

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Djilali- Bounaama de Khemis- Miliana

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre

Département: Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en

Microbiologie appliqué

Thème

**Isolement et identification de la microflore bactérienne des
canalisations pré et post-pasteurisation de lait recombiné d'une
usine laitière**

Soutenu Le 08/07/2019

Présentée par :

Belmebarki Mouna

Douha Sara

Devant le jury :

M^{me} Aiza.A	Présidente	MAA	UDB Khemis Miliana
M^{me} Zouadi.N	Examinatrice	MAA	UDB Khemis Miliana
M^{me} Didouh .N	Promotrice	MCB	UDB Khemis Miliana

Année universitaire : 2018 /2019

Remerciements

Nous commençant tout d'abord par rendre grâce à **ALLAH**, le tout puissant de nous avoir illuminé et ouvert les portes de savoir et nous avoir donné la volonté et le courage d'élaborer ce travail.

Ce travail n'aurait pu être effectué sans l'accord, le soutien et l'aide de plusieurs personnes.

Nous remercions nos promotrice M^{me} **Dr. Didouh.N** pour sa précieuse aide, ces orientations et le temps qu'elle nous accordons pour nos encadrement.

Nous adressons nos remerciement les plus respectueux aux membres du jury pour le grand honneur qu'il nous fond en acceptant d'examiner ce mémoire :

M^{me} **Zouadi.N**

M^{me} **Aiza.A**

Nous remercions profondément tous les enseignants qui m'ont encouragé et soutenu pendant nos cursus.

Nos remerciements vont également à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Un très grande merci, à l'ensemble du personnel du laboratoire de université à Telemcen , sans oublier laboratoire de **université de khemis miliana** et leurs équipes.

Merci a vous tous pour votre aide

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chers parents :

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, je vous dois beaucoup .merci grandement.

A mes chers frères : Mohammed Amine, Abdelkader pour leur appui et leur encouragement.

A mon fiancé : Azzedine pour son encouragement permanent, et son soutien moral.

A toute ma famille Amara pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire, surtout mes sœurs : Hadda et Aicha.

A mes amies : Nawel, Amira , Sara ,Nacera ,Fatiha , Asma, Nadjet pour tous les moments qui nous avons partagé.

A tous mes camarades de promotion de master II Microbiologie Appliquée.

Mouna

Dédicace

Je voudrais dédie ce modeste travail à :

A mes parents :

Sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Tout ce que j'ai accompli dans ma vie, c'est grâce à vous, à votre soutien, votre amour et vos sacrifices. Merci infiniment

A mon frère : Hakim, Mohamed, Sid Ahmed

A ma sœur : Fatma zohra, Khadidja, Kaouther, Chaïmaa

A ma tante : Zohra, Malika, Nabila, Souhila

A mes chères amies : Rima, Malak, Noura, Asma, Mouna, Samira, Nadjat, Chahinez, Kheira, Fatma zohra, Malika, Aïcha

A tous mes camarades de promotion de master II Microbiologie Appliquée.

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

Sara

Table de matière

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction 01

Partie I : Synthèse bibliographique

I.	Introduction sur le biofilm	03
II.	Les étapes de formation d'un biofilm	04
II.1	Le conditionnement de la surface par le milieu	05
II.2	L'adhésion des micros organismes	05
	a) Adhésion réversible	06
	b) Adhésion irréversible	06
II.3	Formation de micro colonie appelée aussi «maturation précoce	06
II.4	Maturation du biofilm	06
II.5	Dispersion du biofilm	06
III.	Composition et organisation	07
III.1	Composition	07
	III.1.1 Le micro organismes	08
	III.1.2 La matrice extra cellulaire ou (EPS)	08
III.2	Organisation	09
IV.	Facteurs favorisant la formation d'un biofilm sur les surfaces industrielles	10
V.	Le mécanisme régulateur de la formation de biofilm	10
VI.	Les biofilms dans l'industrie laitière	11
	VI.1 La microflore bactérienne du biofilm en industrie laitière	12
	VI.2 Les biofilms et la pasteurisation	13

Partie II : Matériel et méthodes

I.	Caractérisation des souches isolées	14
I.1	Origine des prélèvements	14

I.2	Nettoyage et désinfection des cylindres d'acier inoxydable	14
I.2.1	Méthode de prélèvement	14
I.3	Traitement des échantillons	15
I.3.1	Préparation des dilutions décimales	15
I.3.2	Ensemencement	15
I.3.3	Dénombrement	15
I.4	Purification	16
I.5	Conservation des souches	16
I.6	Identification des souches	16
I.6.1	Caractérisation morphologique des isolats	16
I.6.1.1	Aspect macroscopique des colonies	16
I.6.1.2	Aspect microscopique des isolats	16
I.6.2	Identification biochimique	19
I.6.2.1	Mise en évidence des enzymes respiratoires	19
a)	Recherche de la catalase	19
b)	Recherche de la cytochrome-oxydase	19
I.6.2.2	Identification le genre <i>Staphylococcus</i>	19
A.	Recherche de la coagulase	19
B.	Utilisation le milieu sélectif	19
C.	Le système API 20 STAPH	20
I.6.2.3	Identification des bacilles à Gram négatives	20
a.	Utilisation des galeries API 20 ^E	20
I.7	Détermination du potentiel de formation de biofilm	20

Partie III : Résultats et discussion

I.	Identification des isolats par les galeries API 20 E et API staph	21
II.	Evaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i>	27
II.1	La méthode du Rouge Congo Agar	27
Conclusion et perspectives		30
Références Bibliographiques		
Annexes		

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

ADN : Acide disoxy ribonucléique

AI : Auto Inducteur

ARN: Acide ribonucleique

CIP: **C**leaning **I**n **P**lace

EPS: Extracellular polymeric substances (Exo polysaccharides)

GN : Gélose nutritive

LDC : Lysine décarboxylase

ODC: Ornithine décarboxylase

ONPG: Orthonitrophenyl β galactoside

PCA: Plate count agar

PCR : polymérase chaîne reaction

PH : Potentiel Hydrométrique

PIA : Polysaccharide intercellular adhesin

QS: Quorum-sensing

RBS: (Chemical Products R. Borghraef s. a. Belgique)

RCA: Rouge congo agar

TSE : Tryptone-sel-eau

UFC : Unité formant colonies

Liste des figures :

Figure n°01 :	Différents types de biofilms présents en industrie agro-alimentaire	04
Figure n°02:	Paramètres impliqués dans la bio-adhésion bactérienne, la maturation et la structure des biofilms bactériens	05
Figure n°03:	Le cycle de vie du biofilm	07
Figure n°04:	Composition du biofilm	08
Figure n°05:	Facteurs influençant la formation et la structuration des biofilms industriel	10
Figure n°06:	Etapes d'identifications des bacilles à Gram-négatif	17
Figure n°07:	Schéma d'identification dichotomique des bactériens de groupe coque à Gram positif	18
Figure n°08:	la microflore bactérienne présente dans les canalisations pré et post pasteurisation durant la saison froide	22
Figure n°09:	la microflore bactérienne présente dans les canalisations pré et post-pasteurisation durant la saison chaude	24
Figure n°10:	Phénotype de production de slime par les souches sur milieu RCA	28
Figure n°11:	Répartition des souches isolées d'industrie laitière en fonction de production de slime bactérien	29

Liste des tableaux :

Tableau n° 01	Les principaux constituants de la matrice du biofilm	09
Tableau n°02	Répartition des isolats obtenus de différents sites de prélèvements au niveau de la laiterie pendant la saison froide.	21
Tableau n°03	: Répartition des isolats obtenus de différents sites de prélèvements au niveau de la laiterie pendant la saison chaude.	23

Résumé :

Les biofilm laitiers comportent un écosystème microbien (microbiote) complexe qui inclut des microorganismes pathogènes ou d'altération. Ces micro-organismes indésirables sont responsables de rejet des produits, même des maladies d'origine alimentaire.

Dans ce travail, 76 isolats sont caractérisés et identifier à partir des caractères morphologique et des testes biochimiques (API 20 E et API staph). 69 isolats à Gram négatifs (30 isolats présents dans la calalisation pré-pasteurisation et 46 isolats présents dans les canalisations post-pasteurisation) ont été identifiés en tant que *Aeromonas* (6), *Myroides* (36), *Burkholderia* (9), *Serratia* (7), *Chryseobacterium* (3), *Enterobacter* (6), *Yersinia* (1) et *Bordetella* (1). 7 isolats à Gram positif ont été identifiés en tant que *Staphylococcus* (7). L'évaluation de la capacité de la microflore adhéree à former le biofilm montre qu'uniquement 26 isolats capable de produire le slime. Après l'évaluation des microorganismes présents à la surface des équipements d'une usine laitière, les résultats nous a montré une contamination dans les canalisations du lait recombinaée même après nettoyage et désinfection et une pasteurisation. L'évaluation de l'efficacité de processus de pasteurisation contre les biofilms présents sur les surfaces en acier inoxydable a révélés une biodiversité bactérienne. Enfin, Cette étude souligne que la connaissance des microorganismes attachés aux surfaces laitières peut aider au développement de stratégies pour améliorer les paramètres opérationnels optimaux (Temps / T C°) pour les processus de pasteurisation.

Les mots clés : Biofilm, canalisation post et pré pasteurisation, lait recombinaée, slime.

Abstract :

Dairy biofilms contain a complex microbial (microbiotic) ecosystem that includes pathogenic or spoilage microorganisms. These undesirable microorganisms are responsible for rejecting products, even food-borne diseases.

In this work, 76 isolates are characterized and identified from morphological characters and biochemical tests (API 20 E and API staph). 69 Gram-negative isolates (30 isolates present in the pre-pasteurization pipelines and 46 isolates present in post-pasteurization pipelines) have been identified as *Aeromonas* (6), *Myroides* (36), *Burkholderia* (9), *Serratia* (7), *Chryseobacterium* (3), *Enterobacter* (6), *Yersinia* (1) and *Bordetella* (1). Seven Gram-positive isolates have been identified as *Staphylococcus* (7). The evaluation of the ability of the adhered microflora to form the biofilm shows that only 26 isolates capable of producing slime. After the evaluation of the microorganisms present on the surface of the equipments of a dairy industry, the results showed us a contamination in the pipelines of the recombined milk even after cleaning and disinfection and pasteurization. Evaluating the effectiveness of pasteurization processes against biofilms on stainless steel surfaces has revealed bacterial biodiversity. Finally, this study emphasizes that knowledge of microorganisms attached to dairy surfaces can help to develop strategies to improve optimal operational parameters (Time / T C °) for pasteurization processes.

Key words: Biofilm, post canalization and pre pasteurization, recombinant milk, slime.

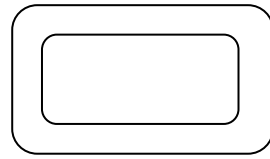
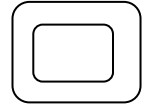
الملخص :

الأغشية الحيوية للألبان لديها نظام بيئي معقد (ميكروبيولوجي) يتضمن الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض أو اتلاف الأغذية. هذه الكائنات الحية الدقيقة غير المرغوب فيها هي المسؤولة عن رفض المنتجات ، حتى الأمراض التي تنقلها الأغذية.

في هذا العمل ، تم تمييز 76 عزلة و تحديدها من الصفات المورفولوجية و الاختبارات الكيميائية الحيوية حيث تم التعرف على 69 عزلة سالبة الجرام (30 عزلة موجودة في معايرة ما قبل البسترة و 46 عزلة موجودة في خطوط ما بعد البسترة) و هي (*Chryseobacterium* (3)، *Serratia* (7)، *Burkholderia* (9)، *Myroides* (36)، *Aeromonas* (6) و *Enterobacter* (6) و *Bordetella* (1) و *Yersinia* (1).

اما العزلات السبعة فهي ايجابية الجرام ،من مجموعة المكورات العنقودية (7) . يظهر تقييم قدرة البكتيريا الدقيقة الملتصقة على تشكيل الغشاء الحيوي أن 26 عزلة فقط قادرة على إنتاج slime . بعد تقييم الكائنات الحية الدقيقة الموجودة على سطح معدات مصنع الألبان ، أظهرت النتائج لنا تلوثاً في خطوط أنابيب الحليب المعاد تجميعه حتى بعد التنظيف والتطهير والبسترة. كما كشف تقييم فعالية عمليات البسترة ضد الأغشية الحيوية على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ عن التنوع البيولوجي الجرثومي. و أخيراً ، تؤكد هذه الدراسة على أن معرفة الكائنات الدقيقة المرتبطة بسطح الألبان يمكن أن تساعد في تطوير استراتيجيات لتحسين الاعدادات التشغيلية المثلى (الوقت / درجة مئوية) لعمليات البسترة.

الكلمات المفتاحية : الغشاء الحيوي (البيوفيلم) ، قناة ما بعد البسترة ، قناة ما قبل البسترة ، الحليب المعاد تجميعه, Slime.



Introduction

La contamination de lait par une flore microbienne varié survient entre le moment de la traite , le moment où il arrive à l'usine et où il va être transformé. Cette microflore connaît des évolutions durant le processus technologique, et de nombreuses sources de contamination sont identifiées le long de la chaîne de production, en particulier les équipements laitiers siège de la formation des biofilms (**Malek et al., 2013**).

Le lait souvent un milieu idéal pour la croissance microbienne y compris les micro organismes pathogènes pour l'homme dont l'ingestion peut causés différentes pathologies (**Amiot et al., 2002**) si les conditions de production et d'entreposage ne sont pas bien contrôlées. Donc, les consommateurs doivent être attentifs aux qualités sanitaires du lait. Ainsi durant la traite, la collecte et les différentes étapes de transformation, le lait peut subir des modifications des paramètres physico-chimiques et des contaminations microbiologiques pouvant constituer des risques sanitaires pour les consommateurs.

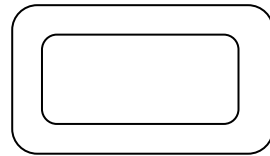
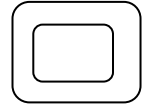
L'industrie laitière, est en effet très sensible au sujet de biofilm car ils nuisent la qualité du lait et sont responsables de la diminution de sa durée de vie. Pour lutter contre le problème des biofilms, des efforts sont réalisés pour améliorer le design des équipements, en diminuant la rugosité de l'acier inoxydable et rendre l'intérieur des tuyauteries aussi lisses que possible afin d'éviter l'adhésion des bactéries. En effet plus la surface est rugueuse plus les bactéries peuvent adhérer (**Géry, 2007**). Les efforts visent aussi l'optimisation des procédures de nettoyage- en- place ou CIP (Cleaning-In-Place), via l'utilisation de formulation complexe associant plusieurs produits de nettoyage à action complémentaire, comme les détergents alcalin- chlorés ou les détergents enzymatique (**Faile et al.,2010**).

Les biofilms bactériens qui se développent sur les surfaces des équipements des lignes de production du lait pasteurisé, sont composé d'une flore émergente favorisée par les conditions du processus technologique.

L'objectif de ce travail est d'isoler, identifier, caractériser la microflore bactérienne qui contamine les canalisations pré et post-pasteurisation du lait recombinaison d'une usine laitière et aussi de déterminer la capacité des bactéries à former des biofilms.

Ce mémoire comporte trois grandes parties :

- 1.** Une mise au point bibliographique traitant du biofilm en industrie agroalimentaire et des problèmes qu'il génère.
- 2.** Une démarche expérimentale afin d'évaluer le processus de pasteurisation à travers l'identification de la flore bactérienne constitutive des biofilms sur les segments post et pré-pasteurisation du lait recombinaé et la capacité des souches à former les biofilms.
- 3.** Résultats et discussion donne des résultats très pertinents et très clairement argumentés. Ce travail s'achève par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail. Les futures recherches devraient se concentrer sur la structure ainsi que le comportement des communautés bactériennes des canalisations des usines laitières.



Partie 1: Synthèse bibliographique

I. Introduction

Le terme "Biofilm" a été proposé pour la première fois par Costerton et son équipe, en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes (**Costerton, 1978**).

Les biofilms sont des communautés microbiennes hétérogènes ou homogènes (dans le cas expérimental), qui peuvent se composer d'une seule espèce bactérien, de champignons, ou plus fréquemment peuvent être poly-microbiens (**Philips *et al.*, 2011**).

Les biofilms bactériens sont formés par des communautés qui sont intégrées dans une matrice autoproduite de substances polymères extracellulaires (EPS) (**Felemming *et al.*, 2016**), adhéree à une surface qu'elle peut être biotique ou abiotique tels que les canalisation des usines de production agroalimentaire (**Tremblay *et al.*, 2014**).

L'organisation, la forme, et la densité de ces assemblages ne sont pas liées au hasard, cette construction est une réponse à la variation de conditions écologiques (**Melechiour *et al.*, 2006**).

Les différentes espèces bactériennes qui peuvent former des biofilm sur les surfaces d'industrie agroalimentaire sont représentées sur la **Figure n°01**.

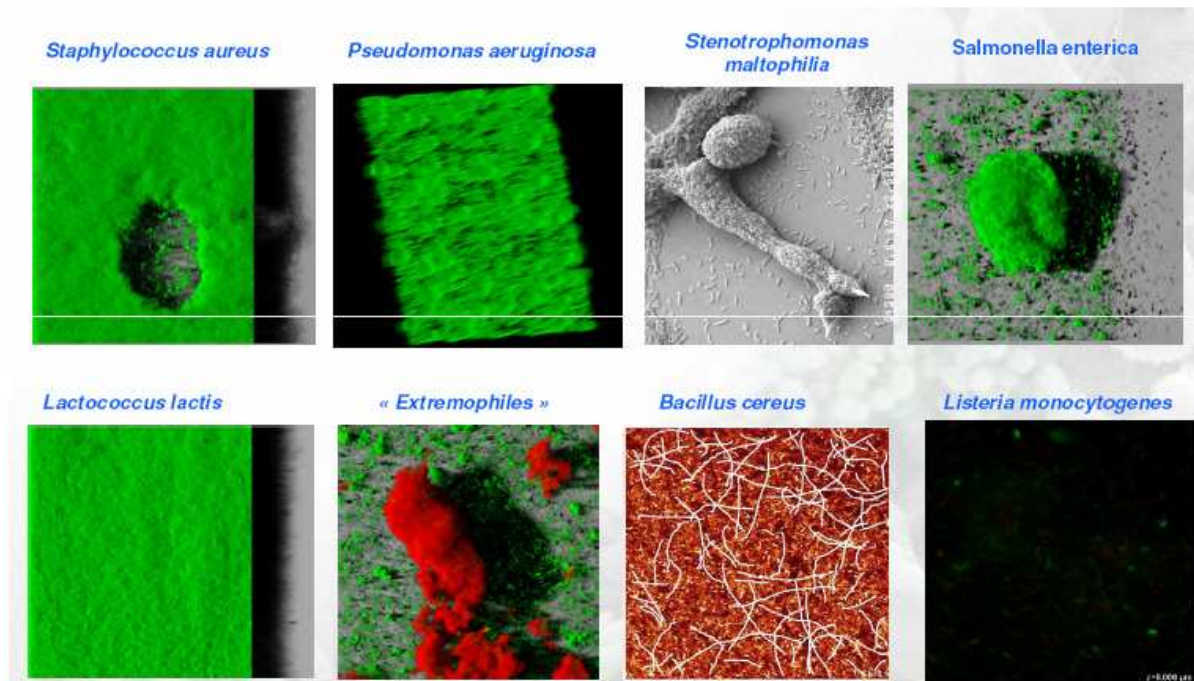


Figure n°01 : Les différents types de biofilms présents en industrie agro-alimentaire
(Briandet *et al.*, 2012)

II. Les étapes de formation de biofilm

La formation des biofilms bactériens sur une surface solide immergée en milieu aqueux est un phénomène complexe dans lequel de nombreux paramètres sont impliqués (Le virginie,2008). La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes présentées sur la figure n°02.

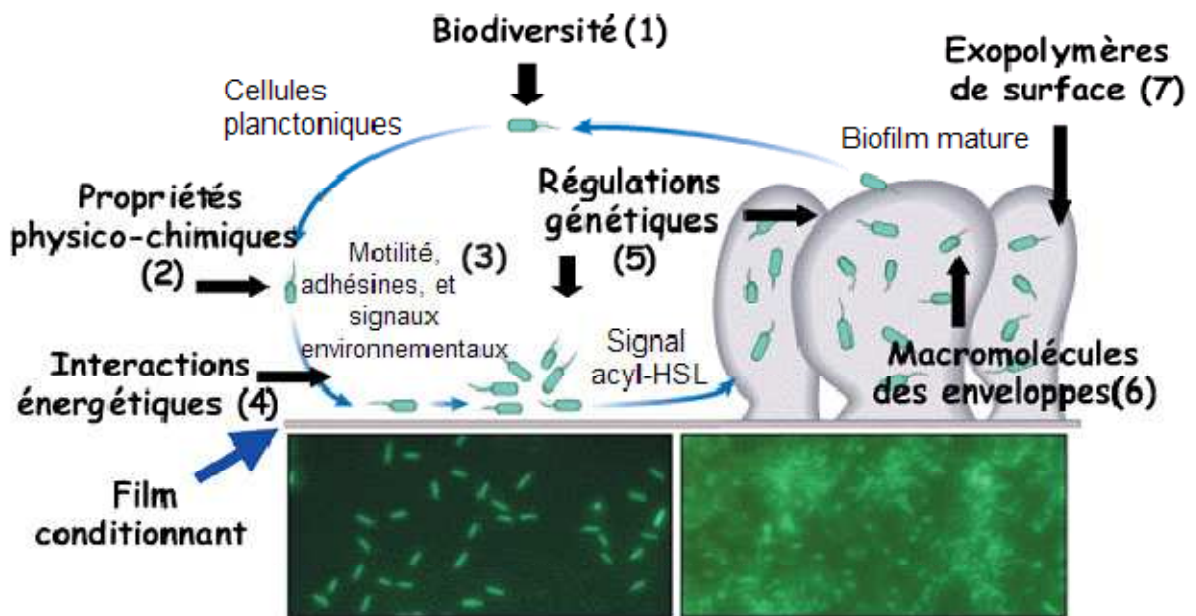


Figure n°02 : Paramètres impliqués dans la bio-adhésion bactérienne, la maturation et la structure des biofilms bactériens (Haras, 2005).

II.1 Le conditionnement de la surface par le milieu

En premier lieu, la surface est le siège d'une adsorption des composés du milieu tels que des molécules organiques et des ions, conduisant à la formation d'un film conditionnant qui modifie les propriétés physico-chimiques de la surface externe du matériel. Ce film organique est capable de neutraliser partiellement la charge nette et l'énergie libre de la surface, phénomène qui peut prévenir l'approche des bactéries de la surface. C'est en présence de ce film conditionnant que se fait l'adhésion des micro-organismes. Parmi les molécules adsorbées, se trouvent des éléments nutritifs qui sont plus concentrés aux interfaces que dans la phase liquide (Le virginie, 2008).

Ce phénomène crée des micro niches favorables à l'adhésion des bactéries qui trouvent ainsi des nutriments disponibles et/ou des molécules organiques avec lesquelles elles peuvent engager des interactions spécifiques (Le virginie, 2008).

II.2 L'adhésion des micro-organismes

a) Adhésion réversibles

Appelée aussi étape initiale C'est le contact entre la bactérie et substratum mettant en jeu les forces attractives de Van Der Waals, et les forces électrostatiques répulsives (Chmielawski et Frank, 2003).

b) Adhésion irréversibles

Grâce à la sécrétion d'exopolymère par les bactéries favorisant leur fixation à un support et conduisant à des fortes interactions avec des liaisons covalentes entre les bactéries et la surfaces, dues à la présence de flagelles, des pilis et des adhésines (Vallet *et al.*, 2001).

II.3 Formation de micro colonie appelée aussi « maturation précoce »

Une fois l'attachement des bactéries irréversibles, les bactéries commencent à se diviser et à former des micro colonies (Chmielewski et Frank, 2003) qui vont recouvrir toute une partie de la surface (Stanley *et al.*, 2003).

II.4 Maturation du biofilm

Au sein d'un biofilm mature, les microorganismes sont séparés par des canaux qui forment un réseau de circulation permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfuies du biofilm et d'autre part d'évacuer les déchets (Filloux et Vallet, 2003). Le développement des micro colonies traduit le stade de maturation du biofilm et la colonisation de nouvelle surface (Roux *et al.*, 2006).

II.5 Dispersion du biofilm

Lorsque le biofilm est épais, il peut subir un phénomène de détachement bactérien. Sous l'effet de certain stress, les micro colonies peuvent se dissocier du biofilm. Par ailleurs, dans des conditions environnementales défavorables, certaines bactéries sont capables de se détacher elles-mêmes de la surface. *Streptococcus sp* peut synthétiser des enzymes qui hydrolysent ses liaisons avec les protéines de surface. Retournant à l'état planctonique dans le liquide, les bactéries peuvent coloniser alors des milieux plus propices (Bouchard, 2015).

Le cycle de vie des biofilms peut être schématisé en plusieurs étapes séquentielles qui sont représentées sur la Figure n°03.

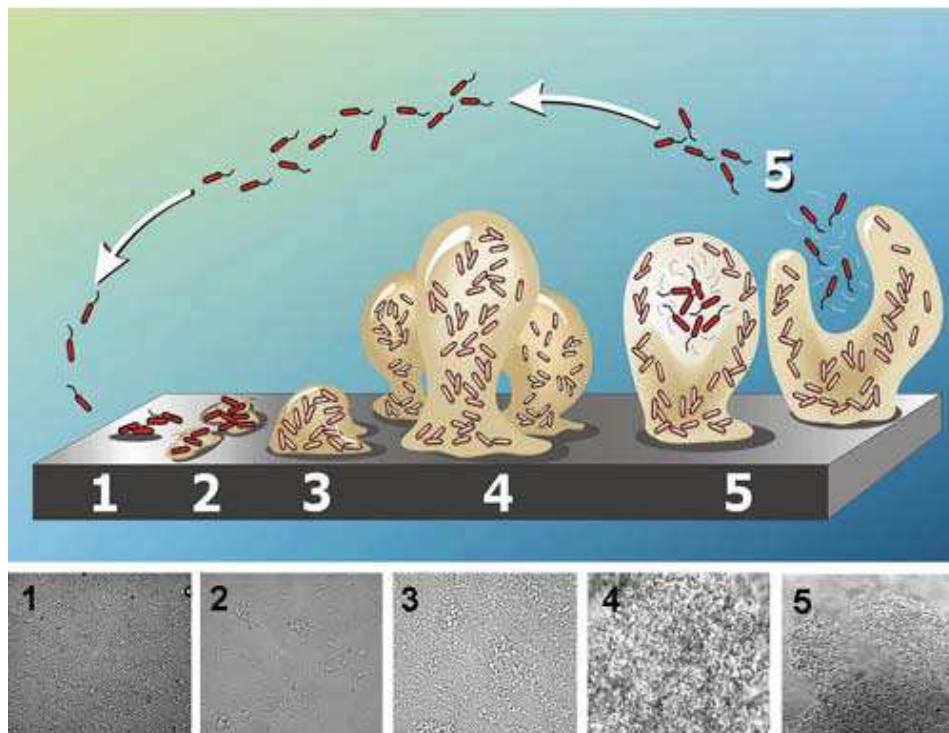


Figure n°03: Le cycle de vie du biofilm (Parot, 2007)

III. Composition et organisation

III.1 Composition

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les micro-organismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. Les micro-organismes représentent 2 à 15 % du matériel du biofilm alors que la matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée d'un biofilm [inclue des protéines (1-2%), des enzymes, l'ADN (1 %), polysaccharides (1-2 %) et l'A.R.N (1 %) (Muhsin *et al.*, 2015).

Les composants des biofilms sont représentés sur la **Figure n°04**.

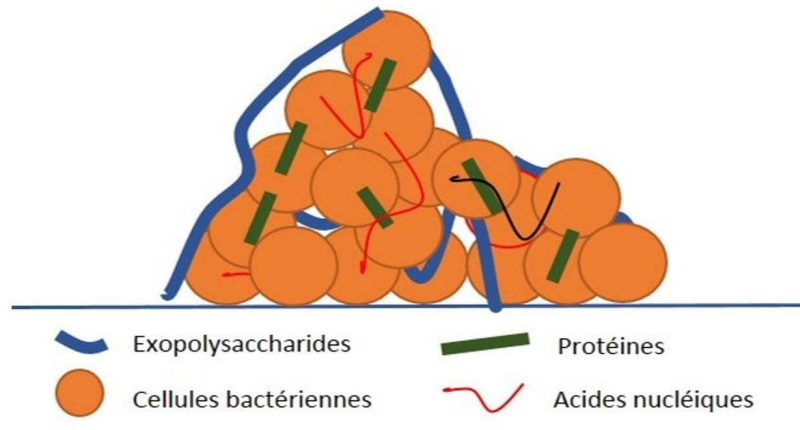


Figure n°04: Composition du biofilm (Lister *et al.* 2014)

III.1.1 Les microorganismes

Les biofilms sont des communautés bactériennes au sein desquelles on peut trouver de nombreuses espèces différentes. Les bactéries planctoniques vont s'attacher sur une surface en réponse à un certain nombre de stimuli environnementaux et nutritionnels. (Filloux et Vallet, 2003).

III.1.2 La matrice extra cellulaire ou (EPS) :

Les EPS sont des biopolymères d'origine microbienne dans lesquelles des microorganismes du biofilm sont emprisonnés. Les EPS ne contiennent pas de polysaccharides seulement, mais comprennent, en outre, une grande variété de protéines, des glycoprotéines et des glycolipides et, dans certains cas, des quantités surprenantes de l'ADN extracellulaire (e-ADN). En plus, les EPS maintiennent les cellules en biofilm, retiennent l'eau, fixent des biofilms sur les surfaces et à travers leurs propriétés de sorption, permettent de séquestrer des substances dissoutes et particulaires de l'environnement, en apportant des nutriments pour les microorganismes en biofilm (Flemming et Wozniak, 2007).

La composition de la matrice varie selon l'espèce et les conditions de croissance (Hatroubi *et al.*, 2014 ; Muhsin *et al.*, 2015).

Les principaux constituants de la matrice du biofilm sont représentés sur le tableau n°01.

Tableau n°01 : Les principaux constituants de la matrice du biofilm (Lu, 2007)

	Composant	% de matrice
1	Cellules microbienne	2-5 %
2	ADN et ARN	< 1-2 %
3	Polysaccharides	1-2%
4	Proteines	< 1-2 % 5 inclus les enzymes
5	Eau	Jusqu'à 97 %

III.2 Organisation

Les microorganismes sont organisés au sein de la matrice sous forme de micro-colonies. Les micro-colonies au sein des biofilms sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et d'autre part d'évacuer les déchets (**Branger, 2007**).

Le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'EPS et être utilisé par les bactéries. Un gradient de nutriments et d'oxygène est observable depuis le sommet du biofilm jusqu'à sa base où l'on a un microenvironnement anaérobie. Cette observation conforte l'idée selon laquelle l'état métabolique d'une bactérie à l'intérieur d'un biofilm dépend de sa localisation au sein de la structure (**Branger, 2007**).

Le biofilm n'est pas un environnement homogène car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments et qui présentent des valeurs de pH différentes. Les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (**Branger, 2007**).

IV. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm sur les surfaces industrielles

Les mécanismes de formation des biofilms et leur organisation structurale résultent essentiellement d'interactions entre l'environnement, la flore microbienne et les matériaux (**Figure n°05**). Ils sont influencés par certains paramètres tels que : l'oxygénation, le pH, la température, l'accès à la lumière, la quantité de matière organique en ce qui concerne l'environnement, la nature du matériau, la microstructure, l'état de surface pour le matériau, le métabolisme, les polymères sécrétés et les interactions cellulaires entre les micro-organismes (**Salta et al.,2013**).

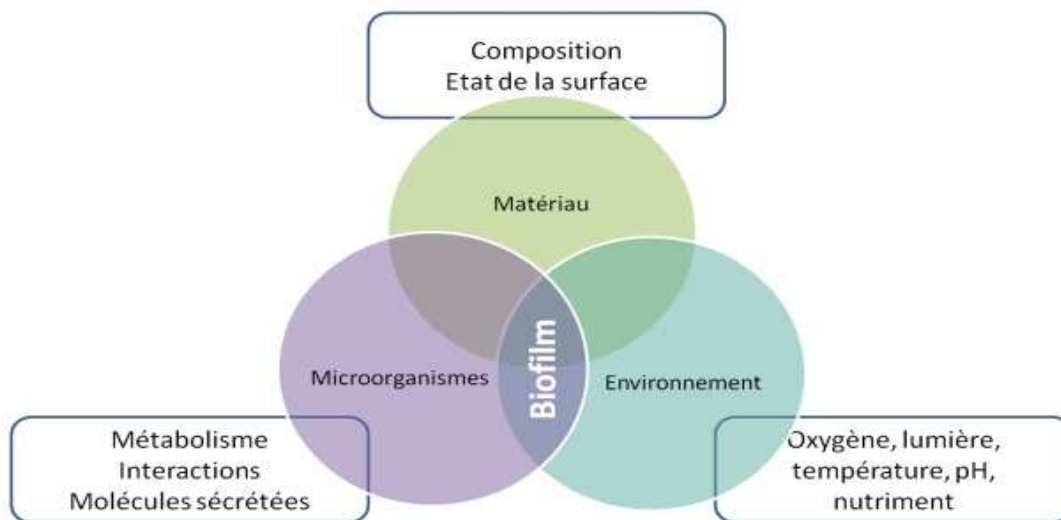


Figure n°05 : Facteurs influençant la formation et la structuration des biofilms industriel (Doghri, 2015).

V. Le mécanisme régulateur de la formation de biofilm

Au sein d'un biofilm, les micro-organismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules. Ces derniers, appelés « quorum sensing », jouent un rôle important dans le développement et la régulation de la formation des biofilms.

Le quorum sensing (Q.S) est un système de communication bactérien qui implique la production et la détection de signaux extracellulaire. Le Q.S permet aux bactéries de

contrôler et répondre à leur propre densité cellulaire et leurs aptitudes au sein de biofilm (Darch ,2018).

Le Q.S a plusieurs rôles :

- *régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm.
- * Il initie les phénomènes de dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm
- *Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases.
- *Il jouerait un rôle dans l'établissement d'antibiorésistance.
- * Il joue aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme les protozoaires.

Il existe plusieurs classes de molécules du quorum sensing qui se diffèrent selon les types de bactéries de petites molécules signal appelées auto-inducteurs (AI). Chez les bactéries à Gram négatifs, l'auto-inducteur est une homosérine lactone, alors que chez les bactéries à Gram positif, c'est un oligopeptide appelé phéromone (Tremblay *et al.*, 2014).

VI. Les biofilm dans l'industrie laitière :

L'étude des biofilms (isolement et identification) dans le milieu des industries alimentaires y compris les secteurs des produits laitiers relève, pour une grande part la sécurité sanitaire des aliments (qualité des produits laitiers qui est affecté par les biofilm) (Srey *et al.*, 2013)et d'autre part la qualité de surface des appareils qui est affecté par ce dernier qui induit une corrosion des surfaces métalliques alimentaires qui diminuer le transfert de chaleur dans les échangeurs thermiques (Simôes *et al.*,2010).

La formation de biofilm peut avoir lieu dans les différents sites de la chaîne de transformation du lait, les équipements laitiers, principalement les tanks de stockage du lait et le système de canalisation ainsi que les appareils de traitement tels que les pasteurisateurs et des évaporateurs (sont reconnus pour être une source de contamination du lait traité par des germes d'altérations ainsi que des pathogènes (Salutiano *et al.*, 2010 ; Marchand *et al.*, 2012).

Le développement des biofilms sur les équipements laitiers est très rapide (8-12 h), avec des nombres de bactéries souvent supérieurs à 10^6 bactérie/cm² (**Bremer et al., 2009**). Le risque de transfert de ces bactéries au lait qui circule dans les lactoducs est grand, ce qui implique la contamination microbienne des produits laitiers transformés et la diminution de leur sécurité et sa durée de vie.

VI.1 La microflore bactérienne du biofilm en industrie laitière :

La flore constitutive du biofilm en industrie laitière peut-être variée et comprendre de nombreuses espèces aussi bien Gram+ que Gram-, telles que *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Pseudomonas* et certaines entérobactéries (**Burgess et al., 2010**).

La variation de la flore est due à des pression sélectives la chaleur, les résidus alimentaires, le pH et l'activité de l'eau.les bactéries qui forme le biofilm sur l'acier inoxydable, peuvent être former d'une monocouche dans les usines qui régulièrement font des cycles de nettoyage au niveau des sites ou' les forces de cisaillement sont élevées (**Burgess et al.,2010**).

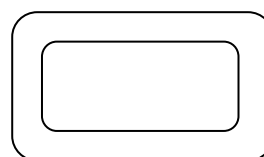
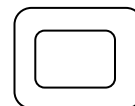
Les bactéries dans les biofilm sont protégées contre les désinfectants en raison de la coopération multi spécifique et de la présence des substances polymériques extracellulaires (EPS), qui favorise leur survie et leur contamination ultérieure des produits laitiers(**Marchand et al .,2012**).En effet, les biofilms sont composés d'espèces bactérienne spécifiques qui sont bien adaptés pour survivre à des facteurs d'extrinsèque (chaleur) et d'intrinsèques (pH, sel) qui sont associés à la transformation du lait (**Marchand et al.,2012**).

Il est bien documenté que les bactéries fréquemment rencontrées dans l'environnement laitier capables de former des biofilms appartiennent au genre *Enterobacter* , *Listeria* (**Vilar et al., 2007**), *Bacillus spp.*, y compris l'espèce *B. cereus* (**Didouh et al., 2015 ; Fernandes et al., 2014**), *Pseudomonas spp.*, incluant *P. fluorescens* (**Aswathanarayan et Vittal, 2014**), *Serratia spp*, *Staphylococcus sciuri* et *Stenotrophomonas maltophilia* (**Cleto et al.,2012**), *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* (**Lee et al., 2014 ; Michu et al., 2011**), *Klebsiella* (**Garedew et al., 2012**), *Proteus*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Moraxella*,), *Enterococcus spp.*, y compris *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,» *L.monocytogenes* (**Fernandes et al., 2015a et Latorre et al., 2010**), *Bacillus licheniformis* et *Lactobacillus paracasei* (**Dat et al., 2012**).

VI.2 Les biofilms et la pasteurisation :

Un problème récurrent en industrie laitière est la qualité microbiologique du lait pasteurisé. La pasteurisation n'assure pas la destruction complète de la flore de contamination du lait et sélectionne les bactéries sporogones (**Aires *et al.*, 2009**). En effet, malgré les progrès réalisés dans la technologie laitière, la contamination du lait spécialement par les bactéries productrices de spores demeure une barrière biologique spécifique qui limite la durée de vie et la qualité des laits traités thermiquement (**Ranieri *et al.*, 2009**).

Les micro-organismes dans les biofilms laitiers catalysent des réactions chimiques et biologiques responsables de la corrosion des métaux dans les canalisations de pasteurisation et les réservoirs, et ils peuvent réduire l'efficacité de transfert de chaleur si les biofilms deviennent suffisamment épais (**Simões *et al.*, 2010**). Ce problème de transfert de la chaleur mène à une pasteurisation qui n'assure pas la destruction complète de la flore de contamination du lait et sélectionne les bactéries sporogones (**Srey *et al.*, 2013**).



Partie II: Matériel et méthodes

I. Caractérisation des souches isolées :

L'objectif de ce travail est d'isoler, identifier et de caractériser la microflore qui contamine les équipements de transformation du lait recombinaé produit par une usine et de déterminer la capacité des bactéries à former des biofilms.

Cette partie a été réalisée au laboratoire de Microbiologie de l'Université Djilali Bounaama Khemis-Miliana.

I.1 Origine des prélèvements :

Le prélèvement a été effectué au niveau de l'usine laitière (au Tlémcen) durant la période s'étalant de mois septembre 2018 au mois juin 2019.

Au total 12 prélèvements ont été réalisés à partir des canalisations du lait recombinaé pré-pasteurisation et post-pasteurisation (6 prélèvements durant la saison chaude et 6 prélèvements durant la saison froide. Chaque 21 jours, nous prenons un échantillon).

I.2 Nettoyage et désinfection des cylindres d'acier inoxydable

Les cylindres d'acier est de 7 cm de longueur sur 5 cm de diamètre sont soumis à un protocole de nettoyage. Ils sont d'abord mélangés à un détergent alcalin fort de la gamme RBS (Chemical Products R. Borghraef s. a. Belgique) et frottés un à un et à température ambiante entre les deux mains munies de gants abrasifs (de type Mappa®) puis rincés rapidement en frottant sous l'eau distillé. Le cylindre est mis dans un bécher de 400 mL. Le bécher est alors rempli de détergent RBS à 5% à 60°C pendant 10 min. Le premier rinçage se fait par l'eau distillé par débordement pendant 5 min. La veille de l'essai, on place les cylindres dans un bécher propre et sec. On recouvre de papier d'aluminium. Les coupons sont stérilisés au four Pasteur pendant 1 h à 180°C (2 h à partir de la T° ambiante). A partir de ce moment, Les cylindres sont manipulés à l'aide de pinces stériles pour les essais d'adhésion (Faïlle *et al.*, 2001).

I.2.1 Méthode de prélèvement

Les prélèvements sont effectués par l'insertion d'un cylindre d'acier inoxydable (fournit par l'usine) au niveau de la canalisation pré et post pasteurisation pendant 7 jours afin d'avoir un biofilm mature. Après cette durée les cylindres ont été récupérées dans des bocaux stérile en verre contient une solution de dilution : tryptone-sel-eau (TSE) (Voir annexe 01) pour assurer une récupération maximale des germes adhéés aux surfaces des cylindres.

Les prélèvements sont transportés et conservés dans une glacière (4°C) jusqu'au laboratoire. Le traitement de l'échantillon est différé au lendemain.

I.3 Traitement des échantillons :

Les bocaux de TSE (2% Tween 80) contenant les écouvillons sont mis dans un bain à ultrason pendant 2 min 30s puis agités pendant une minute au vortex (cette opération est faite deux fois) pour détacher les germes et constituer la solution mère, qui servira à la préparation des autres dilutions décimales (**Faille et al., 2001**).

I.3.1 Préparation des dilutions décimales :

Une série de dilutions successives est appliquée aux échantillons dans l'eau physiologique. Un millilitre de la dilution mère (10^{-1}) est prélevé aseptiquement à l'aide d'une micropipette et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi la dilution 10^{-2} et on répète la même procédure en prélevant 1ml à partir de la dilution 10^{-2} et en l'introduisant aseptiquement dans un tube à essai contenant 9 ml du diluant (**Guiraud, 2003**). On réalise des dilutions jusqu'à la dilution 10^{-10} .

I.3.2 Ensemencement :

Les ensemencements se font en surface dans le milieu gélosé de PCA (**Voir annexe 02**) : On dépose 0,1 ml de chaque dilution (généralement de dilution 10^{-7} jusqu'à 10^{-10}) sur le milieu PCA, puis on utilise des billes en verre pour étaler uniformément et stérilement cet inoculum sur la gélose. Les boîtes ensemencées seront incubées à 37°C pendant 24h.

I.3.3 Dénombrement :

Après l'incubation, les colonies obtenues ont été dénombrées dans le milieu PCA : Lors de l'isolement, nous avons essayé de respecter le ratio isolat/morphotype. En effet le nombre de colonies sélectionnées dépendait du nombre total des colonies du type morphologique en question présentes dans la boîte de Pétri. Dans tous les cas nous avons prélevé au maximum 5 colonies par boîte de Pétri. On prend en considération les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies (**Cheriguene et al., 2007**). Les résultats sont exprimés en UFC par cm^2 de suspension encrassant (**Faille et al., 2001**).

I.4 Purification :

La purification des souches a été réalisée par passages successifs et alternés sur le milieu gélosé de PCA incubé 24h à 37°C. Généralement trois passages alternés sont effectués.

La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (Guiraud, 2004).

I.5 Conservation des souches :

Les souches isolées ont été conservées à court terme sur GN (Voir annexe 03) inclinée à 4°C . Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par des stries et incubées à 37°C pendant 18h.

Les souches identifiées sont conservées à long durée par congélation dans du bouillon nutritif additionné de glycérol v/v (Peng, 2001).

I.6 Identification des souches :

Après vérification de leur pureté, les isolats bactériens ont compris les examens microscopiques après la coloration de Gram et les tests biochimiques.

I.6.1 Caractérisation morphologique des isolats :

Afin de vérifier les caractères morphologiques de nos souches (Gram, type d'association), nous avons effectué une étude macroscopique et microscopique avec coloration de Gram et leurs caractères cultureux (couleur, disposition, forme et aspect) (Guiraud, 2003).

I.6.1.1 Aspect macroscopique des colonies :

Sur la base des caractères morphologiques suivants : la taille, la forme des colonies, l'aspect des contours, et la couleur, une première caractérisation pour chaque morphotype a été déterminée sur un milieu gélosé PCA.

I.6.1.2 Aspect microscopique des isolats :

L'examen consiste à vérifier la morphologie, l'arrangement cellulaire, la réponse à la coloration de Gram de l'isolat, le mode de regroupement, la mobilité.

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par **Delarras (2007)** (**Voir Annexe 04**). Les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose (**Delarras, 2007**).

Les isolats ont été examinés pour la morphologie des cellules et la réaction de Gram. Les isolats ont été divisés en deux groupes, bacilles à Gram-négatif et Cocci à Gram positives.

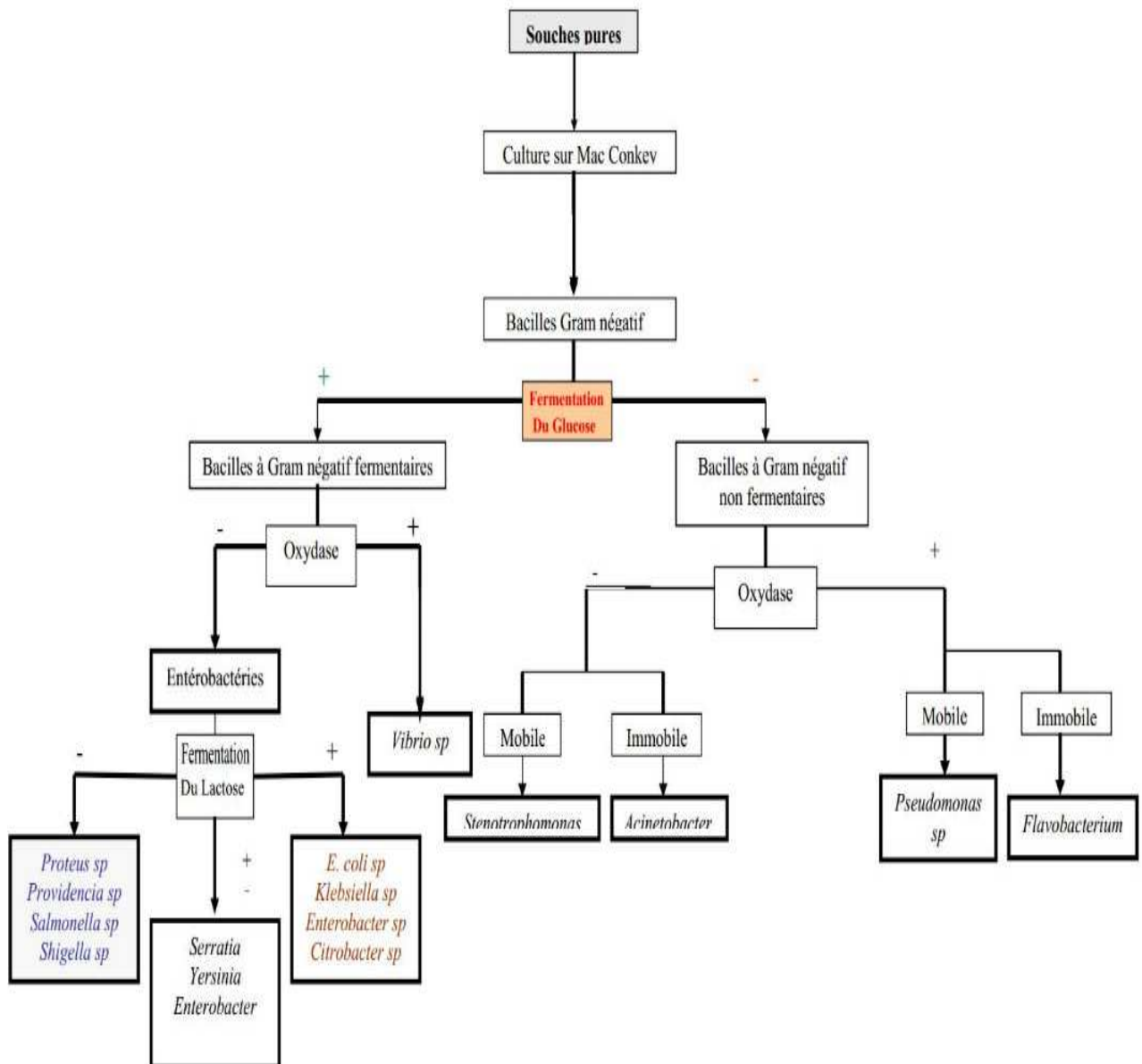


Figure n°06: Etapes d'identifications des bacilles à Gram-négatif.(Martin, 2011)

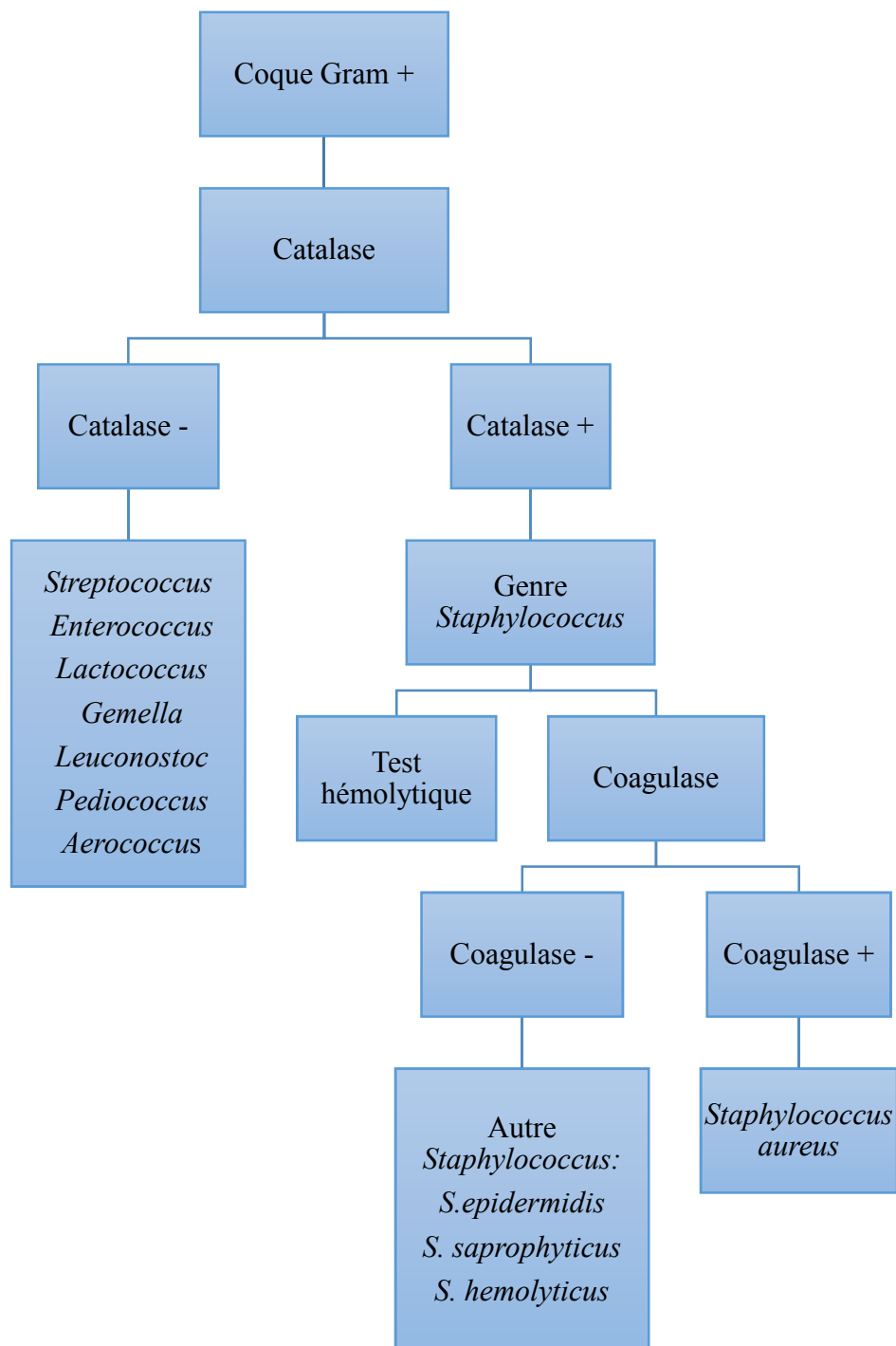


Figure n°07: Schéma d'identification dichotomique des bactériens de groupe coque à Gram + (GuyLeyral et Jean-Noël Joffin, 1998)

I.6.2 Identification biochimique :

La caractérisation des souches isolées a porté sur l'étude des propriétés biochimiques des souches qui contaminent l'environnement laitier et son pouvoir à former des biofilms (Sharma et Anand, 2002).

I.6.2.1 Mise en évidence des enzymes respiratoires :

Les différents tests enzymatiques ont été mis en évidence.

a) Recherche de la catalase :

Sur une lame propre contenant une parcelle de la culture, l'eau oxygénée à 10 Volumes a été déposée. Si la bactérie possède cette enzyme, alors un dégagement gazeux sera observé (Leyral et Vierling, 2007).

b) Recherche de la cytochrome-oxydase :

La recherche de la cytochrome-oxydase a été effectuée à l'aide de disques « Oxydase » dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N, N-diméthyl-1,4phénylène diamine-dichlorure. A partir d'un milieu solide et à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée une partie de la colonie a été déposée sur un disque oxydase placé sur une lame. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet foncé (Joffin et Leyral, 2006).

D'après les résultats des premiers tests on a pu s'orienter vers le genre ou le groupe bactérien tel que *Staphylococcus*, les entérobactéries, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*.

I.6.2.2 Identification le genre *Staphylococcus* :

A. Recherche de la coagulase :

La production de la coagulase libre par *Staphylococcus aureus* provoque une coagulation du plasma qui se traduit par la formation d'un caillot de coagulation (Joffin et Leyral., 2000).

B. Utilisation le milieu sélectif :

Selon Leyral et Vierling (2007), le milieu Chapman (Voir annexe 05) est un milieu sélectif pour les staphylocoques.

C. Le système API 20 STAPH (BioMérieux®) :

Le principe consiste à inoculer dans les microtubes à l'aide d'une pipette pasteur une suspension bactérienne homogène qui reconstitue les milieux déshydratés. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (régler par le logiciel API Excel) permettant une identification de l'espèce bactérienne et la détermination du biotype.

I.6.2.3 Identification des bacilles à Gram négatives

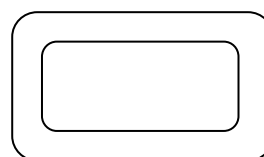
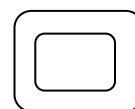
a. Utilisation des galeries API 20E

La recherche de la β -galactosidase (ONPG), de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), la production d' H_2S , l'utilisation du citrate, la production d'indole et la réaction de Voges-Proskauer, la liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres ont été réalisés en utilisant la plaque API 20E (Voir annexe 07).

I.7 Détermination du potentiel de formation de biofilm :

La production de slime a été recherchée sur le milieu Rouge Congo Agar (RCA) (Voire Annexe 06) (Nasr *et al.*, 2012). Le milieu estensemencé en stries par la souche à tester. La lecture a été faite après 24 heures à 37°C et (Jain et Agarwal, 2009).

Les souches productrices de slime donnaient des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Nasr *et al.*, 2012).



Partie III: Résultats et discussion

I. Identification des isolats par les galeries API 20 E et API staph

Résultats obtenus après incubation pendant 24 heures et addition des réactifs, même on utilise le logiciel API feuille de calcul pour l'identification microbienne .

76 isolats ont été obtenus à partir de 12 prélèvements réalisés au niveau d'une laiterie GIPLAIT. La répartition des isolats en fonction des sites de prélèvements est donnée par les tableaux 02 et 03.

Tableau n°02 : Répartition des isolats obtenus de différents sites de prélèvements au niveau de la laiterie pendant la saison froide.

Numéro du prélèvement	Nombre d'isolats	Les espèces avant pasteurisation	Les espèces après pasteurisation
1 et 2	17	(4) <i>Burkholderia cepacia</i> (1002002/2002) (2) <i>Myroides/Chryseobacterium indologenes</i> (2000)	(3) <i>Burkholderia cepacia</i> (1002002) (4) <i>Myroides/Chryseobacterium indologenes</i> (2000) (3) <i>Serratia ficaria</i> (1006563) (1) <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> (1002000)
3 et 4	14	(1) <i>Burkholderia cepacia</i> (2002) (5) <i>Myroides/Chryseobacterium indologenes</i> (2000) (1) <i>Yersinia pestis</i> (1006103)	(7) <i>Myroides/Chryseobacterium indologenes</i> (2000)
5 et 6	1		(1) <i>Myroides/Chryseobacterium indologenes</i> (2000)

Le dénombrement n'a pas été réalisé en raison de la présence des bactéries qui ont un caractère envahissant. Ce caractère d'envahissement traduit son pouvoir de colonisation et de prolifération donc la présence des biofilms épais sur la surface de canalisation qui réduit le transfert de la chaleur et ainsi réduire l'efficacité des traitements de pasteurisation. (Srey *et al.*, 2013 ; Simões *et al.*, 2010) .

Lors de l'isolement, nous avons essayé de respecter le ratio isolat/morphotype. En effet le nombre de colonies sélectionnées dépendait du nombre total des colonies du type morphologique en question présentes dans la boîte de Pétri. Dans tous les cas nous avons prélevé au maximum 5 colonies par boîte de Pétri.

D'après nos résultats de la saison froide, on remarque la dominance des bactéries à Gram négatifs par rapport aux bactéries à Gram positifs. Cette dominance est représentée par l'espèce *Myroides/Chryseobacterium indologenes* avec un seul biotype (2000/19 isolats) suivi par l'espèce *Burkholderia cepacia* avec 2 biotypes différents (08 isolats),

Nos résultats montrent que :

-La persistance de l'espèce *Myroides/Chryseobacterium indologenes*(2000) le long de la saison froide par sa présence au niveau des canalisations post et pré-pasteurisation.

-La persistance du genre *Burkholderia*, le long de la saison froide par sa présence soit au niveau des canalisations post ou pré-pasteurisation.

-La présence de l'espèce *Yersinia pestis* uniquement dans les canalisations pré-pasteurisation.

-La présence de l'espèce *Serratia ficaria* uniquement dans les canalisations post pasteurisation.

-La présence de l'espèce *Chryseobacterium meningosepticum* uniquement dans les canalisations post pasteurisation.

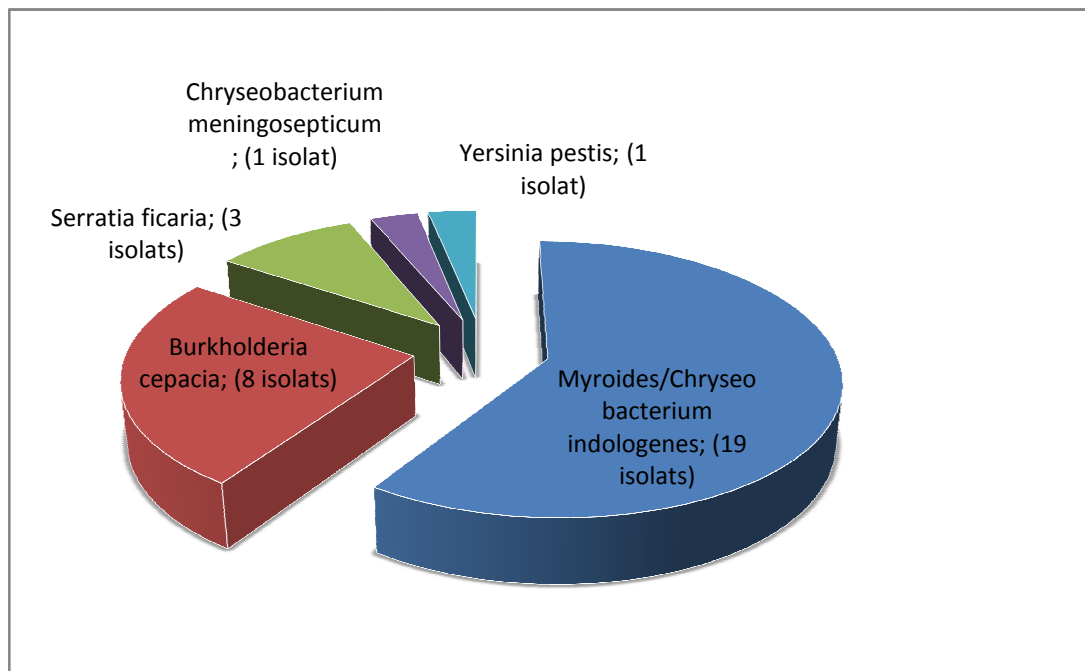


Figure n°08: la microflore bactérienne présente dans les canalisations pré et post-pasteurisation durant la saison froide.

Le tableau n°03 ci-dessous présente les résultats des prélèvements de la saison chaude.

Tableau n°03: Répartition des isolats obtenus de différents sites de prélèvements au niveau de la laiterie pendant la saison chaude.

Numéro du prélèvement	Nombre d'isolats	Les espèces avant pasteurisation	Les espèces après pasteurisation
7 et 8	34	(1) <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> (1002000) (6) <i>Myroides/Chryseobacterium indologenes</i> (2000 /2001/202000) (2) <i>Aeromonas salmonicida spp salmonicida</i> (2002000) (2) <i>Enterobacter cloacae</i> (3307573 /1305775) (1) <i>Staphylococcus sciuri</i> (6330550)	(4) <i>Aeromonas salmonicida spp salmonicida</i> (2002000/3002000/ 3000) (1) <i>Burkholderia cepacia</i> (1302000) (1) <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> (1002000) (1) <i>Enterobacter cloacae</i> (3307573) (7) <i>Myroides/Chryseobacterium indologenes</i> (2000) (3) <i>Serratia ficaria</i> (1307573/1307773) (1) <i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxelle ssp</i> (3000) (2) <i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i> (6210140/6310040) (1) <i>Staphylococcus lentus</i> (6730750) (1) <i>Staphylococcus hominis</i> (6210143)
9 et 10	10	(2) <i>Myroides/Chryseobacterium indologenes</i> (2000) (2) <i>Enterobacter cloacae</i> (3307573/3301573) (1) <i>Staphylococcus lugdunensis</i> (6310150)	(1) <i>Enterobacter cloacae</i> (3304573) (2) <i>Myroides/Chryseobacterium indologenes</i> (2000) (1) <i>Serratia ficaria</i> (1006573) (1) <i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i> (6210140)
11 et 12		Il y'a présence mais pas confirme a cause de la charge bactérienne	

D'après nos résultats de la saison chaude, on remarque la dominance des bactéries à Gram négatifs par apport aux bactéries à Gram positifs. Cette dominance est représentée par du genre *Myroides/Chryseobacterium indologenes* avec 3 biotype différents (17 isolats) suivi par le genre *Aeromonas* présenté par l'espèce *Aeromonas salmonicida spp salmonicida* (3 biotype) (6 isolats) et le genre *Enterobacter* présenté par l'espèce *Enterobacter cloacae* (4biotype) (6 isolats) .

D'après les résultats des isolats de la saison chaude on remarque que :

-La persistance de l'espèce *Myroides/Chryseobacterium indologenes* le long de la saison chaude dans les canalisations post et pré-pasteurisation.

-La persistance du genre *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Chryseobacterium*, *Staphylococcus* même au niveau de la saison chaude.

-L'apparition de nouvelles espèces au niveau de la saison chaude telle que : *Bordetella/Alcaligenes/Moraxelle ssp.*

La figure n°09 ci-dessous présente les espèces formatrices de la microflore bactérienne présente dans les canalisations post et pré-pasteurisation :

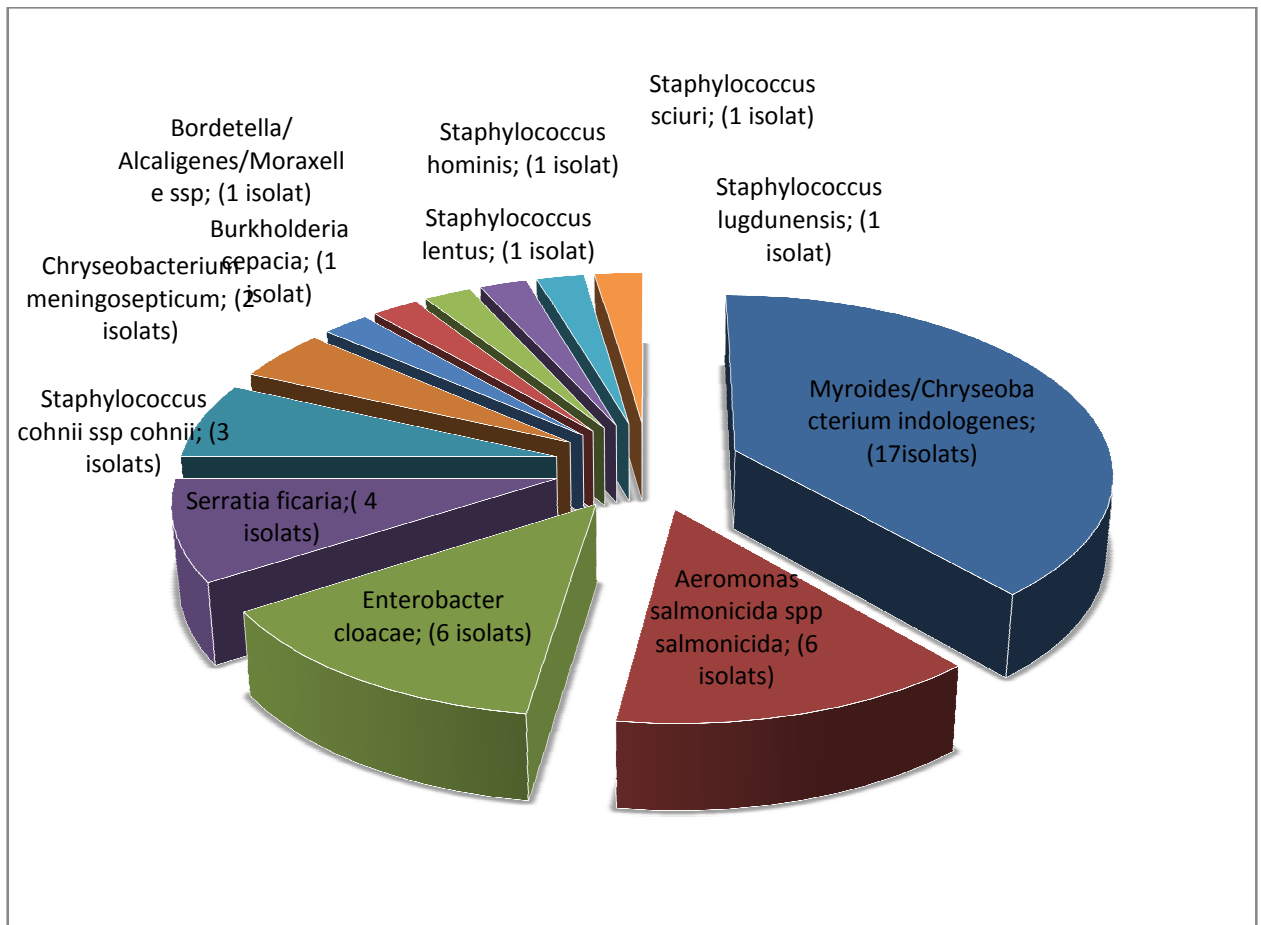


Figure n°09 : la microflore bactérienne présente dans les canalisations pré et post-pasteurisation durant la saison chaude.

-La comparaison des résultats de la saison chaude avec la saison froide on peut remarquer :

-La persistance du *Myroides/Chryseobacterium indologenes*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Serratia* même au niveau de la saison chaude.

- l'apparition du genre *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* uniquement au niveau de la saison chaude .

Dans l'industrie laitière, les surfaces des équipements sont reconnues être une source majeure de contamination du lait transformé avec des microorganismes de détérioration et pathogène. Les bactéries adhérentes peuvent se détacher et contaminer le produit qui passe dans les canalisations (**Bagge-Ravn et al., 2003; Kusumaningrum et al., 2003; Brooks et Flint, 2008**). Dans ce cas, la contamination croisée est un enjeu économique et problème sanitaire (**Malek et al., 2012**).

Différentes sources de contamination potentielles du lait reconstituée sont signalées :

- **Contamination par la poudre de lait :** Qu'est utilisée en premier lieu pour la production du lait reconstitué ou recombine pasteurisée (**Kaci et Yahiaoui, 2017**). Le nombre de microorganismes présents augmente généralement au cours du stockage, bien que le nombre de spores peut rester constant. Les producteurs de la poudre, ne prennent pas en charge la croissance des micro-organismes, le contenu microbiologique varie selon l'utilisation ultérieure de la poudre. Pour cette raison, les organismes gouvernementaux et les laboratoires ont développé des limites microbiologiques ou des spécifications qui s'appliquent à certains groupes de micro-organismes qui peuvent être présents dans le lait en poudre. Ces spécifications peuvent concerner les apports des matières premières à la qualité du lait et l'hygiène lors de la fabrication et du stockage (**Augustin et al., 2003**).
- **Contamination à partir des équipements:** Elle est souvent caractérisée par la formation des biofilms laitiers qui sont dominés par différentes bactéries. La formation de ces biofilms sur les équipements peut entraîner de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques dues à la détérioration des aliments et à la dépréciation des équipements (**Flint et al., 1997**). Les micro-organismes dans les biofilms catalysent les réactions chimiques et biologiques provoquant la corrosion des métaux dans les

tuyauteries et les réservoirs, et ils peuvent réduire l'efficacité de transfert de chaleur s'ils deviennent suffisamment épais (**Simoes et al., 2009**).

La flore microbienne constitutive du biofilm en industrie laitière peut-être varier et comprendre de nombreux groupes bactériens aussi bien Gram-positif que Gram négatif, tels que les genres *Staphylococcus*, *Listeria*, *Pseudomonas* et certaines entérobactéries (**Sharma et Anand, 2002**).

La microflore bactérienne du biofilm des canalisations de lait est intéressante sur le double plan quantitatif et qualitatif. Outre les densités bactériennes conséquentes, les groupes microbiens présents sur les surfaces des équipements laitiers sont affiliés à des genres comprenant des espèces potentiellement pathogènes. Il s'agit des genres *Staphylococcus*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Myroides*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Yersinia*, *Bordetella*, *Alcaligenes*, *Moraxella*. Nous les trouvons dans beaucoup des résultats des chercheurs ; (**Sharma et Anand, 2002**) disent que parmi les agents pathogènes alimentaires susceptibles d'être fixés sur les surfaces en contact avec les aliments environnements laitiers.

Les biofilms se forment habituellement sur les surfaces qui sont en contact avec des fluides, et peuvent être une source de contamination bactérienne responsable de la réduction de la durée de conservation des produits et de la transmission de maladies (**Carpentier et Cerf, 1993 ; Zottola et Sasahara, 1994 ; Dunne, 2002 ; Agarwal et al., 2006**).

Les biofilms sont plus résistants aux agents antimicrobiens comparés aux cellules planctoniques ce qui fait de leur élimination à partir des équipements de traitement des denrées alimentaires un défi important (**Simões et al., 2006 ; Simões et Vieira, 2009**).

Beaucoup de nos isolats sont des types Gram négatif. Cette découverte fournit des informations sur les mauvaises conditions sanitaires de la production de lait recombinant dans l'usine laitière où nous prélevons nos échantillons.

Les bactéries lactiques et les bactéries psychrotrophes sont sensibles à la chaleur et leurs populations sont réduites dans le lait pasteurisé (**Frank et Hassan, 2002**) malgré les espèces qu'on a révélées dans les canalisations post pasteurisation telle que *Chryseobacterium meningosepticum*, *Serratia ficaria*, *Burkholderia cepacia*, *Myroides/Chryseobacterium*

indologenes, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas salmonicida spp salmonicida*, *Bordetella/Alcaligenes/Moraxelle ssp* ces espèces sont reconnus comme bactéries résistantes à la pasteurisation plusieurs auteurs ont mentionné cette résistance à la chaleur sachant que la pasteurisation ne peut garantir l'absence de micro-organismes (**Salmeron et al., 2002; Cleto et al., 2012**). Selon notre conclusion, cela est dû à la contamination post-pasteurisation ou à la contamination du lait en poudre.

Nous avons également remarqué l'apparition de la majorité du genre Staphylocoque à la saison chaude. Parmi les microorganismes qui ont la capacité de former un biofilm sur les surfaces des équipements, *Staphylococcus spp*: un pathogène alimentaire est régulièrement rencontré dans de très nombreux environnements, en particulier ceux de la chaîne alimentaire. La capacité de *Staphylococcus spp* à former des biofilms fournit un important facteur de virulence (**Costerton et al., 1994**).

Les bactéries qui ont montré une plus grande dominance en hiver (saison froide) sont : Flavobacteria (*Myroides*) et Beta Proteobacteria (*Burkholderia cepacia*), et les moins sont : Gammaprotéobactéria (*Yersinia pestis*, *Serratia ficaria*). Cette classe des bactéries ont déjà été rapporté à posséder la capacité sécréter des enzymes protéolytiques et lipolytiques thermostables (**Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007**). Alors que La prédominance des membres psychrotolerans (psychrotrophe) (**Rasolofa et al., 2010**).

Dans la saison chaude la dominance de la classe Gammaprotéobactéria mésophiles (*Aeromonas salmonicida spp salmonicida*, *Enterobacter cloacae*). Nos résultats démontrent que les canalisations post et pré-pasteurisation est un réservoir humide idéal pour la survie de bacilles à Gram négatifs thermorésistants et sont en concordance avec les résultats obtenus par **Serieys en 2002**.

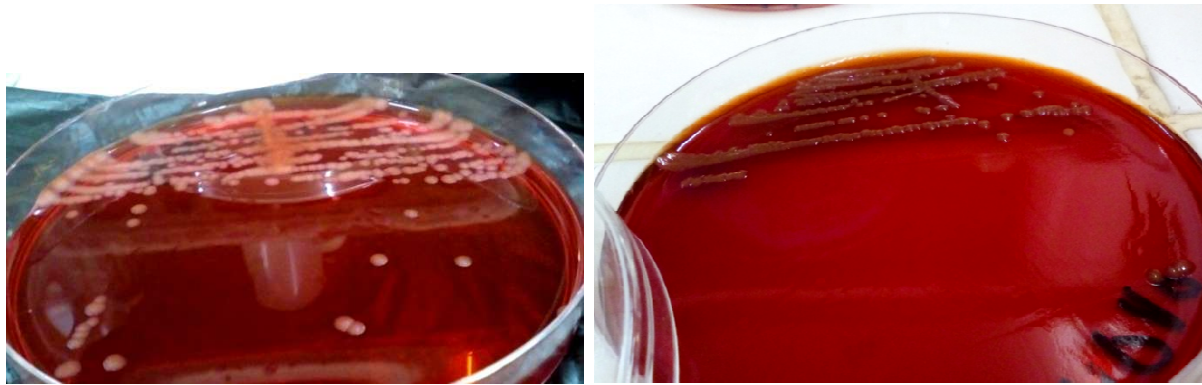
II. Evaluation de la formation de biofilm *in vitro* :

II.1 La méthode du Rouge Congo Agar :

La gélose Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime. (**Chaieb et al., 2005**). Le Slime est définie comme la substance polymérique extracellulaire, également connu sous le nom de exo-polysaccharides (EPS) (**Costerton et al., 1995**). Sur le milieu RCA, les souches exprimant le PIA (polysaccharide intercellular adhesin) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatif (**Chaieb et al., 2005**).

Les résultats du Congo rouge montrent que sur 76 isolats, nous avons trouvé 26 isolats capable de produire de la slime : *Burkholderia cepacia* (1302000,1002002,2002), *Enterobacter cloacae* (3301573,3304573,1305773,3307573,3307573 ,1305775), *Serratia ficaria* (1307773,1307573, 1006573) , *Yersinia pestis* (1006103), *Staphylococcus sciuri* (6330450), *Staphylococcus lugdunensis* (6310150),*Staphylococcus lentus* (6730750) isolées durant la saison chaude et froide.

Le genre de *Staphylocoque* ,testées dans la présente étude avaient une capacité de produire le slime sur RCA. Notre résultat est similaire à celle trouvé par **Cherif-Aantar et ces collaborateurs en 2015**.



A) L'absence de slime

B) Production de slime

Figure n°10: Phénotype de production de slime par les souches sur milieu RCA.

Le criblage de la production de biofilms par la méthode Gélose Rouge Congo a montré que, (26/76) isolats soit **34,21%** des souches étudiées étaient productrices des biofilms, présentant des colonies noires ou grise avec un cristallin de consistance sèche sur Gélose Rouge Congo. Cet aspect est dû à la production des exo-polysaccharides qui réagissent avec le rouge Congo. Tandis que (50/76) souches soit **65,78%** étaient non productrices des biofilms, présentant des colonies rouges ou rose sur le même milieu. Les résultats sont illustrés au niveau de **la figure n°11**.

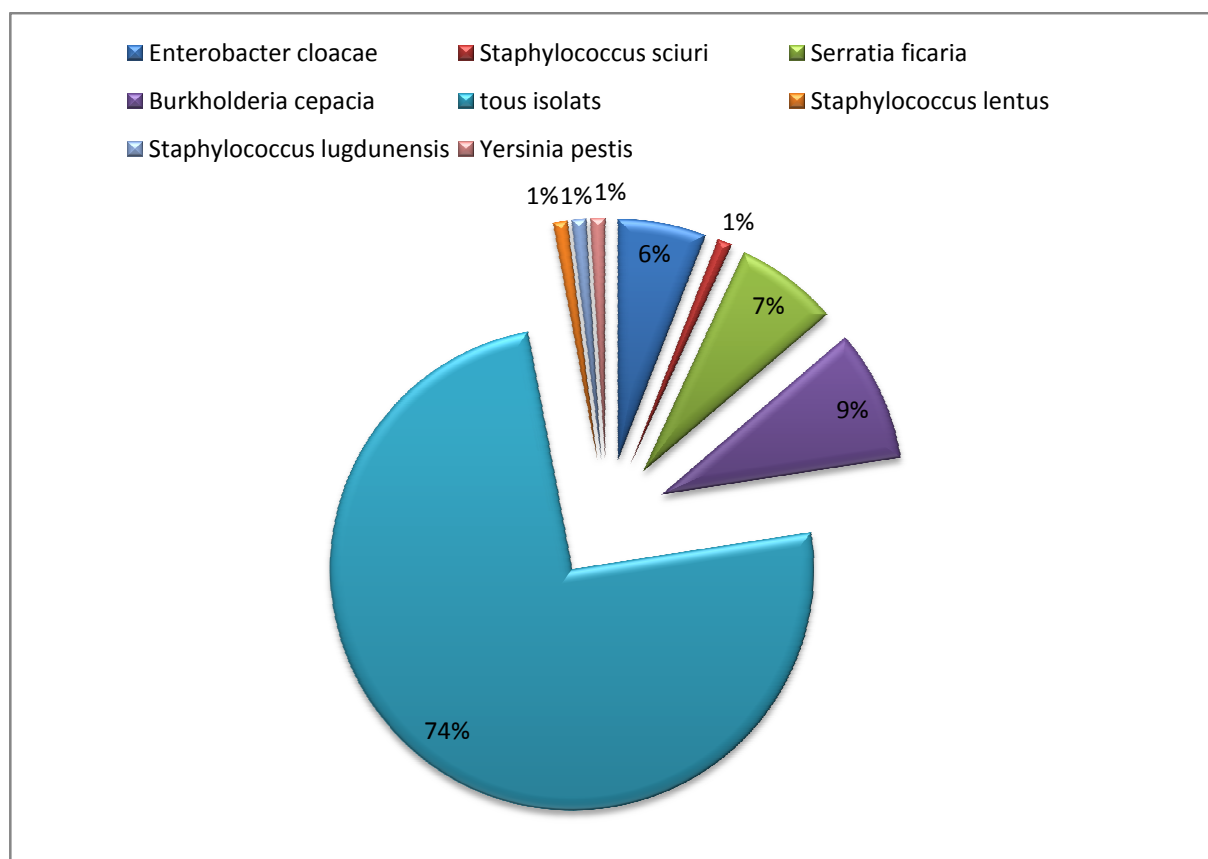


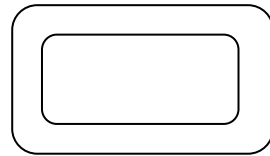
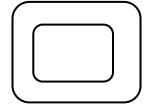
Figure n°11: Répartition des souches isolées d'industrie laitière en fonction de production de slime bactérien.

La production des exo-polysaccharides joue un rôle important dans les infections causées par différents microorganismes (Alcaraz *et al.*, 2003). Les EPS (exo-polysaccharides) sont généralement des matériaux polysaccharidiques, qui sont impliqués dans la protection des cellules microbiennes. En plus, les microorganismes qui produisent ces exo-polysaccharides sont plus résistants à la dessiccation, à la prédation et aux produits chimiques (Ophir *et al.*, 1994).

Nos résultats montrent que les Gram négatifs (99,78%) ont une grande capacité de former les biofilms par rapport au Gram positifs (9,21%) c'est exprime la majorité de la population de biofilm présents au niveau des canalisations. La présence de ces espèces au niveau des canalisations post pasteurisation confirme la source de contamination du produit fini à partir de ces surfaces. N'oubliez pas qu'il y a peu de problèmes de contamination des matières premières.

Plusieurs auteurs signalent que la méthode de rouge Congo agar semble être moins efficace pour détecter la formation de biofilm in vitro (**Rũzicha *et al.*, 2004 ; Hassan *et al.*, 2011 ; Taj *et al.*, 2012**).

Les résultats obtenus dans cette étude confirment l'impact de l'environnement dans la formation des biofilms et leur résistance aux procédures classiques du nettoyage et de la désinfection chimique. Des niveaux de contaminations élevés, associés aux irrégularités de la surface de l'acier inoxydable sont des facteurs d'influence significatifs pour le développement de biofilms consistants et récalcitrants aux procédés visant leur élimination des surfaces industrielles (**Malek ,2019**).



Conclusion générale

Le lait et les produits laitiers renferment une flore microbienne naturelle et/ou additionnelle à l'origine de la diversité des produits mis sur le marché .L'origine des contaminations par les bactéries pathogènes varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation. La contamination du lait reconstitué par les germes pathogènes, des flores de contamination diverses liées à des manutentions soit être endogène (poudre du lait) ou exogène (équipements de l'usine laitière) en appelle cette communauté microbienne un biofilm qui se forme sur toutes les types de surfaces des systèmes technologiques dans l'industrie laitière. L'ensemble des procédés de traitement et de transformation du lait peut freiner la multiplication des germes éventuellement présents ou au contraire favoriser leur développement.

Dans cette optique, on a réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques des canalisations pré et post-pasteurisation de lait reconstitué dans le but d'isoler, identifier la microflore bactérienne des canalisations pré et post-pasteurisation d'une usine laitière et déterminer leur potentiel de production de slime. L'identification biochimique était réalisée en utilisant la galerie API 20^E/API 20 Staph et les isolats identifiés appartiennent à plusieurs espèces différentes.

Une diversité microbienne inter et intra spécifique très élevée a été trouvée parmi les bactéries récoltées dans les deux différents points d'échantillonnage et à des différentes saisons, La flore aérobie mésophile identifiée était composée des groupe d'espèces : *Myroides/Chryseobacterium indologene*, *Staphylococcus Sciuri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Aeromonas salmonicida ssp salmonicida* , *Burkholderia Cepacia* , *Chryseobacterium Meningosepticum* ,*Enterobacter cloacae* et *Yersinia pestis*. Nos résultats mettent en évidence que *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas salmonicida spp salmonicida*, *Staphylococcus lentus* , *Staphylococcus cohnii ssp cohnii*, *Staphylococcus hominis*, *Myroides/Chryseobacterium indologene*, *Bordetella/Alcaligenes/Moraxelle ssp*, *Enterobacter cloacae* , *Serratia ficaria* et *Chryseobacterium meningosepticum* ne semblent pas être affectées ni par le traitement thermique(pasteurisation) ni par le nettoyage et la désinfection.

A' partir de cette étude, la présence des bactéries thermorésistantes dans les canalisations de pasteurisation du lait recombinaé montré un niveau de contamination remarquable, cela pourrait être attribué à des conditions de procédures de stockages de la matière primaire, un mauvais nettoyage et désinfection utilisées et l'inefficacité de la pasteurisation qui aboutissent à la contamination du produit fini en diminuant sa durée de vie .

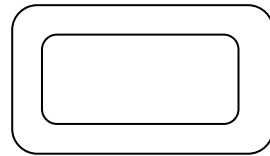
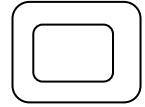
Plusieurs études , y compris nos résultats confirment que la pasteurisation est une étape très importante qui vise d'une part , à allonger la durée de vie , et d'autre part , à prévenir les cas d'intoxication alimentaires liées à la présence des microorganismes pathogènes et à leur transmission au consommateur mais elle ne parvient pas à tirer efficacement les germes résistants à la chaleur .

L'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection est très importante, puisque ces microorganismes restent adhérentes sur les surfaces puis ils sont dispersés dans les produits finis et conduisent à l'altération de ces produits et diminue leur durée de vie, pour cela il faut contrôler le problème de contamination au niveau de l'industrie laitière, nous proposons :

- ✓ Amélioration de système de nettoyage et désinfection appliqué par l'unité de production en tenant compte des caractéristiques du contaminant dominant du groupe de thermorésistants.
- ✓ Un contrôle de la chaîne de fabrication de la matière première jusqu'à le produit finis
- ✓ La propreté des matériaux utilisés dont les propriétés serait défavorable à l'adhésion des bactéries.

Pour nos perspectives de recherches au futur :

- ✚ L'analyse microbiologique du lait recombinaé afin de vérifier la présence de ces bactéries au niveau de ce dernier.
- ✚ L'étude phylogénétique des souches par des techniques moléculaires.
- ✚ Traçage des souches pour identifier les souches de contamination importantes.
- ✚ Une meilleure caractérisation des souches notamment par l'étude de leur propriété d'adhésion et de formation de biofilm.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Agarwal S., Sharma K., Swanson B. G., Yuksel G. U., Clark S. 2006.** Nonstarter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 89:1452-1466.
- **Aires, A, Mota, VR, Saavedra, MJ, Monteiro, AA, Simões, M, Rosa, EAS and Bennett, RN. 2009a.** Initial in vitro evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol*, 106: 2096–2105. .
- **Alcaraz L.E., Satorres S.E., Lucero R.M. and Centrorbi O.N.P. 2003.** Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. *Braz. J. Microbiol.* **34 (1)**, 45-51.
- **Anonymous. (2017).** Validation of alternative analytical methods. Retrieved from
- **Asma Cherif-Antar, Boumediene Moussa–Boudjemâa, Nassima Didouh, Khadidja Medjahdi, Baltasar Mayo, Ana Belén Flórez (2015).** Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant, INRA and Springer-Verlag France, *Dairy Sci. & Technol.* DOI 10.1007/s13594-015-0235-4
- **Aswathanarayan, J.B. & Vittal, R.R.** *Food Sci Biotechnol* (2014) 23: 1903.
- **Augustin M A, Clarke P T, Craven H., (2003).** **Characteristics of Milk Powders** Elsevier

B

- **Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C. et Gram, L. 2003.** The microbial ecology of processing equipment in different fish industries — analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 239–250. doi:10.1016/S0168-1605(03)00067-9. PMID:14527796.

- **Bouchard P., 2015.** Odontologie Parodontologie Dentisterie implantaire. Vol.1. medecine parodontale, Lavoisier paris.
- **Branger A. (2007).** Microbiochimie et alimentation ; 345-343.
- **Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007).** Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon. p.131-164.
- **Bremer PJ, Seale B, Flint S, Palmer J. 2009.** Biofilms in dairy processing. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, IV, editors. Biofilms in the food and beverage industries. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head Publishing Limited. p 396–431.
- **Briandet R 2012. Briandet, Romain, Fechner, Lise, Naitali, Murielle, & Dreanno, Catherine. 2012.** Biofilms, quand les microbes s’organisent. Editions Quae.
- **Brooks JD, Flint SH (2008)** Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. Int J Food Sci Technol 43(12):2163–2176.
- **Burgess, S., Lindsay, D., Flint, S,H.,2010.** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. International Journal of Food Microbiology 144:215-225.

C

- **Carpentier, B. et Cerf, O. 1993.** Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry—a review. J. Appl. Bacteriol. 75:499–511. doi:10.1111/j.1365 2672.1993.tb01587.x. PMID:8294303.
- **Catherine R. Armbruster and Matthew R. Parsek .April 9, 2018** <https://doi.org/10.1073/pnas.1804084115> ... the Wsp system that was described byHickman et al.
- **Chaieb ,K; Mandouani ,K ;&Bakhrouf A. (2005).** Detection of icaA and icaDloci by Polymerase chain reaction and biofiim formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needlesin a dialysis unit, *Journal ofHospital Infection, (61)* 225230.
- **Cherif Antar A., 2015.**Identification et caractérisation de la flore mésophile constitutive des biofilms inféodés aux lignes de production de lait de vache pasteurisé. Doctorat en Biologie Moléculaire et Biochimie. Univ. De Tlemcen.

- **Chmielewski R.A.N., Frank J.F. (2003).** Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
- **Cleto S, Matos S, Kluskens L, Vieira MJ, 2012.** Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS ONE* 7:e40189.
- **Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. 1995.** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.
- **Costerton JW, Lewandowskiz, de beer d, caldwell d, Korberd, James G (1994)** Biofilms, the custo-mized microniche. *J. Bacteriol.*, 176, 2137-2142.

D

- **Da Silva Fernandes M., Kabuki D. Y., Kuaye A. Y. (2015).** Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization procedures. *Int. J. Food Microbiol.* 200, 97–103. 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.004 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- **Darch SE et al. 2018** Spatial determinants of quorum signaling in a *Pseudomonas aeruginosa* infection model. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 115, 4779–4784.(doi:10.1073/pnas.1719317115)
- **Dat, N. M., Hamanaka, D., Tanaka, F., & Uchino, T. (2012).** Control of milk pH reduces biofilm formation of *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus paracasei* on stain-less steel. *Food Control*, 23, 215e220.
- **Delarras C., 2007.** *Microbiologie Pratique Pour Le Laboratoire D’analyses Ou De Contrôle Sanitaire*, 1ère édition, Paris : Edition tec et doc, 476 p.
- **Didouh N., (2015).** Caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées d’équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection.
- **Doghri I. (2015).** Interactions moléculaires entre microorganismes au sein de biofilms en milieu marin : mise en évidence de biomolécules antibiofilm. Thèse de doctorat: Sciences agricoles. Rochelle: Université de La Rochelle, 223p.
- **Dunne W. M. 2002.** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:155–166.

F

- **Faille C., Fontaine F., Bénézech T. 2001.** Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *J. Appl. Microbiol.* **90**:892-900.
- **Fernandes, M. D. S., Fujimoto, G., Schneid, I., Kabuki, D. Y., and Kuaye, A. Y. (2014).** Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. *Int. Dairy J.* **38**, 16–23. doi: 10.1016/j.idairyj.2014.03.009
- **Fernandez, M., Morel, B., Corral-Lugo, A., and Krell, T. (2015)** Identification of a chemoreceptor that specifically mediates chemotaxis toward metabolizable purine derivatives. *Mol Microbiol* doi: 10.1111/mmi.13215 (in press).
- **Flemming, H.C., Neu, T.R. & Wozniak, D.J. (2007).** The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* **189**, 7945-7947.
- **Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016)** Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**: 563– 575.
- **Flint, S.H., Bremer, P.J. et Brooks, J.D. 1997.** Biofilms in dairy manufacturing plant description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, **11**: 81–97. doi:10.1080/08927019709378321.
- **Frank, J.F, Hassan, AN., (2002).** Microorganisms associated with milk. in thèse: analyse du microbiote du lait par les méthodes moléculaires. Département des sciences des aliments et de nutrition faculté des science de l'agriculture et de la l'alimentation université lavai Quebec.

G

- **Gardew L, Berhani A, Mengesha D, Tsegay G (2012)** .identification of gram negative bacteria from critical control points of raw and pasteurized cow milk consumed at Gonder town and it suburbs, Ethiopia. *BMC Public Health* **PP**.12-950.
- **Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F., & Jacques, M. (2016).** Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique. **PP** 215-229.
- **Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Edition DUNOD. Paris.90-292.

- **Guiraud J.P., Rosec J.P.(2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. France. ISBN: 2- 12- 445211-8. 398 p.
- **GuyLeyral ., Joffin J-N. 1998.** Microbiologie technique: Tome 1, Dictionnaire des techniques. s, Canopé - CRDP de Bordeaux, 9782866173876.

H

- **Hantsis-Zacharov E, Halpern M (2007)** Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. Appl Environ Microbiol 73:7162-7168
- **Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M. (2011)** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis.15 (4):305-11.
- **Hathroubi S., Tremblay Yannick D.N., Jacques M. (2014).** Les biofilms Bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. The canadian Journal of Veterinary Reaserch ; 78:110-116.

J

- **Jain A, Agarwal A. (2009).** Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. Journal of Microbiology and Methods. 76: 88–92.
- **Jamal Muhsin, Ufaq T., Tahir H., Andleeb S. (2015).** Bacterial biofilm : its composition,formation and role in human infections. Jornal of microbiology and biotechnology ; 4(3):1-14.
- **Joffin J.N., Leyral G. 2000.** Activités technologiques en microbiologie. Canopé - CRDP de Bordeaux. 9782866173258.
- **Joffin J.N. and Leyral G., 2006.** Microbiologie Technique. Tome 1, dictionnaire des techniques. Académie de bordeaux et crdp d’Aquitaine, France.

K

- **Kaci, M. et Yahiaoui, S. 2017.** Etude lait conditionne et boissons lactees Algerie Synthese 2017. CAP-PME Capitalisation des acquis des programmes Algerie/UE-PME I/PME II.
- **Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C. et Beumer, R.R. 2003.** Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int.J. Food Microbiol.* 85: 227–236. doi:10.1016/S0168-1605(02) 00540-8. PMID:12878381.

L

- **Latorre, A. A., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A.K., Boor, K. J., Schukken, Y. H. (2010).** Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2792–2802. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2717>
- **LE VIRGINIE,2008.**influence du cuivre sur les biomasses microbiennes dans les canalisations d'eau.these de doctorat en pharmacie : a faculte de pharmacie de chatenay malabry » de l'universite paris-sud 11 .12-13p.
- **Lee .A (2014)** .Global safety of fresh produce .Chapter :Commercial and novel solutions for fresh produce safety , organic acid -based sanitizers .
- **Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC et al. (2008)** Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322: 1- 16
- **Leyral G. and Vierling E ., 2007.**Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire ; Biosciences et techniques . Wolters Kluwer ,France
- **Li, L., J. Zhu, K. Yang, Z. Xu, Z. Liu and R. Zhou (2014).** "Changes in gene expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in response to anaerobic stress reveal induction of central metabolism and biofilm formation." *J Microbiol* 52(6): 473-481.
- **LISTER J.L., HORSWILL A.R.:** *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal.*Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, 4,178.
- **Lu, T. K., & Collins, J. J. (2007).** Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104, 11197–11202

- **Luu, Stephanie, and Peter Setlow. (2014):**"Analysis of the loss in heat and acid resistanceduring germination of spores of *Bacillus* species." *Journal of bacteriology* 196.9 (2014): 1733-1740.

M

- **Malek ,F. 2019.** Bacteries sporulees et biofilms : un probleme recurrent dans les lignes de production de lait reconstitue ou recombine pasteurise.*Can. J. Microbiol.* **65**: 1–16 (2019).
- **Malek, F., Moussa-Boudjemaa, B., Aouar-Metri, A. et Kihal, M. 2013.** Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. *Dairy Sci. Technol.* 93: 73–82. doi:10.1007/s13594-012-0093-2.
- **Malek, F., Moussa-Boudjemaa, B., Khaouani-Yousfi, F., Kalai, A. et Kihel, M. 2012.** Microflora of biofilm on Algerian dairy processing lines: an approach to improve microbial quality of pasteurized milk. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6: 3836–3844. doi: 10.5897/AJMR11.1120.
- **Marchand S., De Block J., De Jonghe V., Coorevits A., Heyndrickx M., Herman L. (2012).** Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11 133–147.10.1111/j.1541-4337.2011.00183.
- **Martin C., (2011)** Bacilles à Gram négatif non fermentaires, *Bactériologie médicale.* 331-427.
- **Melchiour M.B., Vaarkams H., Fink-Gremmels J. (2006).** Biofilm : Arol in recurrent mastis infection, *The veterinary journal,* 171,398-407
- **Michu E, Cervinkova D, Babak V, Kyrova K, Jaglic Z (2011)** biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of ica-mediated biofilms.*Int Dairy J*21 :179-184 .
- **Mosquera-Fernández, M., Rodríguez-López, P., Cabo, M. L., and Balsa-Canto, E. (2014).** Numerical spatio-temporal characterization of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* 182, 26–36. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.005

N

- **Nasr RA., AbuShady HM., Hussein HS. (2012).** Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci . *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 13:269-274.

O

- **Oliveira NM, Martinez-Garcia E, Xavier J, Durham WM, Kolter R, Kim W, et al. (2015)** Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLoS Biol* 13(7): e1002191. doi:10.1371/journal.pbio.1002191 PMID: 26158271
- **Ophir T., Gutnick D.L. 1994.** A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60 (2):** 740-745.
- **Otto, M. (2013).** Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 64, 175-188.

P

- **Parot S. (2007).** Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de doctorat. L'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- **Parrot, J. F. y V. Ochoa-Tejeda (2006),** “Generación de Modelos Digitales de Terreno raster. Método de Digitalización”, *Geografía para el siglo XXI, Revista electrónica del Instituto de Geografía, UNAM.*
- **Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C. 2001.** Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* **65:** 105–111.

R

- **Ranieri ML, Huck JR, Sonnen M, Barbano DM, Boor KJ (2009)** High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci* 92(10):4823–4832
- **Rasolofo EA, St-Gelais D, Lapointe G et al. (2010)** Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *Int J Food Microbiol* 138:108-118.

- **Roux A., Chigo J.M. (2006).** Les biofilms bactériens, *Bull. Acad Vét*, 261-268.
- **Ruzicka F., Hola V., Votava M.2004.** Biofilm detection and clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol (Praha)* **2004**;49(5):596-600.

S

- **Sakarya S.,SerkanOncu A.,SelcenOncu A.,BarcinOzturk C.,GunayTuncerd A ,Cavide S. (2004).** Neuraminidase Produces Dose-Dependent Decrease of Slime Production and Adherence of Slime-Forming, Coagulase-Negative *Staphylococci* 35 275– 278
- **Salmeron, J., de Vega, C., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M. and Barron, L.J.R. (2002).** effect of pasteurisation and seasonal variations in the microflora of ewe’s milk for cheese making. *Food Microbiol*, 19: 167-174.
- **Salta, M.; Wharton, J.A.; Blache, Y.; Stokes, K.R.; Briand, J.F.** Marine biofilms on artificial surfaces: Structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2013, doi:10.1111/1462–2920.12186.
- **Salustiano V. C., Andrade N.J., Ribeiro J. I., Fernandes P. E., Lopes J. P., Bernardes P. C., Portugal J. G. 2010.** Controlling *Bacillus cereus* adherence to stainless steel with different cleaning and sanitizing procedures used in dairy plants. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia.* 62:1478-1483.Science Ltd.4703.
- **Serieys F. et Seegers H, 2002 :** L’intervention du vétérinaire face à un problème de mammites :2- Adapter les méthodes à l’évolution de l’épidémiologie, proceeding du congrès de la SNGTV, Tours : 147-156p.
- **Sharma M., Anand S. K. 2002.** Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy industry – a case. *Food Control.* **13**: 469–477.
- **Sharma, M. et Anand, S.K. 2002.** Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol.* 19: 627–636. doi:10.1006/fmic.2002.0472.
- **Simoões, M., & Vieira, M. J. (2009).** Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. In *Proceedings of the international conference processes in biofilms: Fundamentals to applications* (pp. 58–62), Davis, CA, USA.

- **Simoões, M., Bennett, R. N., & Rosa, E. A. S. (2009).** Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, 26, 746–757.
- **Simoões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2006).** Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*, 84, 338–345.
- **Simões M., Simões L.C., Vieira M.J.2010.** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol* .43:573–583.
- **Squinazi F . (2013).** biofilm et materiaux des réseau intérieurs de distribution de l'eau.
- **Srey S., Jahid I. K., Ha S.-D. (2013).** Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31 572–585. 10.1016/j.foodcont.2012.12.001
- **Stanley NR, Britton RA, Grossman AD, Lazazzera BA.** Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol.* 2003;185:1951–1957.

T

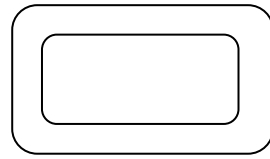
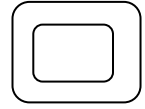
- **Taj, Y. Essa, F. Aziz F. Shahana Kazmi U. (2012).** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dev. Ctries*; 5(6):403-409.
- **Tremblay YDN, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messier S, Jacques M.** Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci.* 2013;96:234–246.
- **Tremblay.YD,Caron.V,Blondeau.A,Messier.S,Jacques.M(2014)**Biofilm formation by coagulase negative staphylococci :impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms.*VetMicrobiol*172:511-518.

V

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

Z

- **Zottola A. E., Sasahara K. C. 1994.** Microbial biofilms in the food processing industry -Should they be a concern?. *Int. J. Food Microbiol.* 23:125-148.



Annexe

Annexe

1. Bouillon TSE (tryptone sel eau)

Tryptone	1 g
Chlorure de sodium	8.5 g
Eau distillée	1000ml

2. Gélose nutritive standard Plate Count Agar (P.C.A)

Hydrolysate tryptique de caséine	2,5g
Extrait de viande	5g
Glucose	1g
Extrait de la levure	2,5g
Agar	15g
Eau distillé q.s.p	1000 ml

pH=7±0.2 à 37°C

3. Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	150g

pH = 7

4. Les étapes de coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au **violet de cristal**; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de **Lugol**, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. À ce stade les cellules gram- seront incolores, les cellules gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la **fushine** pour colorer les cellules gram- présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X 1000) (**Singleton, 1999**).

5. Milieu de Chapman

La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est :

Extrait de viande (bovin ou porcin).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g

pH=7,6

111 g par litre d'eau distillée. stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C .

6. Rouge Congo Agar :

Composition :

Saccharose.....	50g
B HIB.....	37g
Rouge Congo.....	0.8g
Agar	10g
Eaux distillée.....	1000ml

7. La galerie API20E

Principe

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Composition de la galerie

La composition de la galerie API 20 E est reportée dans le Tableau de Lecture.

Réactifs et matériel

- API NaCl 0,85 % Medium, 5 ml (Réf. 20 230) ou API Suspension Medium, 5 ml (Réf. 20 150)
- API 20 E coffret de réactifs (Réf. 20 120) ou réactifs individuels : TDA (Réf. 70 402) JAMES (Réf. 70 542) ; VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422) ; NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
- Réactif Zn (Réf. 70 380) ; - Oxydase (Réf. 55 635) ; - Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Catalogue Analytique API 20 E (Réf. 20 190) ou logiciel d'identification **apiweb**™ (Réf. 40 011)

Tableau des Caractères de la Galerie API20E

Caractère	Substrat	Enzyme	Produit(s) formé(s)	indicateur	Réactif(s) ajouté(s)	Lecture +	Lecture -
ONPG	ONPG	ONPG-hydrolase β -galactosidase	ONP (jaune) galactosidase			Jaune	incolore
ADH	Arginine	Arginine Dihydrolase (ADH)	Ornithine NH ₃ CO ₂	RP		Rouge-orange	Jaune
LDC	Lysine	Lysine Décarboxylase (LDC)	Cadavérine CO ₂	RP		rouge-orange	Jaune
ODC	Ornithine	Ornithine Décarboxylase (ODC)	Putrécine CO ₂	RP		rouge-orange	Jaune
CIT H ₂ S	Citrate		CO ₂ H ₂ O	BBT		Bleu	Vert
	²⁻ S ₂ O ₃	(Thiosulfate Réductase)	S ²⁻ (H ₂ S)	F III		Noir	Jaune pale
URE	Urée	Uréase	NH ₄ ⁺ (HCO ₃ ⁻)	RP		Rouge	Jaune
TDA	Tryptophane	Tryptophane Désaminase (TDA)	Acide indole pyruvique		TDA / immédiat (Fer III)	Rouge	Jaune
IND	Tryptophane	Tryptophanase	Indole A. pyruvique NH ₃		James / immédiat ou Kovacs / 2min	Rouge	Incolore Jaune
VP	Pyruvate		Acétoïne		VP1 (KOH)+ VP2(α - naphtol) / 10min	Rouge	incolore
GEL	Gélatine	Gélatinase	Acides Aminés	BBT		Noir	Incolore

GLU	Glucose		Acides	BBT		Jaune	Bleu ou bleu-vert
	Man, Ino, Sor, Rha, Sac, Mel, Amy, Ara		Acides	BBT		Jaune	Bleu ou bleu-vert