène des bactéries face à l'huile essentielle.

Globalement, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* exerce une activité antibactérienne intermédiaire dépendante de la souche testée.

Tableau 3 : Zone d'inhibition (mm $\pm$ écart type) des souches bactériennes en présence d'huile essentielle.

Souches	<i>Rosmarinus officinalis</i>
<i>Bacillus cereus</i> 110	15,66 $\pm$ 0,577
<i>Bacillus cereus</i> 82	13,66 $\pm$ 1,527
<i>Bacillus cereus</i> 123	16,66 $\pm$ 2,886
<i>Bacillus cereus</i> 107	12,33 $\pm$ 2,516
<i>Bacillus cereus</i> 44	11,66 $\pm$ 1,154
<i>Bacillus cereus</i> 14	15,33 $\pm$ 2,516
<i>Bacillus cereus</i> 100	10,33 $\pm$ 0,577
<i>Bacillus cereus</i> 89	11,66 $\pm$ 1,154
<i>Bacillus cereus</i> 80	11 $\pm$ 1
<i>Bacillus cereus</i> 126	12,33 $\pm$ 0,577
<i>Bacillus cereus</i> 109	11,33 $\pm$ 0,577

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* exerce une activité antibactérienne notable contre *Bacillus cereus* (voir figure 8), avec des diamètres de zones d'inhibition variant entre 10,33 mm et 16,66 mm.

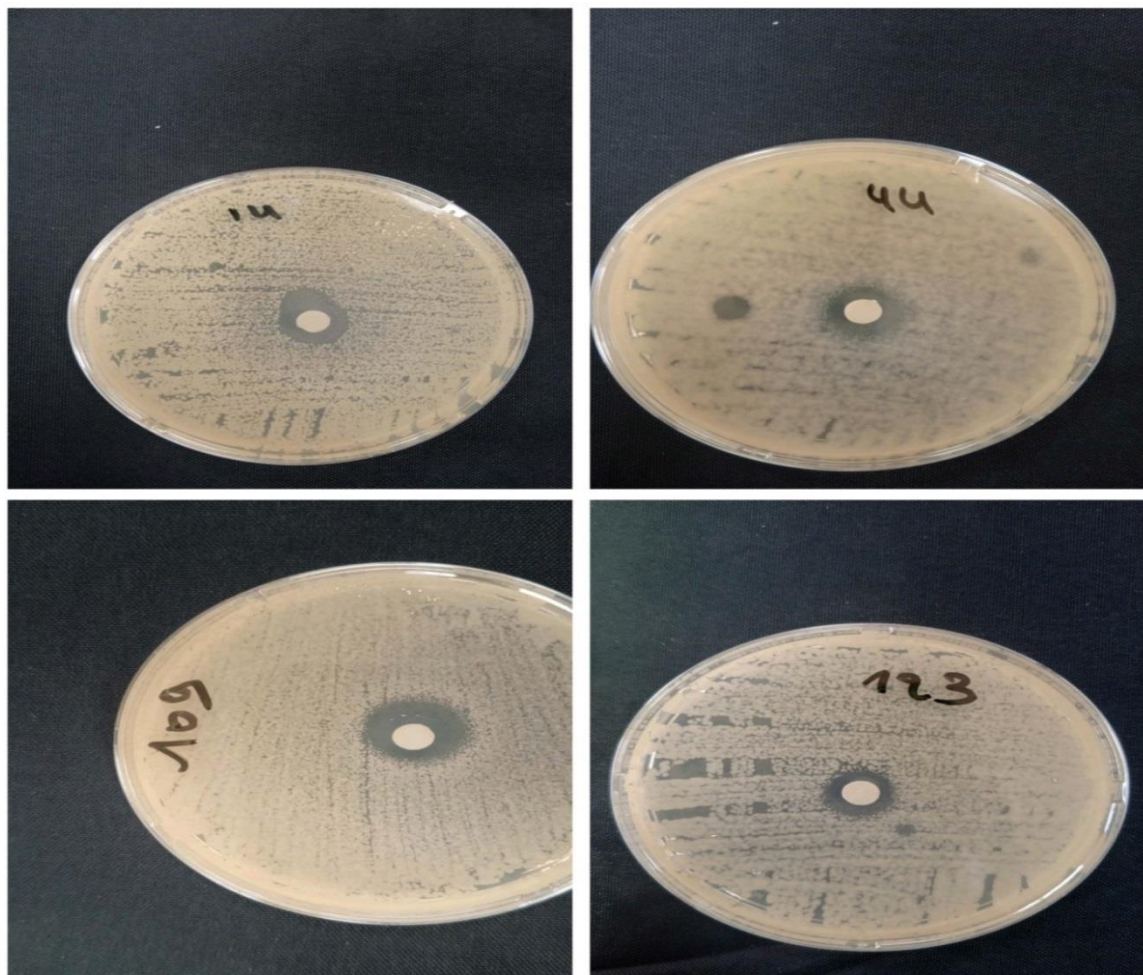


Figure 08 : Les résultats de l'activité antimicrobienne

Cette variabilité traduit une sensibilité différente des souches testées, suggérant l'influence de facteurs intrinsèques liés à la structure cellulaire et aux mécanismes de résistance bactérienne. Globalement, ces résultats sont en accord avec la littérature scientifique récente. En effet, Nieto *et al.*, (2018) ont démontré que l'huile essentielle de romarin possède une activité antibactérienne significative contre les bactéries Gram positives, incluant *Bacillus cereus*, grâce à sa richesse en composés terpéniques tels que le 1,8-cinéole et le camphre. De plus, Nazzaro *et al.*, (2017) ont rapporté que les huiles essentielles agissent principalement par désorganisation de la membrane cytoplasmique bactérienne, entraînant une augmentation de la perméabilité et une fuite des constituants intracellulaires, ce qui conduit à l'inhibition de la croissance bactérienne. Les résultats obtenus s'inscrivent donc dans les tendances générales

décrites dans la littérature concernant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sur les bactéries d'origine alimentaire. Par ailleurs, *Bacillus cereus* est reconnu comme une bactérie sporulée responsable d'intoxications alimentaires. Sa capacité à former des spores résistantes explique sa forte persistance dans les aliments et son comportement variable face aux agents antimicrobiens. Cette caractéristique est largement documentée par Stenfors Arnesen *et al.* (2008), qui décrivent la résistance et les mécanismes de survie de cette espèce dans les systèmes alimentaires. En comparaison avec d'autres huiles essentielles, les huiles riches en composés phénoliques, telles que le thym (*Thymus vulgaris*) et l'origan (*Origanum vulgare*), présentent généralement une activité antimicrobienne plus forte en raison de la présence de thymol et carvacrol, reconnus pour leur action bactéricide rapide et intense par rupture directe de la membrane cellulaire, ce qui explique des zones d'inhibition plus élevées que celles observées avec le romarin (Sakkas *et al.*, 2018 ; Levy Lopez *et al.*, 2017).

De même, certaines huiles essentielles, notamment celles de lavande, peuvent présenter une activité antibactérienne comparable, voire légèrement supérieure selon les souches bactériennes, en raison de leur richesse en composés actifs tels que le linalol et l'acétate de linalyle (Carrasco *et al.* 2016). Par ailleurs, les résultats obtenus dans cette étude confirment que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* possède une activité antibactérienne significative contre *Bacillus cereus*, en accord avec les données récentes de la littérature (Nieto G. *et al.* 2018). Toutefois, cette activité reste généralement légèrement inférieure à celle des huiles essentielles riches en composés phénoliques, tels que le thymol ou le carvacrol, reconnus pour leur forte capacité à perturber les membranes cellulaires bactériennes (Maura Nazzaro *et al.* 2017).

III.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Le tableau 4 présente un résumé des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues pour l'ensemble des souches bactériennes testées. Les résultats mettent en évidence une activité antibactérienne de l'huile essentielle étudiée, dont l'intensité varie en fonction des souches. Les valeurs de CMI enregistrées s'étendent de 0,0011 $\mu\text{L/mL}$ à 4,687 $\mu\text{L/mL}$, traduisant une différence de sensibilité des micro-organismes vis-à-vis de cette huile essentielle.

Les souches BC 80 et BC 123 apparaissent comme les plus sensibles, avec des valeurs de CMI particulièrement faibles, indiquant une forte efficacité inhibitrice. En revanche, les autres souches présentent des valeurs intermédiaires, suggérant une activité antibactérienne modérée.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment que l'huile essentielle testée possède une activité antibactérienne significative, bien que son efficacité dépende de la souche bactérienne considérée.

Tableau 4 : Concentration minimale inhibitrice (MIC± écart-type)

Souche	<i>Rosmarinus officinalis</i> MIC (µl/ml)
<i>Bacillus cereus</i> 126	0,65 ± 0,22
<i>Bacillus cereus</i> 89	0,52± 0,225
<i>Bacillus cereus</i> 107	4,687333 ± 2,706618
<i>Bacillus cereus</i> 123	0,004 ± 0,001732
<i>Bacillus cereus</i> 44	0,064333 ± 0,02829
<i>Bacillus cereus</i> 14	0,113333 ±0,074849
<i>Bacillus cereus</i> 82	0,162333 ±0,05658
<i>Bacillus cereus</i> 80	0,0011 ± 0,000693
<i>Bacillus cereus</i> 100	0,195 ±3,4E-17
<i>Bacillus cereus</i> 110	0,162333± 0,05658
<i>Bacillus cereus</i> 109	0,715667 ±0,739403

L'évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) met en évidence une activité antibactérienne dépendante de la concentration de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*. Cette propriété reflète la capacité de cette huile à inhiber efficacement la croissance bactérienne lorsque sa concentration atteint un seuil critique. Cet effet dose-dépendant s'explique par l'accumulation progressive des composés bioactifs, notamment les monoterpènes et les composés oxygénés, qui agissent en perturbant la perméabilité de la membrane cellulaire, en inhibant l'activité enzymatique et en altérant le métabolisme bactérien (Hyldgaard *et al.*, 2012 ; Burt, 2004). Des travaux récents confirment également que les huiles essentielles exercent leur activité antimicrobienne en ciblant les fonctions cellulaires essentielles des bactéries (Wang *et al.* 2024). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les composés naturels d'origine végétale peuvent inhiber la croissance de *Bacillus cereus* même à de faibles concentrations, en affectant principalement la membrane cellulaire et les systèmes enzymatiques (Nazzaro *et al.* 2017 ; Hyldgaard *et al.*, 2012) En outre, la capacité de cette

bactérie à former des spores et des biofilms renforce l'intérêt d'utiliser des agents naturels efficaces tels que les huiles essentielles (Al-Shimmmary *et al.*, 2020). Ainsi, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* présente une activité inhibitrice notable, confirmant son potentiel en tant qu'agent antibactérien naturel prometteur. Les valeurs de CMI obtenues dans cette étude confirment également le fort pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle testée, avec une efficacité notable même à de faibles concentrations pour certaines souches. Comparativement aux travaux de Jiang *et al.* (2011), Nos résultats montrent une activité antimicrobienne plus élevée. Cette différence pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs, notamment la variation de la composition chimique de l'huile essentielle utilisée, une concentration plus élevée en composés actifs, ainsi qu'un effet synergique entre les différents constituants. En effet, cette synergie entre molécules aromatiques peut renforcer leur capacité à désorganiser les membranes cellulaires et à inhiber les processus métaboliques bactériens (Swamy *et al.* 2016 ; Nazzaro *et al.*, 2017). Toutefois, il convient de noter que les conditions expérimentales (température, milieu de culture et méthode utilisée) peuvent également influencer les valeurs de CMI, ce qui pourrait expliquer certaines divergences avec les études antérieures (Nazzaro *et al.* 2017).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* observée dans cette étude s'inscrit dans une dynamique de recherche croissante sur les propriétés biocides des Lamiacées. Nos résultats, montrent une inhibition dose-dépendante, confirment les mécanismes décrits par Hyldgaard *et al.* (2012), selon lesquels de composés lipophiles entraine provoque une désorganisation structurelle de la membrane cytoplasmique. Comparativement aux travaux de Didouh *et al.* (2025) portant sur des souches de *Bacillus cereus* isolées en Algérie, il apparaît que si le romarin possède un fort potentiel, l'huile essentielle de *Lavandula latifolia* (lavande aspic) affiche une efficacité encore plus marquée avec des CMI atteignant 0,064 $\mu\text{L/mL}$. Cette performance supérieure peut être attribuée à une concentration exceptionnelle en 1,8-cinéole (73 %), un composé clé également présent dans le romarin mais souvent à des teneurs moindres selon le chémotype. À l'inverse, l'huile de *Lavandula angustifolia*, bien qu'efficace, présente une activité plus hétérogène (CMI de 0,2 à 12,5 $\mu\text{L/mL}$), soulignant l'importance de la synergie entre le linalol et l'acétate de linalyle. Ces différences d'effet, confirmées par des études de liaison moléculaire montrant une forte affinité des constituants des lavandes pour les protéines cibles de *B. cereus*.

En conclusion, l'huile de *Rosmarinus officinalis* demeure un agent antibactérien naturel de premier plan, dont l'efficacité contre les formes végétatives et les spores de *B. cereus*

rivalisent avec les meilleures essences de lavande, offrant ainsi des perspectives concrètes pour la biopréservation dans l'industrie agroalimentaire.

III.3. Activité anti-spoires des HE :

Le tableau 5 met en évidence que l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis*) exerce une activité anti spores variable en fonction des souches de *Bacillus cereus*. Les valeurs de réduction logarithmique ($\log_{10}$) obtenues témoignent d'une efficacité globale de cette huile sur les spores testées, avec des réductions comprises entre 1,36 et 4,38 $\log_{10}$.

Les souches BC 123 et BC 107 se révèlent les plus sensibles à l'action de l'huile essentielle, enregistrant des réductions respectives de 4,38 et 3,93 $\log_{10}$, ce qui traduit une activité sporicide relativement élevée. En revanche, d'autres souches, telles que BC 110 et BC 82, présentent une sensibilité plus faible, avec des réductions limitées à 1,36 et 1,95 $\log_{10}$.

Cette variabilité suggère que l'efficacité anti spores de l'huile essentielle de romarin est fortement dépendante des caractéristiques propres à chaque souche bactérienne

Tableau 5: Activité antispore (réduction $\log_{10}$ des spores viable)

Souche	<i>Rosmarinus officinalis</i>
<i>Bacillus cereus</i> 126	3,872642
<i>Bacillus cereus</i> 123	4,386817
<i>Bacillus cereus</i> 80	3,084644
<i>Bacillus cereus</i> 44	3,479413
<i>Bacillus cereus</i> 14	2,81673
<i>Bacillus cereus</i> 82	1,953348
<i>Bacillus cereus</i> 89	2,744727
<i>Bacillus cereus</i> 107	3,933693
<i>Bacillus cereus</i> 110	1,361217
<i>Bacillus cereus</i> 109	2,90309
<i>Bacillus cereus</i> 100	2,799085

L'efficacité de l'huile essentielle (HE) de *Rosmarinus officinalis* sur les spores de *Bacillus cereus*, telle qu'illustrée par nos résultats, s'inscrit dans la recherche actuelle d'alternatives naturelles pour la sécurité sanitaire des produits laitiers. La réduction de la charge sporulée observée dans notre étude présente une variabilité inter-souches marquée, avec des valeurs de réduction $\log_{10}$ comprises entre 1,36 et 4,38. Cette disparité confirme que la sensibilité aux agents antimicrobiens n'est pas uniforme au sein de l'espèce *B. cereus*, une observation qui rejoint les travaux de Santamarta *et al.* (2021) sur la spécificité des réponses bactériennes face aux composants bioactifs.

En comparant nos données à la littérature, il apparaît que l'HE de romarin possède une potentielle antispore particulièrement intéressante. Alors que De Camargo Bertuso *et al.* (2021) rapportent une réduction maximale de 3,6 log en utilisant une combinaison complexe d'oléorésine de céleri et de rhamnolipides, l'HE de *R. officinalis* seule parvient à dépasser ce seuil pour plusieurs souches de notre échantillon (notamment les souches 123, 126 et 107). Cette performance suggère que les composants intrinsèques du romarin pourraient agir de

manière synergique pour altérer l'enveloppe protectrice des spores, mécanisme également mis en évidence par Ribes *et al.* (2021) pour d'autres composés comme le thymol ou le carvacrol.

Au cours des dernières décennies, l'amélioration des techniques d'assainissement et de désinfection a entraîné une baisse spectaculaire de la fréquence des épidémies associées au lait et aux produits laitiers. En raison de leurs puissantes propriétés antibactériennes et anti-biofilm, ainsi que de leur caractère écologique, les huiles essentielles (HE) d'origine végétale et leurs composants bioactifs sont de plus en plus utilisés comme alternative aux désinfectants synthétiques (Orhan-Yanikan *et al.*, 2019). La combinaison de l'oléorésine de céleri, du limonène et du rhamnolipide a entraîné une réduction de 2,8 à 3,6 log de la croissance des spores de *B. cereus* (De Camargo Bertuso *et al.*, 2021). Alors que l'HE de *Cymbopogon martinii* var. *motia*, à forte teneur en géraniol, a montré un effet antimicrobien élevé contre *B. subtilis*, ses combinaisons avec l'HE d '*Eugenia caryophyllus* ont montré des effets antagonistes (Santamarta *et al.*, 2021). Des images fluorescentes ont démontré la faible viabilité des cellules végétatives et des spores de *B. subtilis* traitées avec des composants d'huiles essentielles (carvacrol, eugénol, thymol et vanilline) en raison de dommages causés à l'enveloppe cellulaire (Ribes *et al.*, 2021). Un autre composant de l'huile essentielle d'ail, appelé disulfure de diallyle, a inhibé les facteurs de virulence de *B. cereus*, à savoir la production d'entérotoxines, la formation de biofilms et la motilité en essaim, à une concentration sous-inhibitrice (> 60 g/mL), ce qui en fait une option très prometteuse pour contrôler les biofilms (Jin *et al.*, 2021). Dans une étude récente menée par Didouh *et al.* (2024), il a été démontré que l'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus* inhibait la croissance des spores et des formes végétatives. La sensibilité de *B. cereus* aux huiles essentielles dont les spores adhérentes et en suspension a été fortement recommandée dans les programmes d'élimination pour les surfaces laitières et autres surfaces de transformation.

En conclusion, l'activité antispore de *Rosmarinus officinalis* démontrée ici valide son potentiel en tant qu'agent de désinfection écologique malgré une résistance variable observé selon certain souche, l'efficacité globale de cette huile essentielle en fait une alternative prometteuse au désinfectant chimique conventionnel dans les environnements.

Conclusion générale

Afin d'éliminer ou au moins de réduire au minimum les bactéries formant des endospores dans les laiteries et de garantir une durée de conservation plus longue du lait pasteurisé, il est essentiel de comprendre le comportement des spores lorsqu'elles sont présentes sur les équipements laitiers, ainsi que les facteurs qui influencent leur résistance à la chaleur, leur capacité d'adhérence aux surfaces et leur résistance aux processus de nettoyage. d'autre part, l'état d'hygiène des équipements ne dépend pas uniquement des caractéristiques des spores, mais également des propriétés de surface des équipements, des résidus et des salissures adhérant aux surfaces, ainsi que des différents types d'encrassement, en plus de la fréquence et de l'efficacité du nettoyage, qui doivent être adaptés à tous ces facteurs propres à chaque industrie. D'autres études devraient se concentrer sur l'induction de la germination comme approche permettant une élimination plus efficace des spores. En outre, le développement de surfaces réduisant le taux d'encrassement par le lait faciliterait les processus de nettoyage. Notre travail de recherche met en évidence l'intérêt de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* dans le contrôle de *Bacillus cereus*, en raison de son activité antibactérienne observée. Ces résultats soulignent le potentiel des huiles essentielles comme solutions naturelles alternatives dans la lutte contre les bactéries responsables de la contamination alimentaire. Ainsi, cette étude s'inscrit dans une démarche de valorisation des substances naturelles et ouvre des perspectives intéressantes pour leur utilisation dans le domaine de la sécurité alimentaire et la conservation des produits agroalimentaires.

Les références

- Aaliya, B., Sunooj, K. V., Navaf, M., Akhila, P. P., Sudheesh, C., Mir, S. A., ... & George, J. (2021). Recent trends in bacterial decontamination of food products by hurdle technology: A synergistic approach using thermal and non-thermal processing techniques. *Food Research International*, 147, 110514.
- Al-Shimmery, S. M., Abdulhasan, G. A., & Ahmed, M. E. (2020). *Bacillus cereus* in meat products: 16S rRNA phylogenetic tree analysis and antimicrobial investigation of Nisin A, rosemary essential oil and tetracycline. *Indian J Forensic Med Toxicol*, 14(4), 1816-1822.
- Álvarez-Martínez, F. J., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., & Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90, 153626.
- Awasti, N., & Anand, S. (2022). A fluorescence spectroscopic method for rapid detection of bacterial endospores: Proof of concept. *JDS communications*, 3(2), 97-100.
- Bajalan, I., Rouzbahani, R., Pirbalouti, A. G., & Maggi, F. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Industrial crops and products*, 107, 305-311.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Beno, S. M., Cheng, R. A., Orsi, R. H., Duncan, D. R., Guo, X., Kovac, J., ... & Wiedmann, M. (2020). *Paenibacillus odorifer*, the predominant *Paenibacillus* species isolated from milk in the United States, demonstrates genetic and phenotypic conservation of psychrotolerance but clade-associated differences in nitrogen metabolic pathways. *MSphere*, 5(1), 10-1128.
- Bertuso, P. D. C., Mayer, D. M. D., & Nitschke, M. (2021). Combining celery oleoresin, limonene and rhamnolipid as new strategy to control endospore-forming *Bacillus cereus*. *Foods*, 10(2), 455.
- Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., & Carvalho, J. C. T. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of ethnopharmacology*, 229, 29-45.
- Borreani, G., Ferrero, F., Nucera, D., Casale, M., Piano, S., & Tabacco, E. (2019). Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium* spp. and *Paenibacillus* spp. spores in silage, total mixed ration, dairy cow feces, and raw milk. *Journal of dairy science*, 102(9), 8273-8289.
- Brent Seale, R., Flint, S. H., James McQuillan, A., & Bremer, P. J. (2011). Effect of NaOH (caustic wash) on the viability, surface characteristics and adhesion of spores of a *Geobacillus* sp. isolated from a milk powder production line. *Letters in applied microbiology*, 52(2), 104-108.

- Buehler, A. J., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2018). Psychrotolerant spore-former growth characterization for the development of a dairy spoilage predictive model. *Journal of dairy science*, 101(8), 6964-6981.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Burt, Sara. "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review." *International journal of food microbiology* 94.3 (2004): 223-253.
- Burtscher, J., Rudavsky, T., Zitz, U., & Domig, K. J. (2024). Specificity of the AMP-6000 Method for Enumerating Clostridium Endospores in Milk. *Foods*, 13(8), 1192.
- Calahorrano-Moreno, M. B., Ordoñez-Bailon, J. J., Baquerizo-Crespo, R. J., Dueñas-Rivadeneira, A. A., Montenegro, M. C. B., & Rodríguez-Díaz, J. M. (2022). Contaminants in the cow's milk we consume? Pasteurization and other technologies in the elimination of contaminants. *F1000Research*, 11, 91.
- Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. (2016). Lavandula angustifolia and Lavandula latifolia essential oils from Spain: Aromatic profile and bioactivities. *Planta Medica*, 82(01/02), 163-170.
- Celano, G., Calasso, M., Costantino, G., Vacca, M., Ressa, A., Nikoloudaki, O., ... & De Angelis, M. (2022). Effect of seasonality on microbiological variability of raw cow milk from Apulian dairy farms in Italy. *Microbiology Spectrum*, 10(5), e00514-22.
- Chauhan, K., Dhakal, R., Seale, R. B., Deeth, H. C., Pillidge, C. J., Powell, I. B., ... & Turner, M. S. (2013). Rapid identification of dairy mesophilic and thermophilic sporeforming bacteria using DNA high resolution melt analysis of variable 16S rDNA regions. *International journal of food microbiology*, 165(2), 175-183.
- Cherif-Antar, A., Moussa-Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., & Flórez, A. B. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy science & technology*, 96(1), 27-38.
- Cho, W. I., & Chung, M. S. (2020). Bacillus spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. *Food science and biotechnology*, 29(11), 1447.
- Cho, W. I., Choi, J. B., Lee, K., Chung, M. S., & Pyun, Y. R. (2008). Antimicrobial activity of torilis isolated from Torilis japonica fruit against Bacillus subtilis. *Journal of food science*, 73(2), M37-M46.
- Ciofu, O., & Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and resistance of Pseudomonas aeruginosa biofilms to antimicrobial agents—how P. aeruginosa can escape antibiotics. *Frontiers in microbiology*, 10, 913.

Clair, G., Esbelin, J., Mallea, S., Bornard, I., & Carlin, F. (2020). The spore coat is essential for *Bacillus subtilis* spore resistance to pulsed light, and pulsed light treatment eliminates some spore coat proteins. *International journal of food microbiology*, 323, 108592.

Coorevits, A. N., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., ... & Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(2), 126-140.

Council of Europe. (2004). European Directorate for the quality of Medicines & Health Care. European Pharmacopoeia, 2.

da Silva, M. P., Fernandes, P. É., de Jesus Pimentel-Filho, N., de Andrade, N. J., Alves, R. B. T., Eller, M. R., & Peña, W. E. L. (2022). Modelling adhesion and biofilm formation by *Bacillus cereus* isolated from dairy products as a function of pH, temperature and time. *International Dairy Journal*, 134, 105472.

Dallagi, H., Faille, C., Gruescu, C., Aloui, F., & Benezech, T. (2022). Foam flow cleaning, an effective and environmentally friendly method for controlling the hygiene of closed surfaces contaminated with biofilms. *Food and Bioproducts Processing*, 136, 236-248.

Dash, K. K., Fayaz, U., Dar, A. H., Shams, R., Manzoor, S., Sundarsingh, A., ... & Khan, S. A. (2022). A comprehensive review on heat treatments and related impact on the quality and microbial safety of milk and milk-based products. *Food Chemistry Advances*, 1, 100041.

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433.

De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., ... & Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International journal of food microbiology*, 136(3), 318-325.

Deeth, H. C. (2021). Effects of high-temperature milk processing. *Encyclopedia*, 1(4), 1312-1321.

Deeth, H. C. (2021). Heat-induced inactivation of enzymes in milk and dairy products. A review. *International Dairy Journal*, 121, 105104.

Delaunay, L., Cozien, E., Gehannin, P., Mouhali, N., Mace, S., Postollec, F., ... & Mathot, A. G. (2021). Occurrence and diversity of thermophilic sporeformers in French dairy powders. *International Dairy Journal*, 113, 104889.

Den Besten, H. M., Wells-Bennik, M. H., & Zwietering, M. H. (2018). Natural diversity in heat resistance of bacteria and bacterial spores: impact on food safety and quality. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 383-410.

- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25.
- Didouh, N., Achek, R., Celandroni, F., Ghelardi, E., Mazzantini, D., Postollec, F., Moussa-boudjemaa, B., Ouoba, L.I.I., Tamaso, H., Lind, J., & El-Adawy, H. (2023a). Genomic diversity and virulence genes characterization of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from processing equipment of an Algerian dairy plant. *Journal of Food Quality*, 2023.
- Didouh, N., Bendimered, N., Postellec, F., Deperieux, E., Leguerinel, I., & Boudjemâa, B. M. (2022). Effect of hydrophobic or hydrophilic characteristics of *B. cereus* spores on their resistance to detergents. *Journal of Food Protection*, 85(4), 706-711.
- Didouh, N., Cherif-Antar, A., Benamar, I., & Moussa-Boudjemaa, B. (2015). Physico-chemical surface characterization of *Bacillus cereus* spores isolated from an Algerian dairy plant. *African Journal of Microbiology Research*, 9:57–65.
- Didouh, N., Khadidja, M., Campos, C., Sampaio-Maia, B., Boumediene, M. B., & Araujo, R. (2023). Assessment of biofilm, enzyme production and antibiotic susceptibility of bacteria from milk pre-and post-pasteurization pipelines in Algeria. *International journal of food microbiology*, 407, 110389.
- Didouh, N., Saifi, M., Aissaoui, N., Medjahdi, K., Khiri, Z., Achek, R., ... & Araujo, R. (2024). Essential oils application as *Bacillus cereus* antispore agent in food hygiene. *Journal of Agriculture and Food Research*, 18, 101454.
- Doll, E. V., Scherer, S., & Wenning, M. (2017). Spoilage of microfiltered and pasteurized extended shelf life milk is mainly induced by psychrotolerant spore-forming bacteria that often originate from recontamination. *Frontiers in Microbiology*, 8, 135.
- Echchaoui, M. (2018). Le pouvoir antibactérien des huiles essentielles.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology spectrum*, 7(3), 10-1128.
- Eijlander, R. T., van Hekezen, R., Bienvenue, A., Girard, V., Hoornstra, E., Johnson, N. B., ... & Wells-Bennik, M. H. (2019). Spores in dairy—new insights in detection, enumeration and risk assessment. *International Journal of Dairy Technology*, 72(2), 303-315.
- Evanowski, R. L., Kent, D. J., Wiedmann, M., & Martin, N. H. (2020). Milking time hygiene interventions on dairy farms reduce spore counts in raw milk. *Journal of dairy science*, 103(5), 4088-4099.
- Faille, C., Bénézech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., ... & Slomianny, C. (2014). Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. *Food microbiology*, 40, 64-74.

- Faille, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garénaux, E., & Guerardel, Y. (2010). Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International journal of food microbiology*, 143(3), 125-135.
- Faille, C., Sylla, Y., Le Gentil, C., Bénézech, T., Slomianny, C., & Lequette, Y. (2010). Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. *Food microbiology*, 27(6), 769-776.
- Faille, C., Tauveron, G., Le Gentil-Lelièvre, C., & Slomianny, C. (2007). Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of food protection*, 70(10), 2346-2353.
- Finton, M., Skeie, S. B., Aspholm, M. E., Franklin-Alming, F. V., Mekonnen, Y. B., Kristiansen, H., & Porcellato, D. (2024). Two-year investigation of spore-formers through the production chain at two cheese plants in Norway. *Food Research International*, 190, 114610.
- Flint, S., Bremer, P., Brooks, J., Palmer, J., Sadiq, F. A., Seale, B., ... & Zain, S. N. M. (2020). Bacterial fouling in dairy processing. *International Dairy Journal*, 101, 104593.
- Flores, M. J., Duricy, K., Choudhary, S., Laue, M., & Popham, D. L. (2023). A family of spore lipoproteins stabilizes the germination apparatus by altering inner spore membrane fluidity in *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 205(10), e00142-23.
- Freire, V., Casañas, L., Laborda, L., Condón, S., & Gayán, E. (2024). Influence of Sporulation Temperature on Germination and Growth of *B. weihenstephanensis* Strains in Specific Nutrients and in an Extended Shelf-Life Refrigerated Matrix Under Commercial Pasteurization and Storage Conditions. *Foods*, 13(21), 3434.
- Fysun, O., Kern, H., Wilke, B., & Langowski, H. C. (2019). Evaluation of factors influencing dairy biofilm formation in filling hoses of food-processing equipment. *Food and bioproducts processing*, 113, 39-48.
- Gao, T., Ding, Y., Wu, Q., Wang, J., Zhang, J., Yu, S., ... & Wu, H. (2018). Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk in China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 533.
- Ghosh, B., Dhar, J., Mukhopadhyay, M., & Bhattacharya, D. (2024). *Bacillus cereus* biofilm: Implications for food and diseases. *The Microbe*, 4, 100129.
- Gottschalk, N., Augustin, W., Scholl, S., Wilson, D. I., & Mercadé-Prieto, R. (2022). Model food soils for investigating cleaning: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 136, 249-296.
- Griep-Moyer, E. R., Trmčić, A., Qian, C., & Moraru, C. I. (2022). Monte Carlo simulation model predicts bactofugation can extend shelf-life of pasteurized fluid milk, even when raw

milk with low spore counts is used as the incoming ingredient. *Journal of Dairy Science*, 105(12), 9439-9449.

Guerrero-Navarro, A. E., Ríos-Castillo, A. G., Avila, C. R., Hascoët, A. S., Felipe, X., & Jerez, J. R. (2019). Development of a dairy fouling model to assess the efficacy of cleaning procedures using alkaline and enzymatic products. *LWT*, 106, 44-49.

Gupta, T. B., & Brightwell, G. (2017). Farm level survey of spore-forming bacteria on four dairy farms in the Waikato region of New Zealand. *Microbiologyopen*, 6(4), e00457.

Gupta, T. B., & Brightwell, G. (2023). Identification and characterisation of spore-forming bacteria in bovine raw milk collected from four dairy farms in New Zealand. *Dairy*, 4(4), 650-671.

Hamiot, A., Lemy, C., Krzewinski, F., Faille, C., & Dubois, T. (2023). Sporulation conditions influence the surface and adhesion properties of *Bacillus subtilis* spores. *Frontiers in microbiology*, 14, 1219581.

Haque, M. A., Wang, F., Chen, Y., Hossen, F., Islam, M. A., Hossain, M. A., ... & Ahmed, F. (2022). *Bacillus* spp. contamination: a novel risk originated from animal feed to human food chains in south-eastern Bangladesh. *Frontiers in microbiology*, 12, 783103.

Harikrishna, S., Anil, P. P., Shams, R., & Dash, K. K. (2023). Cold plasma as an emerging nonthermal technology for food processing: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100747.

Hebishy, E., Yerlikaya, O., Mahony, J., Akpinar, A., & Saygili, D. (2023). Microbiological aspects and challenges of whey powders—I thermophilic, thermophilic and spore-forming bacteria. *International Journal of Dairy Technology*, 76(4), 779-800.

Hertwig, C., Meneses, N., & Mathys, A. (2018). Cold atmospheric pressure plasma and low energy electron beam as alternative nonthermal decontamination technologies for dry food surfaces: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 131-142.

Heydenreich, R., Delbrück, A. I., Trunet, C., & Mathys, A. (2024). Strategies for effective high pressure germination or inactivation of *Bacillus* spores involving nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(10), e02299-23.

Huang, Q., Zhang, Z., Liu, Q., Liu, F., Liu, Y., Zhang, J., & Wang, G. (2021). SpoVG is an important regulator of sporulation and affects biofilm formation by regulating Spo0A transcription in *Bacillus cereus* 0-9. *BMC microbiology*, 21(1), 172.

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

Huang, Y., Flint, S. H., & Palmer, J. S. (2021). The heat resistance of spores from biofilms of *Bacillus cereus* grown in tryptic soy broth and milk. *International Dairy Journal*, 123, 105169.

- Hubble, L. J., Chow, E., Cooper, J. S., Webster, M., Müller, K. H., Wieczorek, L., & Raguse, B. (2012). Gold nanoparticle chemiresistors operating in biological fluids. *Lab on a Chip*, 12(17), 3040-3048.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 12.
- Jha, P. K., Dallagi, H., Richard, E., Benezech, T., & Faille, C. (2020). Formation and resistance to cleaning of biofilms at air-liquid-wall interface. Influence of bacterial strain and material. *Food Control*, 118, 107384.
- Jiang, Yang, et al. "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary." *Environmental toxicology and pharmacology* 32.1 (2011): 63-68.
- Jiménez-Pichardo, R., Regalado, C., Castano-Tostado, E., Meas-Vong, Y., Santos-Cruz, J., & García-Almendárez, B. E. (2016). Evaluation of electrolyzed water as cleaning and disinfection agent on stainless steel as a model surface in the dairy industry. *Food Control*, 60, 320-328.
- Jin, Z., Li, L., Zheng, Y., & An, P. (2021). Diallyl disulfide, the antibacterial component of garlic essential oil, inhibits the toxicity of *Bacillus cereus* ATCC 14579 at sub-inhibitory concentrations. *Food Control*, 126, 108090.
- Jonsmoen, U. L., Malyshev, D., Sleutel, M., Kristensen, E. E., Zegeye, E. D., Remaut, H., ... & Aspholm, M. E. (2024). The role of endospore appendages in spore–spore interactions in the pathogenic *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology*, 26(9), e16678.
- Karaca, B., & Cihan, A. C. (2020). The potential thermophilic Bacilli contaminants for dairy industry. *Natural and Engineering Sciences*, 5(2), 53-67.
- Karaca, B., Buzrul, S., & Coleri Cihan, A. (2019). Anoxybacillus and Geobacillus biofilms in the dairy industry: Effects of surface material, incubation temperature and milk type. *Biofouling*, 35(5), 551-560.
- Korza, G., DePratti, S., Fairchild, D., Wicander, J., Kanaan, J., Shames, H., ... & Setlow, P. (2023). Expression of the 2Duf protein in wild-type *Bacillus subtilis* spores stabilizes inner membrane proteins and increases spore resistance to wet heat and hydrogen peroxide. *Journal of applied microbiology*, 134(3), 1xad040.
- Koutchma, T., Bissonnette, S., & Popović, V. (2021). An update on research, development and implementation of UV and pulsed light technologies for nonthermal preservation of milk and dairy products.
- Kumar, M., Flint, S., Palmer, J., Chanapha, S., & Hall, C. (2021). Influence of incubation temperature and total dissolved solids on biofilm and spore formation by dairy isolates of *Geobacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(8), e02311-20.

- Landel, J. R., & Wilson, D. I. (2021). The fluid mechanics of cleaning and decontamination of surfaces. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 53(1), 147-171.
- Lechner, S., MAYR, R., Francis, K. P., PRÜß, B. M., KAPLAN, T., Wießner-Gunkel, E. L. K. E., ... & SCHERER, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 48(4), 1373-1382.
- Leguerinel, I., Couvert, O., & Mafart, P. (2000). Relationship between the apparent heatresistance of *Bacillus cereus* spores and the pH and NaCl concentration of the recovery medium. *International journal of foodmicrobiology*, 55(1-3), 223-227.
- Lelievre, C., Antonini, G., Faille, C., & Bénézech, T. (2002). Cleaning-in-Place: modelling of cleaning kinetics of pipes soiled by *Bacillus* spores assuming a process combining removal and deposition. *Food and Bioproducts Processing*, 80(4), 305-311.
- Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2017). Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22(6), 989.
- Li, F., Hunt, K., Van Hoorde, K., Butler, F., Jordan, K., & Tobin, J. T. (2019). Occurrence and identification of spore-forming bacteria in skim-milk powders. *International dairy journal*, 97, 176-184.
- Li, G., Tang, L., Zhang, X., & Dong, J. (2019). A review of factors affecting the efficiency of clean-in-place procedures in closed processing systems. *Energy*, 178, 57-71.
- Liang, L., Wang, P., Qu, T., Zhao, X., Ge, Y., & Chen, Y. (2022). Detection and quantification of *Bacillus cereus* and its spores in raw milk by qPCR, and distinguish *Bacillus cereus* from other bacteria of the genus *Bacillus*. *Food Quality and Safety*, 6, fyab035.
- Liu, J., Nam, Y., Choi, D., Choi, Y., Lee, S. E., Oh, H., ... & Hong, S. (2024). MXene/Hydrogel-based bioelectronic nose for the direct evaluation of food spoilage in both liquid and gas-phase environments. *Biosensors and Bioelectronics*, 256, 116260.
- Lott, T. T., Wiedmann, M., & Martin, N. H. (2023). Shelf-life storage temperature has a considerably larger effect than high-temperature, short-time pasteurization temperature on the growth of spore-forming bacteria in fluid milk. *Journal of dairy science*, 106(6), 3838-3855.
- Ma, L., Long, T., Yuan, S., Qi, P., Han, L., & Hao, J. (2023). A pH-indicating smart tag based on porous hydrogel as food freshness sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 647, 32-42.
- Magnusson, M., Christiansson, A., & Svensson, B. (2007). *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *Journal of dairy science*, 90(6), 2745-2754.

- Maillard, J. Y., & Centeleghe, I. (2023). How biofilm changes our understanding of cleaning and disinfection. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 12(1), 95.
- Malek, F., Boudjemaa, B. M., Aouar-Métri, A., & Kihal, M. (2013). Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. *Dairy Science & Technology*, 93(1), 73-82.
- Malek, F., Moussa-Boudjemâa, B., Khaouani-Yousfi, F., Kalai, A., & Kihel, M. (2012). Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: An approach to improve microbial quality of pasteurized milk. *Afr J Microbiol Res*, 6(17), 3836-3844.
- Martin, N. H., Evanowski, R. L., & Wiedmann, M. (2023). Invited review: Redefining raw milk quality—Evaluation of raw milk microbiological parameters to ensure high-quality processed dairy products. *Journal of Dairy Science*, 106(3), 1502-1517.
- Martinez, B. A., Stratton, J., & Bianchini, A. (2017). Isolation and genetic identification of spore-forming bacteria associated with concentrated-milk processing in Nebraska. *Journal of dairy science*, 100(2), 919-932.
- Masiello, S. N., Kent, D., Martin, N. H., Schukken, Y. H., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2017). Longitudinal assessment of dairy farm management practices associated with the presence of psychrotolerant Bacillales spores in bulk tank milk on 10 New York State dairy farms. *Journal of dairy science*, 100(11), 8783-8795.
- Mathot, A. G., Postollec, F., & Leguerinel, I. (2021). Bacterial spores in spices and dried herbs: The risks for processed food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 840-862.
- Mathys, A. (2018). Perspective of micro process engineering for thermal food treatment. *Frontiers in nutrition*, 5, 24.
- Mcauley, C. M., McMillan, K., Moore, S. C., Fegan, N., & Fox, E. M. (2014). Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *Journal of dairy science*, 97(12), 7402-7412.
- McGuiggan, J. T., McCleery, D. R., Hannan, A., & Gilmour, A. (2002). Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores. *International journal of dairy technology*, 55(2), 100-107.
- Meaney, C. A., Cartman, S. T., McClure, P. J., & Minton, N. P. (2016). The role of small acid-soluble proteins (SASPs) in protection of spores of *Clostridium botulinum* against nitrous acid. *International journal of food microbiology*, 216, 25-30.
- Miller, R. A., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J., & Kovac, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(11), 4744-4753.

- Moeller, R., Raguse, M., Reitz, G., Okayasu, R., Li, Z., Klein, S., ... & Nicholson, W. L. (2014). Resistance of *Bacillus subtilis* spore DNA to lethal ionizing radiation damage relies primarily on spore core components and DNA repair, with minor effects of oxygen radical detoxification. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), 104-109.
- MOERMAN¹, F., & HOLAH, J. (2024). Hygienic Design of. Prevention of the Biological Contamination of Food: Processing/Distribution and Consumer Usage, 143.
- Mokashi, S., Kanaan, J., Craft, D. L., Byrd, B., Zenick, B., Laue, M., ... & Setlow, P. (2020). Killing of bacterial spores by dodecylamine and its effects on spore inner membrane properties. *Journal of applied microbiology*, 129(6), 1511-1522.
- Murphy, S. I., Reichler, S. J., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2021). Machine learning and advanced statistical modeling can identify key quality management practices that affect postpasteurization contamination of fluid milk. *Journal of Food Protection*, 84(9), 1496-1511.
- Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F., & Capanoglu, E. (2020). Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. *Molecules*, 25(20), 4711.
- Nakamura, L. K., & Jackson, M. A. (1995). Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(1), 46-49.
- Nardi, G., Lineros-Rosa, M., Palumbo, F., Miranda, M. A., & Lhiaubet-Vallet, V. (2021). Spectroscopic characterization of dipicolinic acid and its photoproducts as thymine photosensitizers. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 245, 118898.
- Nayeri, Fasaie B., Tamai I. Ashrafi, and S. M. Joghataei. "First Isolation of *Bacillus licheniformis* from Bovine Mastitis in Iran." 1690-1697.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- Neokleous, I., Tarapata, J., & Papademas, P. (2022). Nonthermal turbulent flow ultraviolet-C (UV-C) radiation processing for cheese whey-brines purification. *International Journal of Dairy Technology*, 75(3), 710-716.
- Nerber, H. N., & Sorg, J. A. (2024). The small acid-soluble proteins of spore-forming organisms: similarities and differences in function. *Anaerobe*, 87, 102844.
- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A. M., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., ... & Salkinoja-Salonen, M. (2007). Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Veterinary microbiology*, 124(3-4), 329-339.

Nieto, G., Ros, G., & Castillo, J. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*, 5(3), 98.

Nieto, G., Ros, G., & Castillo, J. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*, 5(3), 98.

Nieto, Gema, Gaspar Ros, and Julián Castillo. "Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review." *Medicines* 5.3 (2018): 98.

Nilsson, D. P., Jonsmoen, U. L., Malyshev, D., Öberg, R., Wiklund, K., & Andersson, M. (2023). Physico-chemical characterization of single bacteria and spores using optical tweezers. *Research in Microbiology*, 174(6), 104060.

Norris, M. H., Bluhm, A. P., Metrailler, M. C., Jiranantasak, T., Kirpich, A., Hadfield, T., ... & Blackburn, J. K. (2023). Beyond the spore, the exosporium sugar anthrose impacts vegetative *Bacillus anthracis* gene regulation in cis and trans. *Scientific reports*, 13(1), 5060.

Nyokabi, S. N., De Boer, I. J., Luning, P. A., Korir, L., Lindahl, J., Bett, B., & Oosting, S. J. (2021). Milk quality along dairy farming systems and associated value chains in Kenya: An analysis of composition, contamination and adulteration. *Food Control*, 119, 107482.

Ohkubo, Y., Uchida, K., Motoshima, H., & Katano, N. (2019). Simple membrane filtration method for estimating numbers of *Paenibacillus* spp. spores in raw milk, using β -galactosidase activity as a selection criterion. *International Dairy Journal*, 96, 10-14.

Oliveira, R. B., Lopes, L. S., Baptista, R. C., Chinha, A. A., Portela, J. B., Nascimento, J. S., ... & Sant'Ana, A. S. (2018). Occurrence, populations, diversity, and growth potential of spore-forming bacteria in "requeijão cremoso". *LWT*, 89, 24-31.

Orchard, A., & van Vuuren, S. (2017). Commercial essential oils as potential antimicrobials to treat skin diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017(1), 4517971.

Orhan-Yanikan, Esin, et al. "Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains present in the meat industry." *Food Control* 101 (2019): 29-38.

Ostrov, I., Paz, T., & Shemesh, M. (2019). Robust biofilm-forming *Bacillus* isolates from the dairy environment demonstrate an enhanced resistance to cleaning-in-place procedures. *Foods*, 8(4), 134.

Owusu-Darko, R., Allam, M., Ismail, A., Ferreira, C. A., Oliveira, S. D. D., & Buys, E. M. (2020). Comparative genome analysis of *Bacillus sporothermodurans* with its closest phylogenetic neighbor, *Bacillus oleronius*, and *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* groups. *Microorganisms*, 8(8), 1185.

Pahalagedara, A. S., Gkogka, E., Ravn, L. W., & Hammershøj, M. (2023). The growth potential and thermal resistance of bacterial spores under conditions relevant for ambient acid dairy-based products. *Food Control*, 152, 109841.

- Palabiyik, I., Atik, D. S., Sivri, G. T., Uzun, S., Kahyaoglu, L. N., Koc, Y., ... & Boluk, E. (2022). Optimization of temperature for effective cleaning with a novel cleaning rig: Influence of soil and surface types. *Food and Bioproducts Processing*, 136, 36-46.
- Pant, K. J., Cotter, P. D., Wilkinson, M. G., & Sheehan, J. J. (2023). Towards sustainable Cleaning-in-Place (CIP) in dairy processing: Exploring enzyme-based approaches to cleaning in the Cheese industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(5), 3602-3619.
- Pelz, P., Noß, J., von Harbou, E., & Bart, H. J. (2024). Whey protein fouling on polymeric heat exchangers. *Heat Transfer*, 53(6), 2948-2964.
- Pérez-González, C., Salvo-Comino, C., Martin-Pedrosa, F., Dias, L., Rodriguez-Perez, M. A., Garcia-Cabazon, C., & Rodriguez-Mendez, M. L. (2021). Analysis of milk using a portable potentiometric electronic tongue based on five polymeric membrane sensors. *Frontiers in Chemistry*, 9, 706460.
- Petróczki, F. M., Béri, B., & Peles, F. (2020). The effect of season on the microbiological status of raw milk.
- Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H., Dague, E., & Rols, M. P. (2016). Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Scientific reports*, 6(1), 19778.
- Poghossian, A., Geissler, H., & Schöning, M. J. (2019). Rapid methods and sensors for milk quality monitoring and spoilage detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 140, 111272.
- Postollec, F., Mathot, A. G., Bernard, M., Divanac'h, M. L., Pavan, S., & Sohier, D. (2012). Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. *International journal of food microbiology*, 158(1), 1-8.
- Pradhan, B., Liedtke, J., Sleutel, M., Lindbäck, T., Zegeye, E. D., Llarena, A. K., ... & Remaut, H. (2021). Endospore Appendages: a novel pilus superfamily from the endospores of pathogenic Bacilli. *The EMBO Journal*, 40(17), EMBJ2020106887.
- Reginensi, S. M., González, M. J., Olivera, J. A., Sosa, M., Juliano, P., & Bermúdez, J. (2011). RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International Journal of Food Microbiology*, 148(1), 36-41.
- Reichler, S. J., Murphy, S. I., Erickson, A. W., Martin, N. H., Snyder, A. B., & Wiedmann, M. (2020). Interventions designed to control postpasteurization contamination in high-temperature, short-time-pasteurized fluid milk processing facilities: A case study on the effect of employee training, clean-in-place chemical modification, and preventive maintenance programs. *Journal of dairy science*, 103(8), 7569-7584.
- Reineke, K., & Mathys, A. (2020). Endospore inactivation by emerging technologies: a review of target structures and inactivation mechanisms. *Annual review of food science and technology*, 11(1), 255-274.

- Ribeiro, M. C. E., da Silva Fernandes, M., Kuaye, A. Y., & Gigante, M. L. (2019). Influence of different cleaning and sanitisation procedures on the removal of adhered *Bacillus cereus* spores. *International dairy journal*, 94, 22-28.
- Rush, C. E., Johnson, J., Burroughs, S., Riesgaard, B., Torres, A., Meunier-Goddik, L., & Waite-Cusic, J. (2022). Evaluating *Paenibacillus odorifer* for its potential to reduce shelf life in reworked high-temperature, short-time fluid milk products. *JDS communications*, 3(2), 91-96.
- Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., & He, G. (2016). A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China. *International journal of food microbiology*, 217, 200-208.
- Sakkas, H., Economou, V., Gousia, P., Bozidis, P., Sakkas, V. A., Petsios, S., ... & Papadopoulou, C. (2018). Antibacterial efficacy of commercially available essential oils tested against drug-resistant gram-positive pathogens. *Applied Sciences*, 8(11), 2201.
- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. D. M., Segura-Carretero, A., ... & Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy research*, 32(9), 1688-1706.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., Xhaferi, R., & Heyndrickx, M. (2014). Incidence, diversity and characteristics of spores of psychrotolerant spore formers in various REPFEDS produced in Belgium. *Food microbiology*, 44, 288-295.
- Santamarta, S., Aldavero, A. C., & Rojo, M. A. (2023). Essential oil of *Cymbopogon martini*, source of geraniol, as a potential antibacterial agent against *Bacillus subtilis*, a pathogen of the bakery industry. *F1000Research*, 10, 1027.
- Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1480-1494.
- Seale, R. B., Bremer, P. J., Flint, S. H., & McQuillan, A. J. (2010). Characterization of spore surfaces from a *Geobacillus* sp. isolate by pH dependence of surface charge and infrared spectra. *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1339-1348.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology*, 101(3), 514-525.
- Setlow, P., & Christie, G. (2021). What's new and notable in bacterial spore killing!. *World journal of microbiology and biotechnology*, 37(8), 144.
- Setlow, P., & Christie, G. (2023). New thoughts on an old topic: secrets of bacterial spore resistance slowly being revealed. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 87(2), e00080-22.

Sharma, K., & Pagedar Singh, A. (2018). Antibiofilm effect of DNase against single and mixed species biofilm. *Foods*, 7(3), 42.

Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. (2016). *Bacillus* spores in the food industry: A review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1139-1148.

Stenfors Arnesen, Lotte P., Annette Fagerlund, and Per Einar Granum. "From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins." *FEMS microbiology reviews* 32.4 (2008): 579-606.

Sudhaus, N., Nagengast, H., Pina-Pérez, M. C., Martínez, A., & Klein, G. (2014). Effectiveness of a peracetic acid-based disinfectant against spores of *Bacillus cereus* under different environmental conditions. *Food control*, 39, 1-7.

Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H., & Christiansson, A. (2004). Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International dairy journal*, 14(1), 17-27.

Svensson, B., Eneroth, Å., Brendehaug, J., & Christiansson, A. (1999). Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. *International dairy journal*, 9(12), 903-912.

Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016(1), 3012462.

Taylor, W., Camilleri, E., Craft, D. L., Korza, G., Granados, M. R., Peterson, J., ... & Setlow, P. (2020). DNA damage kills bacterial spores and cells exposed to 222-nanometer UV radiation. *Applied and environmental microbiology*, 86(8), e03039-19.

Te Giffel, M. T., Wagendorp, A., Herrewegh, A., & Driehuis, F. T. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 625-630.

Tian, J., Tu, Q., Li, M., Zhao, L., Zhu, Y., Lee, J. H., ... & Ma, Y. (2024). Development of fluorescent GO-AgNPs-Eu³⁺ nanoparticles based paper visual sensor for foodborne spores detection. *Food Chemistry: X*, 21, 101069.

TIMMERMAN, H. (2024). Cleaning Operations–State of the Art. *Prevention of the Biological Contamination of Food: Processing/Distribution and Consumer Usage*, 209.

Touch, V., & Deeth, H. C. (2009). *Microbiology of raw and market milks Milk processing and quality management*. United Kingdom.

Tuipulotu, D. E., Mathur, A., Ngo, C., & Man, S. M. (2021). *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host–pathogen interactions. *Trends in Microbiology*, 29(5), 458-471.

- Vacheyrou, M., Normand, A. C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., & Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International journal of food microbiology*, 146(3), 253-262.
- Valerio, F., De Bellis, P., Di Biase, M., Lonigro, S. L., Giussani, B., Visconti, A., ... & Sisto, A. (2012). Diversity of spore-forming bacteria and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* as a species frequently associated with the ropy spoilage of bread. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 278-285.
- Valková, V., Ďúranová, H., Galovičová, L., Vukovic, N. L., Vukic, M., & Kačániová, M. (2021). In Vitro antimicrobial activity of lavender, mint, and rosemary essential oils and the effect of their vapours on growth of *Penicillium* spp. in a bread model system. *Molecules*, 26(13), 3859.
- Van Zuijlen, A., Periago, P. M., Amézquita, A., Palop, A., Brul, S., & Fernández, P. S. (2010). Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores; putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilisation. *Food research international*, 43(7), 1895-1901.
- Wang, Han, et al. "Variations in volatile components and biological activities of essential oils from *Citrus aurantium* 'changshanhuoyou' at different growth and ripening stages." *Food Research International* 197 (2024): 115303.
- Wang, L., Zhang, C., Tang, H., & Cao, D. (2023). A novel chromophore reaction-based pyrrolopyrrole aza-BODIPY fluorescent probe for H₂S detection and its application in food spoilage. *Food Chemistry*, 427, 136591.
- Wang, S., Zhao, Y., Breslawec, A. P., Liang, T., Deng, Z., Kuperman, L. L., & Yu, Q. (2023). Strategy to combat biofilms: a focus on biofilm dispersal enzymes. *npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 63.
- Wang, T., Flint, S., & Palmer, J. (2021). Heterogeneous response of *Geobacillus stearothermophilus* biofilms to calcium. *International Dairy Journal*, 116, 104961.
- Wang, Y., Feng, Y., Xiao, Z., & Luo, Y. (2025). Machine learning supported single-stranded DNA sensor array for multiple foodborne pathogenic and spoilage bacteria identification in milk. *Food Chemistry*, 463, 141115.
- Wanniarachchi, P. C., Kumarasinghe, K. U., & Jayathilake, C. (2024). Recent advancements in chemosensors for the detection of food spoilage. *Food Chemistry*, 436, 137733.
- Weber, M., Liedtke, J., Plattes, S., & Lipski, A. (2019). Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and-independent methods. *PLoS One*, 14(9), e0222238.
- Wells-Bennik, M. H., Eijlander, R. T., Den Besten, H. M., Berendsen, E. M., Warda, A. K., Krawczyk, A. O., ... & Abee, T. (2016). Bacterial spores in food: survival, emergence, and outgrowth. *Annual review of food science and technology*, 7(1), 457-482.

- Wells-Bennik, M. H., Eijlander, R. T., Den Besten, H. M., Berendsen, E. M., Warda, A. K., Krawczyk, A. O., ... & Abee, T. (2016). Bacterial spores in food: survival, emergence, and outgrowth. *Annual review of food science and technology*, 7(1), 457-482.
- Weston, M., Kuchel, R. P., Ciftci, M., Boyer, C., & Chandrawati, R. (2020). A polydiacetylene-based colorimetric sensor as an active use-by date indicator for milk. *Journal of colloid and interface science*, 572, 31-38.
- Weston, M., Phan, M. A. T., Arcot, J., & Chandrawati, R. (2020). Anthocyanin-based sensors derived from food waste as an active use-by date indicator for milk. *Food Chemistry*, 326, 127017.
- Wilson, D. I., Christie, G., Fryer, P. J., Hall, I. M., Landel, J. R., & Whitehead, K. A. (2022). Lessons to learn from roadmapping in cleaning and decontamination. *Food and Bioprocess Processing*, 135, 156-164.
- Wu, X. Y., Walker, M., Vanselow, B., Chao, R. L., & Chin, J. (2007). Characterization of mesophilic bacilli in faeces of feedlot cattle. *Journal of applied microbiology*, 102(3), 872-879.
- Xu, Z., Wang, J., Xia, L., & Zhang, Y. (2021). A biofouling thermal resistance model with a growth term of surface biofilm on heat transfer surface. *International Journal of Thermal Sciences*, 161, 106699.
- Yakubu, H. G., Kovacs, Z., Toth, T., & Bazar, G. (2022). Trends in artificial aroma sensing by means of electronic nose technologies to advance dairy production—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 63(2), 234-248.
- Yalew, K., Pang, X., Huang, S., Zhang, S., Yang, X., Xie, N., ... & Li, X. (2024). Recent development in detection and control of psychrotrophic bacteria in dairy production: Ensuring milk quality. *Foods*, 13(18), 2908.
- Yeak, K. Y. C., Perko, M., Staring, G., Fernandez-Ciruelos, B. M., Wells, J. M., Abee, T., & Wells-Bennik, M. H. (2022). Lichenysin production by *Bacillus licheniformis* food isolates and toxicity to human cells. *Frontiers in microbiology*, 13, 831033.
- Yu, B., Kanaan, J., Shames, H., Wicander, J., Aryal, M., Li, Y., ... & Setlow, P. (2023). Identification and characterization of new proteins crucial for bacterial spore resistance and germination. *Frontiers in microbiology*, 14, 1161604.
- Zhou, Z., Lan, X., Zhu, L., Zhang, Y., Chen, K., Zhang, W., & Xu, W. (2023). Portable dual-aptamer microfluidic chip biosensor for *Bacillus cereus* based on aptamer tailoring and dumbbell-shaped probes. *Journal of Hazardous Materials*, 445, 130545.
- Zhu, Y., Tian, J., Liu, S., Li, M., Zhao, L., Liu, W., ... & Tu, Q. (2024). Rapid capture and quantification of food-borne spores based on the double-enhanced Fe₃O₄@ PEI@ Ag@ PEI core-shell structure SERS sensor. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 305, 123512.

Les annexes

Gélose nutritive

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

Bouillon BHI :

- Infusion de cœur de bœuf (à partir de 250g), 5 g/L.
- Infusion de cerveau de veau (à partir de 200g) , 12.5 g/L.
- Phosphate disodique (hydrogénophosphate de sodium) 2.5 g/L.
- Peptone, 10 g/L.
- Chlorure de sodium (Nacl) 5 g/L.
-

Gélose Mueller- Hinton :

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

Bouillon de Mueller-Hinton :

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

Eau physiologique :

- Chlorure de sodium 9 g/L
- Eau distillée 1000 ml