

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون

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

Département de Biologie

MÉMOIRE

Présenté par

Melle Benallal Khadidja Fatima Zohra

Melle Benazzouz Narimene

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER en Sciences biologiques

Option : Microbiologie et contrôle de qualité

Thème

Evaluation de la qualité microbiologique des équipements après application du système de nettoyage et désinfection dans une laiterie de la wilaya de Tlemcen

Soutenue le 14 /06/2023, devant le jury composé de :

Présidente	Pr. Bekhechi Chahrazed	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	Dr. Malek Fadila	M.C.A	Université de Tlemcen
Examineur	Pr. Ziane Mohamed	Professeur	Université d'Ain Temouchent

Année universitaire : 2022-2023

Remerciements

Cette recherche a été réalisée grâce au soutien et à l'encouragement de plusieurs personnes qui ont contribué chacune à leur façon, à l'atteinte de l'objectif que constitue la conception de ce mémoire. Nous tenons à leurs adresser un très grand merci.

Avant tout, nos remerciements, en premier lieu, à Allah qui nous a donné la foi, le courage durant ces longues années d'études et la patience de parvenir à finir ce modeste travail.

Nous voudrions exprimer par ce modeste travail notre gratitude, notre reconnaissance et nos grands remerciements à notre encadrant, Mme Malek Fadila, Maître de Conférences de classe A au département de biologie, à l'Université Abou Bekr-Belkaid-Tlemcen. Nous tenons à la remercier chaleureusement pour nous avoir proposé ce sujet de recherche et pour nous avoir fait bénéficier de ses compétences scientifiques tout au long de ce travail. Sa disponibilité constante, sa patience et son engagement indéfectible ont été d'une aide précieuse pour nous. Ses conseils éclairés, ses suggestions pertinentes et son encadrement attentif nous ont permis de repousser nos limites et de développer nos compétences académiques.

Nous tenons à remercier très vivement Mme Bekhechi Chahrazed Professeur au département de biologie de l'université de Tlemcen pour le grand honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury.

Nos chaleureux remerciements s'adressent également à Mr. Ziane Mohamed Professeur au département de biologie centre universitaire de wilaya d'Ain Temouchent d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Nous tenons à témoigner nos sincères remerciements et gratitude à tous les ingénieurs de laboratoire du pôle de biologie moléculaire, microbiologie et biochimie faculté SNV-STU qui nous ont facilité le travail au laboratoire et nous ont aidé pour la réalisation de ce modeste travail spécialement Mr Loukil Amine, Mr. Yazid El Amine et Mr. Ferouani Miloud.

Enfin nous adressons nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste projet de fin d'études

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te protège, à toi mon **père**.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences, et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, mon adorable **mère**.

A mon-grand père et ma grand-mère que dieu vous garde.

À mes chers frères **Samad** et **Zaki**. Je tiens à vous dédier ces quelques mots empreints d'affection et de reconnaissance. Vous êtes bien plus que des frères pour moi, vous êtes mes compagnons de vie, mes soutiens indéfectibles et mes meilleurs amis.

A leurs femmes **Imen** et **Cherifa**. Qui ont choisi de partager leur vie avec mes frères, vous êtes de véritables bijoux qui illuminent notre famille. Merci d'apporter votre amour et votre douceur à nos vies.

À mes chères sœurs, **Asma** et **Meriem**, qui ont été mes précieuses conseillères, mes sources inépuisables d'encouragement et mon soutien indéfectible tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leur accorde chance et bonheur, car elles méritent le meilleur pour leur bienveillance et leur amour infini. Et à leurs maris **Lotfi** et **Diden**.

A mes neveux **Iyed Younes Walid**, ma princesse **Tajou** et à mon chouchou **Yazen**.

A mes oncles, mes tantes, mes cousines, mes cousins chacun par son nom.

A tout la famille **Benallal** et **Belarbi**

A mes amies **Wafaa**, **Nabahet**, **Marwa**.

A mes professeurs de toutes les années de mes études

A mon binôme **Narimene** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de notre parcours universitaire.

Téma

Dédicace

À la femme que j'aspire à devenir, ma confidente, et ma meilleure amie. Tu as été ma source d'inspiration et ma force tout au long de mon parcours. Ton amour, ton soutien et ta tendresse ont été des piliers indispensables à ma réussite. Que Dieu te protège et que ton magnifique sourire illumine ma vie pour toujours. Je t'aime infiniment ma merveilleuse mère **Fatiha**.

En tant que fille, tu es mon héros, mon guide. Je suis profondément reconnaissante pour tous les sacrifices que tu as faits pour moi et pour ton soutien inébranlable. Tu es mon modèle de force, de gentillesse et de détermination. Je t'aime de tout mon cœur mon père **Youcef**.

A mes chers frères **Ghouti** et **Moussa** Vous êtes mes complices de vie, mes alliés dans les défis, mes sources de bonheur et des piliers solides dans ma vie, je suis profondément reconnaissant d'avoir grandi à vos côtés. Je suis honoré d'appeler chacun de vous mon frère. Merci d'être dans ma vie. Que notre fraternité continue de grandir et de s'épanouir à travers les années à venir.

A **Yousra**, tu es une précieuse addition à notre famille et votre amour et votre soutien nous comblent de bonheur.

A ma petite princesse, mon trésor précieux **Ayla meriem**.

A ma sœur **Djihane**

A mon binôme **Fatima** complice indéfectible de mon mémoire. Malgré les défis, le stress et le travail intense, nous avons surmonté chaque obstacle ensemble et atteint le succès. Les précieux souvenirs que nous avons créés resteront à jamais gravés dans ma mémoire.

A tout la famille **Benazzouz** et **Dahmane**.

Narimene

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer la qualité microbiologique des équipements après application du système de nettoyage et désinfection dans une laiterie de la wilaya de Tlemcen.

Des échantillons sont prélevés par écouvillonnage à partir de la surface des équipements dans différents sites de l'atelier de production ainsi que de l'air ambiant dans la laiterie analysée. Le dénombrement et l'isolement des différentes flores de contamination sont réalisés sur les milieux appropriés (TSA, PDA, Chapman, MacConkey). La charge microbienne des surfaces varie en fonction des équipements. Les germes totaux, les levures et les moisissures sont indénombrables au niveau du tank de stockage du lait et du mélangeur du yaourt. Le nombre d'entérobactéries et de staphylocoques varie de 10 à 250 et de 40 à 90 UFC/cm² respectivement. L'air ambiant est également une source de contamination par les germes totaux et les mycètes. Ces derniers sont caractérisés par la grande diversité des champignons filamenteux et la présence des levures, tel que montré par l'identification morphologique (caractères culturels et microscopiques, après coloration au bleu coton).

L'identification des isolats bactériens, réalisée par galeries API a montré la présence d'*Escherichia coli*, *Rahnella aquatilis*, *Pantoea spp*, *Laclercia boxylata* (galerie API 20 E). La galerie API Staph a permis l'identification aux espèces suivantes du genre *Staphylococcus* : *Staphylococcus xylossus*, *S.epidermis*, et *S.aureus*. La présence d'*E. Coli*, *S.aureus* et *Rahnella aquatilis* constitue un risque sanitaire. La présence des bactéries sporulées du genre *Bacillus* a également été notée dans les échantillons de l'air ambiant.

Le potentiel de formation de biofilm des souches isolées a été déterminé par la technique au cristal violet sur des surfaces en verre et en polystyrène. Les résultats obtenus montrent que les souches testées sont caractérisées par leur aptitude à la formation rapide du biofilm et à sa dispersion, *in-vitro*. L'organisation en biofilm, *in-situ* entrave l'efficacité des procédures de nettoyage/ désinfection, et est à l'origine de la persistance des contaminations sur les équipements laitiers. La dispersion est impliquée dans les problèmes de contamination croisée et l'altération de la qualité du produit fini.

Mots clé : Contamination bactérienne, Contamination fongique, Equipements laitiers, Biofilm, Nettoyage en place

Abstract

The objective of this study is to assess the microbiological quality of equipment after application of the cleaning and disinfection system in a dairy in the wilaya of Tlemcen.

Samples are taken by swabbing from the surface of the equipment in different sites of the production workshop as well as from the ambient air in the analyzed dairy. The enumeration and isolation of the different flora of contamination are carried out on the appropriate media (TSA, PDA, Chapman, Macconkey). The microbial load on surfaces varies depending on the equipment. Total germs, yeasts and molds are countless in the milk storage tank and yogurt mixer. The number of enterobacteria and staphylococci ranges from 10 to 250 and from 40 to 90 CFU/cm² respectively. The ambient air is the main source of contamination by fungi, characterized by the great diversity of filamentous fungi and the presence of yeasts, as shown by the morphological identification (cultural and microscopic characters, after staining with cotton blue)

The identification of bacterial isolates, carried out by API galleries showed the presence of *Escherichia coli*, *Rahnella aquatilis*, *Pantoea spp*, *Laclercia boxylata* (API gallery 20 E). The API Staph gallery allowed the identification of the following species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus xylossus*, *S.epidermis*, and, *S.aureus*. The presence of *E.coli*, *S.aureus* and *Rahnella aquatilis* constitutes a sanitary risk. The presence of spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* was also noted in the ambient air samples.

The biofilm formation potential of the isolated strains was determined by the crystal violet technique on glass and polystyrene surfaces. The results obtained show that the tested strains are characterized by their ability to rapidly form biofilm, *in-vitro*. The organization in biofilm, *in-situ*, hinders the efficiency of the cleaning/disinfection procedures, and is at the origin of the persistence of the contaminations on the dairy equipments.

Key words: Bacterial contamination, Fungal contamination, Dairy equipment, Biofilm, Cleaning in place

ملخص

. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الجودة الميكروبيولوجية للمعدات بعد تطبيق نظام التنظيف والتعقيم في مصنع ألبان في ولاية تلمسان.

تم أخذ عينات عن طريق مسح سطح المعدات في مواقع مختلفة في ورشة الإنتاج، بالإضافة إلى الهواء المحيط في مصنع الألبان التي يتم تحليلها. يتم إجراء عمليات التعداد والعزل للفطريات الملوثة المختلفة في الوسط المناسب (PDA، TSA)، (Macconkey، Chapman). يختلف الحمل الميكروبي، الخمائر والعفن على الأسطح بناءً على الأجهزة. الجراثيم الكلية لا تُعدّ في خزان تخزين الحليب ومخفق الزبادي.. يتراوح عدد *staphylocoques* و *entérobactéries* من 10 إلى 250 ومن 40 إلى CFU/90 سم مربع على التوالي. الهواء المحيط هو المصدر الرئيسي للتلوث بالفطريات، والتي تتميز بتنوع كبير في الفطريات الأليافية ووجود أنواع خمائر، كما يظهر ذلك من خلال التعرف المورفولوجي (السمات الثقافية والمجهرية، بعد تلوين باللون الأزرق القطني).

أظهر تحديد العزلات البكتيرية باستخدام معرفة الجمعيات البكتيرية API وأظهرت وجود *Escherichia coli* و *Rahnella aquatilis* و *Pantoea spp* و *Laclercia boxylata* (معرف API 20 E).

أتاحت معرفة API Staph تحديد الأنواع التالية من جنس *Staphylococcus xylosus*: *Staphylococcus* و *S.aureus* و *S.epidermidis*. وجود *Rahnella aquatilis* و *E.coli* و *S.aureus* يشكل خطرًا صحيًا. كما لوحظت البكتيريا المكونة للأبواغ من نوع *Bacillus* في عينات الهواء المحيط.

تم تحديد قدرة السلالات المعزولة على تكوين البي وفيلم باستخدام تقنية الكريستال البنفسجي على سطح الزجاج والبولسترين. تُظهر النتائج المتحصل عليها أن السلالات المختبرة تتميز بقدرتها على تكوين البيوفيلم بسرعة، في الظروف الاختبارية

(*in-vitro*). يعيق تنظيم البيوفيلم في الموقع (*in-situ*) فعالية إجراءات التنظيف والتعقيم، ويكون هو سبب استمرار التلوث على معدات الألبان.

الكلمات المفتاحية: التلوث البكتيري، التلوث الفطري، معدات الألبان، الأغشية الحيوية، التنظيف في المكان

Liste des abréviations

AI : Auto-inducteur

AW : Activité water

CIP : Cleaning in place

DO : densité optique

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

EPS : Substance polymérique extracellulaire

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

HACCP : Hazard Analysis – Critical Control Point

ISO : Organisation internationale de normalisation

MEC : Matrice extracellulaire

NIH : Instituts nationaux de la santé

NEP : nettoyage en place

N&D : Nettoyage et désinfection

PDA : Gélose déxtrosée à la pomme de terre

PNAG : Polysaccharide poly-N-Acetylglucosamine

QS : Quorum sensing

TACT : Température, Action mécanique, concentration, temps

TSA : Gélose trypticase soja ou gélose tryptone soja

UFC : Unité formant colonie

Liste des figures

Figure 01 : Phénomènes microbiens pouvant survenir lors d'une étape de fabrication (Bourgeois et al., 1996)	5
Figure 02 : Les étapes du développement du biofilm (Sauer et al., 2022)	13
Figure 03 : Images de microscopie électronique à balayage (MEB) des biofilms de <i>Pseudomonas fluorescens</i> de 3 jours formés sur de l'acier inoxydable (Carrascosa, 2014)	15
Figure 04 : Spore de <i>B. cereus</i> montrant les structures cellulaires impliquées dans l'adhésion aux surfaces (Ankolekar et Labbé, 2010)	16
Figure 5 : Des biofilms de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
Figure 06 : Cercle de sinner (Müller et Gassier, 2021).	23
Figure 07 : Une représentation schématique simplifiée du système CIP conventionnel à 5 étapes et d'une stratégie d'un CIP amélioré à 3 étapes (Malek, 2022).	25
Figure 08 : Bonne pratique alimentaire et HACCP (Vignola, 2002).	27
Figure 09 : Photos montrant quelques sites des prélèvements	30
Figure 10 : Adhésion et formation de biofilm sur les lames de microscopie en verre	35
Figure 11 : Aspects des colonies bactériennes des échantillons des équipements sur milieu TSA	39
Figure 12 : Aspects des colonies bactériennes de l'air ambiant (Conditionneuse, point d'atelier, cuve de fermentation, atelier de mélange) sur milieu TSA.	40
Figure 13 : Aspects des colonies bactériennes sur milieu Chapman. Colonies mannitol positives (images à gauche et au centre) et colonies mannitol négatives (images à droite)	41
Figure 14 : Aspect morphologique des colonies sur milieu Mac-conkey	41
Figure 15 : Aspects morphologiques des colonies isolées des équipements (couteau, ligne de mélangeur, ligne de conditionneuse, tank de stockage ; respectivement) sur milieu PDA.	42
Figure 16 : Aspects morphologiques des colonies isolées de l'air ambiant (conditionneuse, point d'atelier, cuve de fermentation, atelier de mélange) sur milieu PDA.	43
Figure 17 : Observation microscopique des cultures bactériennes après coloration de Gram (G x100). Bacille Gram négatifs, Bacille Gram positifs, Cocci Gram positifs (de gauche à droite).	44
Figure 18 : Observation microscopique des spores après coloration de Gram	44
Figure 19 : Caractéristiques morphologiques des champignons isolés des équipements	45
Figure 20 : Résultats des tests des enzymes respiratoires. A droite, catalase positive, à gauche oxydase négative	47
Figure 21 : Galerie API staph après 24 heures d'incubation	47
Figure 22 : galerie API20E après 24 heures d'incubation	49
Figure 23 : Biofilms formés dans les microplaques en polystyrène et colorés au cristal violet	50
Figure 24 : Caractérisation microscopique des biofilms formés sur les lames en verre.	51
Figure 25 : Observation microscopique de phase de dispersion de biofilm	52

Liste des tableaux

Tableau 01 : Type de désinfectants pouvant être utilisés en industrie agroalimentaire (Zoz, 2016)	27
Tableau 02: Nombre de bactéries isolées à partir des équipements du fromage Mozzarella	37
Tableau 03: Nombre de bactéries isolées à partir de la ligne de production du yaourt.	38
Tableau 04: Nombre de bactéries isolées à partir de l'air ambiant.	39
Tableau 05: Caractéristiques morphologiques des champignons isolés des équipements et de l'air ambiant	46
Tableau 06: Détermination du biotype par galerie Staph	47
Tableau 07 : Détermination du biotype par galerie 20E	49

Table des matières

Résumé

Liste des abréviations

Listes des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Les flores de contamination dans les industries agroalimentaires

- | | |
|---|---|
| 1. Les différents types de contamination | 4 |
| 2. Les différents types de contamination | 5 |
| 2.1. Contamination initiale | 5 |
| 2.2. Contamination croisée | 6 |
| 2.3. Contamination particulière | 6 |
| 3. Les pathogènes alimentaires bactériens | 6 |
| 3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 6 |
| 3.2. <i>Entérobactéries</i> | 7 |
| 3.2.1. <i>Salmonella</i> | 7 |
| 3.2.2. <i>Escherichia coli</i> | 7 |
| 3.3. Les bactéries sporulées | 7 |
| 3.3.1. <i>Clostridium</i> | 7 |
| 3.3.2. <i>Bacillus cereus</i> | 7 |
| 4. Levure moisissure | 8 |

Chapitre 02 : Le problème du Biofilm en industrie laitière

- | | |
|--------------------------------------|----|
| 1. Définition du biofilm | 11 |
| 2. Composition | 11 |
| 3. Processus de formation du biofilm | 12 |

4. Le biofilm dans les industries agroalimentaires	14
5. Exemples des biofilms dans les industries agroalimentaires	15
5.1. Biofilm de <i>B.cereus</i>	16
5.2. Biofilm des levures	16
6. Résistance des biofilms et moyens de lutte	17
6.1. Résistance des biofilms	17
6.2. Les moyens de lutte	18
6.2.1. Les stratégies à empêcher la formation de biofilms consiste à	18
6.2.2. Traitement du biofilm formé	19
6.2.3. Action sur le quorum sensing (QS)	19
Chapitre 03 :L'hygiène des surfaces agro-industrielles	20
1. Le nettoyage	21
2. Les différents types de nettoyage	22
3. Principes de nettoyage	23
4. Exemple de nettoyage automatique : le système CIP	24
5. La désinfection	25
6. Approche préventive pour l'amélioration de l'hygiène industrielle : le système HACCP	26
Matériel Et Méthodes	28
1. Prélèvement	29
1.1. Echantillonnage des surfaces	29
1.2. Echantillonnage de l'air ambiant	29
2. Transport des échantillons	30
3. Traitement des échantillons	30
3.1. Préparation des dilutions décimales	30
3.2. Ensemencement	30
4. Dénombrement	31
5. Identification morphologique	31
5.1. Aspect macroscopique	31
5.2. Aspect microscopique	31

6. Identification biochimique des bactéries	32
7. Identification bactérienne par galerie API	32
8. Conservation des souches	33
9. Etude du potentiel de formation de biofilm	33
9.1. Formation des biofilms dans les microplaques de titration	33
9.2. Formation du biofilm dans les tubes en verres	34
9.3. Caractérisation microscopique des biofilms	35
Résultats et Discussions	36
1. Résultat du dénombrement et isolement des souches	37
2. Résultat de l'identification des isolats bactériens et fongiques	39
2.1. Caractères cultureux	39
2.2. Caractères cultureux des isolats fongiques	42
2.3. Caractères microscopiques	43
3. Caractères biochimiques des isolats bactériens	46
3.1. Les enzymes respiratoires	46
3.2. Détermination des biotypes	47
4. Résultats de la caractérisation des biofilms bactériens	49
4.1. Caractérisation des biofilms des microplaques de titration en polystyrène	49
4.2. Caractérisation des biofilms formés dans les tubes en verre	50
4.3. Caractérisation microscopique de la formation de biofilm sur les lames en verres	51
4.3.1. Adhésion des cellules bactériennes	51
4.3.2. Dispersion des biofilms	51
Conclusion	53
Références bibliographiques	56
Annexes	

Introduction

Chaque année la contamination microbienne coûte à l'industrie alimentaire des fortunes, liées à d'importantes pertes de produits ne répondant pas aux critères de sécurité : produits dégradés contenant un nombre inacceptable de contaminants que ce soit en termes de qualité organoleptique ou de qualité hygiénique (Merzougui et al., 2013).

La qualité microbiologique des équipements dans une laiterie est une préoccupation majeure pour l'industrie agro-alimentaire, car les produits laitiers sont sensibles à la contamination microbiologique. Les équipements tels que les réservoirs de stockage, les tuyaux, les conduites et les vannes peuvent servir de vecteurs pour les bactéries, les levures, les moisissures et autres micro-organismes, qui peuvent persister sur ces surfaces grâce à leur pouvoir d'adhésion et de production de biofilm. En effet, de nombreuses espèces bactériennes ont la capacité de former des biofilms, face à des agressions de l'environnement, aux antibiotiques et aux désinfectants.

Dans les entreprises de production laitière, les biofilms peuvent se former facilement en raison de la présence de résidus de lait et de la capacité spécifique des microorganismes à coloniser presque tous les matériaux, en particulier les aciers inoxydables largement utilisés en industries laitière. Les bactéries organisées en biofilms forment une matrice extracellulaire protectrice qui les rend difficiles à éliminer, et peuvent persister sur les équipements et de ce fait contaminer le lait ou les produits laitiers (Dallagi et al., 2023).

Selon les Instituts nationaux de la santé (NIH), environ 80% des infections microbiennes sont associées à la formation de biofilms. Ainsi, l'hygiène des surfaces de contact alimentaire est importante pour garantir la sécurité des aliments. En effet les erreurs les plus courantes entraînant une contamination croisée sont un nettoyage insuffisant des équipements de traitement ou des ustensiles (67%) et un stockage dans un environnement contaminé (39%) (Bennet et al., 2013).

Pour prévenir la formation de biofilms et minimiser les risques de contamination microbiologique, les équipements dans une laiterie doivent être nettoyés et désinfectés régulièrement et de manière rigoureuse. Des protocoles de nettoyage et de désinfection appropriés doivent être mis en place pour éliminer les contaminants microbiologiques. Des stratégies antibiofilm doivent être adoptées pour lutter contre la persistance des contaminations microbiennes sur les surfaces industrielles en contact avec les aliments (Carrascosa, 2014).

Le contrôle microbiologique des équipements pour vérifier l'efficacité du système de nettoyage réalisé dans une laiterie est crucial pour maîtriser les contaminations microbiennes et garantir la sécurité alimentaire et la qualité des produits laitiers. C'est l'objectif de cette étude qui consiste à évaluer la qualité microbiologique des équipements après application de système de nettoyage et désinfection dans une laiterie de la région de la wilaya de Tlemcen. L'approche méthodologique comprend :

- ✚ Un échantillonnage de la surface des équipements dans différents sites de l'atelier de production laitière ainsi que de l'air ambiant.
- ✚ Un dénombrement et isolement de la flore de contamination sur des milieux de culture appropriés.
- ✚ Une identification phénotypique de la flore fongique (caractères morphologiques, culturels et microscopiques)
- ✚ Une identification phénotypique de la flore bactérienne (caractères culturels, morphologiques et biochimiques par systèmes API)
- ✚ Une caractérisation du potentiel des bactéries isolées à former le biofilm *in-vitro*, permettant de déterminer leur caractère transitoire ou persistant sur les équipements laitiers

Chapitre 01 :
Les flores de contamination
dans les industries
agroalimentaires

La contamination est l'introduction ou présence d'un contaminant dans un aliment ou dans un environnement alimentaire (OMS, 2005).

En Europe, l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) et la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) définissent les contaminants comme des substances présentes dans les aliments qui n'ont pas été ajoutées intentionnellement, mais qui se trouvent néanmoins dans l'aliment en tant que résidus de sa production, de sa fabrication, de sa transformation ou de son stockage, ou à la suite d'une contamination environnementale. (Verdier, 2020).

Les microorganismes se trouvent naturellement dans l'environnement de l'homme, tels que l'eau, le sol et diverses surfaces. Par conséquent, il existe un risque permanent de contamination des produits alimentaires, qu'ils soient transformés ou non, tout au long de la chaîne alimentaire. Les conséquences des contaminations peuvent varier en fonction des germes impliqués, qui dépendent des caractéristiques physico-chimiques du produit. Ces conséquences vont de la simple altération du produit, entraînant la perte de ses qualités organoleptiques ou de sa valeur commerciale, à des toxi-infections graves. (Bourgeois et al. 1996).

1. Les sources de contamination des aliments :

Les microorganismes présents dans les aliments peuvent avoir différentes origines : ils peuvent exister préalablement dans la matière première avant toute manipulation ou transformation, être accidentellement introduits lors des manipulations ultérieures de l'aliment ou ajoutés intentionnellement. La règle des 5M énumère cinq sources potentielles de contamination (Joffin et al., 2010).

- ✓ Matière première
- ✓ Matériel
- ✓ Main-d'œuvre
- ✓ Milieu
- ✓ Méthode

La source de contamination des bactéries pathogènes varie en fonction de la nature et du processus de production et de transformation du produit. Dans le cas du lait et des produits laitiers, la contamination par des germes pathogènes peut être endogène, résultant d'une excrétion mammaire de l'animal malade, ou exogène, résultant d'un contact direct avec des

troupeaux infectés ou de l'apport des éléments extérieurs tels que l'eau ou le personnel. (Brisabois et al., 1997).

Les différentes étapes de traitement et de transformation du lait peuvent limiter la croissance des éventuels germes présents ou, au contraire, favoriser leur développement (Brisabois et al., 1997). La figure 1 représente de manière schématique les transferts de microorganismes susceptibles de se produire pendant les différentes étapes de production et de distribution d'un produit alimentaire.

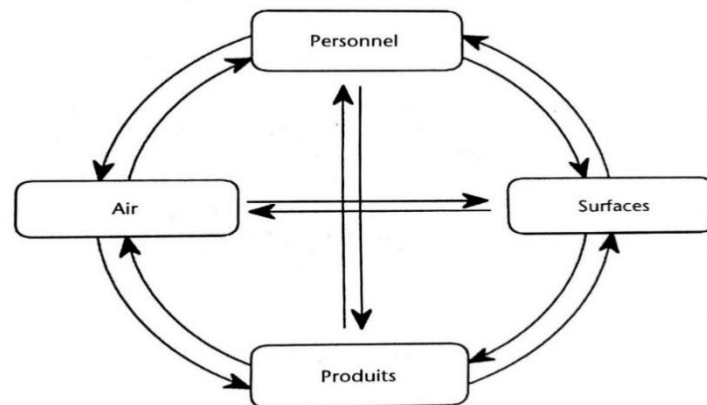


Figure 01 : Phénomènes microbiens pouvant survenir lors d'une étape de fabrication
(Bourgeois et al., 1996)

2. Les différents types de contamination

La contamination des produits alimentaires peut se produire de différentes manières.

2.1. Contamination initiale

Les matières premières alimentaires sont souvent contaminées par des germes pathogènes présents dans l'eau ou le sol, tels que *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* et *Listeria*. Au cours de la transformation des matières premières, d'autres micro-organismes peuvent contaminer les produits, même à faible concentration, à partir de l'environnement de l'usine tel que l'air, les surfaces, les équipements et le personnel.

Toutefois, les processus technologiques peuvent influencer la sélection de la flore microbienne présente dans les aliments. Par exemple, la flore psychrotrophe comme *Listeria*, *Escherichia*, *Yersinia* et *Aeromonas* est favorisée dans les aliments réfrigérés, tandis que les germes sporulés tels que *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus* se développent dans les aliments ayant subi un traitement thermique (Zuliani, et Garry, 2004).

2.2. Contamination croisée

La contamination croisée correspond à la re-contamination du produit fini. Il s'agit, notamment, du transfert des microorganismes à partir du biofilm formé sur les équipements de production (Malek, 2019). La contamination microbienne peut être particulièrement dangereuse car elle implique l'introduction de bactéries ou de moisissures qui pourraient causer des maladies (Richard, 2014).

Une autre source de contamination microbienne est lorsque des employés manipulent plusieurs ingrédients sans utiliser d'outils d'échantillonnage propres. En effet une contamination microbienne peut se produire pendant la production ou l'emballage si un employé manipule le produit sans porter un équipement de protection ou sans se laver les mains. La présence dans le produits fini de pathogènes humains tels que *Staphylococcus aureus*, ou *Pseudomonas aeruginosa*, peut résulter de cette source de contamination (Richard, 2014).

2.3. Contamination particulière

Une autre façon dont les produits alimentaires peuvent être contaminés est la contamination particulière, qui se produit lorsque des particules telles que les poussières se retrouvent dans les ingrédients et les produits alimentaires/boissons pendant la production ou l'emballage. Cela peut être dû à une mauvaise conception des installations ou à un manque de filtration de l'air (Richard, 2014).

Ces particules peuvent également contenir de nombreux microorganismes, sachant que la contamination aéroportée est largement responsable de la dissémination des germes sporulants notamment les champignons filamenteux.

3. Les pathogènes alimentaires bactériens

3.1. *Staphylococcus aureus* :

Les bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* sont des cocci à Gram positif, regroupés en amas, immobiles et anaérobies facultatifs, et possédant une catalase. La présence de ces bactéries dans les aliments peut poser un risque pour la santé humaine, car certaines souches de l'espèce *S. aureus* produisent des entérotoxines qui peuvent causer une toxi-infection alimentaire à staphylocoques.

S. aureus est habituellement un parasite inoffensif qui fait partie de la flore de la peau et des muqueuses chez l'homme et l'animal. Cependant, il peut provoquer des infections telles que

des abcès cutanés et des mammites. La contamination du lait peut se produire via des porteurs sains ou infectés, ou par l'environnement (Brisabois et al., 1997).

3.2. Entérobactéries :

Les entérobactéries sont très répandues dans la nature et contaminent facilement les aliments.

3.2.1. *Salmonella* :

Salmonella est une des membres de la famille des *Enterobacteriaceae* et ont les caractéristiques biochimiques de cette famille. Elles sont des bactéries à gram négatif, aérobie-anaérobie facultatif et ont des flagelles péritriches qui les rendent mobiles. Les Salmonelles peuvent se multiplier à des températures allant de 5°C à 45°C, avec un optimum à 35°C-37°C, et dans des aliments ayant un pH compris entre 4,5 et 9, avec un optimum entre 6,4 et 7,5. La plupart des souches de *Salmonella* peuvent se développer dans des aliments ayant une activité de l'eau (A_w) comprise entre 0,945 et 0,999, ce qui les rend très présentes dans les aliments à risque (Brisabois et al., 1997).

3.2.2. *Escherichia coli* :

Escherichia coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et comprend des bacilles mobiles ou immobiles à Gram négatif. Ils sont capables de se reproduire dans une plage de températures allant de 4°C à 46°C, avec une température optimale de 37°C, et dans des conditions de pH variant de 4,6 à 9,5. En ce qui concerne leur élimination, une pasteurisation à 72°C pendant 15 secondes suffit pour éradiquer *E. coli* (Brisabois et al., 1997).

3.3. Les bactéries sporulées :

3.3.1. *Clostridium* :

Les *Clostridium* sont des bactéries anaérobies strictes de forme bacillaire, Gram positif, souvent de grande taille et mobiles. Elles possèdent la capacité de former des spores, qui sont des structures de résistance qui se développent dans des conditions environnementales défavorables (Guiraud et Rosec, 2004).

3.3.2. *Bacillus cereus* :

B.cereus est une bactérie sporulée à Gram positif, ayant une préférence pour l'aérobiose mais pouvant également se développer en conditions anaérobies facultatives (Brisabois et al., 1997).

Cette bactérie est connue pour sa capacité à proliférer rapidement et à former des biofilms, ce qui en fait un micro-organisme redoutable pour les industries agroalimentaires (Merzougui, 2013).

B. cereus, peut subsister dans des milieux défavorables, tels que les environnements carencés en nutriments ou en oxygène, ainsi que dans des environnements secs, sous forme de spore pendant des périodes prolongées. Les spores ont la capacité de se propager facilement et de résister à des conditions extrêmes, notamment les températures élevées et basses, la dessiccation, les agents désinfectants, l'ionisation, les radiations et la lumière ultraviolette (vidic, 2020).

D'autres bactéries pathogènes peuvent être rencontrées dans le lait et les produits laitiers, parmi lesquels *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus agalactia*.

4. Levure et moisissure

Les moisissures et les levures peuvent être utiles, nuisibles ou pathogènes. Les moisissures, des champignons microscopiques filamenteux, ont une préférence pour les environnements aérobies et ont une capacité à se développer dans des conditions acides, avec un pH optimal compris entre 3 et 7. Elles se développent généralement à des températures comprises entre 20 et 30°C, bien que certaines espèces soient capables de se développer à des températures basses (<15°C), voire même inférieures à 0°C (Guirad et Rosec, 2004). On distingue également *Penicillium roquefortii*, *Rhizopus stolonifera*, ainsi que d'autres moisissures produisant des mycotoxines *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium divers* (Camille, 2007).

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires, qui préfèrent également les environnements aérobies et ont une préférence pour les pH acides et neutres, avec une plage de croissance optimale comprise entre 3 et 7,5. Elles se multiplient généralement à des températures proches de 25-28°C. (Guirad et Rosec, 2004). On distingue également *Saccharomyces bayanus*, *Torulopsis inconspicua*, *Rhodotorula*, *Candida utilis* (Camille, 2007).

Les produits laitiers peuvent être contaminés par des levures et des moisissures provenant principalement de l'air et d'autres sources environnementales présentes dans les usines de transformation et autres lieux similaires. Si l'humidité intérieure est élevée pendant une période prolongée, certains champignons peuvent se développer et former des spores, ce qui peut aggraver la contamination de l'environnement intérieur (Buehler, 2017).

Plusieurs espèces de moisissure peuvent envahir les fromages telles que : *Mucor* (*M.racemosus*, *M.fuscus*, *M.mucedo*), *Rhizopus stolonifera*, *Penicillium cyclopium*, les *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria alternata*, *Trichotecium roseum* (Botton et al., 1990).

Les levures les plus répandues isolées des produits laitiers sont *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*), *Yarrowia lipolytica*, *Candida famata*, *Candida diffluens*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* et *Saccharomyces cerevisiae* (Mayoral et al., 2005).

Chapitre 02 :
Le problème du biofilm en
industrie laitière

1. Définition du biofilm :

Les micro-organismes peuvent adhérer aux surfaces, qu'elles soient biotiques ou abiotiques, et se reproduire. Si ces cellules ne sont pas éliminées et que les conditions sont favorables, elles peuvent former un biofilm (Overney, 2016).

Un biofilm est un ensemble de microorganismes, soit de la même espèce, soit d'espèce différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il constitue un ensemble de cellules isolées et de microcolonies de cellules filles, associées entre elles et/ou aux surfaces. Cet ensemble est contenu dans une matrice constituée d'exopolysaccharides bactériens auto produites, de matières organiques et non organique, ainsi que des macromolécules piégées du milieu environnant (Branger et al., 2007).

Il est généralement admis que les biofilms représentent la forme de croissance microbienne la plus répandue et la plus naturelle, et qu'ils offrent des avantages écologiques pour les cellules qui s'y attachent. Ils facilitent les interactions inter- et intra-espèces, offrent une protection mutuelle contre les agents antimicrobiens et le stress environnemental, et créent des conditions environnementales distinctes de celles prévalentes, qui peuvent inclure une variété de sources nutritionnelles (Bremer et al., 2018).

2. Composition :

Le biofilm est constitué d'une matrice qui englobe les microorganismes

- ✚ Les microorganismes : Les biofilms sont rarement composés d'un seul type d'organisme, sauf dans des conditions environnementales particulières. La plupart des biofilms naturels abritent une grande variété de microorganismes, tels que des bactéries, des protozoaires, des algues et des mycètes, chacun ayant des fonctions métaboliques spécialisées. Ces différents groupes représentent moins de 30% de l'ensemble du biofilm.
- ✚ La matrice du biofilm remplit plusieurs fonctions, telles que la protection et la cohésion de chaque microcolonie, l'absorption d'eau et la capture de petites particules en suspension. En outre, elle fournit des nutriments dissous aux microorganismes et facilite l'élimination de leurs déchets (Branger et al., 2007).

La composition de la matrice est variable en fonction de l'espèce bactérienne et des conditions de croissance.

Elle est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau (Tremblay, 2014). Elle est constituée :

- Des EPS : (Extracellulaire polymérique substances) ces substances polymériques extracellulaires sont autoproduites et comprennent principalement des polysaccharides, mais aussi des protéines, des lipides, des molécules de quorum-sensing. Un des exopolysaccharides le plus souvent retrouvés est un polymère de β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine (polyglucosamine, PNAG). (Tremblay, 2014) les EPS interviennent sur les relations des microorganismes entre eux et avec les surfaces (Branger et al., 2007).
- De débris cellulaire (protéines, acides nucléique.).
- De déchets du métabolisme cellulaire, comme des sels d'acides organique (pyruvate, succinate...) qui favorisent notamment les phénomènes de corrosion des surfaces.
- De débris issus des matières en contact avec les surfaces (produits alimentaires, fluides biologiques, eaux diverses) (Branger et al., 2007).

3. Processus de formation du biofilm :

Le biofilm peut se former très rapidement, en quelques heures ; un bon exemple étant la plaque dentaire (Tremblay, 2014). Toutefois, le processus séquentiel, se déroule en plusieurs étapes ou séquences (figure 02).

Les cinq étapes du mécanisme de formation des biofilms selon Stoodley et al. (2002), tel qu'illustré sur la figure, sont les suivantes :

- ❖ Transport et attachement des cellules à un substrat, ainsi que la création d'un film de conditionnement.
- ❖ Adhésion réversible des cellules avec production d'EPS.
- ❖ Début de la croissance microbienne et évolution de l'architecture du biofilm avec le développement de micro-colonies primaires.
- ❖ Maturation du biofilm avec le développement des colonies.
- ❖ Détachement microbien ou détachement de colonies de biofilm en réponse aux conditions hydrodynamiques.

Après le détachement, les microorganismes (ou colonies) sont dispersés dans le milieu environnant ou peuvent coloniser d'autres parties de la surface (Cecilia, 2016).

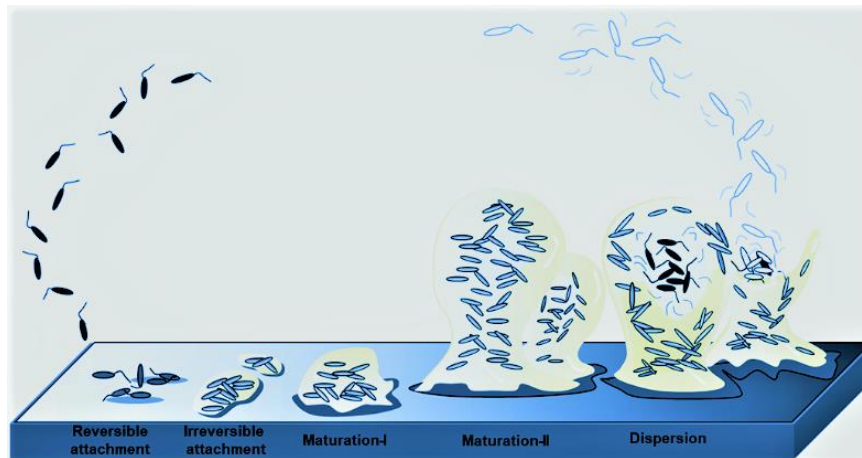


Figure 02 : Les étapes du développement du biofilm (Sauer et al ,2022)

- **Conditionnement de surface** : Pour la formation d'un biofilm, la première étape est la création d'un film primaire qui conditionne la surface et facilite l'adhérence des bactéries. Cette phase est rapide, prenant quelques heures seulement. Pendant cette période, les molécules organiques et inorganiques du milieu se déposent sur la surface, créant ainsi un film de conditionnement et augmentant la concentration en nutriments sur la surface. L'adsorption de ces molécules joue un rôle crucial dans l'adhérence des bactéries à la surface en altérant les propriétés physico-chimiques de celle-ci, comme l'énergie libre de surface, l'hydrophobicité, les charges électrostatiques, etc (Merzougui et al, 2013).
- **Le transport des bactéries vers la surface** : Les micro-organismes ont un contact permanent avec les surfaces, tout comme les souillures. Dans les ateliers agro-alimentaires, les cellules peuvent se déposer sur les surfaces soit lors d'un événement de contamination, soit par un processus continu, c'est-à-dire par l'apport permanent de matière première contaminée. L'approche des bactéries vers la surface peut être active ou passive. Le transport actif est dû à la mobilité bactérienne tandis que le transport passif dépend des propriétés du milieu aqueux environnant, telles que la viscosité et l'écoulement des fluides (Overney, 2016).
- **Adhésion réversible et irréversible** : La troisième étape de la formation d'un biofilm est caractérisée par l'adsorption réversible et non spécifique des bactéries à une surface. Cette étape est influencée par plusieurs facteurs tels que le pH, l'osmolarité et la température du milieu, et implique principalement des processus physiques tels que

les interactions van der Waals, électrostatiques et hydrophobes. L'attachement irréversible correspond à une fixation active et spécifique des micro-organismes sur une surface (Merzougui et al, 2013).

- **Maturation** : Une fois que l'attachement des bactéries au substrat est devenu irréversible, le biofilm commence à croître et à mûrir. À ce stade, le biofilm mature est un système biologique dynamique en équilibre entre la production de nouvelles cellules et le détachement. La maturation du biofilm peut être divisée en deux phases. La première phase est caractérisée par des régulations génétiques entraînant un changement significatif de phénotype, tandis que la seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses polymériques importantes. C'est au cours de cette phase que l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte (Merzougui et al, 2013).
- **Détachement** : La dernière phase du développement du biofilm peut se produire de manière passive, à travers le flux ou les forces de cisaillement, ou de manière active. La libération active des bactéries du biofilm est provoquée par un stress environnemental, tel que des fluctuations de la concentration alimentaire, des changements de pH ou une limitation en oxygène. Certaines bactéries vont détruire la matrice qui les entoure pour se libérer du biofilm et passer à l'état planctonique, avec une réinduction flagellaire et un changement des propriétés de surface. Les enzymes qui dégradent les EPS, comme l'alginate lyase de *P. aeruginosa*, contribuent également au détachement des bactéries de la matrice. Ainsi, l'essaimage du biofilm nécessite une transformation morphologique des bactéries, impliquant la formation de flagelles pour leur permettre de coloniser rapidement de nouvelles surfaces (Brian-Jaisson, 2014).

4. Le biofilm dans les industries agroalimentaires :

Les biofilms constituent une importante source de problèmes dans l'industrie agroalimentaire, en raison de leur impact sur l'hygiène alimentaire et leur capacité à altérer les caractéristiques organoleptiques des produits alimentaires (Merzougui et al, 2013). En effet, les biofilms peuvent proliférer sur divers supports tels que les sols, les murs, les siphons, ainsi que sur les surfaces des équipements et des ateliers des lignes de transformation des aliments, tels que les tapis convoyeurs, les pasteurisateurs, les plans de travail et les joints. Des matériaux tels que l'acier inoxydable, le polyéthylène, le Téflon, le caoutchouc, le plastique ou le verre peuvent servir de support à leur développement. La contamination croisée à partir de ces surfaces contaminées joue un rôle essentiel dans la transmission des agents pathogènes

aux aliments, sachant que les biofilms se composent souvent de différents genres bactériens et peuvent contenir des pathogènes (Kumar et al., 2022). Les autres nuisances comprennent la diminution d'efficacité des appareils tels que les échangeurs thermique, le risque de corrosion et de colmatage. La figure 03 montre un biofilm formé sur une surface en acier inoxydable.

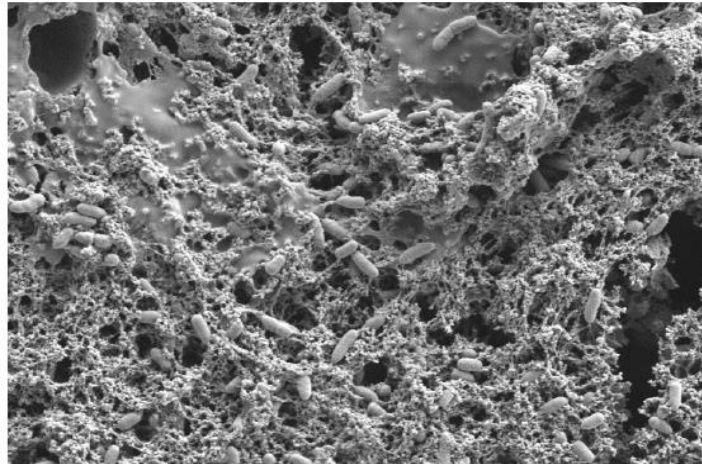


Figure 03 : Image de microscopie électronique à balayage (MEB) des biofilms de *Pseudomonas fluorescens* de 3 jours formés sur de l'acier inoxydable (Carrascosa, 2014)

5. Exemples des biofilms dans les industries agroalimentaires :

Dans l'industrie agroalimentaire, les microorganismes ont tendance à se fixer sur les surfaces solides qui sont généralement riches en nutriments, permettant leur survie et leur croissance. Après leur dépôt initial, ces microorganismes adhèrent aux surfaces et se multiplient pour former des colonies. Au fil du temps ces colonies s'agrandissent et attirent des débris organiques et inorganiques, ainsi que des nutriments et d'autres microorganismes, ce qui constitue l'encrassement biologique ou biofouling. (Merzougui et al., 2013).

Les conditions qui prévalent dans les entreprises agroalimentaires sont favorables à l'émergence de certains groupes microbiens qui s'organisent en biofilms et persistent sur les équipements industriels. Il s'agit notamment des biofilms des bactéries sporulées telles que *B.cereus* et de ceux des champignons levuriformes.

5.1. Biofilm de *B. cereus* :

B. cereus est une bactérie sporulée capable de former des biofilms sur les surfaces de contact alimentaires, telles que les tuyaux en acier inoxydable, les courroies de transport et les réservoirs de stockage. Les flagelles bactériens permettent à *B. cereus* d'accéder à des surfaces propices à la formation de biofilms, et sont essentiels pour la propagation des biofilms sur des surfaces non colonisées, c'est un germe fréquent dans l'environnement laitier à cause de la formation des spores thermorésistantes (Carrascosa, 2014). Celles-ci sont également caractérisées par un grand pouvoir d'adhésion aux surfaces inertes telles que l'acier inoxydable grâce à des structures morphologiques : l'exosporium et les appendices (figure 04).

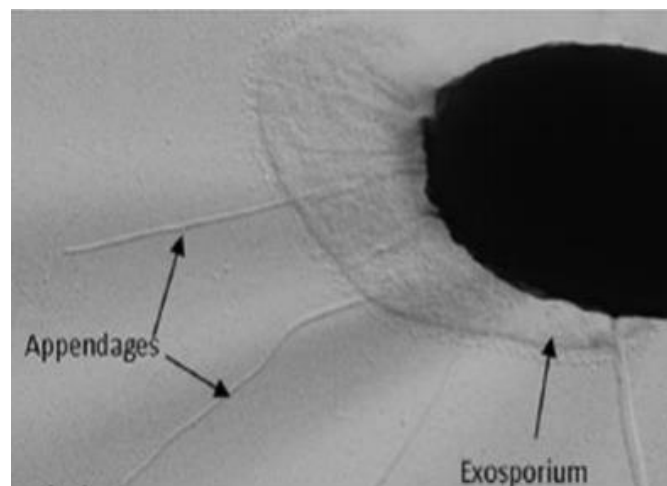


Figure 04 : Spore de *B. cereus* montrant les structures cellulaires impliquées dans l'adhésion aux surfaces (Ankolekar et Labbé, 2010)

5.2. Biofilm des levures :

La présence de levures dans les usines de transformation alimentaire est due à la dispersion de spores par des aérosols, des éclaboussures et des pulvérisations lors des programmes de désinfection. Des niveaux élevés de levures dégradant la qualité des aliments ont également été détectés dans les caniveaux de sol. De plus, certaines espèces de levures ont la capacité de former des biofilms, ce qui rend leur élimination plus difficile que celle des cellules planctoniques (Zara et al, 2020).

Chez les levures, le processus de formation du biofilm comporte certaines particularités. La première étape de la formation d'un biofilm de levures consiste en l'adhésion des cellules les unes aux autres et aux surfaces biotiques et abiotiques. Cette adhésion est assurée par des

molécules spécifiques appelées adhésines. Une fois qu'elles sont fixées, les cellules de levure se multiplient et se développent en formes filamenteuses telles que les hyphes et les pseudo-hyphes. Elles produisent également une matrice extracellulaire (MEC) qui les entoure et les protège (Figure 05). La MEC confère aux cellules de levure des avantages tels que l'adhérence, la cohésion, la protection et des propriétés mécaniques.

Les cellules capables de former un réseau de pseudo-hyphes ont une adhérence plus forte aux surfaces inertes telles que l'acier inoxydable et le plastique. La quantité de pseudo-hyphes est directement liée à la résistance et à la force du biofilm en raison de la quantité élevée de chitine dans ces cellules (Zara et al, 2020).

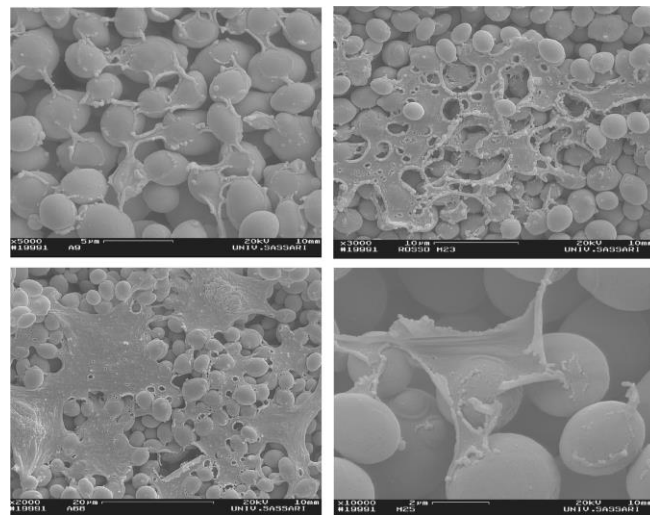


Figure 05: Des biofilms de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

6. Résistance des biofilms et moyens de lutte

6.1. Résistance des biofilms :

Il est essentiel de lutter contre les biofilms, car le risque de contamination des aliments par les bactéries qui se détachent des surfaces est un problème de santé publique majeur. Par conséquent, la lutte contre la formation de populations sessiles dans les environnements agro-alimentaires est de plus en plus importante, conformément à la réglementation européenne (Paquet Hygiène, normes ISO 22000) qui préconise l'adoption de bonnes pratiques d'hygiène, y compris la mise en place de procédures rigoureuses de nettoyage et de désinfection (Overney, 2016).

Les cellules qui forment des biofilms ont une résistance supérieure aux opérations de nettoyage et de désinfection (N&D) par rapport aux cellules planctoniques. Les bactéries formant des biofilms sont moins sensibles aux biocides que les cellules planctoniques, mais leur adhérence aux surfaces est tout de même affaiblie par ces traitements (Eginton et al., 1998).

La résistance accrue des biofilms aux opérations d'hygiène peut être attribuée à plusieurs facteurs. La présence de la matrice extracellulaire offre une protection contre les stress environnementaux et les traitements chimiques (Pan et al., 2006). De plus, ces composés extracellulaires ont un effet protecteur contre le dessèchement des cellules (Overney, 2016). En outre, la résistance multifactorielle est due à l'expression de gènes spécifiques qui sont réprimés dans l'état planctonique, à l'hétérogénéité physiologique et au phénotype de croissance altéré, ainsi qu'à la présence de sous-populations de cellules dans un état de dormance, y compris les cellules persistantes (Malek, 2019). Dans l'ensemble, c'est le phénotype biofilm qui est impliqué dans la résistance des biofilms aux agents antimicrobien

De même, la capacité des biofilms fongiques à résister aux antifongiques résulte de mécanismes physiques et régulateurs complexes. Plusieurs facteurs génétiques sont impliqués dans cette résistance, notamment la production d'une matrice extracellulaire, l'augmentation de l'expression des pompes d'efflux de médicaments, la réponse au stress et la modification de la physiologie cellulaire, qui peut entraîner une réduction de la croissance des cellules (Zara et al., 2020).

6.2. Les moyens de lutte :

Les moyens de lutte contre les biofilms suivent trois axes de recherche : l'inhibition de l'adhésion, le traitement du biofilm formé et l'action sur le quorum sensing (QS) (Branger et al., 2007)

6.2.1 Les stratégies à empêcher la formation de biofilms consiste à :

- Une modification de surface des matériaux, qui peut être réalisée par divers traitements physiques, biochimiques ou biologiques. L'utilisation de biofilms positifs est également envisagée pour concurrencer les germes indésirables. Les bio-surfactants sont également utiles pour réduire la force d'adhésion des microorganismes et renforcer l'efficacité du nettoyage.

- Une conception des matériaux qui ne présentent pas de zones inaccessibles pour le nettoyage et la désinfection, et à éviter les transferts qui favorisent la formation de biofilms.
- La maîtrise du réseau, le flux laminaire et l'élimination du biofilm de conditionnement sont également importants pour éviter la formation de biofilms (Branger et al., 2007).

6.2.2. Traitement du biofilm formé :

Plusieurs étapes permettent d'éliminer les biofilms en place.

- Un nettoyage pour éliminer la souillure, en utilisant des amines quaternaires pour détacher les biofilms. Ensuite, l'action mécanique est nécessaire pour provoquer une réduction des bactéries des biofilms, cela peut être effectué par différents moyens tels que le jet d'eau sous pression, le brossage ou le nettoyage en place.
- La désinfection est une autre étape importante pour détruire tous les germes restés après le nettoyage, cependant, l'efficacité des traitements diffère selon le matériau de support utilisé.
- Enfin, le rinçage doit être effectué avec soin pour éviter l'apparition de souches résistantes, et l'utilisation de produits rémanents est sujette à débat (Branger et al., 2007).

6.2.3. Action sur le quorum sensing (QS) :

Le quorum sensing (QS) est un mode de communication et de perception utilisé par les bactéries. Il se fonde sur la production de petites molécules, les auto-inducteurs (AI), qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportés à l'extérieur de la cellule (Mion, 2019).

Contrairement aux antibiotiques qui peuvent provoquer l'apparition de bactéries multi-résistantes, l'inhibition du QS ne bloque pas directement la croissance bactérienne, mais sa virulence (Branger et al., 2007).

Chapitre 03 :

L'hygiène des surfaces agro-industrielles

Les produits laitiers constituent l'un des principaux secteurs touchés par les pertes alimentaires, la principale source d'altération ces derniers est attribués aux bactéries sous formes de biofilm (Piyush, 2022). Les procédures d'hygiène et d'assainissement pendant la fabrication et la sélection de matières premières de bonne qualité sont essentielles pour contrôler les contaminations microbiennes dans la nourriture (Mayoral et al., 2005).

L'objectif des opérations de nettoyage et de désinfection est de supprimer les souillures (débris des produits traités ou des outils et machines utilisés dans le processus industriel) ainsi que les contaminations microbiologiques et chimiques (Hery et al., 2003).

1. Le nettoyage :

Le processus de nettoyage consiste à enlever les souillures visibles ou invisibles qui adhèrent à une surface donnée (Laprent, 1997). L'encrassement de ces derniers est un phénomène naturel et irrémédiable. Plusieurs types de souillures peuvent s'accumuler sur les surfaces, on peut distinguer :

- Les souillures minérales, ces dépôts de matière minérale sont le plus souvent issus de l'eau utilisée dans les processus de fabrication ou des fragments de produits eux-mêmes.
- Les souillures organiques, ce sont des fragments « macroscopiques » de produits. Hormis le cas particulier de produits stériles, les souillures organiques renferment fréquemment des micro-organismes qui peuvent s'y multiplier.
- Les souillures microbiologiques, il s'agit de l'accumulation de micro-organismes sur les surfaces. Ce sont en général des micro-organismes résiduels après nettoyage non suivi d'une désinfection, ou suivi d'une désinfection insuffisante, ou encore après une désinfection non précédée d'un nettoyage. Ces micro-organismes sont simplement adhérents ou colonisent les surfaces sous forme de biofilms le plus souvent « microscopique », le phénomène peut être cependant beaucoup plus spectaculaire (c'est-à-dire visible à l'œil nu) dans les recoins que le nettoyage n'atteint jamais du fait d'une mauvaise conception hygiénique des locaux ou des équipements (Amgar, 1998).

Bien que l'objectif d'une opération de nettoyage soit d'obtenir un état de propreté satisfaisant, elle ne vise pas à éliminer les micro-organismes. Pour ce faire, il est souvent nécessaire d'utiliser une série de produits chimiques ou des mélanges de produits pour éliminer les

saletés plus ou moins complexes. La liste des produits chimiques autorisés pour cette utilisation a été publiée dans le Journal Officiel sous le décret n°73138 du 12 février 1973.

Les différents agents de nettoyage utilisés dans le domaine alimentaire comprennent :

- Les détergents minéraux alcalins ont un pH supérieur à 10 et sont choisis pour éliminer les souillures organiques. L'alcalinité peut être apportée par des bases (soude, potasse) ou par des sels minéraux alcalins (carbonates, silicates) qui concourent à renforcer la détergence.
- Les détergents minéraux acides (acide phosphorique, nitrique, citrique...) ont un pH inférieur à 4 et ont une activité sur les souillures minérales (Mounier et al., 2009).
- Les détergents organique : sont des composés amphiphiles, possédant une partie lipophile (ou apolaire) et une partie hydrophile (ou polaire), apportant au produit détergent tout son pouvoir détergent (Manon, 2021).
- Les détergents enzymatiques : Pour faire face à la nature complexe des souillures, les produits enzymatiques sont généralement composés d'un cocktail d'enzymes (lipases, protéases, etc.) Actifs à faible dose et à pH neutre, ces produits ne sont pas corrosifs (Overney, 2016).

2. Les différents types de nettoyage :

L'intérêt est de réduire l'intervention humaine lors des nettoyages afin de minimiser le contact avec des produits dangereux et nocifs, ainsi que pour remédier à l'absence de reproductibilité des nettoyages effectués manuellement (Bolzan, 2008).

- ✚ Le nettoyage manuel consiste en une élimination des résidus par une action mécanique couplée ou non à l'action chimique de produits comme les détergents et les désinfectants.

Le principal avantage de ce type de nettoyage est le ciblage des zones critiques du matériel difficilement atteignables avec d'autres types de nettoyage. Le principal inconvénient est le manque de reproductibilité de la méthode. L'efficacité de ce type de nettoyage est assurée par la bonne application par l'opérateur des procédures de nettoyage.

- ✚ Le nettoyage semi-automatique n'implique que très peu l'opérateur. Il s'agit d'une succession d'opérations manuelles et automatiques ; le nettoyage par machines à laver industrielles en est le meilleur exemple.

- ✚ Le nettoyage automatique ne nécessite aucune intervention humaine, il est réalisé par aspersion ou recirculation des fluides, et ne nécessite aucun démontage du matériel.

L'enchaînement des opérations s'effectue dans des conditions prédéterminées. Ce type de nettoyage assure la meilleure reproductibilité mais requiert des installations lourdes et coûteuses (Bolzan, 2008).

3. Principes de nettoyage

Afin d'assurer un nettoyage optimal, il est recommandé de suivre les principes de TACT. Cette abréviation désigne les quatre éléments clés qui ont un impact direct sur l'efficacité du lavage et qui sont regroupés dans le cercle de Sinner. Il s'agit de :

- La température à laquelle le produit est utilisée
- L'action mécanique exercée (par exemple, le brossage ou la turbulence)
- La concentration du produit (l'action chimique)
- Le temps pendant lequel le produit est en contact avec la surface à nettoyer (Vignola, 2002).

Si un des paramètres est manquant, il faudra rééquilibrer les paramètres restants pour garantir l'efficacité d'un nettoyage mais d'une manière générale, les quatre paramètres sont indispensables (Manon, 2021).

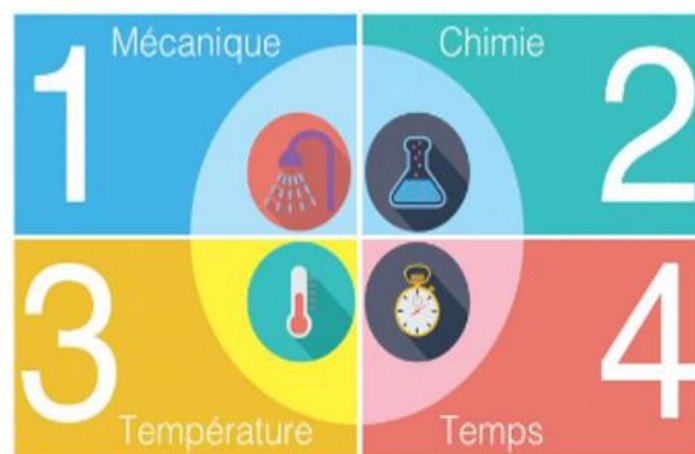


Figure 06 : Cercle de Sinner (Müller et Gassier, 2021).

4. Exemple de nettoyage automatique : le système CIP

Le système CIP (Cleaning-in-place) ou nettoyage en place est un système de nettoyage automatique qui ne requiert pas de démonter les équipements (Bolzan, 2008).

Les tuyaux, les vannes, les pompes et les cuves sont soumis à un nettoyage et une désinfection réguliers par circulation d'eau et de divers produits de nettoyage et de désinfection, selon des cycles prédéterminés. L'action mécanique est obtenue par les forces de cisaillement générées par les mouvements des liquides sous l'effet de la pression (Overney, 2016).

Le NEP (nettoyage en place) est constitué de plusieurs éléments indépendants qui permettent de faire circuler la solution de nettoyage et de désinfection appropriée dans un équipement non démonté. Cette solution est diffusée à la bonne concentration, au bon endroit, à la bonne température, au bon débit, avec l'action mécanique requise et pour une durée de contact suffisante. En combinant correctement ces paramètres, le CIP permet d'assurer un nettoyage et une désinfection efficaces des surfaces entrant en contact avec les denrées (Vignola, 2002).

Le processus de nettoyage peut impliquer plusieurs étapes, comme la préparation d'une solution de nettoyage à une certaine concentration, le chauffage de cette solution, la circulation de solutions de lavage et de rinçage sur toutes les surfaces de l'équipement, et enfin, si nécessaire, le séchage de ces surfaces (Rivera, 2014).

Les produits les plus couramment utilisés sont la soude caustique (NaOH) et l'acide nitrique (HNO₃). Un CIP standard comprend :

- ✓ un rinçage à l'eau froide
- ✓ un traitement avec NaOH 1% à 65 °C pendant 10 min
- ✓ un rinçage intermédiaire
- ✓ un traitement avec HNO₃ à 1% à 65°C pendant 10 min
- ✓ et un rinçage final.

Plusieurs combinaisons (concentrations en produit, températures et temps d'action) sont adoptées par les laiteries, en fonction de la nature de la souillure (microbienne et chimique) et du taux d'encrassement, toutefois, ce type de nettoyage industriel classique ne permet pas l'élimination totale du biofilm qui est responsable de la réduction de l'efficacité de ce système de nettoyage industriel (Malek, 2019).

D'après Malek, (2019), le contrôle du biofilm doit passer par l'amélioration du système de nettoyage/désinfection en :

- Renforçant l'étape du nettoyage alcalin par un traitement enzymatique permettant un meilleur décrochement du biofilm
- utilisation des formulations désinfectantes à base de produits naturels (huile essentielle) dans le programme CIP aux fins de l'éradication du biofilm. La figure 07 résume cette approche de nettoyage.

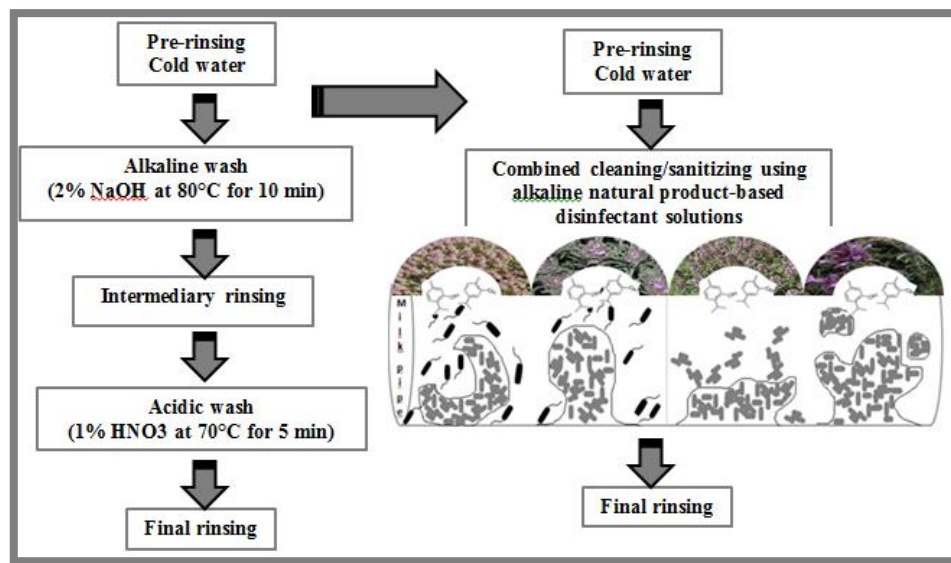


Figure 07 : Une représentation schématique simplifiée du système CIP conventionnel à 5 étapes et d'une stratégie d'un CIP amélioré à 3 étapes (Malek, 2022).

5. La désinfection :

La propreté microbologique ne peut être obtenue que par la désinfection des surfaces. L'objectif de la désinfection est de réduire la population microbienne sur les surfaces à un niveau qui est compatible avec des pratiques d'hygiène satisfaisantes, et d'empêcher toute contamination alimentaire. En effet, une surface propre est considérée comme étant une surface qui n'altère pas la qualité microbologique du produit alimentaire final. Cela signifie que la surface peut être contaminée, mais à un niveau qui respecte les normes d'hygiène en vigueur.

Par conséquent, il est recommandé de nettoyer les installations après la fabrication d'un produit alimentaire pour éliminer les micro-organismes indésirables qui adhèrent aux surfaces. Cependant, cette élimination n'est que partielle, c'est pourquoi une désinfection est

nécessaire pour inactiver les micro-organismes qui subsistent après le nettoyage (Laprent, 1997).

Les différents agents de désinfection utilisés dans le domaine alimentaire comprennent :

- les halogènes, tels que le chlore et ses dérivés (eau de javel, chlorocyanurates de sodium)
- les oxydes et peroxydes (eau oxygénée, ozone, acide peracétique)
- les aldéhydes (formol, glutaraldéhyde)
- les agents tensioactifs, comme les ammoniums quaternaires
- les acides pour le détartrage
- les bases souvent associées au chlore sous forme d'alcalins chlorés
- les alcools, ainsi que les agents physiques tels que les rayonnements ionisants et les rayons UV (Hery et al., 2003).

Des exemples des désinfectants ainsi que certaine de leurs conception sont données au tableau 01.

6. Approche préventive pour l'amélioration de l'hygiène industrielle : le système HACCP

L'amélioration du statut hygiénique des entreprises de production laitière nécessite l'utilisation d'une démarche d'assurance qualité telle que le système HACCP.

Le HACCP (Hazard Analysis – Critical Control Point : Analyse des risques, points critiques pour leur maîtrise) peut être défini comme une méthode, une démarche structurée permettant de concevoir et de mettre en œuvre l'assurance de la sécurité d'un produit alimentaire (notions de salubrité, d'hygiène alimentaire) (Bourgeois et al., 1996).

L'HACCP est un outil de prévention de la sécurité alimentaire qui vise à maîtriser toutes les étapes de la vie d'un produit, depuis les matières premières jusqu'à l'utilisation par le consommateur final. Cette approche systématique et rationnelle permet de gérer les risques microbiologiques, physiques et chimiques dans les aliments en identifiant les dangers spécifiques, en les évaluant et en mettant en place des mesures préventives et de maîtrise. (Laprent, 1997). Les étapes de cette démarche assurance qualité sont illustrées dans la figure 08.

Tableau 01 : Type de désinfectants pouvant être utilisés en industrie agroalimentaire (Zoz, 2016)

Type de désinfectants	Exemples	Information supplémentaires
Les halogènes	Chlores et ses dérivés : hypochlorite de sodium, les chlorocyanurates de sodium	Produits facile d'emplois et peu couteux
Agents oxydants	Le peroxyde d'hydrogène, l'ozone, l'acide peracétique	Composés très actifs mais sont corrosifs
Aldéhydes	Le formol et le glutaraldéhyde	Large spectre bactéricide
Agents tensio-actifs	Les ammoniums quaternaires (largement utilisées)	Grande stabilité non corrosifs et bon pouvoir mouillant
Acides	Les acides organiques : acide acétique, lactique, citrique. les acides non organiques : nitrique, sulfurique	Utilisée notamment pour le détartrage
Bases	Souvent associée au chlore sous forme d'alcalins chlorés	Peuvent générer des résidus toxiques
Alcools	L'éthanol, l'isopropanol, le méthanol...	Efficaces contre les cellules végétative mais inefficace contre les spores
Agents physique	Les rayonnements ionisants, UV	

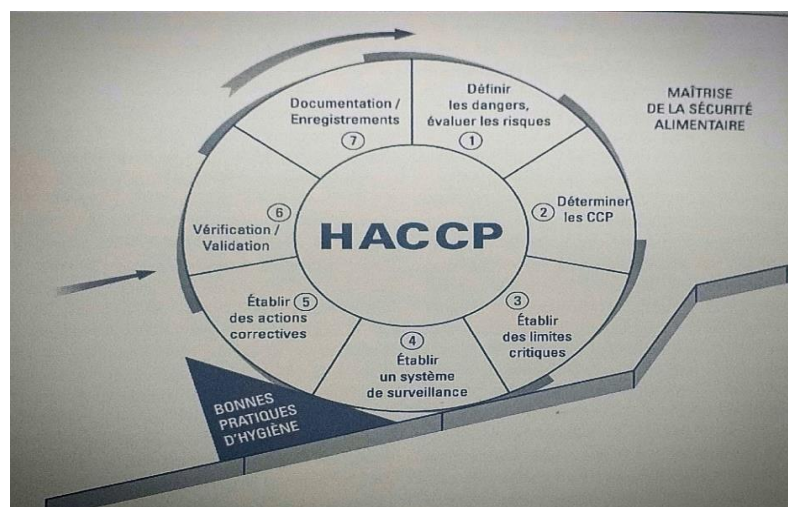


Figure 08: Bonne pratique alimentaire et HACCP (Vignola, 2002).

Matériel

Et

Méthodes

Notre travail expérimental a été réalisé dans les laboratoires de pédagogie du département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et l'univers, de l'université de Tlemcen.

L'objectif de notre étude est d'évaluer la qualité microbiologique des équipements dans une laiterie après application du système de nettoyage et désinfection. Le plan expérimental est le suivant :

- Dénombrement et isolement de la flore présente dans les équipements et l'air ambiant
- Identification phénotypique des souches isolées par l'étude des caractères morphologique et biochimique
- Caractérisation du potentiel d'adhésion et de formation du biofilm des isolats

1. Prélèvements :

1.1. Echantillonnage des surfaces

Neuf échantillons ont été prélevés en mars 2023 à partir de la surface des équipements laitiers dans différents sites de l'atelier de production de la laiterie étudiée. Il s'agit de :

- Système de canalisation du lait pasteurisé,
- Tank de stockage du lait,
- Conditionneuse,
- Emballage du yaourt (pot et couvert)
- Cuve de fermentation du fromage Mozzarella, ainsi que la table à découper et le couteau

La technique d'échantillonnage des surfaces adoptée est l'écouvillonnage. A l'aide d'un écouvillon de coton, stérile et humide, et un gabarit, la surface à analyser est balayée. L'écouvillon est transféré dans les tubes contenant 5ml de TSE à 0.3% de Tween 80.

1.2.Echantillonnage de l'air ambiant

Des boîtes contenant les milieux TSA et PDA préalablement coulés, ont été placées dans différents endroits de l'atelier de production, et laissées ouvertes pendant 30min afin de rechercher la flore bactérienne et fongique présente dans l'environnement de l'atelier.

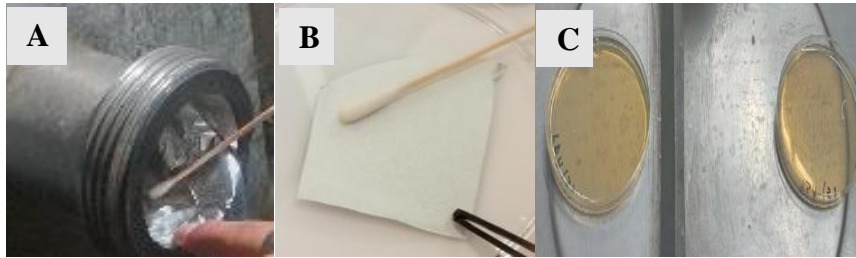


Figure 09: Photos montrant quelques sites des prélèvements

(A : Cuve de fermentation, B : Couvert de pot de yaourt, C : Air ambiant)

2. Transport des échantillons :

Les échantillons sont transportés dans une glacière à 4°C et sont analysés tout de suite après leur arrivée au laboratoire pour que l'échantillon soit représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage comme il est préconisé par la norme (N.M08.0.109., 2004).

3. Traitement des échantillons :

3.1. Préparation des dilutions décimales :

Les tubes contenant l'écouvillon constituent les solutions mères, et les dilutions sont effectuées jusqu'à la cinquième dilution.

3.2. Ensemencement :

L'ensemencement s'effectue en surface sur les milieux TSA, PDA, Chapman, Macconkey, préalablement coulés dans les boîtes de pétri. Grâce à une micropipette on dépose 100µl de la solution mère, et des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} pour les prélèvements qui sont pris après nettoyage des équipements du yaourt et de la mozzarella, et 100µl des dilutions 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} pour les prélèvements de la mozzarella avant nettoyage. On étale uniformément cet inoculum sur la gélose par les pipettes pasteur en forme d'un râteau.

L'incubation a été faite à l'optimum de température des différentes flores recherchées :

- 25°C pendant 5jrs pour les boîtes contenant le milieu PDA (Levures et moisissures)
- 37°C pendant 24 à 48 h pour les boîtes contenant les milieux CHP et MK (Staphylococcus, et Entérobactéries)
- 30°C pendant 24 à 48 h pour les boîtes contenant le milieu TSA (Les germes totaux)

4. Dénombrement

Les boîtes après incubation ont été dénombrées, seules celles qui sont dénombrables et contenaient entre 30 et 300 colonies sont pris en considération

5. Identification morphologique :

Elle porte sur l'étude des deux aspects macroscopiques et microscopiques

5.1. Aspect macroscopique :

Une observation à l'œil nu de l'aspect morphologique des colonies obtenue sur les différents milieux après 24 à 48h, est réalisée en tenant compte des critères suivants : nombre de type de colonies, taille, forme de colonies, l'aspect de contour, et la couleur.

5.2. Aspect microscopique :

- Observation des bactéries après la coloration de Gram :

Sur le frottis bactérien préparé, le premier colorant, le cristal violet oxalaté, va colorer en violet les bactéries, puis le Lugol (solution iodo-iodurée) libère de l'iode qui va fixer le colorant précédent. Un complexe iode-cristal violet se forme ; il sera solubiliser par l'alcool à 95°C lors de la phase de décoloration, uniquement pour les bactéries à Gram –

Le deuxième colorant, dit de contraste, la fushine, va colorer en rose les bactéries à Gram- ; les bactéries à Gram+, non décolorer par l'alcool, ont conservé leur couleur violette.

- Observation des champignons filamenteux après coloration au bleu coton :

Afin de réaliser des observations microscopiques des moisissures il faut d'abord réaliser un montage entre lame et lamelle en déposant en premier lieu un liquide de montage «bleu coton». Le prélèvement du matériel fongique peut être réalisé selon différentes méthodes :

- a. Le matériel fongique, un fragment de mycélium peut être prélevé avec une pince stérile
- b. Il est également possible de prélever un petit carré de gélose contenant le mycélium
- c. Prélèvement par l'utilisation d'un morceau de ruban adhésif (Scotch).

Cette technique consiste à : Prélever, à l'aide d'un morceau de scotch transparent, le mycélium directement dans la boîte de Pétri, puis coller ce morceau de scotch directement sur la lame.

L'observation des différents montages effectués entre lame et lamelle est réalisée au microscope optique au grossissement $\times 40$.

6. Identification biochimique des bactéries :

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C et à 30°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées, en vue de leur identification. La première étape consiste à rechercher les enzymes respiratoires : la catalase et l'oxydase.

• Test de la catalase :

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage. Le protocole expérimental consiste à : prendre une lame porte objet propre. Déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et émulsionner un peu de la colonie ou de la culture obtenue sur gélose.

Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase

• Test d'oxydase :

Le test de l'oxydase est une technique utilisée pour différencier certaines bactéries en fonction de leur capacité à produire l'enzyme cytochrome oxydase. Lorsque cette enzyme est présente chez les bactéries à Gram négatif, elle réagit avec un réactif contenant de l'oxalate de N,N-diméthyl-p-phénylènediamine et de l' α -naphthol, formant ainsi un pigment bleu appelé bleu d'indophénol.

7. Identification bactérienne par galerie API :

Les différentes galeries API sont préparées conformément aux guides correspondants.

La Galerie API20E :

▪ Préparation de l'inoculum :

- A l'aide d'une pipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.
- Réaliser une suspension bactérienne dans 5ml d'eau physiologique stérile en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

- **Inoculation de la galerie :**

Introduire la suspension bactérienne dans les microtubes de la galerie à l'aide de la même pipette, en respectant les instructions concernant le remplissage des cupules et en créant l'anaérobiose avec l'huile de paraffine si nécessaire.

Refermer la boîte d'incubation. Incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures.

La Galerie API STAPH :

- **Préparation de l'inoculum :**

Ouvrir une ampoule d'API Staph Medium et préparer une suspension bactérienne homogène

Vérifier la densité optique au colorimètre qui doit être comprise entre 0.6 et 0.8

- **Inoculation de la galerie :**

A l'aide d'une pipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Mediumensemencé. L'anaérobiose est créée dans les microtubes des tests ADH et URE en remplissant leur cupule avec l'huile de paraffine.

Renfermer la boîte d'incubation. Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures.

8. Conservation des souches :

Les souches isolées sont conservée dans des tubes à essai contenant du milieu TSA incliné.

Les souches sontensemencées sur la pente des tubes par des stries, puis incubées à 37°C et à 30°C pendant 24h, puis conserver à 4°C .

9. Etude du potentiel de formation de biofilm :

9.1. Formation des biofilms dans les microplaques de titration :

La technique au cristal violet utilisant les microplaques de titration à 96 puits est utilisée pour étudier le potentiel de formation de biofilm chez les souches bactériennes isolées des équipements laitiers et de l'air ambiant de l'atelier de production laitière selon O'Toole ,2011.

- **Technique :**

- Préparer une suspension bactérienne en utilisant l'eau physiologique avec une densité optique (DO) de 0.6 à 0.8 à 580 nm, introduire 20µl de cette dernière dans 2ml du milieu TSB

- Après 24h d'incubation à 30°C et 37°C, 20µl de la suspension est transférer dans un tube contenant 2ml TSB
- Ensuite les puits sont remplis à raison de 100µl
- Le milieu TSB non ensemencé est utilisé comme un témoin.
- Les microplaques sont incubées à 30°C et 37°C pendant 24h
 - **Coloration des biofilm au cristal violet :**
- Vider les microplaques à fin d'éliminer la culture liquide et les cellules faiblement attachées
- Rinçage à l'eau distillée trois fois pour éliminer les cellules non adhérer
- Egoutter les microplaques à fin d'éliminer l'excès de l'eau
- Remplir chaque puits avec 125µl de cristal violet à 0.5%
- Laisser agir 20 à 30min puis rincer à l'eau distillé
- Laisser sécher à l'air libre

L'observation des puits des microplaques est faite à l'œil nu. La formation de biofilm se traduit par la coloration des puits en violet. L'absence de coloration traduit un résultat négatif. La biomasse du biofilm formé est proportionnelle à l'intensité de la coloration, qui peut être notée comme suit :

- (+) Faiblement formatrice de biofilm
- (++) Formatrice de biofilm
- (+++) Fortement formatrice de biofilm

9.2. Formation du biofilm dans les tubes en verres :

▪ Protocole expérimental

Les biofilms sont formés dans les tubes à hémolyse en verre stérile selon la technique au cristal violet décrite pour les microplaques de titration à 96 puits. Les différences dans le protocole expérimental concernant les volumes des cultures (2 ml) et celui du colorant de révélation (3 ml)

▪ Quantification des biofilms

L'évaluation de la biomasse des biofilms formés sur les parois des tubes en verre se fait par mesure de la DO, après solubilisation des biofilms, selon le protocole suivant :

- Ajouter dans les tubes colorés au cristal violet, 3 ml de la solution dissolvante (un mélange d'éthanol, d'acide acétique et d'eau distillée.)

- Laisser agir 5 à 10 min pour assurer l'extraction et la solubilisation des biofilms formés sur la surface interne des tubes.
- Mesurer l'absorbance à 570nm

9.3. Caractérisation microscopique des biofilms :

Des biofilms sont formés selon la technique de Maris (1992), sur les lames en verre pour la microscopie, et coloré au cristal violet selon le protocole établi par Malek 2023 :

Les lames sont partagées en deux portions égales, marquée chacune en son centre par un carré de 2 cm de côté, puis stérilisées.

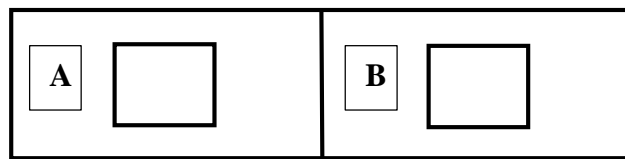


Figure 10: Adhésion et formation de biofilm sur les lames de microscopie en verre

A : suspension bactérienne dans de l'eau physiologique obtenue après centrifugation à 2000g pendant 20 min. la DO est ajustée à 0.6-0.8. B : culture bactérienne jeune sur TSB.

- **Inoculation des lames pour l'adhésion et la formation de biofilm :**

- Les lames sont introduites dans des boîtes de pétri stériles
- À l'aide de la micropipette, on prélève 100µl de la suspension et de la culture bactérienne préalablement préparée
- On place cet inoculum au centre du carré tracé sur la lame, on incube à l'étuve en atmosphère saturée en humidité pendant 2 h, pour permettre aux cellules d'adhérer à la surface de la lame en verre
- Après incubation, on rince les lames 3 fois à l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules faiblement attachées
- À l'aide de la micropipette, on ajoute 100µl du milieu TSB
- On incube à 37°C pendant 24 h en atmosphère saturée en humidité

- **Observation microscopique des lames :**

- Après 24h, rincer les lames à l'eau distillée et les laisser sécher
- Recouvrir les zones de biofilm avec une solution de cristal violet à 0,5%
- Laisser agir pendant 20 min, puis rincer à l'eau distillée, laisser sécher à l'air
- Recouvrir d'une goutte d'huile à immersion et observer au microscope

Résultats

Et

Discussion

1. Résultat du dénombrement et isolement des souches :

L'analyse des différents échantillons prélevés à partir des équipements laitiers dans l'atelier de production et de l'air ambiant sont présentés dans les tableaux 2, 3 et 4 respectivement.

Le dénombrement des germes a été effectué sur les différents milieux afin de vérifier la charge microbienne des différents groupes de contamination (germes totaux, staphylocoques, entérobactéries, levure et moisissures) sur les équipements. Le nombre de germes par cm^2 est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution.

Selon les résultats obtenus on peut constater que la charge microbienne est importante dans tous les prélèvements analysés. Les différentes microflore des équipements sont présentées à des taux qui varient de 10 à 530 UFC/ cm^2 , la valeur la plus élevée est obtenu au niveau de la cuve de fermentation du fromage mozzarella (tableau 02). Il est important de notée la présence des staphylocoques et des entérobactéries dont l'origine humaine est probable sachant que la table de découpage du fromage est exposé à l'air libre et aux manipulateur. Par ailleurs les différentes flores de contamination analysée sont indénombrables au niveau du couteau de découpage.

Tableau 02: Nombre de bactéries isolées à partir des équipements du fromage Mozzarella

Origine des échantillons	Nombre d'UFC/ mc^2			
	TSA	Chapman	Macconkey	PDA
Table à découper	Indénombrable	48	230	230
Cuve de fermentation	Indénombrable	30	530	4
Hélice de la cuve de fermentation	20	10	30	30
Couteau	Indénombrable	Indénombrable	Indénombrable	Indénombrable

Les mêmes groupes de contaminations se retrouvent au niveau de la ligne de production du yaourt avec une dominance des mycètes au niveau du tank du stockage et du mélangeur du

yaourt (tableau 03). Leur diminution dans les segments de post pasteurisation pourrait être due à l'effet destructeur du traitement thermique. Les entérobactéries sont indénombrables au niveau de la conditionneuse et les staphylocoques sont présents à des taux qui varient de 10 à 250 UFC/cm².

Tableau 03: Nombre de bactéries isolées à partir de la ligne de production du yaourt.

Origine des échantillons	Nombre d'UFC/mc ²			
	TSA	Chapman	Macconkey	PDA
Tank de stockage	Indénombrable	10	60	Indénombrable
Mélangeur du yaourt	390	70	90	Indénombrable
Ligne du mélangeur	160	60	40	5
Ligne de conditionneuse	Indénombrable	250	50	20
conditionneuse	Indénombrable	20	Indénombrable	20

Les taux de contaminations de l'air ambiant (tableau 04) varient de 12 à 55 colonies bactériennes et de levures, et concernant les champignons filamenteux le nombre de colonies obtenues sur le milieu PDA après 48h d'incubation varient de 3 à 9 colonies par boîtes. Ce résultat pourrait être expliqué par un temps d'incubation insuffisant pour la croissance des champignons filamenteux, sachant que les levures ont été mises en évidence sur milieu TSA après 48h d'incubation. D'après ces résultats l'air ambiant est une source de contamination par les bactéries et les champignons.

Tableau 04: Nombre de bactéries isolées à partir de l'air ambiant.

Origine des échantillons	Nombre de colonies par boîtes	
	TSA	PDA
Conditionneuse de yaourt	42	6
Un point d'atelier	32	8
Sur la cuve de fermentation	55	9
l'atelier de mélange des matières premières	12	3

2. Résultat de l'identification des isolats bactériens et fongiques

2.1. Caractères cultureux

L'observation des boîtes de pétri du milieu TSA a permis de noter plusieurs types de colonies d'un échantillon à un autre. Les colonies diffèrent par la forme, la taille, la consistance, la couleur, et la régularité des contours. Des colonies punctiformes et d'autres envahissantes sont notées (figure 11).

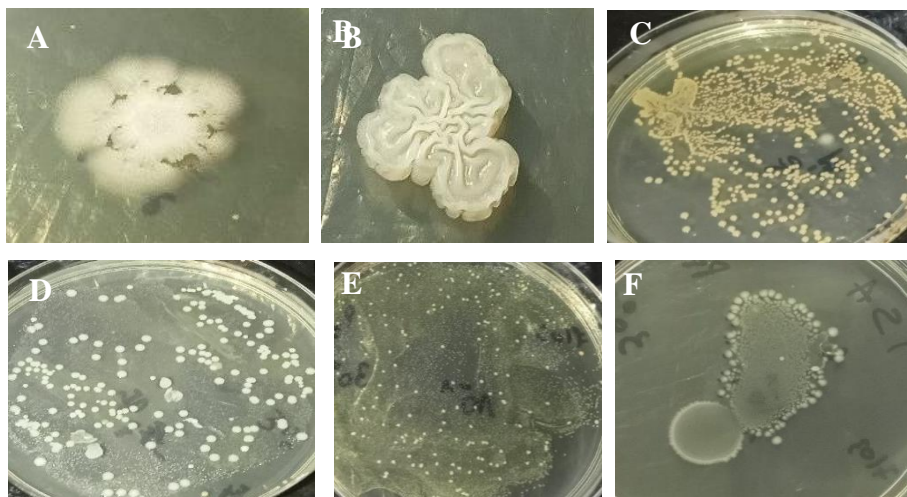


Figure 11: Aspects des colonies bactériennes des échantillons des équipements sur milieu TSA

Les colonies des images A et B présentent un aspect caractéristique, avec une texture sèche et irrégulière qui rappelle la forme d'une fleur. Cependant, la souche B se distingue par une surface rugueuse et légèrement surélevée. Cette particularité confère à la colonie une apparence distincte et oriente davantage son identification vers le genre *Bacillus*. L'image C est formée de petites colonies (1 mm de diamètre) jaunâtres, avec un bord régulier, une élévation convexe et une surface lisse crémeuse. Les souches D, E et F forment des tapis de colonies allant des colonies punctiformes aux colonies de petite taille. Ces colonies sont circulaires, régulières, avec une surface lisse qui peut varier de opaque à translucide.

Les aspects des colonies bactériennes observées sur les milieux TSA de l'air ambiant sont présentés dans la figure 12, qui montre une diversité culturelle caractéristique des colonies bactériennes et levuriforme, confirmé par examen microscopique.

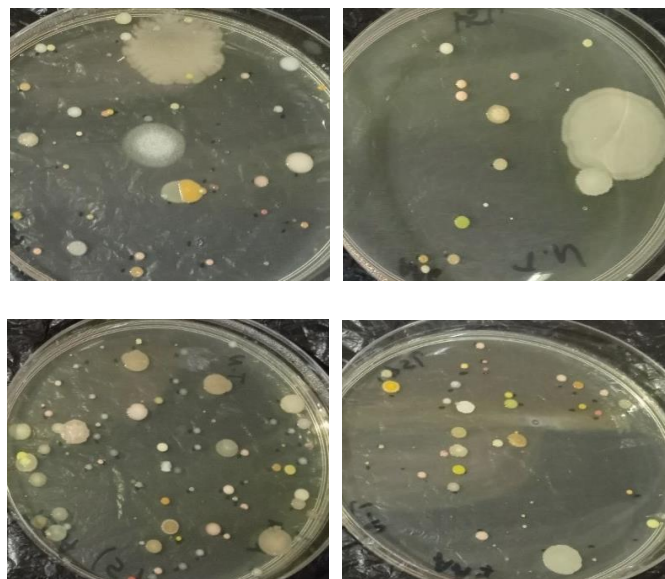


Figure 12: Aspects des colonies bactériennes de l'air ambiant (Conditionneuse, point d'atelier, cuve de fermentation, atelier de mélange) sur milieux TSA.

Sur milieu Chapman nous avons obtenus deux différents types de souches : celles qui rendent le milieu jaune ce qui signifie qu'elles sont mannitol positives. Et d'autres qui rendent le milieu rose ce qui signifie que la souche est mannitol négatif (figure 13).

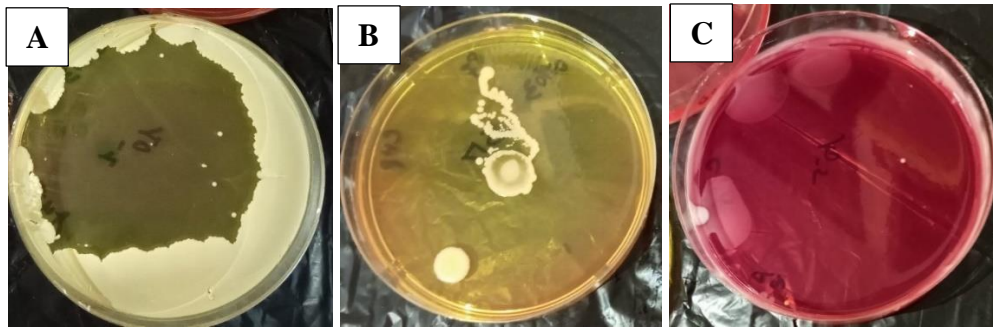


Figure 13: Aspects des colonies bactériennes sur milieu Chapman. Colonies mannitol positives (images à gauche et au centre) et colonies mannitol négatives (images à droite)

Dans la figure 13A, on observe la présence de huit colonies punctiformes avec un tapis envahissant de coloration jaune. Ces colonies se distinguent par leur caractère sec, rhizoïde et envahissent, caractéristique des bactéries sporulées du genre *Bacillus*, confirmé par examen microscopique.

La figure 13B, on observe deux colonies moyennes. La première présente une forme ronde, tandis que la seconde a une forme irrégulière. Les deux colonies sont de couleur jaune et ont une apparence bombée.

La figure 13C, une colonie occupe la paroi de la boîte avec une couleur blanchâtre. Elle présente une forme plate et une surface lisse, crémeuse et translucide. Ces caractéristiques ainsi que le virage de la couleur du milieu de culture orientent notre attention vers le genre *Staphylococcus*.

Sur milieu Mac-conkey nous avons obtenus deux différents types de colonies : celles qui rendent le milieu jaune ce qui signifie que cette souche est lactose négatif. Et d'autres qui rendent le milieu rose ce qui signifie que la souche est lactose positif

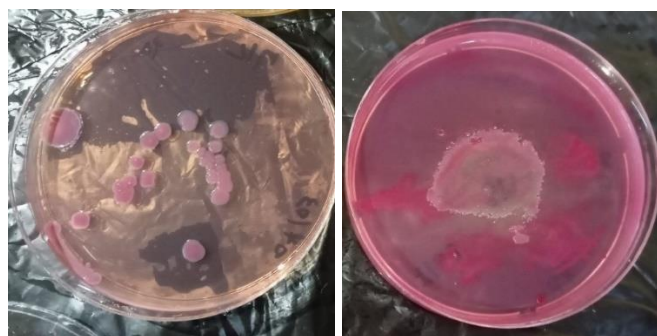


Figure 14: Aspect morphologique des colonies sur milieu Mac-conkey

On observe des colonies circulaires convexes avec un bord régulier. Ces colonies sont de taille moyenne et présentent une surface lisse et translucide. Autre colonie centrale observée est de forme irrégulière et plate, avec un bord bouclé, sa surface est lisse crémeuse, elle présente également une teinte jaune transparente. Par ailleurs, on peut observer d'autres colonies dans la même figure qui se distinguent par leur couleur rose, respectivement. Ces aspects sont évocateurs de *Klebsiella* et d'*Escherichia coli* respectivement.

2.2. Caractères cultureux des isolats fongiques

Sur milieu PDA nous avons obtenus une diversité des caractères cultureux des champignons filamenteux sur le plan de la taille, couleurs (rose, vert, marron, noir) et formes (rond, envahissant) tel que montré par la figure 15.

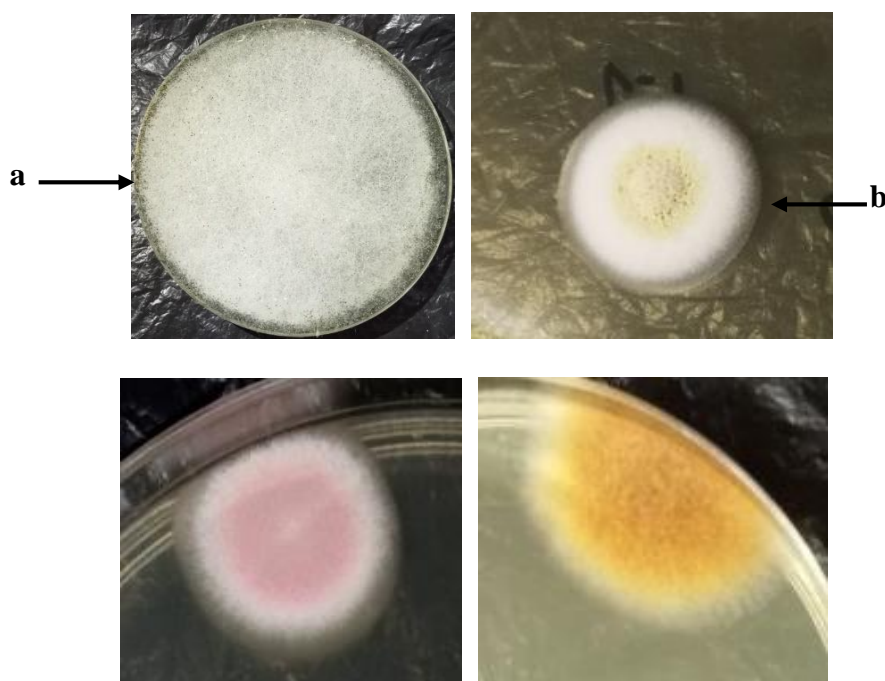


Figure 15: Aspects morphologiques des colonies isolées des équipements (couteau, ligne de mélangeur, ligne de conditionneuse, tank de stockage ; respectivement) sur milieu PDA.

Les échantillons prélevés sur les équipements ont montré une prédominance des espèces de moisissures. Parmi celles-ci, on a observé une moisissure filamenteuse présentant de petits points noirs, caractéristiques du genre *Mucor* (également connu sous le nom de "poil de chat") (image **a**). Une autre moisissure, dont l'aspect évoque celui du genre *Aspergillus*, a été identifiée grâce à son aspect filamenteux distinctif et sa couleur jaune (image **b**).

Les aspects des colonies bactériennes observées de l'air ambiant sur les milieux PDA sont présentés dans la figure 16.



Figure 16: aspects morphologique des colonies isolées de l'air ambiant (conditionneuse, point d'atelier, cuve de fermentation, atelier de mélange) sur milieu PDA.

Les échantillons d'air ambiant ont révélé une diversité remarquable tant au niveau des levures que des moisissures. Les colonies de levures présentaient généralement une forme ronde ou ovale, avec une texture crémeuse ou poudreuse. Leur aspect était souvent lisse, et leur couleur pouvait varier, allant du blanc au jaune.

Ces observations mettent en évidence la présence d'une diversité significative de levures et de moisissures dans l'environnement étudié, avec une prévalence plus marquée des moisissures sur les équipements. L'identification précise de ces micro-organismes nécessiterait des analyses microbiologiques supplémentaires, notamment observation au microscope. Les champignons filamenteux et non filamenteux sont des contaminants fréquents du lait, produit laitiers et environnement laitier, comme souligné dans la littérature. Les facteurs physico-chimiques, température, PH et l'humidité de l'environnement sont favorables au développement des champignons (Basset et Laffont, 2011) (Buehler, 2017).

2.3. Caractères microscopiques

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes : la coloration de Gram pour les bactéries et la coloration au bleu coton pour les champignons (figures 17- 21)

➤ Chez les bactéries

L'observation des frottis de la coloration de Gram a permis d'obtenir différents bacilles Gram positifs et négatifs et des différentes coques Gram positifs (figure 17). La présence de spores à également était mise en évidence chez certaines cultures bactériennes (figure 18).



Figure 17: Observation microscopique des cultures bactériennes après coloration de Gram (G x100). Bacille Gram négatifs, Bacille Gram positifs, Cocci Gram positifs (de gauche à droite).

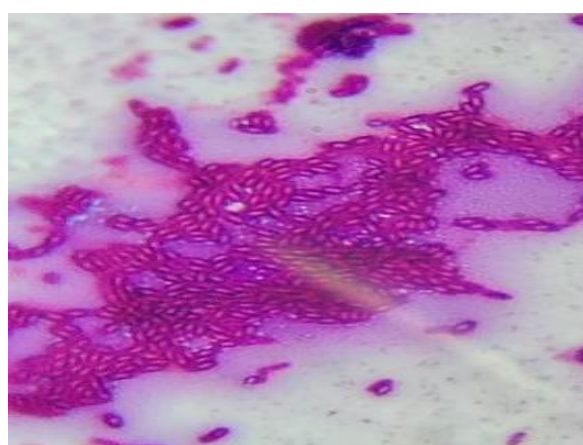


Figure 18: Observation microscopique des spores après coloration de Gram

Selon les caractères morphologiques et le type de gram obtenu on a pu orienter l'identification microscopique de certaines souches vers le genre *Staphylococcus* constitué de coques Gram positif souvent en amas sous forme de grappe de raisin (Singleton, 2005) et une souche vers le genre *Bacillus* constitué de Gram positif, apparaissant sous forme de bâtonnets et formant des endospores (Drider et Salvat, 2015).

➤ **Chez les champignons :**

L'aspect cultural en poil de chat ainsi que la morphologie cellulaire, filaments et sporanges (figure 19) ont permis l'orientation de l'identification des champignons filamenteux isolés des équipements laitiers vers le genre *Mucor* (Botton et al., 1990).

Le genre *Mucor* est un groupe de champignons qui joue un rôle ambivalent dans l'industrie fromagère. Certaines espèces de *Mucor*, telles que *M. fuscus* et *M. lanceolatus*, sont appréciées pour leur capacité à produire des enzymes telles que des lipases et des protéases, améliorant ainsi la texture, la saveur et la valeur nutritionnelle des fromages. Cependant,

d'autres espèces de *Mucor*, telles que *M. racemosus* et *M. circinelloides*, peuvent contaminer certains fromages et provoquer des incidents de production (Desmasures, 2016).

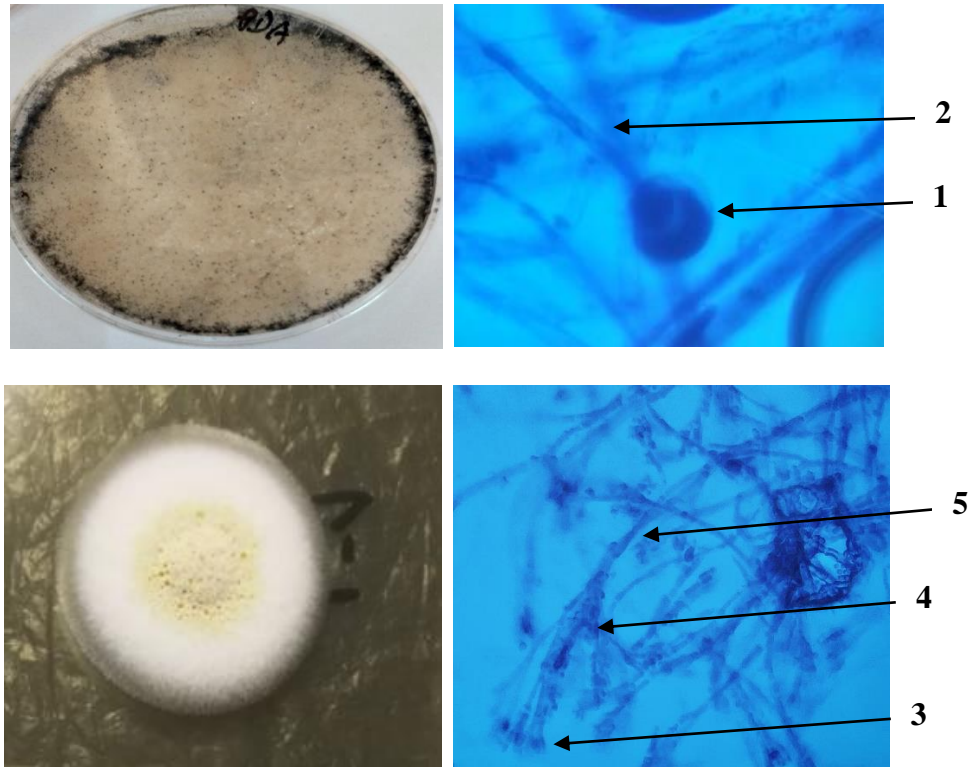


Figure 19: Caractéristiques morphologiques des champignons isolés des équipements

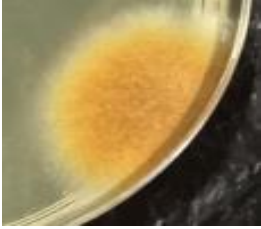
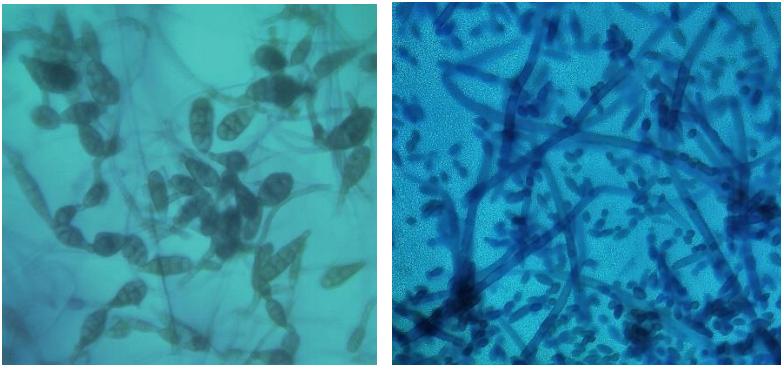

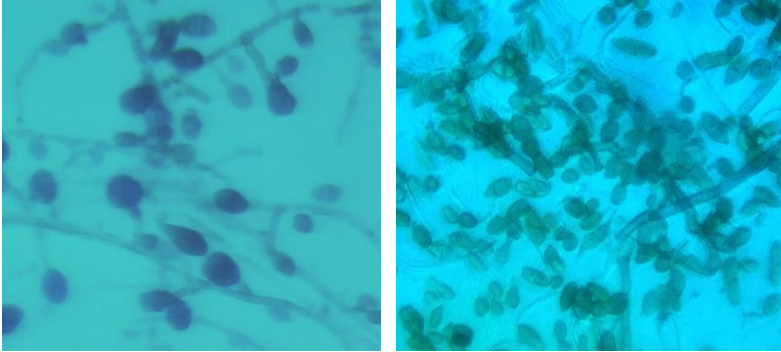

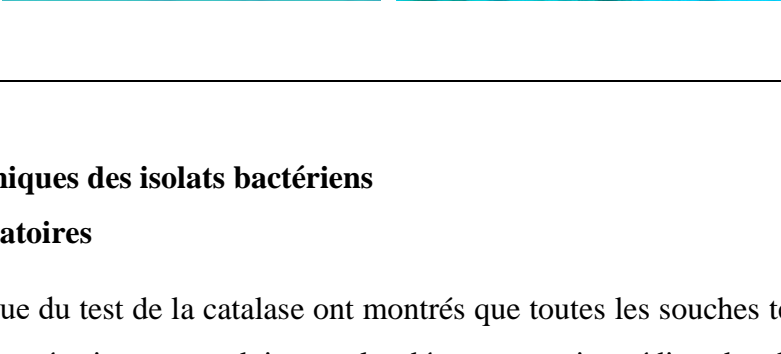
1 : sporange 2 : sporangiophore 3 : conidies (conidiospores) 4 : conidiophores 5 : mycélium

D'autres isolats fongiques ont présenté l'aspect filamenteux caractéristique du genre *Aspergillus* ainsi que ces structures cellulaires : mycélium, conidiospores, conidiophores (figure 19) tels que décrits dans la littérature.

Les *Aspergillus* sont des champignons ayant une vaste répartition géographique, bien qu'ils soient plus fréquemment associés aux régions au climat chaud. Certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent être directement pathogènes pour les humains et les animaux, ayant la capacité d'envahir les tissus vivants et de provoquer des aspergilloses. D'autres espèces de ce genre présentent un intérêt industriel. Ce sont des champignons filamenteux à croissance rapide. Après 48 heures d'incubation, on peut observer des colonies plates composées de courts filaments aériens de couleur blanche (Makhlouf, 2019)

Les prélèvements des équipements ainsi que les échantillons prélevés à partir de l'air ambiant sont caractérisés par une diversité dans l'aspect des colonies (forme, taille pigmentation) mais qui ont le même aspect microscopique, comme le montrent le tableau 05.

Tableau 05: Caractéristiques morphologiques des champignons isolés des équipements et de l'air ambiant

Caractères culturaux sur milieu PDA	Morphologie cellulaire après coloration au bleu coton	
		
		
		

3. Caractères biochimiques des isolats bactériens

3.1. Les enzymes respiratoires

Les résultats obtenus à l'issue du test de la catalase ont montrés que toutes les souches testées sont catalase positives. La réaction se traduit par le dégagement immédiat des bulles d'oxygène. Quant au test de l'oxydase, après avoir déposé les colonies sur les disques d'oxydase, l'apparition d'une coloration rougeâtre indique que les souches sont oxydase négatives (figure 20). Elles peuvent de ce fait être identifiées aux Entérobactérie.



Figure 20: Résultats des tests des enzymes respiratoires. A droite, catalase positive, à gauche oxydase négative

Les souches sporulées catalase positives sont orientées vers le genre *Bacillus* constitué de bâtonnets gram positif sporulé et une catalase positif. La présence de la spore chez ces souches confirme l'orientation vers ce genre bactérien. Et les cocci catalase positive peuvent être orientées vers les genres *Micrococcus* ou *Staphylococcus*, confirmé par la présence de la grappe de raisin caractéristique des espèces de ce dernier.

3.2. Détermination des biotypes :

- **Par galerie Staph :** Les résultats de l'identification par galerie API Staph sont montrés dans les tableaux 06 et la figure 21

Tableau 06: Détermination du biotype par galerie Staph

Origine	Affiliation
Ligne de mélangeur	<i>Staphylococcus xylosus</i>
Couteau à découper	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Emballage	<i>Staphylococcus aureus</i>



Figure 21 : Galerie API staph après 24 heures d'incubation

S. xylosus, est largement considérée comme non pathogène (Dordet, 2007). On la retrouve naturellement dans les matières premières d'origine animale et elle peut coloniser les environnements des ateliers agro-alimentaires (Dordet, 2007) elle est également décrite dans le sol et sur les surfaces des usines de transformation des aliments (Kloos et Schleifer, 1986). La formation de biofilms, qui est souvent associée à la colonisation de surfaces biotiques et abiotiques, peut expliquer la présence de *S. xylosus* dans ces environnements (Planchon et al., 2006).

S. aureus est un pathogène d'origine alimentaire important, entraîne une contamination du lait et des produits laitiers (Normanno, 2007), peut être transmis aux humains par le biais de la consommation de lait et de produits laitiers contaminés et non traités (Sasidharan et al., 2011)

- **Par galerie API 20 E :** Les résultats de l'identification par galerie API 20E sont montrés dans le tableau 07 et la figure 22.

E. coli est un commensal du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Il représente l'espèce dominante de la flore bactérienne aérobie de l'intestin. C'est une bactérie mésophile : son optimum de croissance est proche de la température corporelle des animaux à sang chaud (35-43°C) (Cohen et Karib, 2006). *E. coli* qui provoque la diarrhée, la gastrite aiguë ou la colite de l'homme sont désignés sous le nom d'*E. coli* pathogènes.

Rahnella aquatilis, est décrite comme un pathogène humain (Tash, 2005), elle a été trouvée dans l'environnement des brasseries, (le mout de fermentation) et dans les biofilm formés sur les membranes de filtration (biofouling), en industrie laitière (Anand et Verma, 2023). Et peut se développer entre 4 et 10°C. La bactérie psychrotrophe est connue pour corrompre même le lait correctement réfrigéré (Tash, 2005).

Les espèces de *Pantoea* ont été isolées à partir de matières fécales, de sols, d'eau, des produits laitiers. Certaines espèces sont des agents pathogènes opportunistes chez l'homme (Morin, 2014).

Leclercia adecarboxylata est un pathogène émergent récemment reconnu. Son isolement a été signalé à partir de divers échantillons animaux et environnementaux. *Leclercia adecarboxylata* a montré un degré de résistance croissant (Shuhoumi et al., 2023).

Tableau 07 : Détermination du biotype par galerie 20E

Origine	Affiliation
Cuve de fermentation	<i>Escherichia coli</i>
Mélangeur du yaourt	<i>Rahnella aquatilis</i>
Mélangeur du yaourt	<i>Pantoea spp</i>
Cuve de fermentation	<i>Leclercia adecarboxylata</i>



Figure 22: galerie API20E après 24 heures d'incubation

4. Résultats de la caractérisation des biofilms bactériens

4.1. Caractérisation des biofilms des microplaques de titration en polystyrène

La formation des biofilms dans les microplaques de titration à 96 puits a été analysée en visualisant simplement les puits à l'œil nu après coloration au cristal violet. Après 24h d'incubation à 37°C, le biofilm se produit préférentiellement aux bords des puits formant un anneau variable d'une souche à une autre dans l'interface air-liquide (figure 23). La masse des biofilms est liée à l'intensité de la coloration des anneaux formés, les couleurs foncées indiquent que la souche est forte formatrice de biofilm et vice versa.

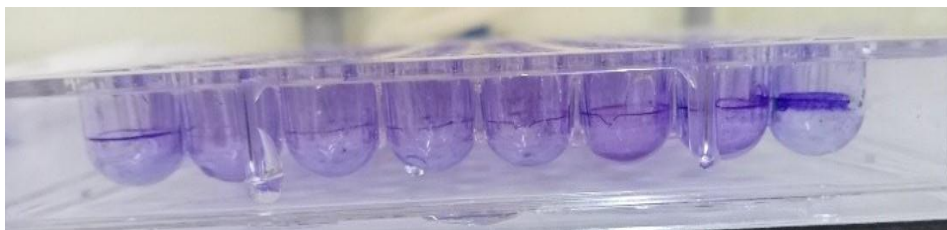


Figure 23: Biofilms formés dans les microplaques en polystyrène et colorés au cristal violet

4.2. Caractérisation des biofilms formés dans les tubes en verre

La formation de biofilm a été détectée en évaluant visuellement l'adhérence des cellules à une surface lisse en verre, selon la technique de Christine et al 1982.

Après avoir incubé pendant 24 heures à 37°C et effectué une coloration, nous avons remarqué que certaines souches avaient une adhérence faible, se manifestant par la formation d'un film à peine visible à la surface interne des tubes à hémolyse. L'observation des résultats révèle que certaines souches étudiées présentent un faible potentiel de formation de biofilm et une adhérence limitée.

La quantification des biofilms formés sur les parois des tubes en verre, après solubilisation du colorant à l'aide de la solution dissolvante, a montré de valeurs de DO très faibles, de l'ordre de 0,01 à 0,04, confirmant l'observation à l'œil nu. Cette faible aptitude à former le biofilm chez les souches isolées des équipements laitiers, semble indiquer que ces souches présentent une capacité réduite à s'attacher et à coloniser les surfaces, limitant ainsi leur potentiel de formation de biofilm.

Par contre la figure 24 montre des photos de biofilm formés par la technique de la goutte et colorée au cristal violet selon le protocole établi par Malek 2023. D'après ces images on constate que les cellules bactériennes ont pu adhérer au verre et former des biofilms important en 24h. Des rangés de spores bien organisées et bien structurés sont visible sur ces images ce qui implique un potentiel important de formation de biofilm. L'absence de formation de biofilm noté dans les microplaques de titration pourrait être du a la non-adhésion des cellules au polystyrène ou au problème de contamination des microplaques utilisées.

4.3. Caractérisation microscopique de la formation de biofilm sur les lames en verres :

4.3.1. Adhésion des cellules bactériennes :

La figure 24 montre l'adhésion des spores et des cellules végétatives d'une culture de *Bacillus* spp. La forme sporulée est dominante. Les spores sont connues comme une des formes de vie les plus résistantes, et leur inactivation complète est souvent impossible sans altérer la qualité de l'aliment, comme c'est le cas pour *B. cereus* (Merzougui et al., 2013)

Le grand pouvoir d'adhésion de *Bacillus cereus* aux surfaces inertes est dû à la présence, à la surface externe des spores, de structures cellulaires particulières : l'exosporium et les appendices, impliqué dans le phénomène d'adhésion. Les spores adhérentes aux surfaces sont capables de germer, se multiplier et former des biofilms (Ankolekar et Labbé, 2010).

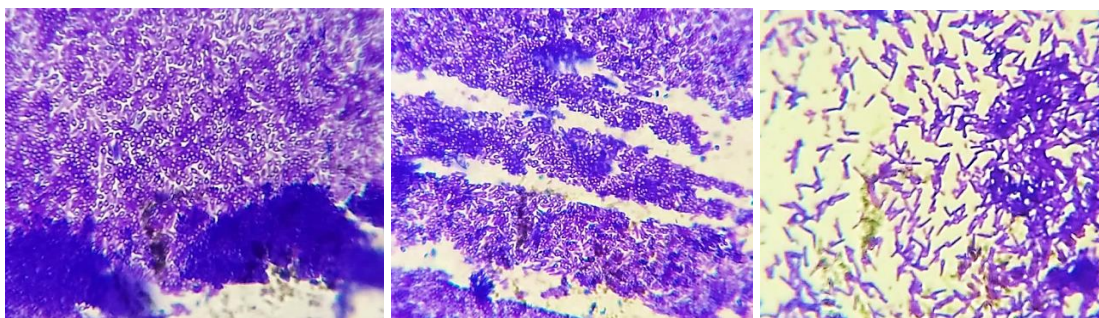


Figure 24: Caractérisation microscopique des biofilms formé sur les lames en verre.

4.3.2. Dispersion des biofilms :

La figure 25 montre les biofilms en phase de dispersion active semblable à ceux obtenu par Malek 2023, pour les spores de *B.cereus* et les bacilles thermophiles d'origine laitière et également décrite pour des biofilms formés dans les conditions dynamiques de culture continue (cellules a flux) . Ces résultats confirment le potentiel important de formation de biofilm chez la souche testée, et la rapidité de la dispersion obtenue par cette technique.

Dans la dispersion active, des cellules planctoniques sont libérées du biofilm en réponse à un stimulus antibiofilm, tel que la privation de nutriments ou la libération d'un signal de dispersion. Ainsi, le transfert de bactéries à partir du biofilm par dispersion revêt une signification cruciale en ce qui concerne la contamination croisée dans les industries alimentaires. La contamination croisée se produit lorsque les bactéries adhérentes se détachent

(cellules dispersées) et contaminent le produit lorsqu'il passe sur la surface, ce qui fait des biofilms la principale source de contamination bactérienne des produits finaux dans les usines de transformation laitière, notamment après la pasteurisation. Par conséquent, la compréhension et le contrôle de la dispersion des biofilms revêtent une grande importance pour prévenir la contamination croisée et améliorer la gestion des biofilms dans les industries alimentaires (Malek , 2023).

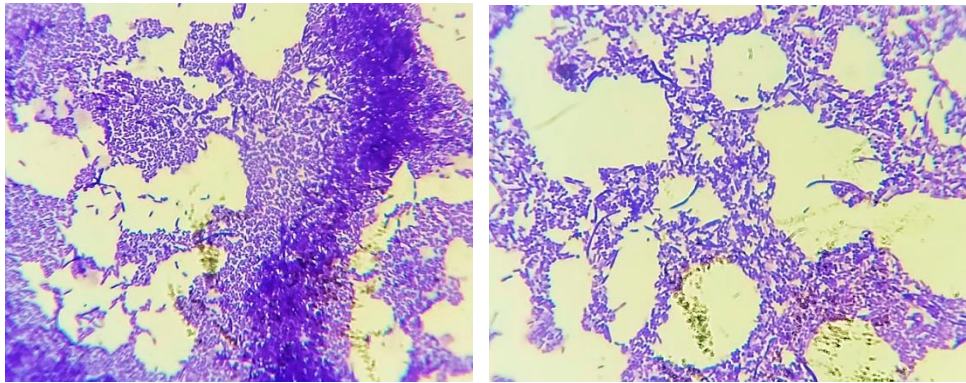


Figure 25 : Observation microscopique de phase de dispersion de biofilm

Conclusion

L'hygiène des installations et des équipements dans l'industrie laitière est essentielle pour assurer la qualité et la sécurité des produits, évitant ainsi les contaminations microbiennes. La présente étude porte sur l'évaluation de la qualité microbiologique des équipements dans une laiterie de la wilaya de Tlemcen. Les échantillons prélevés à partir des surfaces des équipements et de l'air ambiant et les analyses effectués ont permis de déterminer les niveaux de contamination microbiologique.

Les résultats ont révélé la présence de divers micro-organismes indicateurs d'hygiène et de pathogènes alimentaire. Les nombres de bactéries totales, de staphylocoques, d'Entérobactéries et de levures-moisissures variaient dans des plages spécifiques, indiquant une contamination variable des équipements.

L'analyse de l'air ambiant a montré que les mycètes étaient également présents soulignant l'importance de la contamination aéroportée. Les isolats fongiques identifiés sont caractérisés par une grande diversité de champignons filamenteux et de levure.

L'identification des isolats bactériens a révélé la présence d'*Escherichia coli*, de *Rahnella aquatilis*, de *Pantoea spp* et de *Leclercia adecarboxylata*, ainsi que plusieurs espèces de *Staphylococcus*, dont *Staphylococcus xylossus*, *S. epidermidis* et *S. aureus*. La présence d'*E. coli*, de *S. aureus* et de *R. aquatilis* soulève des préoccupations en termes de risque sanitaire. De plus, les résultats ont démontré un fort potentiel de formation de biofilm chez les souches bactériennes isolées, ce qui peut entraver l'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection, conduisant à la persistance des contaminations sur les équipements laitiers.

En conclusion, cette étude met en évidence l'importance de maintenir une hygiène rigoureuse et des protocoles de nettoyage/désinfection adéquats dans les installations laitières, et l'adoption d'une stratégie antibiofilm. Les résultats soulignent la nécessité d'une surveillance régulière de la qualité microbiologique des équipements pour prévenir les risques sanitaires et maintenir la qualité des produits laitiers.

Des mesures supplémentaires doivent être prises pour améliorer les protocoles de nettoyage et de désinfection, en mettant l'accent sur la prévention de la formation de biofilm et la réduction de la contamination par des agents pathogènes spécifiques tels qu'*E. coli* et *S. aureus*.

Cette étude constitue une base importante pour la mise en place de mesures préventives et d'interventions ciblées visant à garantir la sécurité et la qualité des produits laitiers dans l'industrie.

**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques :

1. Ankolekar C, Labbé RG, (2010). Physical characteristic of spores of food-associated isolates of the *B.cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:982-984
2. Amgar, A. (1998). Nettoyage et désinfection dans les entreprises alimentaires. ASEPT.
3. Basset, T., & Laffont, C. (2011). Les contaminations fongiques. *La Lettre de l'OCIM. Musées, Patrimoine et Culture scientifiques et techniques*, (138), 48-54.
4. Béal, C., & Helinck, S. (2019). Fabrication des yaourts et des laits fermentés
Augustin, J. C. (2015). Nouvelle approche de la gestion des risques microbiologiques dans les aliments. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 199(4-5), 639-650.
5. Bennett, S. D., Walsh, K. A., & Gould, L. H. (2013). Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* United States, 1998–2008. *Clinical infectious diseases*, 57(3), 425-433.
6. Bolzan, C. (2008). La validation de nettoyage en industrie pharmaceutique : validation des prérequis, principe et application au cas particulier d'une centrale de pesées (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
7. Botton, B., A. Breton, & Fèvre, M. (1990). Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle (p. 426). Paris : Masson.
8. Bourgeois, C. M., Mescle, J. F., & Zucca, J. (Eds.). (1996). *Microbiologie alimentaire : tome 1-Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Tec & Doc Lavoisier.
9. Branger Alain, Richer Marie-Madeleine, Roustel Sébastien., (2007). *Microbiochimie et alimentation*, © Educagri éditions, Dijon. 343 pages. ISBN : 978-2- 84444-558-2.
10. Bremer, P., Brooks, J., Flint, S., Palmer, J., Burgess, S., Lindsay, D., & Seale, B. (2018). *Biofilm Formation and Control in the Dairy Industry*.
11. Brian-Jaisson, F. (2014). Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines (Doctoral dissertation, Toulon).
12. Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., De Buyser, M. L., Collette, C., Garin-Bastuji, B., & Thorel, M. F. (1997). Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 16(1), 452-471
13. Buehler, A. J., Evanowski, R. L., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2017). Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. *Journal of dairy science*, 100(11), 8814-8825.

14. Camille Delarras, (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Lavoisier
15. Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021). Microbial biofilms in the food industry—A comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(04), 2014.
16. COHEN, N., & KARIB, H. (2006). Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés: Un réel problème de santé publique?. *Les technologies de laboratoire*, 1(1).
17. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., et Beachey, E.D. (1982). Adherence of coagulase –negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates, a quantitative model for adherence of *Staphylococci* to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6): 996-1006.
18. Dallagi, H., Jha, P. K., Faille, C., Alain, L. B., Rawson, A., & Benezech, T. (2023). Removal of biocontamination in the food industry using physical methods; an overview. *Food Control*, 109645.
19. Desmasures, N. (2016). Etudes physiologiques et moléculaires de l'adaptation des *Mucor* aux matrices fromagères (Doctoral dissertation, Université de Caen).
20. Eginton, P. J., Holah, J., Allison, D. G., Handley, P. S., et Gilbert, P. (1998). Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. *Letters in applied microbiology*, 27(2), 101-105.
21. Guiraud, J. P., & Rosec, J. P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire (Vol. 300). Afnor. Pages 225-228-199
22. Hery, M., Binet, S., Gagnaire, F., Gerardin, F., Hecht, G., & Massin, N. (2003). Nettoyage et désinfection dans l'industrie agroalimentaire : évaluation des expositions aux polluants chimiques. *Documents pour le médecin du travail*, 95, 333-350.
23. Jean-Paul, L. (1997). Microbiologie alimentaire : techniques de laboratoire. Lavoisier.
24. Joffin, C., Joffin, J. N., Figarella, J., & Leyral, G. (2010). Microbiologie alimentaire. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.
25. Lapointe-Vignola, C. (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses inter Polytechnique.
26. Makhlof, J. (2019). Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* isolées d'aliments commercialisés au Liban: approche moléculaire, métabolique et morphologique (Doctoral dissertation).

27. Malek, F. (2016). Evaluation of a non-submerged cultivation assay combined to ESEM imaging for analysis of biofilms formed by dairy-associated sporeforming bacteria. *African journal of microbiology research*, 10(32), 1263-1273.
28. Malek, F. (2019). Bactéries sporulées et biofilms : un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombinaison pasteurisé. *Canadian journal of microbiology*, 65(6), 405-420.
29. Malek, F. 2022. Flow of spore-forming bacteria between suppliers of dairy powders and users in some developing countries : Challenges and perspectives. *Journal of food sciences and technologies*. DOI: 10.1007/s13197-022-05495-0.
30. Malek, F. (2023). Microorganism Carrier-Surface Method as an Efficient Model for Microscopic Characterization of Biofilm Structure and Dispersion in Dairy Associated Spore-Forming Bacteria. *Journal of Food Engineering and Technology*, 12(1), 21-28.
31. Manon, L. (2021). Validation et optimisation du nettoyage dans l'industrie pharmaceutique : cas pratique dans un flux de production dédié
32. Mayoral, M. B., Martín, R., Sanz, A., Hernández, P. E., González, I., & García, T. (2005). Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. *International journal of food microbiology*, 105(1), 27-34.
33. Medeiros, A. C. D. A. P. (2016). Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées (Doctoral dissertation, Université Grenoble Alpes).
34. Merzougui, S., Lkhider, M., & Cohen, N. (2013). *Bacillus cereus*, a real problem for food industry. *ScienceLib Edition Mersenne*, 5, 2111-4706.
35. Mion, S., Rémy, B., Plener, L., Chabrière, É., & Daudé, D. (2019). Quorum sensing et quorum quenching: Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence?. *médecine/sciences*, 35(1), 31-38.
36. Mounier, M., Pestourie, N., Ploy, M. C., & Denis, F. (2009). Les détergents et les désinfectants: rôle en médecine (1re partie). *Antibiotiques*, 11(3), 177-184.
37. Müller, C., & Gassier, J. (2021). *Guide AS-Aide-soignant: Conforme à la réforme*. Elsevier Health Sciences.
38. OMS, G. (2005). *Hygiène alimentaire. Textes de base*.

39. Overney, A. (2016). *Persistence de Listeria monocytogenes dans les ateliers agro-alimentaire : influence de facteurs environnementaux et étude des mécanismes d'adaptation aux stress* (Doctoral dissertation, Paris Est).
40. Pan, Y., Breidt Jr, F., et Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and environmental microbiology*, 72(12), 7711-7717.
41. Piyush Kumar, J. H. A., Bénézech, T., Deleplace, M., & Faille, C. (2022). La contamination microbienne des surfaces des équipements dans les agro-industries. Les dangers dans la chaîne de transformation et de distribution des denrées alimentaires, 115.
42. Rivera, E. (2014) *Notions de base sur la conception d'équipements de Nettoyage En Place (NEP) utilisés dans les industries soumises aux BPF.*
43. Roux, A., & Ghigo, J. M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 159(3), 261-268.
44. Rozier, J., & Rozier, F. (1995). HACCP : de la théorie à quelques contraintes. *la Cuisine collective*
45. Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620.
46. Tash, K. (2005). *Rahnella aquatilis* bacteremia from a suspected urinary source. *Journal of clinical microbiology*, 43(5), 2526-2528.
47. Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.
48. Verdier, E. (2020). Contaminants dans les aliments: panorama des modes de contamination et des risques. Point pour la pratique du diététicien-nutritionniste. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55(2), 82-88.
49. Vidic, J., Chaix, C., Manzano, M., & Heyndrickx, M. (2020). Food sensing: detection of *Bacillus cereus* spores in dairy products. *Biosensors*, 10(3), 15.
50. Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., & Zara, S. (2020). Yeast biofilm in food realms: Occurrence and control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 1-10.

51. Zuliani, V., & Garry, P. (2004). Les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire. Bulletin de liaison du CTSCCV, 14(5), 23-29.
52. Zoz, F. (2016). Impact des fluctuations de l'humidité relative de l'air sur la survie de *Listeria monocytogenes*: application à l'amélioration de l'hygiène dans les ateliers de production alimentaire (Doctoral dissertation, Dijon).

Annexe

➤ **Tryptone-sel-eau (TSE)**

Eau distillée 1000 ml

NaCl 8.5g

Tryptone 1g

➤ **Milieux de cultures**

✧ **Tryptone soja agar (TSA)**

Poudre déshydraté 40g

Eau distillée 1000 ml

✧ **Potato dextrose agar (PDA)**

Poudre déshydraté 42g

Eau distillée 1000 ml

✧ **Chapman**

Poudre déshydraté 111g

Eau distillée 1000 ml

✧ **Mac conkey**

Poudre déshydraté 50g

Eau distillée 1000 ml

✧ **Bouillon -Trypton soja (TSB)**

Poudre déshydraté 30g

Eau distillée 1000 ml

➤ **Eau physiologique**

Eau distillée 1 000ml

NaCl 1g

➤ **Cristal violet**

Cristal de violet 2 g

Eau distillé 100ml

➤ **Solution dissolvante**

Ethanol 200 ml

Acide acétique glacial 50 ml

Eau distillé 250ml