

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE

L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES



Présenté pour l'obtention du diplôme de Master en
Sciences de la Nature et de la Vie

**Option: sécurité agro-alimentaire et
assurance qualité**

Sous le thème :

Contribution à l'étude des biofilms dans l'industrie laitière

Présenté par :

- Drouya Nariman Zineb
- Sayah Noussaiba
- Kina Hanane

Devant le jury :

Bougherra F.	M.C.B	Président
Bouzar A.C.	M.A.B	Examineur
Aoues K.	M.C.B	promotrice
Hamzi M.	Doctorant	Co- promoteur

Année scolaire : 2021/ 2022

Remerciements

Au terme de ce travail nous tenons à exprimer notre gratitude à "Allah" pour tous ce qu'il nous a offert dans nos vie, ainsi pour qu'il nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail

Ce travail a été réalisé au sein du l'entreprise bel

*Nous désirons à exprimer notre sincère reconnaissance et gratitude à notre encadreur DR **Aoues Karima** pour avoir accepté de nous encadrer et consacré autant de temps pour nous malgré ses multiples occupations, pour son suivi régulier, sa bien vaillance, ses orientations .On aimerait aussi la remercier pour l'autonomie qu'elle nous a accordée, ses précieux conseils et ses critiques qui nous ont permis démener à bien ce travail.*

On voudrait également remercier les membres du jury

***Dr.Bougherra .F** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider les membres du jury de soutenance.*

***Dr. Bouzar A.C** De nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail, veuillez accepter monsieur l'expression de notre profond respect.*

*Nos remerciements sont également adressés à notre chef département **Dr Benlemene Samira** Et notre chef d'option **Pr Doumandji Amenl**. Ainsi qu'à toute l'équipe pédagogique et tous les enseignants de la faculté des sciences alimentaires Blida 1 pour leurs efforts fournis durant l'année scolaire afin d'assurer notre formation et Notre Succès.*

Enfin, dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos remerciements vont à toutes les personnes qui de près ou de loin ont permis la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous qui me sont chers

♥À ma chère mère♥

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma Considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et Mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'Amour que vous portez depuis mon enfance Puisse Dieu, le très Haut, vous Accorde sante, bonheur et longue vie.

♥À mon père♥

Ce travail est dédié à mon père Qui Dieu lui fasse miséricorde

♥À mes chères sœurs♥

Amina, khadidja, Hamida, fatima Zahra, Aicha, Meriem

Et

♥À mon frère Abdel Fateh et mon oncle Mohamed ♥

♥ Mes chères binômes Hanane et Zinabe ♥

♥ A tous mes amies ♥

Ikram, Sabrina, Nessrine, Hadjer, Amina

♥ A mon fiancé Akram ♥

Noussaiba

Dédicace

Je dédie ce travail à...

♥ **Ma chère mère Nadjia** et mon cher père **Abed elkader** ♥

Je dédie ce mémoire à mes parents, pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études. Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être. Trouvez ici, chère mère et cher père, dans ce modeste travail, le fruit de tant de dévouements et de sacrifices ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour. Puisse Dieu leur accorder santé, bonheur, prospérité et longue vie afin que je puisse un jour combler de joie leurs vieux jours.

♥ **Mon très chers frère** ♥

Mohamed Amine kina

♥ **Ma sœur** ♥

Ismahan kina

Elle présente dans tous mes moments difficiles par son soutien moral Un grand
Merci pour toi ma belle

♥ **Toute la famille kina** et la famille **Bellalouche** ♥

♥ **Mes chères binômes Noussaiba et Zinabe** ♥

Qui m'ont accompagné pendant ces 3 années, j'ai partagé avec elles mon chemin, des moments de fatigue, de travail, et de stress, mais aussi de joie, de rire et de bonheur, Je leur souhaite une vie plein de bonheur, de gloire, et de succès, Merci pour vous.

♥ **Mes chères ami(e)s** ♥

Ikram, chaima, Dounia, Halla, Zineb, Marwa, Charazade, Abir, Aya

Qui m'ont aidé durant toute ma vie, que Dieu nous garde toujours unis et heureux.
Merci à ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

♥ **Mon cher ami Azzedine** ♥

Hanane

Dédicace

Je dédie ce travail à...

♥A ma chère mère et mon cher père♥

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard , de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

♥A mes frères, Mohamed, mouloud, Ayoub♥

♥A ma chère sœur ritadje Imane Aicha Mona ♥

Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

♥A mes chers binômes Hanane et Noussaiba ♥

Pour son entente et sa sympathie

Pour leurs indéfectibles soutiens et leurs patiences infinies

♥ A mes chères amis Amel, Lamy, Taieb. Hicham Imane Walid ♥

Qui m'ont aidé et supporté dans les moments difficile

**A mes chères ami (e)s .Bilal Nadjibe rida, Madjid, yani Zineb Meziane
chaima Manel, akila**

♥A toute ma famille ♥

Zineb

Résumé

Ce présent travail avait pour objectif de contrôler l'efficacité de système de nettoyage et de désinfection (nettoyage NEP / nettoyage enzymatique) adoptée, Par la laiterie au niveau de la fromagerie de l'entreprise bel. Nous avons commencé par des analyses microbiologiques, qui consistent en la recherche de la Flore total 22°C, Flore total 36°C, les coliformes, analyser des eaux de rinçages, du matériel, de l'hygiène du personnel, et de l'ambiance a été réalisé en fabrication sur toutes les surfaces de procès. Les résultats obtenus, ont montré une inefficacité du nettoyage NEP, présence de microorganisme dans l'eau de rinçage. Les analyses fait sur le matériel ont montré une contamination par les coliforme au niveau des précuisons, Cuves, couleuses. Pour hygiène du personnel, les analyses ont montrées une présence de streptocoque D et coliforme, pour l'ambiance un développement de moisissure et de levures.

Mots clé : NEP, nettoyage, désinfection, biofilm, contamination

Abstract

The objective of this work was to control the effectiveness of the cleaning and disinfection system disinfection system (CIP cleaning / enzymatic cleaning) adopted by the dairy at the cheese factory of the bel company. We started with microbiological analyses, which consisted of the research of the total Flora 22°C, total Flora 36°C, the coliforms, to analyze the rinsing water, the material, the hygiene of the personnel of the material, the hygiene of the personnel, and the atmosphere was carried out in manufacture on all the surfaces of process. The results obtained, according to the methodology used, these analyses showed an inefficiency of CIP cleaning, presence of microorganism in the rinsing water. The analyses made on the material showed a contamination by coliforms at the level of the precookers, tanks, pouring machines. For l'hygiene of the personnel, the analyses showed a presence of streptococcus D and coliform, for the environment a development of mold and yeast.

Key words: CIP, cleaning, disinfection, biofilm, contamination

ملخص

هدفنا من هذا العمل هو تقيّم فعّالية نظام التنظيف و التطهير (الذي تنتجناه منتجات اللبان) مصنع الجين التابع لشركة بيل بيتنا بالحلّالت الميكروبيولوجية, والناجيات لنا على مجموع النباتات 22 و مجموع النباتات 63, و البكتيريا القولونية, نحلّل مّاها الشفط , المععدات , نظافة الموظفين و الجو. و لنا جمع السطح التجريبية التابعة لإنتاج .

النتائج التي تم الحصول عليها وفقا للمنهجية المستخدمة اظهرت هذه التحاليل عدم فعّالية التنظيف باستخدام نظام ال ووجود الكائنات الحية الدقيقة لنا مّاها الشفط و اظهرت التحاليل البنية اجرية على المععدات وجود تلوث من قبل البكتيريا القولونية على مستوى ما قبل الطبخ, والخزانات, السكاكين . اما بالنسبة لنظافة الموظفين فقد اظهرت التحاليل وجود الميكروبات العقدية د و الكوليفورم, اما عن الجو اظهرت النتائج تطور العفن و الخمائر

الكلمات المفتاحية: التنظيف الميكروبيولوجي, التطهير, التنظيف, الغشّة الجوّية , و التلوث

Liste des tableaux

Tableau n°1 : résumé l'effet général des facteurs environnementaux sur la formation de biofilms	
Bactériens Dans l'industrie alimentaire.	16
Tableau n°2 : choix de détergent en fonction de types de souillures.....	21
Tableau n°3 : mode d'action des principaux désinfectants.....	22
Tableau n°4 : les détergents utilise.....	31
Tableau n°5 : Le protocole de nettoyage et désinfection.....	36
Tableau n°6 : Niveaux de prélèvement des échantillons à contrôler.....	38
Tableau n°7 : Résultats bactériologique de lavage enzymatique	45
Tableau n°8 : Les résultats d'analyses enzymatiques par frottis.....	46

Liste de figure

Figure 1 : Représentation de la distribution des principaux composants de la matrice du biofilm (Polysaccharides, protéines et ADN) parmi les cellules qui habitent le biofilm	6
Figure 2 : Etapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérienne.....	8
Figure 3 : L'image SME de <i>S. aureus</i> intégré dans un biofilm colonisé sur un cathéter intravein.....	17
Figure 4: Méthode CRA appliquée sur support CRA. Colonies cristallines noires de cellule productrice de biofilm et Colonies rouge rose de cellule non productrice de biofilm.....	18
Figure 5 : Méthode du tube les deux premiers tubes à essai en polystyrène a partir de la gauche Indiquent la production de biofilm. D'autres tubes à essai plutôt que les deux premiers tubes a essai en Polystyrène à partir de la gauche indiquent un manque de production de biofilm.....	19
Figure n°6 : diagramme de fabrication du fromage fondu.....	29
Figure n° 7 : Broyeur de fromager de fonte (emmental, cheddar ...)......	33
Figure n°8 : Profil d'un circuit fermé.....	34
Figure n°9 : Révélation de biofilm sur des pièces de coulée.....	35
Figure n°10 : Traitement enzymatique en bac et cagette de lavage.....	36
Figure n°11 : Application de la solution enzymatique à l'aide de canon à mousse.....	39
Figure n°12 : biofilm test.....	40
Figure n°13 : tube de slyme burt.....	43
Figure n°14 : résultats des analyses microbiologiques de l'eau de rinçage au niveau de la cuve de brassage léger (bl1).....	43
Figure n°15 : résultats des analyses microbiologiques de l'eau de rinçage au niveau de lacuve de brassage fort (bf).....	44
Figure n°16 : résultats des analyses microbiologiques de l'eau de rinçage au niveau de la cuve de brassage léger (bl2).....	44
Figure n°17 : control hygiène de mains personnelles.....	47
Figure n°18 : Contrôle d'ambiance atelier Fabrication / Conditionnement.....	48

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AHLs : N-acyles homo-sérines lactones

BHI : Brainheart infusion

CAQ : les composés d'ammonium quaternaire

CRA: Congo red agar

EPS: Exopolysaccharides (Extracellular polymeric substance)

HHP : La haute pression hydrostatique

LAB : bactéries lactiques acidifiantes

MCBL : Microscopie confocale par balayage au laser

MS: spectrométrie de masse

PBS : phosphate-buffered saline (Tampon phosphate salin)

QQ : quorum quenching

QS : le quorum sensing

TM : La méthode du tube

TSB : tryptycase soja bouillon

UFC : les unités formant colonies

Sommaire

Résumé	
Abstract.....	
ملخص.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction.....	1

Partie Rappels bibliographique

Chapitre 1: État des connaissances

1. Définition.....	4
2. Composition du biofilm.....	4
3. Le cycle de vie d'un biofilm et sa régulation.....	6
4. Quorum Sensing.....	9
5. Biofilm laitier.....	9
6. Composition des biofilms laitiers.....	10
7. Aspects sanitaire liés aux biofilms de l'industrie alimentaire.....	11
8. Avantage du Mode de vie biofilm.....	14

Chapitre 2: Développement de biofilms dans les environnements de transformation des aliments

1. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....	14
2. Méthodes de détection des biofilms.....	17
3. Méthode de contrôle et d'élimination de la formation de biofilms dans l'industrie alimentaire.....	20

Partie étude expérimental

Chapitre 1 : matériel est méthode

1. Objectif.....	28
2. présentation de l'unité.....	28
3. Processus de fabrication du fromage fondu.....	29

4. Les détergents et désinfectants utilisés au niveau de bel...	31
4.1. les détergents utilisés...	31
4.2. la désinfection utilisée	32
5. méthode de nettoyage et désinfection adopté par bel Algérie...	32
5.1. Nettoyage Nep (cip)	32
5.2. Lavage enzymatique...	33
5.2.1.1. Parte fabrication	33
5.2.1.2. Parte conditionnement.....	34
6. Protocole de nettoyage et désinfection adopté par bel	35
7. Echantillonnage et techniques de prélèvement.....	37
8. Méthode de contrôle.....	39
9. Techniques d'analyses.....	40
9.1. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile	40
9.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux	41
9.3. Dénombrement de levures et moisissures... ..	41

Partie résultat et discussion

1. Les analyses de Léau de rinçage (CIP)
2. Résultats bactériologique de lavage enzymatique
 - 2.1 Les résultats d'analyses enzymatiques par frottis au niveau des trémies:
3. Les résultats de contrôle hygiène des maies personnalisé des employés



Introduction

La transformation du lait en fromage est très fréquente dans le monde où il existe une très grande variété de celui-ci (Eck 1987). Le fromage est connu depuis des temps immémoriaux par la plupart des cultures à travers le monde. Les indigènes le fabriquent par l'utilisation des procédures purement traditionnelles (sans addition de levains) pendant des siècles. Cette technologie de fabrication a été par la suite transférée d'un pays à l'autre au temps que les hommes se déplaçaient à travers le monde (Lahsaoui 2009). Plus de 20 millions de tonnes de fromages sont produits chaque année, soit près de 655 kilos par seconde. Les Etats-Unis sont le premier pays producteur mondial de fromage avec 5584857 tonnes par an, l'Algérie 85000 tonnes par an (Bureau business franc 2017)

Le fromage est une denrée hautement périssable surtout lorsqu'il est préparé dans de mauvaise condition d'hygiène. En effet, la contamination de microorganisme dans les vecteurs sont très variés (l'infrastructure, le matériel, le personnel, les matières premières ainsi que l'eau utilisée), constitue la principale source d'apports de microorganismes responsables d'altérations de la qualité nutritionnelle et marchande du produit mais aussi des maladies pour le consommateur. La transformation du lait en fromage, doit dans ce cas prendre en compte l'hygiène de ces différents vecteurs qui regroupe l'ensemble des mesures et précautions qui visent, à prévenir les risques de contamination où d'altération du produit par les bactéries, les champignons, et Les moisissures. Ces êtres vivants sont associés les uns aux autres par des relations adaptées à leurs besoins Biologiques, elle peut colonisée et recouverte d'un biofilm.

Les biofilms sont la cible d'importantes recherches montrant que leurs propriétés biologiques sont aussi diverses que les organismes qui les constituent et qu'il existe une multitude d'environnements dans lesquels ils peuvent se développer, sur n'importe quel type de surface naturelle ou artificielle.

Le biofilm s'avère une structure complexe formée grâce à l'agglomération des microorganismes, Facilitée par les matières polymériques qu'ils excrètent, Au sein des biofilm.

Le nettoyage et la désinfection dans l'entreprise alimentaire est un sujet d'actualité (Singh Parul, 2019) chaque entreprise alimentaire applique ses propres techniques. Dans le souci de réduire considérablement cette contamination, qui peut induire des graves toxi-infections et intoxication alimentaires. Pour éviter tous ces problèmes de contamination l'entreprise Bel adopte avec le contrôle microbiologique et physicochimiques le nettoyage et la désinfection des surfaces au contact de ces produit comme stratégie préventive. Notre travail entrepris dans cette entreprise au niveau de la chaine de production du fromage fondu a été mené dans l'objectif de contrôler cette stratégie qui consiste à l'évaluation de l'efficacité de la méthode de nettoyage et de désinfection

adoptée, par la réalisation des analyses microbiologiques à savoir l'analyse des eaux de rinçages , du matériel, de l'hygiène du personnel de l'ambiance.

Ce travail est composé :

- Introduction
- Chapitre 1 : synthèse bibliographique mettant en exergue les notions générales sur les biofilms, Les méthodes de contrôle, méthode d'élimination.
- Chapitre 2 : partie de méthodologie utilisée pour évaluer l'efficacité de nettoyage et désinfection dans l'industrie laitière. elle comporte la partie de matérielle est méthodes et les techniques adoptées. Les résultats sont présents avec des interprétations ainsi qu'une discussion
- Conclusion



Partie bibliographique

Chapitre 1: État des connaissances

1. Définition d'un biofilm:

Les biofilms sont des agrégations tridimensionnelles de micro-organismes fixés sur des surfaces. Les bactéries du biofilm s'assemblent et forment une matrice protectrice autour d'elles. On estime que jusqu'à 90 % des populations microbiennes existent sous forme de biofilms, plutôt que sous forme d'organismes discrets (cellules planctonique) flottant dans l'environnement.

"Les biofilms sont des communautés microbiennes sessiles où les microbes vivent en association les uns avec les autres sur des substrats biotiques ou abiotiques qui sont liés par des polysaccharides extracellulaires, des protéines, des lipides et de l'ADN." En d'autres termes, les biofilms représentent tout simplement un mode de vie bactérien important qui colonise la plupart des surfaces dans la nature. (Parul et al. 2019)

2. Composition du biofilm :

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 (Sutherland 2001). L'organisation d'un réseau de canaux aqueux au sein du biofilm permet l'acheminement de l'oxygène et des nutriments entre les microcolonies et vers les régions les plus enfouies, ainsi que l'évacuation des déchets. Toutefois, un gradient de nutriments et d'oxygène existe depuis la superficie vers la profondeur du biofilm, où l'environnement devient plus propice aux organismes évoluant en anaérobiose. Ainsi, l'état métabolique d'une bactérie au sein du biofilm peut être directement dépendant de sa localisation à l'intérieur de la structure (O'Toole G.2000). La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau. Elle peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations (Karatan E, 2009). La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance.

Les exo polysaccharides : La composition des exo polysaccharides est très différente d'un biofilm à l'autre. Elle dépend de la nature des microorganismes présents dans le biofilm, de l'âge du biofilm et des différents facteurs environnementaux comme les forces hydrodynamiques, la température et la disponibilité de nutriments et leur nature (Chalvet.2009) le plus souvent retrouvé est un polymère de β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine (polyglucosamine, PGA ou PNAG). On retrouve ce polymère chez plusieurs espèces bactériennes, dont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia pestis*, *Bordetella* spp. Et *Actinobacillus* spp. Ces exopolysaccharide permettent l'adhésion aux surfaces et le maintien de l'intégrité structurelle. Il joue aussi un rôle majeur dans les propriétés de résistance aux biocides des biofilms, en se liant

Partie Bibliographique

directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (Karatan.2009).

Partie Bibliographique

La cellulose, un polymère linéaire de glucose, est également retrouvée fréquemment chez diverses espèces et genres bactériens, dont *E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. Il existe plusieurs autres polysaccharides dont le glucane chez *Streptococcus mutans* et l'alginate retrouvé chez *Pseudomonas*.

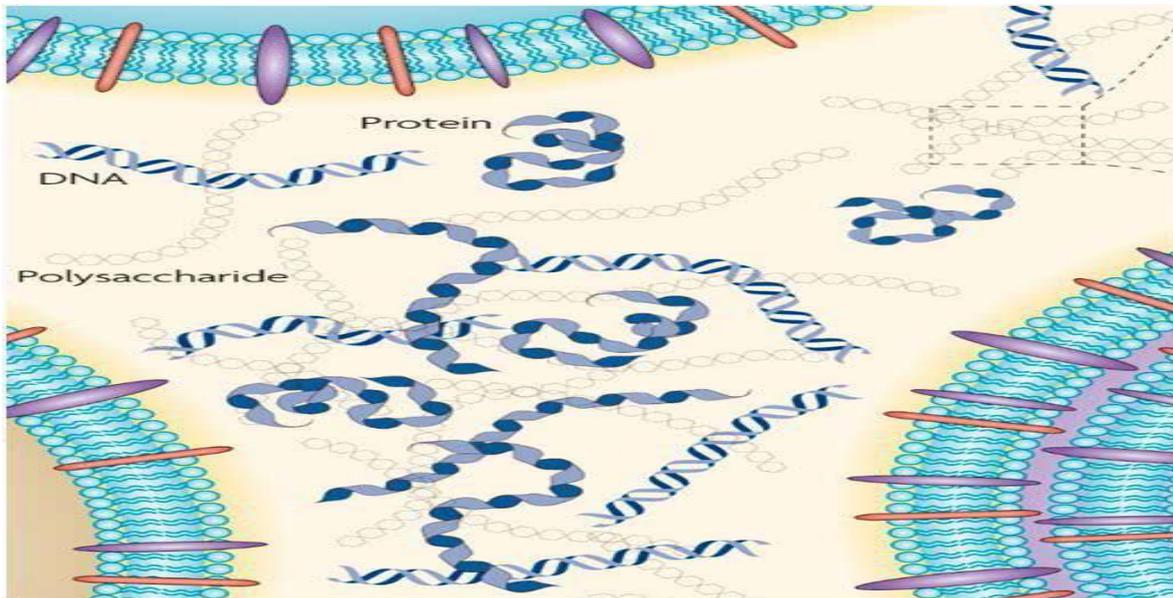


Figure 1 : Représentation de la distribution des principaux composants de la matrice du biofilm (Polysaccharides, protéines et ADN) parmi les cellules qui habitent le biofilm (**Flemming, 2010**).

2.1 Les protéines extracellulaires :

Les protéines présentes dans la matrice extracellulaire ont des fonctions qui permettent la croissance du biofilm et la survie des cellules hébergées grâce à l'accès aux nutriments ou la régulation de l'intégrité et de la stabilité du biofilm.

2.2 ADN extracellulaire :

L'ADN extracellulaire (ADNe) constitue une partie intégrante de la matrice du biofilm et de son mode de vie. Certaines bactéries, sous le contrôle de signaux du Quorum Sensing, libèrent des copies de leur ADN dans le milieu. D'autres bactéries meurent et se lisent au sein du biofilm et libèrent leur ADN au sein de la matrice. L'ADN très chargé négativement qui s'accumule autour des bactéries les protège contre l'activité de composés cationiques bactéricides (peptides antimicrobiens, certains antibiotiques). L'ADN représente une molécule idéale pour assurer la formation d'un échafaudage structurant du biofilm. Permet l'échange de gènes au sein du biofilm et peut servir de source de nutriments dans des conditions oligotrophiques (Wingender et al. 1999).

2.3 Tensioactifs et lipides :

Contrairement aux polysaccharides, aux protéines et à l'ADN, qui sont des molécules hydrophiles, d'autres molécules aux propriétés hydrophobes existent dans la matrice du biofilm. Cette hydrophobie est associée aux substituants méthyle et acétyle dans les lipides, qui sont cruciaux pour l'adhésion des bactéries aux surfaces. Les biosurfactants ont été identifiés comme des facteurs

Partie Bibliographique

qui favorisent la formation initiale de microcolonies , facilitant ainsi la migration des bactéries associées vers la surface et la formation de structures en forme de champignon, empêchant ainsi la propagation des bactéries , empêchant la colonisation des canaux et contribuant à la dispersion du biofilm.

2.4 L'eau :

Est le composant le plus important de la matrice du biofilm. La matrice EPS constitue un environnement hautement hydraté qui sèche plus lentement que son environnement et protège donc les cellules du biofilm contre les fluctuations du potentiel hydrique. De nombreux SPE sont hygroscopiques et semblent retenir l'eau par voie entropique plutôt que par des mécanismes spécifiques de liaison à l'eau. Il a été proposé que les EPS entraînent un découplage hydraulique (la formation de zones qui n'ont pratiquement aucun échange de d'eau avec leur environnement. Un exemple est une couche d'EPS desséchée qui couvre en eau mais dont le transport d'eau à travers la couche retenant eau) lors d'événements rapides de mouillage ou de séchage, protégeant les bactéries intégrées dans le biofilm. Les bactéries répondent activement à la dessiccation en produisant de la PSE (Roberson,1992) . La dessiccation semble être l'une des conditions environnementales dans lesquelles la PSE offre des avantages globaux à la fois aux producteurs de PSE et aux autres membres de la communauté du biofilm (Potts, 1994) . La dessiccation concentre la PSE, augmentant le nombre de sites de liaison non spécifiques qui peuvent réagir entre eux (par rapport au nombre qui peut réagir lorsque les composants de la PSE sont séparés à une teneur en eau plus élevée) et réduisant le volume du biofilm. Ce phénomène peut être facilement observé sur les biofilms phototrophes fixés aux murs, qui se recroquevillent lorsqu'ils se dessèchent.

3. LE CYCLE DE VIE D'UN BIOFILM ET SA REGULATION :

Le cycle de mise en place d'un biofilm peut être considéré comme un équilibre dynamique entre les phénomènes qui tendent à en augmenter l'épaisseur (multiplication des cellules qui le composent ou agrégation de nouveaux organismes planctoniques, en suspension) et les phénomènes qui tendent à en réduire l'épaisseur (mécanismes de détachement) (Squinazi., 2013). L'étude de ce phénomène est complexe et relève de l'interdisciplinarité : microbiologie, génétique, physico-chimie de surface... L'approche par la génétique et la biologie moléculaire a permis un grand progrès dans la compréhension des mécanismes de formation et de développement des biofilms (Pratt.1999). Ce mécanisme est caractérisé par une modification de l'expression génétique et par un changement de phénotype des micro-organismes concernés. L'activation de nombreux groupes de gènes (10^3) en quelques minutes régule cette permutation de mode de vie (Lejeune P 2003). Trois critères influencent la formation d'un biofilm :

- Le phénotype et le métabolisme bactérien

- Le type et l'état de surface
- L'environnement physico-chimique et biologique (Hall-Stoodley L., 2004)

3.1 Les étapes de formation des biofilms :

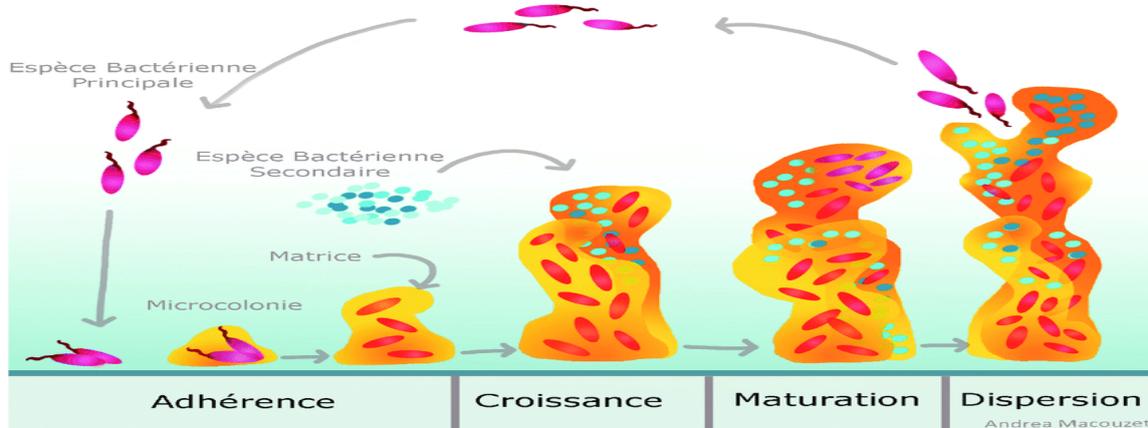


Figure 2 : Etapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérienne

(yannickdn 2014) .

3.1.1 Attachement réversible :

La fixation bactérienne à la surface représente un tournant entre la vie planctonique et le mode biofilm (Toyofuku et al, 2016). L'attachement réversible implique une interaction de micro-organismes planctoniques avec une surface conditionnée (Dunne 2002). Il a été rapporté que la fixation sera meilleure sur des surfaces rugueuses, hydrophobes et recouvertes de différentes substances organiques (Donlan 2002). Les structures bactériennes telles que les fimbriae, les pili et les flagelles renforcent l'interaction entre les bactéries et la surface de fixation (Jamal et al, 2018).

3.1.2 Attachement irréversible :

À ce stade, les organismes faiblement liés consolident le processus d'attachement en produisant des substances polymères extracellulaires qui se complexent avec des matériaux de surface et/ou des ligands spécifiques aux récepteurs situés sur les pili, les fimbriae et les fibrilles ou les deux (Dunne 2002). Une fois les micro-organismes fixés sur des surfaces préconditionnées et permissives, la cellule commence alors une adhésion irréversible et s'accumule sous forme d'amas cellulaires multicouches (Roy et al, 2018). Des études récentes ont révélé que la formation de biofilm commence avec une couche de substances polymères (EPS) dans laquelle les cellules microbiennes se multiplient à la surface (Jangat al, 2017). Au cours de cette étape, un certain nombre de changements physiologiques et structurels se produisent, tels que la non motilité des cellules attachées (Sauer et al, 2009) .

3.1.3 Formation des micro-colonies :

Les cellules microbiennes intégrées dans la matrice extracellulaire subissent une croissance communautaire coordonnée qui conduit à la formation de microcolonies. Selon Dunne (2002) la formation de microcolonies résulte de l'agrégation et de la croissance simultanées de micro-organismes et s'accompagne de la production d'EPS. Les microcolonies qui sont des unités de base du biofilm sont compartimentées par des canaux avec différents microenvironnements distincts (Zhao et al, 2017). Une fois que les cellules sont fermement attachées aux surfaces conductrices, de nombreux micro-organismes apparaissent et sécrètent des substances polymères qui peuvent agir comme une « colle » pour fixer les micro-organismes sur différentes surfaces.

3.1.4 Maturation :

Si les conditions sont propices à une croissance et à une différenciation suffisantes, un biofilm peut se développer en structures de biofilm matures tridimensionnelles bien disposées dans l'espace (Roy et al, 2018) telles que des structures en forme de champignon ou de tour entrecoupées de canaux remplis de fluide dans lesquels les nutriments, l'oxygène et les substances essentielles des substances peuvent être diffusées et circuler dans chaque Microenvironnement (Petrova, 2012). Le développement du biofilm est un comportement de groupe coopératif médié par des signaux chimiques dépendant de la densité libérés par des populations bactériennes intégrées dans une matrice extracellulaire autoproduite (Solano et al, 2014). Ce mécanisme de signalisation est connu sous le nom de détection de quorum qui est utilisé pour communiquer et orchestrer les comportements de groupe, y compris la sécrétion de facteurs de virulence et la formation de biofilm (Kim, et al, 2017). Le quorum sensing active la maturation et le désassemblage du biofilm de manière coordonnée (Solano et al, 2014) Généralement, la signalisation de cellule à cellule joue un rôle énorme dans l'attachement et le détachement des cellules du biofilm (RM Donlan et JW Costerton, 2002).

3.1.5 Dispersion :

La formation de biofilm est un processus cyclique dans lequel les cellules bactériennes se détachent du biofilm mature et entrent dans leur mode de vie antérieur, c'est-à-dire l'état planctonique. Comme le montre, les cellules bactériennes détachées chercheront de nouvelles surfaces pour se fixer et démarrer un nouveau cycle de formation de biofilm. Dans cette étape, les cellules microbiennes décideront en fonction des signaux environnementaux si elles vivent ensemble ou «s'effondrent» (Kostakioti 2013). Du point de vue de la contamination alimentaire, cette étape est importante pour disséminer les micro-organismes dans les produits alimentaires Les cellules du biofilm peuvent être détachées des cellules en croissance active ou de l'environnement privé, de la communication ou de l'élimination des agrégats. Il a été rapporté que la limitation des

Partie Bibliographique

nutriments oblige les micro-organismes à rechercher de nouveaux Environnements (Zhao et al, 2017).

4. Quorum Sensing :

Ce système est une stratégie de communication entre les microorganismes. Il a été découvert chez des bactéries marines bioluminescentes appelée *Vibrio fischeri* (Fuqua et al, 2002). Ce mécanisme a été retrouvé aussi chez d'autres bactéries Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* (Whitehead et al, 2001).

La formation du biofilm est régulée par une « communication » de cellule à cellule fondée sur une détection de la densité cellulaire. L'amplitude du signal est fonction de la taille de la population et, en fonction d'un certain seuil, le signal active un régulateur transformationnel inducteur de gènes spécifiques (mécanisme d'auto induction). Le mécanisme de QS.

4.1 Chez les bactéries à Gram positif :

La voie de communication cellulaire chez les bactéries à Gram positif fait impliquer des Molécules signales peptidiques, dont la protéine précurseur est sécrétée dans le milieu Extracellulaire et commencent à s'accumuler. Une fois le taux d'accumulation atteint une Concentration seuil, une zone d'auto-induction est créée. Les molécules peptidiques "signal" Interagissent avec l'histidine kinase portée par un récepteur membranaire (Ghosh, 2016) L'interaction du récepteur avec le ligand peptidique initie une cascade de phosphorylation qui aboutit à la formation de la protéine régulatrice. Une série de phosphorylation active donc un récepteur qui vient se fixer sur l'ADN et régule ainsi la transcription des gènes cibles (Bassler, 2001). Tout comme les bactéries à Gram négatif, ce type de système est aussi régulé de façon dépendante de la densité cellulaire (Ghosh, 2016).

4.2 Chez les bactéries à Gram négatif :

Le mécanisme de QS chez les Gram négatifs implique la production des petites molécules Inductrices appartenant à la famille des N-acyles homo-sérines lactones ou molécules acylés (AHLs) (Jafra, 2009). Les AHLs sont synthétisées par une protéine homologue le "LuxI", elles sortent par la suite des cellules par une simple diffusion, pour les courtes chaînes d'AHLs, ou par un transport actif pour les longues chaînes. Lorsque leur concentration atteint un seuil critique, Elles entrent dans les cellules et se fixent sur un récepteur homologue de Lux R. Le complexe AHLs – LuxR active la transcription de gènes spécifiques (Fuqua et al, 1994).

5. Les Biofilms dans les industries laitières :

Il existe deux types de biofilms dans l'industrie laitière. D'abord, les biofilms environnementaux sont ceux qui se développent lentement sur toutes les surfaces humides qui ne sont jamais en

Partie Bibliographique

contact avec les produits laitiers (drains, planchers, murs, plafonds) (Bremer et al, 2015). Les contaminations associées à ces biofilms sont indirectes. À l'inverse, les biofilms de procédé se développent sur les surfaces internes des équipements. Ils sont généralement peu diversifiés (dominés par peu d'espèces bactériennes) et se développent beaucoup plus rapidement (P. Bremer et al, 2015). Les biofilms de procédé sont les plus dangereux pour l'industrie.

6. Composition des biofilms laitiers :

La composition des biofilms retrouvés dans l'industrie laitière dépend fortement de la température de l'environnement dans lequel ils se développent (Seale 2015). Des levures ainsi que des Archae peuvent constituer les biofilms laitiers. Toute fois seules les bactéries seront considérées pour la suite de cette thèse en raison de leur prédominance dans les biofilms laitiers (P. Bremer et al. 2015). Il est possible de diviser les bactéries en trois groupes, selon leur température optimale de croissance : les psychrotrophes, les mésophiles et les thermophiles (Seale 2015).

6.1 Bactéries psychrotrophes

Jusqu'à sa transformation, le lait est maintenu à 4 °C pour ralentir sa vitesse de dégradation par les Microorganismes. Cette température favorise la croissance des bactéries psychrotrophes, principalement des bactéries à Gram négatif appartenant à la classe des γ -Protéobactéries dans laquelle on retrouve les *Pseudomonas* (la plus courante (Neubeck et al, 2015) les *Acinetobacter*, les *Enterobacter*, l'*Hafnia* et la *Klebsiella*, etc (Neubeck et al, 2015). Ces bactéries peuvent entre autres provenir des sources d'eau utilisées pour nettoyer les conduites de la ferme ou de l'usine laitière (Quigley et al, 2013). La plupart des psychrotrophes se développent entre 0 °C et 40 °C (Seale, et al, 2015). Certaines bactéries sporulantes sont psychrotrophes, notamment certaines espèces du genre *Bacillus* ou *Paenibacillus* .

6.2 Bactéries mésophiles :

Comme les psychrotrophes, les mésophiles ont une température maximale de croissance d'environ 40 °C, mais leur température minimale est de 10 °C (Seale, et al, 2015). Plusieurs bactéries pathogènes sont mésophiles : *Bacillus cereus* ,*Campylobacter* spp .,*Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. Ou *Staphylococcus aureus* (Seale, et al, 2015). Les cultures de bactéries lactiques acidifiantes (LAB) utilisés en fromagerie les ont aussi : *Lactobacillus* spp.,*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* spp. Et *Streptococcus thermophilus* (Quigley 2015). Ces dernières sont souvent retrouvées sur les surfaces des salles de fabrication fromagère (Bokulich 2013) Certaines bactéries mésophiles sont particulièrement résistantes aux traitements thermiques; ces bactéries sont dites thermorésistantes ou thermoduriques(Seale2015). C'est le cas des Streptococcaceae tels que *Streptococcus thermophilus*, qui résiste à la pasteurisation du lait, mais dont la température optimale de croissance se trouve autour de 35 °C, selon la souche (Bouman

Partie Bibliographique

1982). *S. thermophilus* peut se développer jusqu'à 52 °C, mais ne croît généralement pas à une température inférieure à 10 °C (Sneath 1983).

6.3 Bactéries thermophiles :

Enfin, les bactéries thermophiles, qui se développent dans les environnements chauds (entre 45 °C et 70 °C), sont peu nombreuses dans le lait cru. Elles appartiennent le plus souvent à l'embranchement des Deinococcus-Thermus, tel que *Thermusthermophilus*, ou à celui des Firmicutes, plus précisément dans la famille des Bacillaceae (*Anoxybacillus flavithermus*, *Bacillus* spp., *Geobacillus* spp.) (Brooks 1997) Étant très résistantes à de nombreux stress, elles survivent tout au long du parcours des fluides laitiers dans l'usine et se développent où les autres n'en ont pas la capacité. De fait, elles dominent les surfaces des sorties de ligne de pasteurisation ou celles d'entrée des évaporateurs et des tours de séchage (Lindsay 2010) et peuvent se retrouver dans les sources d'eau chaude de l'usine (Quigley et al, 2016). Étant peu diversifiées au sein de l'industrie laitière, ces bactéries forment généralement des biofilms mono-espèce. Les *Bacillaceae* démarquent par leur production d'endospores, qui leur permettent de persister plus facilement dans les sections subséquentes aux traitements thermiques (Flint 2010). Le temps de génération rapide des *Bacillaceae*, est d'environ 15 à 20 minutes, doit aussi être souligné (Burgess, 2010).

7. Aspects sanitaire liés aux biofilms de l'industrie alimentaire :

Les maladies d'origine alimentaire associées aux biofilms bactériens sur les matrices alimentaires ou les équipements d'usine peuvent se manifester par des intoxications ou des infections. L'importance du risque dépend de l'espèce bactérienne qui forme cette structure vivante tridimensionnelle. Les lieux de développement des biofilms dépendent du type d'usine, mais peuvent inclure les canalisations d'eau, de lait et d'autres liquides, les plaques des pasteurisateurs, les membranes d'osmose inverse, les tables, les gants des employés, les carcasses d'animaux, les surfaces de contact, les silos de stockage des matières premières et des additifs, les tubes de distribution, le matériel d'emballage. Les principales bactéries qui sont responsables sont les suivants :

7.1 *Bacillus cereus* :

Bacillus cereus est une bactérie anaérobie ou anaérobie facultative Gram positive et sporulée qui a la capacité de se développer dans différents environnements et dans une large gamme de températures (4-50 °C) en plus d'être résistante à la chaleur, aux traitements chimiques et aux radiations (Bottone, 2010). Cette bactérie est capable de survivre aux processus industriels de pasteurisation grâce à la production d'endospores. Ce fait complique l'élimination du biofilm avec des procédures de nettoyage (Auger et al, 2009) et peut affecter la persistance du biofilm dans les usines laitières, réduisant la durée de conservation du lait et de la crème pasteurisés, où des niveaux

Partie Bibliographique

de 103 à 1010 UFC ont été détectés dans des lots associés à des épidémies (Gopal et al, 2015). Certaines souches de cette bactérie sont capables de produire des entérotoxines diarrhéiques, qui provoquent des douleurs abdominales, tandis que d'autres souches produisent la toxine émétique (céréulide thermostable), qui provoque des symptômes de vomissement. Les biofilms de *Bacillus cereus* sont souvent associés à d'autres microorganismes le long des chaînes de transformation alimentaire (Majed et al, 2016). Cette association est favorisée par leur matrice complexe d'exopolysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire, qui sont nécessaires à leur adhésion sur différentes surfaces comme le verre (Vilain et al, 2009). L'attachement initial de *B. cereus* sur les surfaces de fabrication des aliments provoque un effet de préconditionnement, car il facilite l'attachement rapide d'autres espèces bactériennes qui seraient autrement éliminées par le flux d'eau, les flux de lait ou d'autres mécanismes physiques présents dans ces industries (Marchand et al, 2012).

7.2 *Salmonella enterica* :

Salmonella enterica est une bactérie Gram négatif, en forme de bâtonnet, flagellée et aérobie facultative. Elle peut provoquer des gastro-entérites ou des septicémies (dans le cas de certains sérovars) (Wang et al, 2013). *S. enterica* serovar Enteritidis est le sérotype le plus fréquent générant nausées, vomissements, fièvre, diarrhée et douleurs abdominales comme principaux symptômes (Nguyen et al, 2014). La viande de volaille est un réservoir commun de ces bactéries dans les aliments transformés. Son importance en tant que pathogène alimentaire est démontrée par le fait que la formation de biofilms de *S. enterica* sur des surfaces alimentaires a été le premier rapport de ces structures complexes et multicellulaires (Duguid et al, 1966).

S. enterica est capable de se développer sur des surfaces en acier inoxydable, ce qui donne lieu à une structure en 3D avec plusieurs couches de cellules, qui peuvent présenter différentes morphologies en fonction des nutriments disponibles. *S. enterica* peut survivre dans un biofilm sur l'acier inoxydable pendant plus d'un an. A partir de là, il est possible pour cette bactérie de contaminer des milliers de lots d'aliments (Morita et al, 2011). En fait, la principale source de contamination par cette bactérie est la formation d'un biofilm dans les infrastructures utilisées lors de la fabrication d'aliments précuits (telles que les installations de précuisons).

7.3 *Escherichia coli* entérohémorragique :

Escherichia coli est une bactérie Gram-négative en forme de bâtonnet. La plupart des souches d'*E. coli* font partie du microbiote intestinal humain et ne posent aucun problème de santé. Cependant, les types de virulence de d'*E. coli* comprennent les entérotoxiques (ETEC), les entéro-invasifs (EIEC), les entéro-pathogènes (EPEC) et les VeroColi.(EPEC) et cytotoxique de Vero (VTEC). L'EHEC O157:H7 est le sérotype le plus fréquemment associé aux infections EHEC chez l'homme. La plupart des souches d'*E. coli* font partie du microbiote intestinal humain, où elles ne

Partie Bibliographique

représentent pas un problème de santé. Cependant, d'autres souches présentent un risque pour la santé et sont des agents pathogènes nocifs d'origine alimentaire transmis par l'eau potable, les fruits et légumes (tomates, melons, persil, coriandre, laitue, épinards, etc.), le lait cru ou la viande fraîche.). Ces produits peuvent avoir été contaminés à leur origine ou au cours du processus de fabrication des aliments. Dans l'industrie alimentaire, cette contamination peut avoir lieu pendant la période précédant la récolte, en raison de l'utilisation d'une eau contaminée lors de la culture des légumes. Cette contamination peut également avoir lieu dans les environnements post-récolte, où elle peut apparaître après le lavage et le traitement de la matière première (carcasses, légumes, etc.), mais aussi en raison des températures de stockage qui permettent une croissance rapide des contaminants bactériens présents (Carter et al, 2016). L'hydrophobie des matériaux de surface joue un rôle important dans la formation de biofilms par cette espèce.

7.4 *Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram positif, non sporulée, non mobile et anaérobie facultative. C'est un pathogène opportuniste pour l'homme, en grande partie en raison de sa production caractéristique d'entérotoxines à des températures comprises entre 10 et 46°C. Cette espèce est capable de se multiplier sur les muqueuses et la peau des manipulateurs d'aliments, un problème majeur pour les usines alimentaires (Giaouris et al, 2015), car les entérotoxines staphylococciques sont thermostables et sont sécrétées lors de la croissance de cette bactérie dans une matrice alimentaire, éventuellement contaminée par le manipulateur d'aliments ou un animal. La croissance des biofilms de *S. aureus* est favorisée par diverses méthodes de transformation rencontrées dans l'industrie alimentaire, telles que des températures sous-optimales, une désinfection inadéquate ou une combinaison de sel et de glucose. La transcription de gènes impliqués dans la formation de biofilms et la virulence chez ce pathogène (protéines de surface, protéases, polysaccharides capsulaires) est régulée à la hausse en présence de concentrations sublétales de divers détergents courants utilisés dans l'industrie alimentaire (Slany et al, 2017)

7.5 *Listeria monocytogenes* :

L. monocytogenes est un pathogène mésophile en forme de bâtonnet, Gram positif, catalase positive, anaérobie facultatif, non sporulant, psychotrophe (Wilks S 2006). Sa capacité à survivre à des températures comprises entre 0,4 et 50 °C, à un pH de 4,6 à 9,5, à une faible activité de l'eau jusqu'à 0,92 et à des concentrations élevées de sel (Liu d 2006).

L. monocytogenes est une bactérie ubiquiste qui a été isolée dans le sol, les plantes, l'ensilage et l'eau, en particulier dans les environnements de transformation des aliments et notamment dans les locaux réfrigérés, bien qu'ils soient régulièrement nettoyés et désinfectés (FerrieriaV 2014)) ; elle est donc responsable de nombreuses épidémies alimentaires (Freitag N 2009) le tractus intestinal chez l'homme, 2-10% de la population générale est porteuse du micro-organisme sans conséquences

Partie Bibliographique

apparentes pour la santé (Bunchanan R 2017) son entrée dans les usines de transformation des aliments peut se faire par de nombreuses voies différentes, depuis les matières premières jusqu'au contact avec des surfaces contaminées sur les équipements ou plus généralement dans les installations (Moreto T 2004).

8. Avantage du Mode de vie biofilm :

L'organisation sous forme de biofilm présente des avantages significatifs par rapport aux bactéries planctoniques, le développement sur un support solide permet d'apporter une certaine stabilité dans les paramètres environnementaux, facilitant ainsi la croissance bactérienne. De plus, cette organisation permet de se prémunir contre divers dangers environnementaux tels que l'exposition aux UV, la présence d'éléments toxiques (métaux, acides, antibiotiques...), la salinité, la déshydratation ou encore la phagocytose et la présence de virus. En effet la matrice joue le rôle de barrières chimique et physique, limitant l'accès de potentielles agressions à l'ensemble de la population. Cependant, il est à noter que ces mêmes propriétés peuvent être responsables d'une limitation de l'accès aux substrats au sein des couches inférieures du biofilm. En outre plusieurs états physiologiques des cellules peuvent être trouvés au sein d'un même biofilm. Chaque état pouvant avoir une sensibilité différente à l'agression donnée (notamment certaines cellules dites dormantes peuvent présenter une résistance accrue aux antibiotiques), cette diversité garantit la pérennité de la colonisation microbienne (Walters et al, 2003). Au-delà de cette diversité physiologique, on trouve dans les biofilms matures une diversité de micro-habitats permettant la recrudescence d'une large variété de métabolismes et/ou d'espèces (Stoodley et al, 2002). Là encore, par ses différents degrés d'organisation et de variabilité, le biofilm assure une colonisation durable et robuste de son milieu. Enfin les différents phénomènes de dispersion, qu'ils soient actifs via la motilité microbienne ou passifs via les forces exercées par le fluide, permettent aux microorganismes de coloniser de nouveaux milieux (Hall-Stoodley et al, 2004). Ainsi ces arguments expliquent l'avantage stratégique d'une organisation en biofilm par rapport à une configuration planctonique et donc l'ubiquité de ce mode de vie.

Chapitre 2 : Développement de biofilms dans les environnements de transformation des aliments.

1. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm :

Il est bien connu que les conditions environnantes sous lequel les bactéries se développent influencent largement le comportement des cellules planctoniques : la croissance, la résistance, la production de toxines, etc. Parmi ces facteurs, nous trouvons la température, les nutriments, les métaux, osmose, l'activité de l'eau, le pH, le potentiel redox, les communautés microbiennes,

Partie Bibliographique

l'interaction avec l'hôte, stress, antimicrobiens, etc. De même, les conditions environnementales peuvent modifier l'état physiologique des cellules dans un biofilm bactérien. Etant donné que la formation de biofilm nécessite une interaction entre les cellules bactériennes et le substrat, les facteurs environnementaux peuvent influencer à la fois propriétés bactériennes et les propriétés du substrat (principalement les propriétés physico-chimiques. Encore, l'effet des principaux facteurs environnementaux conditions se sont produites dans la transformation des aliments sur la formation de biofilm bactérien est décrite.

Partie Bibliographique

Le tableau 1 : L'effet des facteurs environnementaux sur la formation de biofilms bactériens dans l'industrie alimentaire (Pagán, 2015)

Facteur		Effets générale	References
- Composition des produits Chimiques	- La texture	- La surface rugueuse du substrat favorise l'initiation du biofilm	(Mariani et al., 2011; Wirtanen et al., 1996)
	- Hydrophobicité	- Les surfaces des matériaux hydrophobes favorisent l'attachement des bactéries aux propriétés hydrophobes	(An and Friedman, 1998; Katsikogianni and Missirlis, 2004)
	- La charge de Surface	- Les charges de surface opposées du substrat et la cellule favorisent l'attachement	(Morisaki and Tabuchi, 2009)
- Température		- Des températures plus basses conduisent à des propriétés plus uniformes des polysaccharides, ce qui stimule la formation de biofilm - Les températures plus basses diminuent le niveau hydrophobie de la surface cellulaire ce qui entraîne une moindre formation de biofilm.	Di Ciccio et al., 2015 ; Garrett et al., 2008).
- Concentration d'oxygène		- La diminution d'oxygène a l'intérieur des biofilm réduit l'activité métabolique des bactéries et inhibe la croissance bactérienne.	(Chavant et al., 2002; Di Ciccio et al., 2015; Garrett et al., 2008) .
- L'effet hydrodynamique		- Des taux de cisaillement plus élevés diminuent la fixation des bactéries mais augmentent la densité et la finesse des biofilm	(Anderson and O'Toole, 2008)
- Composition de la matrice alimentaire		- L'osmolarité élevée de la matrice alimentaire inhibe la formation de biofilms - Influence du pH et de la force ionique sur la formation de biofilm par des modifications de l'hydrophobie des surfaces	(Jubelin et al., 2005; Katsikogianni and Missirlis, 2004)
- Interactions microbiennes		Effets de la variable	(Bridier et al., 2015; Van Houdt and Michiels, 2010)

A) Observation directe :

1. Méthodes microscopiques

Les méthodes les plus fréquemment suivies pour évaluer l'hétérogénéité du biofilm sont l'imagerie microscopique directe de la morphologie du biofilm local ou les mesures microscopiques de l'épaisseur du biofilm local (Ansari, 2015) Pour de nombreuses applications, la microscopie time-lapse avec la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) est un outil idéal pour la surveillance à une résolution spatiale de l'ordre du micromètre, et elle permet l'étude non destructive des biofilms en examinant toutes les couches à différentes profondeurs. De cette manière, il est possible de reconstituer une structure tridimensionnelle (Lawrence, 1999). La détection de la matrice peut être réalisée par une technique de double coloration combinée au CLSM, qui permet l'imagerie simultanée des cellules bactériennes et du glycocalyx dans les biofilms (Ommen, 2007).

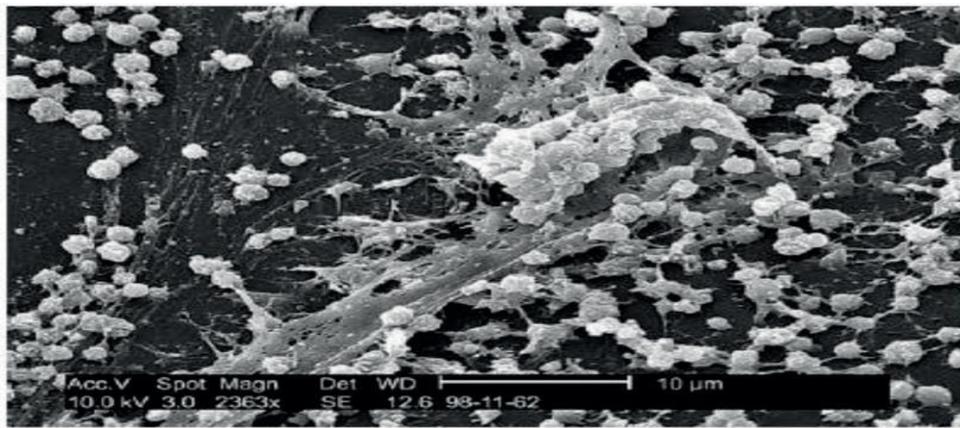


Figure 3 : L'image SME de *S. aureus* intégré dans un biofilm colonisé sur un cathéter intravein (Suchita et al, 2021)

2. Bio Finder :

La détection des biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments à l'aide des méthodes traditionnelles de culture microbiologique peut prendre beaucoup de temps. Pour l'industrie alimentaire, il est très important de réduire le temps nécessaire pour confirmer la contamination microbienne afin de connaître l'état hygiénique de l'environnement et de pouvoir prendre rapidement des mesures correctives. C'est pourquoi l'utilisation de Bio Finder est une bonne solution, car il détecte visuellement la présence de biofilms quelques secondes ou minutes seulement après l'application. Le produit est conçu pour réagir avec la catalase, une enzyme présente dans presque toutes les cellules vivantes et universellement présente dans les biofilms. Lorsque des biofilms sont présents, il produit un changement de couleur très visible et une couche de nombreuses petites bulles. Bio Finder peut également être utilisé pour vérifier les points d'inspection critiques juste avant la désinfection et pour valider les procédures d'hygiène correctes sur les sites de production. (Suchita et al, 2021)

3. Observation indirecte :

1. Méthode de la plaque roulante :

La méthode de la plaque roulante est appliquée pour la détection d'une éventuelle colonisation microbienne ayant un potentiel de développement d'une infection associée à un dispositif à demeure sur la surface externe de matériaux cylindriques tels que les cathéters et les greffes vasculaires. La colonisation microbienne sur la surface externe du cathéter est détectée par la méthode de la plaque roulante, au lieu de la colonisation microbienne sur le site intraluminal du cathéter. Le matériau est touché et roulé sur la surface du support.

2. Méthode de la gélose au rouge Congo (CRA) :

La méthode de la gélose au rouge Congo (CRA) est un test qualitatif pour la détection des microorganismes producteurs de biofilms, en raison du changement de couleur des colonies inoculées sur le milieu CRA, décrit par Freeman et al. Le milieu CRA est construit en mélangeant 0,8 g de rouge Congo et 36 g de saccharose à 37 g/L de gélose Brainheart infusion (BHI). Après une période d'incubation de 24 heures à 37 °C, la morphologie des colonies qui ont pris des couleurs différentes permet de déterminer si elles sont productrices de biofilms ou non. Les colonies noires avec une consistance cristalline sèche indiquent des producteurs de biofilm, tandis que les colonies conservées en rose sont des non producteurs de biofilm.

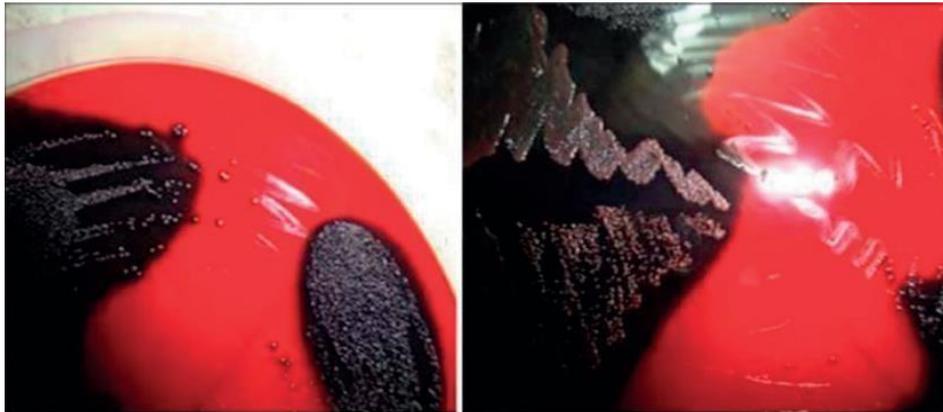


Figure 4 : Méthode CRA appliquée sur support CRA. Colonies cristallines noires de cellule Productrice de biofilm et Colonies rouge rose de cellule non productrice de biofilm (Suchita et al, 2021)

3. Méthode du tube (TM) :

La méthode du tube (TM) est un test qualitatif pour la détection des microorganismes producteurs de biofilms, suite à l'apparition d'un film visible. Les isolats sont inoculés dans des tubes à essai en polystyrène contenant du TSB et incubés pendant 24 heures à 37 °C. Les isolats sessiles dont les biofilms se sont formés sur les parois du tube à essai en polystyrène sont colorés à la safranine pendant 1 h, après que les cellules planctoniques aient été éliminées par deux rinçages avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Ensuite, le tube à essai en polystyrène coloré à la

Partie Bibliographique

safranine est rincé deux fois avec du PBS pour éliminer la coloration. Après séchage à l'air du tube à essai, l'apparition d'un film visible sur les parois et le fond du tube indique la production d'un biofilm



Figure 5 : Méthode du tube les deux premiers tubes à essai en polystyrène à partir de la gauche Indiquent la production de biofilm. D'autres tubes à essai plutôt que les deux premiers tubes à essai en Polystyrène à partir de la gauche indiquent un manque de production de biofilm. (Suchita et al, 2021)

4. Bioluminescence à l'ATP :

La bioluminescence ATP, basée sur l'utilisation de l'enzyme luciférase, émet de la lumière en présence d'ATP qui est ensuite mesurée quantitativement avec un instrument appelé luminomètre. Bien que les résultats puissent être disponibles en 20 s, cette méthode n'est pas très adaptée à l'échantillonnage des biofilms, surtout lorsqu'ils sont matures, car le transfert d'ATP à l'intérieur du biofilm est très faible, et les faibles nombres d'ATP qui en résultent peuvent indiquer une faible charge microbienne alors qu'il s'agit en fait d'un biofilm mature composé d'une forte concentration de micro-organismes

5. Spectrométrie de masse :

Les EPS peuvent être détectées et caractérisées par spectrométrie de masse (MS). Les grandes molécules biologiques peuvent également être détectées et caractérisées dans des structures biologiques complexes telles que les EPS par MS. Les produits chimiques impliqués dans le processus du biofilm sont examinés en détail par la MS. L'ionisation par électro nébulisation (ESI) et l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) sont les types de SM. Dans le spectromètre de masse TOF (time-offlight), la masse est analysée par les ions désorbés dans la chambre à vide. Ces deux techniques sont combinées et appelées MALDI-TOF. L'échantillon est ionisé et vaporisé par un laser. Les ions générés à partir de l'échantillon par le laser passent à travers la colonne du dispositif MALDI-TOF vers le détecteur TOF par un champ électrique. Les mesures sont effectuées par TOF en fonction du rapport masse/charge de la molécule. Les bactéries sont identifiées, l'expression des protéines bactériennes telles que les protéines de surface et les exo

enzymes comme la β -lactamase en réponse aux antimicrobiens peut être suivie, et la croissance des bactéries est mesurée par les applications du MALDI.

6. Méthodes microbiologiques :

L'estimation du nombre total d'organismes (nombre total viable) est la technique la plus largement utilisée pour estimer les cellules viables du biofilm. Ce comptage se fait sur milieu gélosé et son résultat est les unités formant colonies (UFC). Basée sur l'approche des séries de dilutions en série suivie pour quantifier les micro-organismes, cette technique est simple et ne nécessite aucun équipement spécial (Azeredo, 2017). Les échantillons de surface (acier inoxydable, plastique, coupons en caoutchouc) avec des biofilms sont analysés par écouvillonnage ou sonication, et transférés sur des plaques de gélose. Ce milieu de culture peut être spécifique soit de l'espèce étudiée, soit d'espèces non spécifiques (milieu gélosé par comptage sur plaque).

Plusieurs auteurs (Xu, 1982) ont découvert que certaines espèces bactériennes peuvent entrer dans un état distinct appelé l'état viable, mais non cultivable (VBNC). Ces cellules vivantes ont perdu la capacité de se développer sur des milieux de gélose en plaque. Cependant, cette méthode présente de sérieux inconvénients et limites (Li, 2014): (i) la fraction de cellules vivantes détachées peut ne pas être représentative de la population de biofilm initiale ; (ii) une sous-population de cellules de biofilm peut être viable, mais non cultivable (VBNC), et ne peut pas être détectée par l'approche CFU pour l'estimation CFU de la récupération et de la quantification des cellules de biofilm viables. Plusieurs auteurs, tels que Cerca et al. (Cerca, 2011) et Olivera et al. (Oliveira, 2015), ont proposé d'appliquer la cytométrie en flux couplée à quelques fluorophores possibles comme alternative au nombre total viable des biofilms, car la cytométrie en flux résout les deux limitations de comptage des UFC en distinguant le total, le mort et le vivant.

2. Méthodes de contrôle et d'élimination de la formation de biofilms dans l'industrie alimentaire

Le développement de méthodes de contrôle en ligne pour suivre l'adhésion, la croissance et/ou l'élimination des dépôts et des biofilms sur les surfaces en milieu industriel permet de réduire le coût des opérations de nettoyage et de minimiser les arrêts de production pour la maintenance. Les méthodes classiques de détection des biofilms, comme l'ensemencement en gélose, ne sont pas efficaces en raison de la difficulté à cultiver de nombreuses bactéries de biofilms

Méthode d'élimination :

1. Nettoyage et désinfection en industrie alimentaire :

1.1 Nettoyage :

Le nettoyage pour but d'éliminer toute trace de salissure présent sur les équipements et matériaux en contact avec l'aliment, l'efficacité du nettoyage est conditionnée par l'action chimique, l'action mécanique, la température et le temps de contact (wirtanen et Salo, 2003).

Le nettoyage consiste à l'élimination des contaminants aux moyens de détergents (agents dont le mode d'action est physique ou physicochimique) ces détergents sont classés en catégories (Herry et al. 2003).

•Détergents alcalins :

Leur rôle est d'enlever la croûte organique collée par les traitements de chaleur, de saponifier les lipides saponifiables, de dissoudre la matière grasse, dégrader les protéines en acides aminés et de les ioniser puis les solubiliser (Didouh, 2015). On peut citer la soude, potasse, carbonate, phosphatetrisodique...etc. (Heryet al, 2003). L'alcalinité favorise la formation de tartre, source de corrosion des matériaux, d'où la nécessité de l'ajout d'antitartre (khamisse, 2012).

•Détergents acides :

Ont pour but de dissoudre les résidus minéraux résultant des aliments, de l'eau ou des réactions chimiques eau +aliment ou eau +aliment +produit de lavage alcalin (Didouh,2015). Les molécules actives les plus utilisées sont l'acide phosphorique, l'acide nitrique, l'acide lactique, l'acide acétique... etc. (Heryetal,2003)

Le choix de détergents doit tenir compte des souillures rencontrées dans l'industrie (Tableau 02)

Tableau 2: choix de détergent en fonction de types de souillures (Khamisse, 2012).

Types de souillures	Détergent
Souillures organique fraîche	Alcalin moyen, alcalin chloré
Souillures organique sèche	Alcalin fort
Souillures minérales	Acide

1.2 Désinfection :

C'est l'utilisation des produits antimicrobiens pour inactiver et détruire les microorganismes présents sur un objet ou une surface. Cette opération réduit les cellules viables laissées de matière organique (graisses ou sucres) les désinfectants sont plus efficaces. L'efficacité est également influencée par la concentration, le temps de contact de produit, le pH et la température (cloett et

Partie Bibliographique

al.,2008)Les désinfectants les plus largement utilisés dans les programmes de désinfection de l'industrie alimentaire sont les composés d'ammonium quaternaire (CAQ), les composés amphotères, les hypochlorites, peroxydes (acide peracétique et peroxyde d'hydrogène) (Bayomi M ;2012)aldéhydes (formaldéhyde, glutaraldéhyde,paraformaldéhyde) et les composés phénoliques. Cette liste de produits reste inchangée après18 ans. Aujourd'hui, les alkylamines, le dioxyde de chlore et les mélanges d'ammonium quaternaires sont incorporés dans les programmes de désinfection. En outre, les alcools, les composés phénoliques, aldéhydes et la Chlorhexidine sont également utilisés, mais principalement dans les services de santé. Dans l'industrie alimentaire, les désinfectants peuvent rester plus longtemps sur les surfaces en raison de l'exposition prolongée des micro-organismes au désinfectant utilisé. Employé, ce qui améliore leur efficacité (Daisy B, 2003). Le mode d'action des principaux désinfectants est résumé dans le tableau ci-dessous:

Tableau 3: mode d'action des principaux désinfectants (Ducoulombier et Bousser, 1986).

Classes	Cibel et mode d'action
Alcools	Dénaturation des proteins cytoplasmique et Membranaire inhibition de la synthèse des acides nucléiques de protéines
Aldéhydes	Altération de la paroi cellulaire inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines
Ammoniums quaternaires	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires et lyse de la cellule
Biguanides	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires coagulation du cytosol
Halogènes chlorésetiodés	Destruction des protéines membranaires et chromosomiques (halogénéation)
Oxydants	production de radicaux libre agissent avec le macromolécules

2. Méthode de control :

2.1 Perturbation enzymatique :

Les enzymes sont considérées comme des contre-mesures vertes contre la formation de biofilms car elles sont biodégradables et ont une faible toxicité. Ces caractéristiques en font un outil puissant pour le contrôle des biofilms, et c'est pourquoi elles sont largement utilisées dans les détergents pour les applications de l'industrie alimentaire (Torres et al, 2011 ; Huang et al, 2014). Les principaux composants de la structure du biofilm sont constitués de macromolécules organiques (principalement des protéines et des polysaccharides). Par conséquent, les protéases (par exemple, les protéases à sérine, la protéinase K, la pepsine et la trypsine) et les glycosidases (par exemple, les amylases, la dextranase et la pectinase) sont toujours la première option pour l'élimination du biofilm (Meireles et al, 2016). D'autres activités enzymatiques telles que les amylases, les cellulases, les lyases, les glycosidases (comme la dispersine B) et les ADNses, qui font partie des détergents industriels, sont couramment utilisées dans l'industrie alimentaire pour éliminer les biofilms (Coughlan et al, 2016).

2.2 Biosurfactants

Les biosurfactants sont des composés naturels, généralement d'origine microbienne, capables de modifier les caractéristiques hydrophobes de la surface bactérienne. Cela modifie les propriétés d'adhésion et les capacités de liaison à une surface donnée. L'une de ces molécules est la lichénysine, un lipopeptide cyclique non ribosomal produit par *B. licheniformis*. Les surfaces de l'industrie alimentaire peuvent être traitées avec ce biosurfactant.

2.3 Bactériophages

L'activité antimicrobienne exercée par les bactériophages est inoffensive pour les humains, les animaux et les plantes, car ils tuent spécifiquement les cellules procaryotes. Par conséquent, la phagothérapie est actuellement une alternative intéressante aux antibiotiques. Leur utilisation en tant qu'agents anti-film est une approche prometteuse et a déjà conduit à des applications commerciales. Par exemple, une application basée sur le phage P100 de *Listeria* (sous le nom commercial Listex P100) a été produite pour éliminer les biofilms présents dans les produits carnés transformés et sur les surfaces de travail des usines, et a déjà été autorisée aux États-Unis par le ministère de l'Agriculture avec le statut d'agent biologique GRAS (Iacumin et al, 2016). D'autres espèces pathogènes ont été ciblées par des produits bactériophages commerciaux, comme par exemple *S. enterica* ou *E. coli* (SalmofreshTM et ScoShieldTM, respectivement) (Gutiérrez et al, 2016). La principale limite des traitements par phages est leur capacité à accéder et à cibler les

Partie Bibliographique

cellules bactériennes à l'intérieur du biofilm. Cette limitation existe en raison de la structure complexe du biofilm et de la présence de matériel extracellulaire, qui agit comme un obstacle physique à la diffusion des phages. Cependant, certains phages possèdent des exopolysaccharides dépolymérase, une excellente solution à ce problème de diffusion (Pires et al. 2016). La présence de ces enzymes améliore le processus d'invasion et de dispersion des phages à travers le biofilm traité (Parasion et al, 2014).

2.4 Bactériocines

L'utilisation de bactériocines dans l'industrie alimentaire est utile pour prévenir la formation de biofilms sur différentes surfaces. Ces agents antimicrobiens peuvent également prolonger la date de péremption d'un aliment donné, protéger contre les altérations pendant la réfrigération, réduire la détérioration des aliments, prévenir la transmission des agents pathogènes d'origine alimentaire, diminuer les concentrations de conservateurs chimiques et réduire le nombre de traitements thermiques.

2.5 Inhibition de la détection du quorum

Différentes voies de signalisation sont nécessaires à la formation des biofilms bactériens et au développement de la résistance aux antimicrobiens. Elles comprennent l'échange de petites molécules organiques ou de protéines ainsi que la transmission de signaux électriques (Kim et al, 2016). Parmi ces voies de signalisation, le quorum sensing (QS) et la signalisation par le di-GMP cyclique (cGMP) sont les mieux caractérisés.

Le QS est un mécanisme de signalisation intercellulaire largement répandu. Il est utilisé par les bactéries pour réguler l'expression des gènes en réponse à des concentrations environnementales élevées de petites molécules de signalisation diffusibles (acylhomosérine lactones, peptides et autoinducteur-2). Ces mécanismes régulés par QS incluent des gènes impliqués dans la formation de biofilms (Yang et Givskov, 2015). Sur la base de ces données, une stratégie efficace pour éradiquer les biofilms bactériens associés aux aliments consiste à prévenir leur formation en utilisant l'inhibition des QS (Coughlan et al, 2016).

QS a été décrite, comme un facteur régulant le développement et la maturation des biofilms (da Silva et De Martinis, 2013). Les inhibiteurs du système QS (QSI) ont été proposés comme une nouvelle génération d'agents antimicrobiens car ils agissent principalement en neutralisant les médiateurs du système QS (QQ, quorum quenching). Contrairement aux stratégies bactéricides, les composés ciblant QS et la formation de biofilms provoquent moins de pression de sélection et, par conséquent, ne développent pas de résistance au composé inhibiteur (Brackman et Coenye, 2015).

2.6 Huiles essentielles

Plusieurs composés dérivés de plantes ont démontré des propriétés antibiofilmantes. Un avantage utile lié à l'utilisation de ces composés comme agents antibiofilm est la perception positive qu'en ont les consommateurs, contrairement aux désinfectants chimiques de synthèse, notamment dans les applications de l'industrie alimentaire. Les huiles essentielles d'origine végétale sont principalement un mélange complexe, spécifique à chaque espèce, de monoterpénoïdes (comme le bornéol, le camphre, le carvacrol, l'eucalyptol, le limonène, le pinène, la thuyone), de sesquiterpénoïdes (comme le caryophyllène, l'humulène) et de flavonoïdes (comme le cinnamaldéhyde et d'autres acides phénoliques) (Raffaella et al, 2017). Certaines de ces huiles essentielles présentent des propriétés antibiofilmantes. L'énorme diversité chimique des huiles essentielles d'origine végétale permet de développer des préparations antibiofilm à la carte contre divers pathogènes. Les huiles essentielles d'*Origanum vulgare* présentent des propriétés anti-adhésion, qui sont cruciales pour prévenir l'altération des aliments et les agents pathogènes d'origine alimentaire

2.7 Haute pression hydrostatique

La haute pression hydrostatique (HHP, 300-900 MPa) est capable de détruire ou d'inactiver les cellules bactériennes végétatives. Cependant, cette technologie n'est pas efficace dans le cas des endospores (comme celles de *B. cereus*), à moins qu'un prétraitement ne soit effectué à des pressions inférieures (300-400 MPa) afin de permettre la germination des spores existantes (Evelyn et Silva, 2015).

Quoi qu'il en soit, certaines spores qui ne germent pas peuvent rester dans la matrice alimentaire après les traitements HHP, et c'est pourquoi, au niveau industriel, le HHP est généralement combiné avec des traitements thermiques (50_C à 100_C), ou dans certains cas avec des composants d'huile essentielle (Luu-Thi et al, 2015). Un avantage important des traitements HHP est qu'ils n'altèrent pas les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des matrices alimentaires (goût, vitamines, etc.), un grand avantage par rapport aux méthodes à haute température (Santos et al, 2017).

2.8 Plasma non thermique

Le plasma non thermique est un gaz partiellement ionisé à basse température qui présente des propriétés antimicrobiennes intéressantes. Il est produit à la pression atmosphérique en mélangeant de la lumière UV avec de l'oxygène, de l'azote, de l'ozone, de l'eau et de l'hélium, sous une décharge électrique. Il est capable de détruire des biofilms bactériens d'espèces Gram-négatives (*Pseudomonas* spp., *S. enterica*) ou Gram-positives (*Bacillus* spp.) en seulement 10 min, Cependant, son utilisation est encore limitée à certaines applications de laboratoire, en raison de son coût élevé (Scholtz et al, 2015).

2.9 Photocatalyse

Divers types de nanoparticules présentent des propriétés photocatalytiques, où l'absorption d'une longueur d'onde spécifique est utilisée pour générer (accélérer) une réaction chimique, y compris la destruction de cellules microbiennes, généralement due à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Nica et al, 2017).



Etude expérimentale

1. Objectif de l'étude :

Notre partie expérimentale a été réalisée au niveau de Bel Algérie .Cette étude a été menée dans le but de contrôler l'efficacité du système de nettoyage et de Désinfection adopté par la laiterie au niveau de la ligne de fabrication du fromage fondue. Pour cela nous avons adopté le plan suivant :

1/La Description générale du protocole du nettoyage adopté par bel Algérie

2/Le contrôle :

De nettoyage et de désinfection utilisée pour le CIP

De nettoyage et de désinfection utilisée pour lavage enzymatique

De frottis des trimé de conditionnement

De l'hygiène du

personnel.de l'ambiance.

2. Présentation de l'entreprise :

La société fromageries Bel est une entreprise de l'industrie agroalimentaire ayant son siège à Suresnes dans les Hauts-de-Seine en région Île-de-France. Ses différents sites de transformation fabriquent et commercialisent des fromages industriels a pâte cuite, demi-cuite ou pressées dont beaucoup en portions les « Etablissements Jules Bel » furent fondes en 1865 Orgelet (Jura)

Les marques commerciales de cette société sont distribuées dans les 5 continents. Bel a développé une gamme de plus de 30 marques locales et internationales. Les plus reconnues sont : Baby Bel, Boursin, Kiri, La vache Qui Rit. Elle est implantée dans plus de 30 pays .Ses fabrications sont commercialisées dans plus de 130 pays chaque jour, plus de 33 millions de portions de fromages Bel consommées dans le monde (Bel Algérie)

Présentation Bel Algérie :

Bel Algérie est une société privée étrangère de droit algérien, créée en janvier 2007. Le début de la phase de production a commencé en Avril 2007. La société fabrique les fromagers fondus de la marque « La Vache qui rit ». Elle satisfait les besoins d'une large clientèle sur tout le territoire national.

3. Processus de fabrication du fromage fondu :

Le processus de fabrication de fromage fondu au niveau de l'entreprise Bel passe par les étapes suivante :

1. Réception et stockage de la matière première

La réception et le stockage de la matière première est effectuée dans des bonnes conditions et fait L'objet d'un contrôle rigoureux avant son utilisation pour les produits tel que :

Le cheddar, la maasdam, l'emmental, le gouda, la poudre de lait, la matière grasse végétale ,le beurre non salé, les arômes et les autre additifs sont stockés à une température variant de 2°C à 8°C. La poudre de lait et les autres poudres (caséine acide et caséine présure et les arômes) sont stockés à 20°C (la température ambiante).

La poudre de lait, caséines (acide et présure), les caseines mixtes, l'amidon, les sels de fonte et les Autre ingrédients en poudre sont entreposés à sec

L'entreprise Bel exige des contrôles physicochimiques microbiologiques et organoleptiques de la matière première à la réception.

2. Découpage et broyage

Le découpage et le broyage des fromages de fonte (emmental, cheddar ...) qui sont reçus sous forme de blocs, se fait mécaniquement à l'aide d'une trancheuse et d'un broyeur. Pour le beurre le groupe Bel établie un broyage seulement. Ces ingrédients sont mis dans des bacs inox après le découpage.



Figure n° 6 : Broyeur de fromage de fonte (emmental, cheddar ...) (original)

3. La pesée :

Les poudres (la poudre de lait, caséine ...) sont pesées et hydratées pour donner une masse de lait hydraté homogène. Les fromages (emmental, cheddar...) et le beurre sont pesés à part selon une

Etude expérimental

formule confidentielle adopté par l'entreprise. Cette opération s'effectue dans des zones spéciales pour chaque matière

4. Homogénéisation :

Le pré cuisson est le traitement thermique qui se fait en continu. Elle a été développée spécialement pour Prolonger la durée de conservation du fromage fondu ou les préparations à base de fromage fondu. La Pré cuisson chez Bel est assurée à une température égale à 80°C. une opération de brassage léger dans une cuve (cuve tampon pour stockage du fromage précuit) est réalisé. l'étape de homogénéisation de la pâte. Elle est accomplie à la température environs de 78°C

Prolonger la durée de conservation

5. Stérilisation (UHT) :

La stérilisation par la chaleur consiste a exposé les aliments à une température supérieure à 100°C pour une durée suffisante pour inhiber les enzymes et détruire toutes les formes végétatives et sporulés des micro-organismes. De plus Cette opération apporte la sécurité contre une fermentation du produit pendant la conservation, et celui-ci acquiert des qualités nouvelles, un gout, une texture stable. Dans l'entreprise Bel, après brassage, le produit non stérile arrive au niveau de la cuve d'UHT ou la température minimum est 143°C pendant 3 secondes.

6. Refroidissement à 90°C :

Est une étape nécessaire après la stérilisation pour réduire la température avant le crémage.

7. Le brassage fort (crémage) :

Pour améliorer le crémage, un brassage fort avec l'adjonction de pied de cuve est réalisé. Puis un filtrage à poche est réalisé pour Eviter toutes les impuretés. Le brassage à un rôle de Stabiliser la matière grasse et d'améliorer aussi la consistance.

Le crémage est assuré par l'action des sels de fontes et les poly phosphates .il est effectué au niveau de cuve par le biais d'une agitation très poussé. La température optimale du crémage se situe entre : 83°C – 85°C. l'adjonction de pied de cuve est réalisé

8. Deuxième brassage léger :

Un deuxième brassage léger pour homogénéiser la pâte et alimenter les conditionneuses est effectué dans des cuves. La température de cette dernière est comprise entre 80°C et 82°C.

9. Conditionnement Primaire et secondaire :

Le conditionnement des portions de spécialité fromagère fondu, s'effectue de manière entièrement automatisée à température de pasteurisation (entre 65 et 85 °C) maintenue de manière à éviter toute contamination microbologique, dans une feuille d'aluminium vernissée sur les deux faces. La feuille est préformée par pression sur la machine sous forme d'une coquille qui après remplissage avec la pâte fondue, reçoit un couvercle avant l'accomplissement du scellage.

10. Refroidissement :

La spécialité fromagère fondue conditionné à chaud doit être refroidi rapidement afin d'éviter les risques de brunissement non enzymatique de la pâte dû aux réactions de Maillard, grâce à des tunnels de refroidissement qui se fait par circulation des produits sur des tapis à l'air ambiant. C'est dans cette phase que se produit la gélification (le réseau protéique va continuer sa structuration pour former un gel qui va enfermer la matière grasse émulsionnée et l'eau d'hydratation).

11. L'étiquetage :

L'étiquetage est la première catégorie de mentions qui permet au consommateur, de connaître les principales caractéristiques du produit (La DLC : date limite de consommation, DLUO : date limite d'utilisation optimale, Le mode de conservation et de préparation, Indication de lot de fabrication et de la masse ou du volume Et enfin, la liste des ingrédients utilisés)

12. Stockage et Expédition :

Bel Algérie stocke le fromage fondu à une température qui varie entre $4 < T^{\circ}\text{C} < 12$ pendant 6 jours avant expédition.

4. Les détergents et désinfectants utilisés au niveau de bel Algérie :

4.1 Les détergents :

Les détergents utilisés sont présentés dans le tableau n° 04 :

Tableau n ° 4 : les détergents utilisés dans l'entreprise BEL

Produits Caractéristique	Acide sulfurique	La soude caustique
- Concentration	- 1% 1.5%	- 1.5% 2.5%
- Composition	- Acide pur	- Base fort
- Prospérité technologique	- Solubilisé les Souillures minerals	- Permet l'élimination Des souillures organiques
- Température d'utilisation	- 60°C 65 °C	- 80°C 85°C
- Formule chimique	- H ₂ SO ₄	- NaOH
- Utilisation légale	- Conforme à la Législation Selon l'arrêté Du 08/09/1999 Concernant Les procédés de nettoyage pour le matériel pouvant	- Conforme à la Législation Selon l'arrêté Du 08/09/1999 Concernant les procédés de nettoyage pour le matériel pouvant se

Etude expérimental

	se trouver en contact avec les denrées alimentaires	trouver en contact avec les denrées alimentaires
- Propriété Microbiologique	- Bactericide	

4.2 Les désinfectants utilisés :

- **Acide parasitique :**

C'est un liquide désinfectant à large spectre, bactéricide à 0,1% et selon le fabricant, il est conforme à la norme AFNOR 72151.

- **Caractéristiques :**

C'est un liquide légèrement jaune à odeur piquante. Il est composé de tensioactifs non ioniques, peroxyde d'hydrogène et de d'acide préceltique. Son pH varie en fonction de la concentration et de la température. Il est non corrosif vis à vis des aciers inoxydables dans les conditions normales d'utilisation. Il s'emploie à des doses de 0,1 à 0,5% et à températures 80°C pour un temps de contact de 2 à 10 minutes

- **Législation :**

Selon le fabricant, le produit est conforme à la législation française relative au nettoyage du matériel pouvant se trouver au contact avec des denrées alimentaires (Arrêté français du 20/10/1975), il est dégradable à plus de 90% (Arrêté français du 2811211977)

5. Méthode de nettoyage et désinfection adopter par le groupe bel :

5.1 Nettoyage :

La démarche de nettoyage cip se fait par une installation automatique dans un circuit fermé, les produits utilisés sont l'acide parasitique (1%), la soude caustique (2%) et le Divosan , utilisé comme désinfectant.

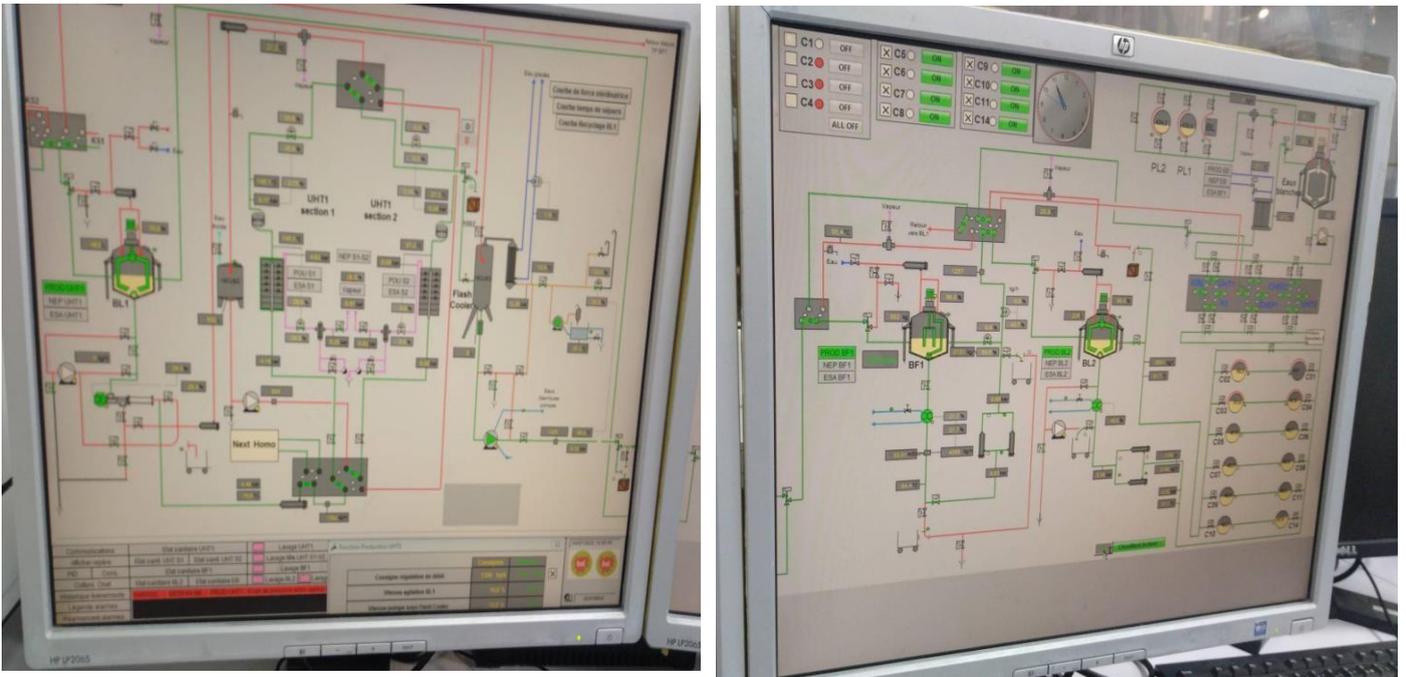


Figure n° 7 :schéma d'un circuit fermé

• **Les systèmes CIP sont passez par différentes étapes :**

CIP est un système fermé où la solution de recirculation de nettoyage est appliquée (souvent avec des jets) et nettoie, rince et désinfecte les appareils. Le système CIP est le plus souvent contrôlé automatiquement et les séquences de nettoyage sont programmées pour un temps optimal pour un nettoyage efficace.

- 1- Nettoyer à grandes eaux pour éliminer les résidus.
- 2- Nettoyage alcalin : les détergents alcalins (la soude) dissout les graisses et les protéines, et nettoie les dépôts qui sont difficiles à enlever.
- 3- Rinçage intermédiaire à l'eau.
- 4- Nettoyage à l'acide parasitique : sert à neutraliser les restes caustiques sur les surfaces de l'entreprise. Les détergents acides enlèvent les dépôts minéraux dans les appareils (spécialement dans les aires chaudes comme les pasteurisateurs).
- 5-Rinçage final à l'eau : l'eau froide enlève les résidus acides.
- 6- La désinfection avec (l'acide parasitique et peroxyde hydrogène).

5.2 LAVAGE ENZYMATIQUE :

5.2.1 Partie fabrication :

Le traitement enzymatique est appliqué une fois tous les trois mois après un nettoyage CIP classique soude/acide, sans désinfection. Après le CIP et à la fin de l'étape de rinçage une vérification du pH permet de valider l'application de produit enzymatique

Etude expérimental

(pH : 6,80 à 7,50). En cas inférieure à 6,80 des phases de rinçage supplémentaires sont réalisés jusqu'à l'obtention de pH objectif.

Étape 1 : Ajout et circulation de l'enzyme (action enzymatique à pH neutre) :

Cette étape consiste à ajouter l'enzyme avec une concentration de 0,25% et le circuler pendant 5min à une température entre 45°C et 48°C. L'additif est ajouté ensuite à une concentration de 0,05%. La durée de circulation des produits au final dépasse 60 min de telle sorte d'assurer un traitement efficace qui comprend un maximum de battement à travers le circuit.

Étape 2 : Circulation de l'enzyme (Action enzymatique à pH basique) :

Pour activer l'action enzymatique à pH basique, la soude diluée est ajoutée progressivement jusqu'à l'obtention de pH égale à 10. Après 60 min de circulation à pH basique l'installation traitée est rincée à froid.

Étape 3 : Désinfection :

Après traitement enzymatique . La désinfection est réalisée à une température de 40°C pour 30min. Un rinçage final est effectué à la fin de désinfection.

5.2.1. Nettoyage de la partie conditionnement :



Figure n° 8 : Révélation de biofilm sur des pièces de coulée

Après l'opération de révélation de biofilm, le traitement enzymatique des surfaces est réalisé par deux moyens :

- Trempage en bac de lavage : Pour les bras racleur de trémie, petites pièces.
- Application à l'aide de canon à mousse : pour les trémies, tête de coulée.

A. Protocole de traitement par trempage en bac de lavage :

- Remplissage des bacs avec de l'eau chauffée à 50°C, puis une incorporation de l'enzyme à 0.25% et de l'additif à 0.05% .

Etude expérimental

- Immersion des pièces dans la solution pendant 2 heures avec chauffage de temps en temps pour maintenir la température au-dessus de 40°C. Dans le cas des petites pièces l'opération est possible dans des cagettes de nettoyage le chauffage est assuré à l'aide de l'injection de vapeur basse pression.
- Rinçage des pièces
- Préparation de la solution désinfectante, (1% de Deptil PA5 ou 2% d'Oxygal), et immersion des pièces pendant 15 min.
- Rinçage final.
- Nettoyage avec une substance alcaline chloré en 2 phases. Ce dernier est impératif avant la reprise de la production (voir photo n° 11).



Figure n° 9 : Traitement enzymatique en bac et cagette de lavage

B. Protocole de traitement en utilisant le canon à mousse :

Le protocole des traitements en utilisant le canon à mousse sont les suivants :

- Application de la solution enzymatique à **3%** de l'enzyme surfaces à l'aide de canon à mousse.
- laissé agir le produit moussant pendant **30 minutes**, frotter pour remonter la mousse si nécessaire.
- Rinçage (produit alcalin assez difficile à rincer, contrôler le rinçage à la phénolphtaléine)
- Application de nouveau à l'aide de canon à mousse de la solution désinfectante (peracétique, Deptil APM à **2%** ou bien Deptal MCL à **4%**).
- Laisser agir la mousse pendant **20 minutes**.
- Rinçage.
- Nettoyage avec un alcalin chloré en 2 phases, (alcalin + désinfectant). Ce dernier est impératif avant reprise de la production.



Figure n° 10 : Application de la solution enzymatique à l'aide de canon à mousse

Avant d'évaluer l'efficacité de la méthode de nettoyage et désinfection adoptée par l'unité, il faut d'abord connaître le protocole utilisé pour le nettoyage au sein de l'unité. Le protocole de nettoyage et désinfection est présenté dans le tableau n°5 :

Tableau n°5 : Le Protocole de nettoyage et désinfection

Local, materiel ou personnel	Programme de nettoyage et désinfection	fréquence de nettoyage et de désinfection
Les cuves	<ul style="list-style-type: none"> - Rinçage a l'eau - Brossage manuel - Nettoyage à la soude caustique - Nettoyage à l'acide - Rinçage à l'eau 	3 mois par semaine
Matériels	<ul style="list-style-type: none"> - Rinçage à l'eau - Nettoyage a soude caustique - Nettoyage à l'acide (contacte de 45 Seconde) - Rinçage à l'eau 	3mois par semaine
Nettoyage et désinfection des mains	<ul style="list-style-type: none"> - Rinçage a l'eau - Nettoyage manuel - Rinçage a l'eau 	A chaque retour au travail

6. Echantillonnage et techniques de prélèvement :

Pour chaque étape de nettoyage et de désinfection des prélèvements ont été pris en double :

A) Echantillons destinés à NOSOCLEAN (Flor total, SLIMPART).

B) Échantillons des frottis destinés au laboratoire central Kolea (Flor total, coliforme et streptocoque groupe D).

Tableau n° 6 : Niveaux de prélèvement des échantillons à contrôler

Prélèvement Echantillons	Lieu de prélèvement	Technique de prélèvement	Quantité prélevée	Contrôle réalisé
- Eau du Dernier Rinçage	- Dans l'atelier de production à partir de cuiseur, et les cuve	- Couler les premiers volumes d'eau puis prélevé dans un Pots stérile.	-Dans le cip 1 pots 25 ml -Dans Lavage enzymatique 4 Pots stérile 25ml	-Microbiologique : Flore total (22-36) -Physicochimique : La turbidité
- Ambiance	atelier de production a proximité de cuiseur et l'une de conditionneuses	Exposition des boites de pétri coulées utilise (air test)	2 boites de Petri	- Microbiologique : Leveurs Les Moisissures
- Personnel	-Mains de 3 Operateurs en contact avec le produit	-Ecouvillon imbibe d'eau physiologique stérile, frotter les mains des opérateurs.	3 Personnes Manipulatrices	-Microbiologique : Streptococcie groupe D Coliforme

7. Méthode de contrôle :

7.1 La méthode par écouvillonnage :

Cette méthode se rapproche de la méthode par swabbing mais elle est utilisée pour la recherche de contaminants microbiologique. L'écouvillon permet d'accéder à des zones impossibles d'accès avec une boîte contact. L'écouvillon est ensuite mis dans un milieu de Culture sélectif à la croissance bactérienne

7.2 Détection des biofilms :

Après un nettoyage classique (CIP) des couleuses, un test à l'aide d'un révélateur de biofilm s'effectue sur certaines pièces de coulée, pour vérifier les zones les plus touchées par la formation de biofilm. Les résultats montrent une coloration violet apparente sur les surfaces en contact permanent avec le fromage, notamment sur les têtes de coulée, les bras racleurs et la paroi des trémies (de l'intérieure).



Figure 11: biofilm Test

7.3 slyme burt :

Les tubes sont incubés 7 jours à 30°C afin d'évaluer la croissance bactérienne qui se révélera par l'apparition plus ou moins importante et rapide de turbidité au sein du tube.

Dans le milieu sélectif, les bactéries formant un biofilm vont produire les structures visqueuses les plus épaisses dans des conditions aérobies qui se produisent autour de la bille. Le développement peut être reconnu comme une formation de trouble ou gel qui peut être localisé ou se produire dans tout l'échantillon. Ces formations sont généralement de couleur blanche, grise, jaune ou beige et peuvent s'assombrir avec le temps.

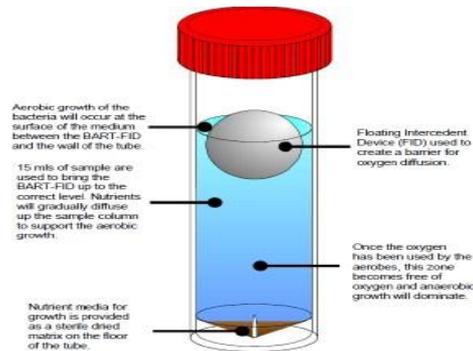


Figure n°12 : tube de slyme burt(donné industriel)

7.4 Hygiène du personnel :

Pour évaluer l'état d'hygiène du personnel manipulant le produit, des empreintes digitales. Sur milieu gélosé avant et après nettoyage des mains sont effectués.

7.5 L'air ambiant :

Des boîtes de pétri contenant un milieu gélosé avec un appareil (l'air test) sont déposées dans les lieux suivants :

- les couloirs ;
- les salles de fabrication, coursa (couleuse)

8. Germes recherches :

8.1 Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile :

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile reflète la qualité microbiologique d'un produit naturel et permet donc de suivre l'évolution de la charge microbienne.

-Principe :

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile est généralement réalisé en milieu solide PCA (Plate Count Agar). Il est nécessaire que le milieu soit à une température inférieure à 45°C. Il faut prendre soin de ne pas trop remplir les boîtes, de manière à ne pas créer des Conditions d'anaérobiose stricte : le volume optimum de milieu à rajouter est de 15ml.

-Technique :

1 ml de dilution (10^{-1}) est introduit aseptiquement à l'aide d'une pipette Pasteur dans des Boîtes de Pétries, puis recouvertes de la gélose PCA préalablement fondue et refroidie à $45 \pm 1^\circ\text{C}$. Les boîtes seront incubées à 30°C pendant 72h.

-Expression des résultats :

Les colonies se présentent sous forme lenticulaire en masse. Leur dénombrement consiste à compter toutes les colonies ayant poussées sur les boîtes contenant uniquement entre 15 et 300 colonies.

8.2 Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux :

Selon la définition ISO, les coliformes sont des bacilles à gram-, non sporulés, oxydase-, Aérobie ou anaérobies facultatives et lactose+, leur présence dans les aliments traduit une contamination fécale par le manque d'hygiène (Bourgeois *et al.*, 1996).

Principe

Les coliformes fermentent le lactose avec dégagement de gaz. Cette fermentation est rendue plus sélective par l'utilisation d'un milieu liquide lactosé au vert brillant (VBL) et d'une cloche de Durham dans laquelle est retenu le gaz produit.

Technique

La recherche des coliformes totaux et des coliformes fécaux est effectuée sur milieu liquide pour les prélèvements du matériel et les eaux de processus, sur milieu solide pour les empreintes digitales et le produit fini, en procédant de la façon suivante :

Matériel : introduire 10 ml de Tryptycase soja bouillon dans chaque écouvillon, puis incubé à 37° C pendant 30 minutes pour la revivification des germes.

- coliformes totaux : A partir de chaque écouvillon prélevé 1 ml de la solution est l'introduire dans des tubes contenant le milieu VBL (vert brillant lactosé) avec cloche de Durham, tous ces tubes sont incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures.

8.3 Dénombrement de levures et moisissures :

Les levures et les moisissures sont des champignons microscopiques dont la présence dans les produits alimentaires n'est pas souhaitable, car ils détruisent la qualité Organoleptique (altération du goût, gonflement et mauvaise texture) (Moreau et Belin, 1996). Le milieu utilisé pour le dénombrement des levures et moisissures est le milieu sabouraud.

-Technique

L'estimation de la contamination de l'air ambiant se fait en utilisant la technique de Sédimentation qui consiste à déposer les boîtes de pétri contenant le milieu gélosé « sabouraud » aux endroits que l'on veut contrôler, après 30 à 60 minutes d'exposition, les boîtes sont refermées et incubées pendant 5 jours à 30°C. Après incubation, les colonies de levures se présentent sous formes arrondies, lisses à Contours réguliers et parfois pigmentées (couleur jaune, orange ou blanche) alors que les Moisissures se présentent sous forme de colonies plus ou moins grandes comparativement aux colonies de levures.

-Lecture

Les levures se présentent sous forme arrondie, lisse à contour régulier et parfois pigmenté, Jaune, orange ou blanc. Les moisissures se présentent sous forme de colonies plus au moins grandes et de couleur différentes. La lecture se fait sur des boîtes contenant de 30 à 300 colonisent incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.



Résultats et discussion

1. Les analyses de Léau de rinçage (CIP) :

FT Dans le but de déduire l'efficacité du nettoyage CIP au niveau de la chaine de fabrication du fromage fondu, un contrôle au niveau des cuves de brassage légers et de brassage fort ont été réalisé par le biais de la recherche des germes saprophyte à 22°C et des germes pathogènes à 37°C dans l'eau de rinçage. Les résultats sont présentés dans les figures suivantes :

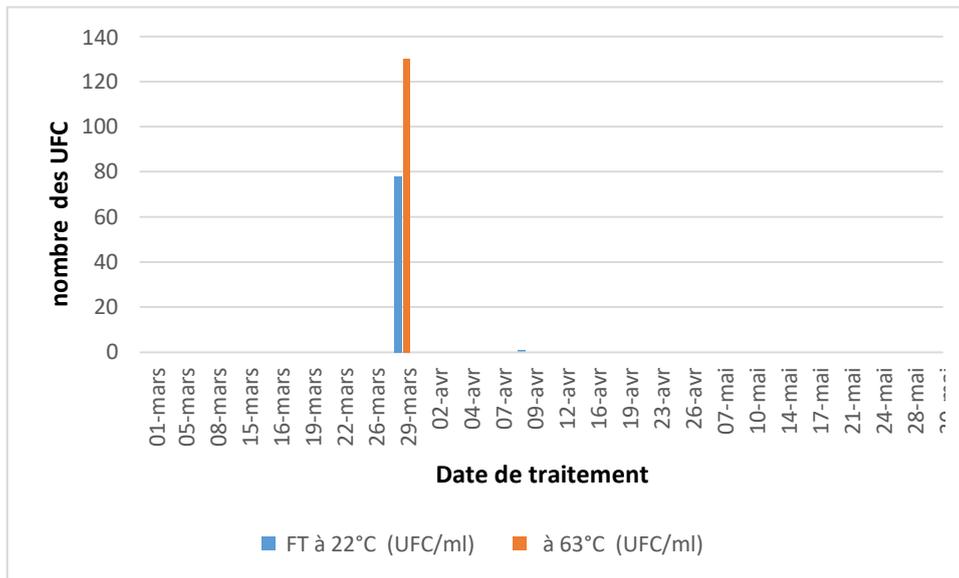


Figure n°15 : résultats des analyses microbiologiques de l'eau de rinçage au niveau de la cuve de brassage léger (bl1).

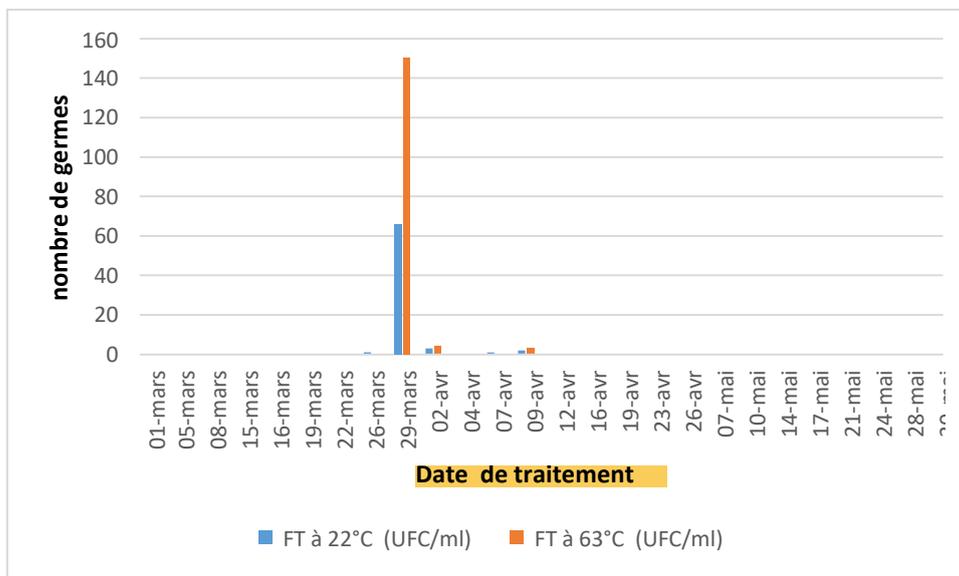


Figure n16 : résultats des analyses microbiologiques de l'eau de rinçage au niveau de la cuve de brassage fort (bf)

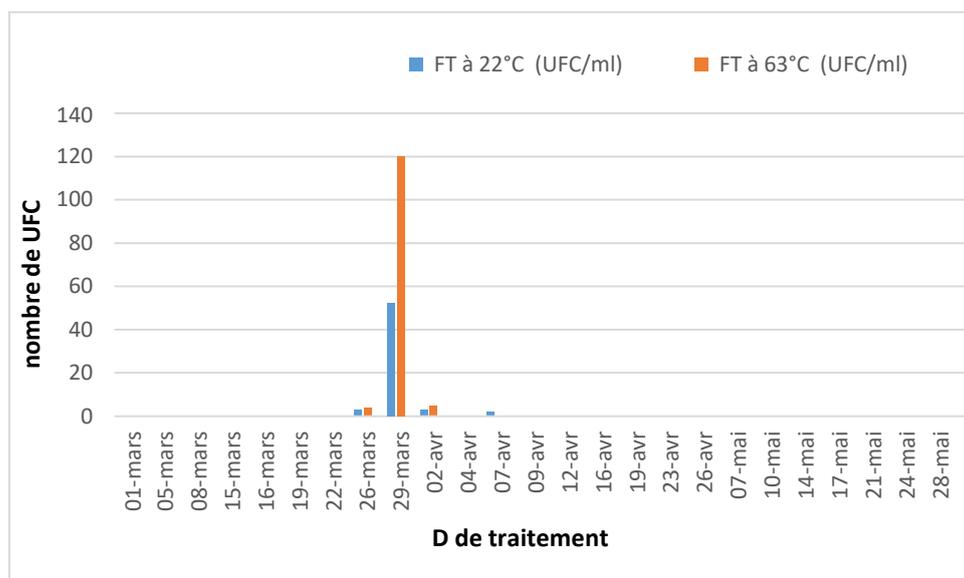


Figure n°17 : résultats des analyses microbiologiques de l'eau de rinçage au niveau de la cuve de brassage léger (bl2).

D'après la figure N°17, les résultats relatifs à la recherche de la flore totale à 22°C et la flore totale à 36°C du dernier rinçage au niveau de la cuve de brassage léger montrent la quasi absence des microorganismes toute au long de la période de contrôle à l'exception du contrôle du mois de mars où un taux dépassant les 60 germes pour la flore de 22°C et un taux qui dépasse les 120 germes pour la flore de 37°C donc la flore pathogène est enregistrée. Ces seuils sont non conformes au norme de l'entreprise qui exige un taux inférieur à 20 germes pour la flore à 22°C et 100 germes pour la flore de 37°C. Cela peut être du a un manque de maîtrise du protocole CIP, sous réserve de la non maîtrise du plan de nettoyage / désinfection par le personnel responsable ou à l'utilisation de produits inefficaces et homologues ou encore au non-respect des normes concentration (soude, acide, désinfectant), températures et temps de travail pour différents produits.

Les mêmes résultats ont été enregistré au niveau de la cuve de brassage fort (BF) et du brassage léger (B12) avec une absence ou une présence assez faible pour l'ensemble de la durée de contrôle à l'exception du mois de mars ou la présence de la flore totale saprophyte et pathogène dépassé la norme d'entreprise.

2. Résultats bactériologiques de lavage enzymatique :

Le nettoyage enzymatique implique l'utilisation d'enzymes pour hydrolyser les Constituants adsorbés de façon irréversible à la surface de la membrane. Les enzymes Réduisent ainsi le nombre d'interactions entre les constituants et la surface de la membrane, Ce qui facilite le nettoyage. Le traitement a été réalisé en fabrication sur toutes les surfaces de procès, En atelier : les précuisions, les brassages léger et fort, stérilisation UHT, le refroidissement. Les résultats des analyses bactériologiques de l'eau de rinçage des différents prélèvements sont effectués dans le but de Contrôler de l'efficacité du nettoyage.

T : temps / Ft : flore total

Point	Eau de rinçage			
	Norme	0(ufc/ml)	< 100(ufc/ml)	< 20 (ufc/ml)
Point	T e m p s	Coliform (ufc/ml)	Ft 22°C (ufc/ml)	Ft36 °C (ufc/ml)
pré caisson	T0	0	5	0
	T1	301	301	301
	T2	0	301	0
	T3	0	120	0
Brassage Léger 1 BL1	T0	0	0	0
	T1	0	0	0
	T2	0	0	0
	T3	0	0	0
stérilisations UHT	T0	0	0	0
	T1	0	11	2
	T2	0	8	0
	T3	0	0	0
flash+refroidissementtete1	T0	0	0	0
	T1	0	0	0
	T2	0	0	0
	T3	0	1	0
crémage BF brassage fort	T0	0	0	0
	T1	0	0	0
	T2	0	0	0
	T3	0	0	0
Brassage Léger 2 BL2	T0	0	0	0
	T1	0	0	0
	T2	0	0	0
	T3	0	0	0

D'après les résultats obtenus dans le tableau, une absence totale des microorganismes (coliforme et flore totale) dans la plupart des appareils à l'exception du précuiseur ou la une présence de biofilm est enregistré. Cette croissance des germes pourrait s'expliquer par :

- L'inefficacité du protocole CIP
- Contamination de L'eau de rinçage
- L'inefficacité de l'enzyme plus l'additive pour les germes totaux à 22°C

2.1 Les résultats d'analyses enzymatiques par frottis au niveau des trémies :

Periode	Frottis	Norme		
		FT (ufc/ml) <10	SD (ufc/ml) 0	Coliforme (ufc/ml) 0
Avant	CZ 01	6	0	0
	CZ 02	7	0	0
	CZ 03	0	0	0
	CZ 04	0	0	0
	CZ 05	0	0	0
	CZ 06	0	0	0
	CZ 07	0	0	0
	CZ 08	2	0	0
	CZ 13	1	0	0
Après	CZ 01	1	0	0
	CZ 02	301	54	32
	CZ 03	1	0	0
	CZ 04	0	0	0
	CZ 05	0	0	0
	CZ 06	0	0	0
	CZ 07	0	0	0
	CZ 08	2	0	0
	CZ 13	4	0	0

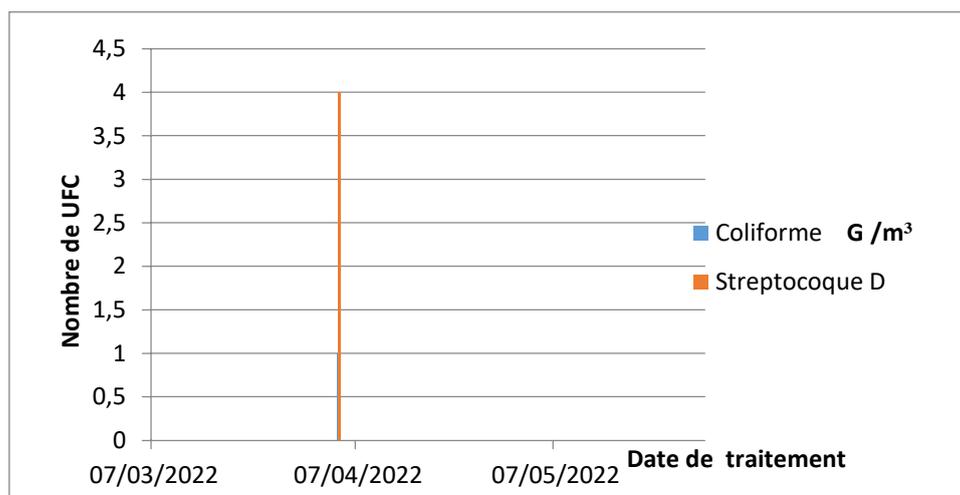
Cz : coursa ; couleuse / FT : flore total / SD : streptococcies de type D

L'écouvillonnage a été réalisé dans des conditions d'asepsie stricte à différents niveaux, Les prélèvements sont réalisés directement sur la surface de l'équipement. Les échantillons sont prélevés avant et après le nettoyage enzymatique.

Avant le nettoyage enzymatique Nous avons remarqué une présence à un faible charge de la Flore aérobies mésophiles à 36°C inférieur a la norme <10 (négligeable), et on constate absence totale des coliformes et streptococcies de type D. Ces résultats montrent une insuffisance de nettoyage en place CIP. Amgar et Hermon(1998), rapportent que toutes les surfaces en contact avec les aliments doivent être Inertes, lisses, non poreuses, visibles ou démontables facilement, pour une inspection, ou bien il est nécessaire de démontrer que le nettoyage et la désinfection en place(CIP), donnent un bon résultat, l'équipement doit être conçu pour protéger le produit d'une contamination extérieur. Après le nettoyage enzymatique, on a noté une présence importante des germes Flore aérobies mésophiles à 36°C, et des coliformes, et streptococcies type D qui dépassent la norme d'entreprise après une diminution importants. Ainsi une formation d'un biofilm a été enregistré . Ce résultat est peut-être dû soit à la mauvaise application du nettoyage enzymatique ou à la lenteur des réactions enzymatique nous permettent de déduire que le nettoyage enzymatique .

3. Les résultats de contrôle d'hygiène des mains des personelles intervenants :

Les résultats de contrôle hygiène des mains des employés sont représentés dans la figure Suivante :



Figure° n 18: Control d'hygiène de mains du personelles.

D'après les résultats obtenus durant les trois mois de contrôle, une absence des germes recherchés au niveau du mois de mars et de mai de l'année 2022. Durant le mois d'avril 4 UFC de Streptocoques de type D et un germe de coliforme ont été enregistrés. Par ailleurs, l'entreprise Bel tolère un seuil ne dépassant pas 1 G/m³ chez les employés de service fabrication. Ainsi, les résultats obtenus sont probablement dus pour les raisons suivantes :

- Le personnel ne se lave les mains ou n'utilise pas des solutions désinfectantes.
- le Manque d'hygiène corporelle.
- Au Manque de formation à l'hygiène.
- A L'utilisation du savon non bactéricide.

Selon Pitt et Widmer (décembre 2001), l'efficacité du lavage des mains au moyen d'un savon est influencée par de nombreux facteurs :

Les savons antiseptiques utilisés : qui ont une action qui dépend de la dose administrée une quantité de 3 à 5 ml est recommandée.

La technique du lavage des mains : ils décrivent de manière très précise la façon de frotter les mains l'une contre l'autre avec le savon pour que toutes les surfaces soient en contact avec l'agent détergent ou désinfectant.

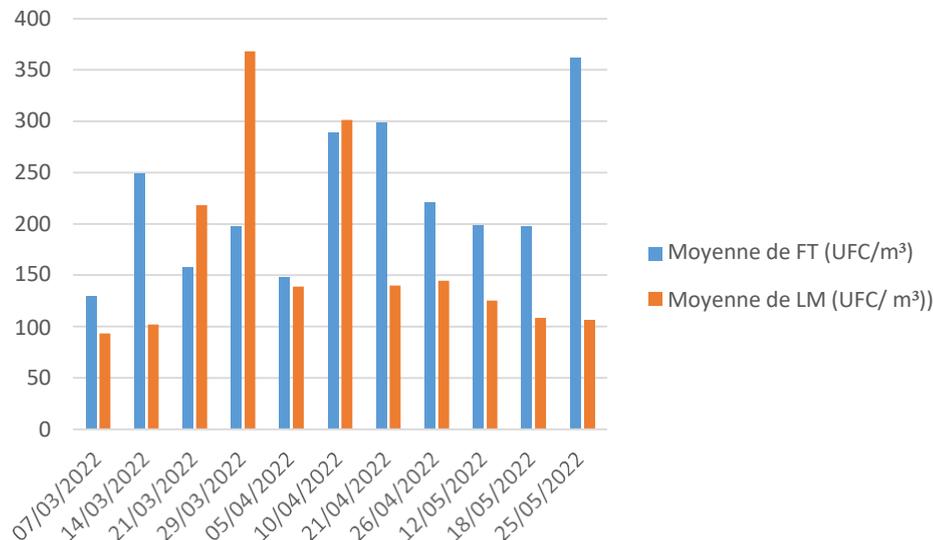
Le temps de friction des mains : il dépend du savon antiseptique utilisé mais ne peut en aucun cas être inférieur à 10-15 secondes.

La qualité du rinçage : elle est importante car d'une part l'effet mécanique de l'eau élimine les micro-organismes et d'autre part les résidus de savon peuvent, à long terme, abîmer la peau des mains.

Le séchage des mains : il doit se faire au moyen de plus hygiénique des serviettes en papier jetables, plus hygiénique

que l'utilisation multiple de serviettes en tissus. Pittet D, Widmer A , (2001)

4. Les Résultats d'ambiance atelier (Fabrication / Conditionnement) et L'évolution microbiologique :



Figure° n 19 : Contrôle d'ambiance atelier Fabrication / Conditionnement

Interprétation des résultats :

Les résultats illustrés dans l'histogramme indiquent : L'estimation de dénombrement des levures et moisissures et de la flore totale. Une présence des de micro-organismes a des taux assez fluctuante a été signalé le long de la durée de contrôle. Ces résultats expliqués par :

- L'insuffisance de nettoyage et l'accumulation des vapeurs d'eau (humidité et Température) favorisent le développement des levures et moisissure.
- L'architecture des locaux qui ne permet pas l'accès facile au nettoyage.
- L'absence d'appareils de filtration d'air et la fermeture automatique des portes.
- L'entrée d'air pollué de l'extérieure (fenêtres ouvertes) .



Conclusion

Conclusion

Les opérations de nettoyage et de désinfection constituent un des moyens essentiels pour obtenir une bonne hygiène dans l'industrie laitière. Elles doivent être efficacement conduites pour prévenir les risques que les contaminations peuvent engendrer chez le consommateur et les denrées Alimentaires. L'entreprise a adopté le CIP et le lavage enzymatique pour obtenir un système de nettoyage et de désinfection. Les résultats de notre étude sont conformes à la norme d'entreprise et on conclut globalement :

- contamination par les coliformes totaux est la flore totale $22c^{\circ}, 36c^{\circ}$ répété dans des cuves.
- une efficacité de lavage enzymatique.
- Le nettoyage et la désinfection des mains ont été efficaces.
- présences de levures et moisissures dans l'ambiance.
- Le système CIP efficace.

Pour améliorer la qualité du nettoyage et de désinfection ; nous proposons les Recommandations Suivantes :

- ✓ Le respect des bonnes pratiques d'hygiène.
- ✓ La sensibilisation du personnel sur l'importance du lavage des mains avant chaque manipulation et surtout la technique la plus appropriée pour le faire.
- ✓ Le nettoyage du matériel de fabrication (cuve, bloc moule, brasseur...) doit se faire après chaque utilisation et non pas après chaque fin de fabrication.
- ✓ Remplacer le matériel endommagé car il peut être une source de contamination.



Référence bibliographique

- Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., and Gohar, M.(2009). Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6616–6618. doi: 10.1128/AEM.00155-09
- AMGAR A. (2002). La méthode HACCP et la Sécurité Alimentaire, un Outil Clé de la Prévention des Entreprises Alimentaires
- Ansari, M.A.; Khan, H.M.; Khan, A.A.; Cameotra, S.S.; Alzohairy, M.A.(2015) Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. *Indian J. Med. Microbiol.* , 33, 101. [CrossRef]
- Battin, T.J., Sloan, W.T., Kjelleberg, S., Daims, H., Head, I.M., Curtis, T.P., Eberl, L., 2007. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nature reviews. Microbiology* 5, 76–81.
- Bendinger B.; Rijnaarts HHM, Altendorff K et al. (1993) physicochemical cell Surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3973-3977
- Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 382–398. doi: 10.1128/CMR.00073-09
- Boels, G. (2011). Enzymatic removal of biofilms: a report. *Virulence* 2, 490–489. doi: 10.4161/viru.2.5.17317
- Beyth, N., Hourri-haddad, Y., Domb, A., Khan, W., and Hazan, R. (2015). Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015:2460122015. doi: 10.1155/2015/246012
- Brackman, G., and Coenye, T. (2015). Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm Agents. *Curr. Pharm. Des.* 21, 5–11. doi: 10.2174/1381612820666140905114627
- Bayomi M.A., Kamal R.M., And El Aal S.F & Awad E.I. (2012). Assessment of Regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of foodborne pathogens and their biofilms. *International Journal of Food Microbiology.* 158: 225-231.
- Buchanan R.L., Gorris L.G.M., Hayman M.M., Jackson T.C., Whiting R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control.* 2017;75:1–13. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016. [CrossRef] [Google Scholar]

- Bendahman, Mokhtaria, Bougueroudjs Samira (2020) Efficacité de produits de nettoyage et désinfection contre les bactéries dans une entreprise fromagerie Cas laiterie Sidi-Saada. (Wilaya de Relizane)., mémoire de master. Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem ()95.
- Belleflamme, c, S. DI Tanna, (2021). *Listeria monocytogens* biofilms in food industry is the current hygiene program sufficient to combat the persistence of the pathogen., (9):4-191.
- Bokulich, N.A, D.A. Mills, (2013) Facility-specific –household microbiome drives microbial landscapes of artisan cheese-making plants, *Appl. Environ. Microbiol.* (79)5214–5223. doi:10.1128/AEM.00934-13.
- Bridge, D.P, P.H.A. Sneath, Numerical taxonomy of *Streptococcus*, *J. Gen. Microbiol.* 129 (1983) 565–597. doi:10.1099/00221287-129-3-565
- Bremer, P, S. Flint, J. Brooks, J. Palmer, (2015) Introduction to biofilms: Definition and basic concepts, in: K.H. Teh, S. Flint, J. Brooks, G. Knight (Eds.), *Biofilms Dairy Ind.*, Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–16. doi:10.1002/9781118876282.ch1
- Bouman, S, D.B. Lund, F.M. Driessen, D.G. Schmidt, (1982) Growth of thermoresistant streptococci and deposition of milk constituents on plates of heat exchangers during long operating times, *J. Food Prot.* (9)788–883. doi:10.4315/0362-028X-45.9.806.
- Bouman, S, D.B. Lund, F.M. Driessen, D.G. Schmidt, (1982) Growth of thermoresistant streptococci and deposition of milk constituents on plates of heat exchangers during long operating times, *J. Food Prot.* 9 (1982)788–883. doi:10.4315/0362-028X-45.9.806.
- Bouman, S, D.B. Lund, F.M. Driessen, D.G. Schmidt, Growth of thermoresistant streptococci and deposition of milk constituents on plates of heat exchangers during long operating times, *J. Food Prot.* 9 (1982) 788–883. doi:10.4315/0362-028X-45.9.806.
- Burgess, S.A, D. Lindsay, S.H. Flint, (2010) Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing, *Int. J. Food Microbiol.* (144)215–225. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027.
- Characklis WG (1973), Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to Microbial slimes. *Water Res.* 7, 1249-1258
- Camargo, A. C., Woodward, J. J., Call, D. R., and Nero, L. A. (2017). *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian Scenario. *Foodborne Pathog. Dis.* 14, 623–636. doi: 10.1089/fpd.2016.2274
- Carter, M. Q., Louie, J. W., Feng, D., Zhong, W., and Brandl, M. T. (2016). Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157: H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiol.* 57, 81–89. doi: 10.1016/j. fm.2016.01.006

- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Alvarez-Ordóñez, A. (2015). Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Front. Microbiol.* 6:672. doi: 10.3389/fmicb.2015.00672
- Chung, J., Goo, E., Yu, S., Choi, O., Lee, J., Kim, J., et al. (2011). Small-molecule inhibitor binding to an N-acyl-homoserine lactone synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12089–12094. doi: 10.1073/pnas.1103165108
- Carrascosa, C.; Raheem, D.; Ramos, F.; Saraiva, A.; Raposo, A. Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 2014.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* *15*, 167-193.
- Duguid, J. P., Anderson, E. S., and Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J. Pathol. Bacterol.* 92, 107–138. doi: 10.1002/path.1700920113
- Dufour, M., R.S. Simmonds, P.J. Bremer, Development of a laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of natural antimicrobials against dairy biofilms., *J. Food Prot.* 67 (2004) 1438–1443. doi:10.4315/0362-028X-67.7.1438.
- Donlan, R.M. et J.W. Costerton, (2002) « Biofilms : mécanismes de survie des micro-organismes cliniquement pertinents », *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 15, non. 2, p. 167–193. Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- Dunne, W.M., (2002) « Adhésion bactérienne : avez-vous vu de bons biofilms récemment ? » *Revue de microbiologie clinique*, vol. 15, non. 2, p. 155–166. Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- Evelyn, and Silva, F. V. M. (2015). High pressure processing of milk: modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores at 38–70°C. *J. Food Eng.* 165, 141–148. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.06.017
- Eck A. 1987. *Le fromage*. 2^{ème} éd. Tech. Lavoisier. Paris .101-227. Eck A, Gillis JC. 1997. *Les agents de transformation du lait. Le fromage*. 3^{ème} éd: Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris. 189 p.
- Flemming HC, Wingender J. La matrice du biofilm. *Nat Rev Microbiol.* 2010 ; 8 : 623–633
- Fuqua C., et Greenberg E. P., (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Molecular cell Biology*, 3: 685-695.
- Fuqua W. C., Winans S. C., et Greenberg E. P., (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density -responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2): 269-275

- Fister, S., Robben, C., Witte, A. K., Schoder, D., Wagner, M., and Rossmanith, P. (2016). Influence of environmental factors on phage–bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100. *Front. Microbiol.* 7:1152. doi: 10.3389/fmicb.2016.01152
- Ferreira V., Wiedmann M., Teixeira P., Stasiewicz M.J.(2014) *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J. Food Prot.* 2014;77:150–170. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-150. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- Freitag N.E., Port G.C., Miner M.D.(2009) *Listeria monocytogenes*—From saprophyte to intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009;7:623–628. doi: 10.1038/nrmicro2171. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- Flint.S.H, P.J. Bremer, J.D. Brooks, Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control, *Biofouling*. 11 (1997) 81–97. doi:10.1080/08927019709378321
- Goller, C., Wang, X., Itoh, Y. & Romeo, T. (2006).The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates *pgaABCD* transcription, required for production of the biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol* 188, 8022-8032.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., and Cotter, P. D. (2015).The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry.*Front.Microbiol.* 6:1418. doi: 10.3389/fmicb.2015.01418
- Giaouris, E., Heir, E., Hebraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., and Mørretrø, T. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environment: causes and control by alternative novel methods. *Meat Sci.* 97, 298–309. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.05.023
- Goh.K.M, U.M. Kahar, Y.Y. Chai, C.S. Chong, K.P. Chai, V. Ranjani, et al.,Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 1475–1488. doi:10.1007/s00253-012-4663-2.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology* 2, 95–108.
- Jang.H, R. Rusconi et R. Stocker,(2017) "La perturbation du biofilm par une bulle d'air révèle des schémas de détachement hétérogènes dépendant de l'âge dictés par la distribution initiale de la matrice extracellulaire", *Npj Biofilms and Microbiomes* , vol. 3, non. 1, p. 6, 2017.Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)

- Julien Chamberland (2018) étude des biofilms dans les systèmes de filtration en industrie laitière : mécanisme de formation caractérisation et stratégie de contrôle .thèse de doctorat université Laval () 143p
- Jamal.M, W. Ahmad, S. Andleeb et al.,(2018) « Biofilm bactérien et infections associées », *Journal de l'Association médicale chinoise* , vol. 81, non. 1, p. 7–11,.Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- Kim.MK, A. Zhao, A. Wang et al.,(2017) « Les molécules fixées à la surface contrôlent la détection du quorum de *Staphylococcus aureus* et le développement de biofilms », *Nature Microbiology* , vol. 2, non. 8, p. 17080,.Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- Körstgens V., Flemming H.C., Wingender J., Borchard W.(2001). The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*.9, 222-227
- Karatan E, Watnick P. Signaux, réseaux de régulation et matériaux qui construisent et cassent les biofilms bactériens. *Microbiol Mol Biol* Rév. 2009 ; 73 : 310–347.
- Kleerebezem M., Quadri L. E. N., Kuipers O. P. et De Vos W. M., (1997). Quorum sensing by Peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 24(5): 895-904.
- Kabwanga Ismail T, Atila Yetisemiyen, Shakira Nankya. Dairy Industrial Hygiene: A Review on Biofilm Challenges and Control. *International J of Research – Granthaalayah* 2018;6(2):268-273.
- Kania, R.E.; Lamers, G.E.; Vonk, M.J.; Huy, P.T.B.; Hiemstra, P.S.; Bloemberg, G.V.; Grote, J.J.(2007) Demonstration of bacterial cells and glycocalyx in biofilms on human tonsils. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 133, 115–121. [CrossRef]
- Lahsaoui S. 2009. Etude du procédé de fabrication d'un produit laitier traditionnel algérien (Klila): [Thèse de Doctorat]. Département d'Agronomie. Université de Batna. Algérie.
- Lawrence, J.R.; Neu, T.R. Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol.* 1999, 310, 131–144. [PubMed]
- Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol.*(2006);55:645–659. doi: 10.1099/jmm.0.46495-0. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- Lenglet, A., and National Epidemiological Surveillance Network of Spain (2005). E-alert 9 August: over 2000 Cases so far in salmonella hadar outbreak in Spain associated with consumption of pre-cooked chicken. *Euro Surveill*.10:E050811.1
- Lazazzera B. A., et Grossman A. D.,(1998). The ins and outs of peptide signaling. *Trends in Microbiology*, 6(7): 288-294

- Maher.M.M, K.N. Jordan, M.E. Upton, A. Coffey, Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk., J. Appl. Microbiol. 90(2001) 201–207.
- Mebarkimanal (2016) . Traitement de biofilm bactérien par les molécules bioactives .mémoire de master . UNIVERSITE de TLEMCEM Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. 66p
- Mittelman MW (1996) Adhesion to biomaterials. Bacterial Adhesion : molecular and Ecological diversity, 89- 127
- Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., and Gohar, M. (2016). Bacillus cereus biofilms—same, only different. Front. Microbiol. 7:1054. doi: 10.3389/fmicb.2016.01054
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., and 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. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x
- Morita, Y., Komoda, E., Ono, K., and Kumagai, S. (2011). Survival of biofilmforming Salmonella on stainless steel bolt threads under dry conditions. ShokuhinEiseigakuZasshi 52, 299–303. doi: 10.3358/shokueishi.52.299
- Mørretrø T., Langsrud S. *Listeria monocytogenes*: Biofilm formation and persistence in food-processing environments. Biofilms.2004;1:107–121. doi: 10.1017/S1479050504001322. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- McGuiggan.J.T.M, D.R. McCleery, A. Hannan, A. Gilmour, Aerobic spore-forming bacteria in bulk rawmilk: Factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores, Int. J. Dairy Technol. 55 (2002) 100–107. doi:10.1046/j.1471-0307.2002.00051.x.
- Nica, I. C., Stan, M. S., Popa, M., Chifiriuc, M. C., Lazar, V., Pircalabioru, G. G., et al. (2017). Interaction of new-developed TiO₂-based photocatalytic nanoparticles with pathogenic microorganisms and human dermal and pulmonary fibroblasts. Int. J. Mol. Sci. 18:249. doi: 10.3390/ijms18020249
- Nguyen, H. D. N., Yang, Y. S., and Yuk, H. G. (2014). Biofilm formation of Salmonella Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. LWT Food Sci. Technol. 55, 383–388. doi: 10.1016/j.lwt.2013.09.022
- Nielsen P-H, Jahn A and Palmgren R. (1997). Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. Water Sci Technol 36: 11–19.
- Otto.M,(2013) « Infections staphylococciques : mécanismes de maturation et de détachement du biofilm en tant que déterminants critiques de la pathogénicité », *Revue*

annuelle de médecine , vol. 64, non. 1, p. 175–188, .Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)

- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49- 79.
- Petrova.O.P et K. Sauer,(2012) «Situations collantes: composants clés qui contrôlent l'attachement de surface bactérienne», *Journal of Bacteriology* , vol. 194, non. 10, p. 2413–2425,.Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- Potts, M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58, 755–805.
- Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 27–33. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.007
- Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L., and Malm, A. (2014). Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Pol. J. Microbiol.* 63, 137–145.
- Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D., Sillankorva, S., and Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2141–2151. doi: 10.1007/s00253-015-7247-
- Pratt L.A. ET Kolter R (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current opinion in microbiology.* 2, 598-603.
- Quigley.L, D.J.O. Sullivan, D. Daly, O.O. Sullivan, G.F. Fitzgerald, P.L.H. Mcsweeney, et al., *Thermus* and the pink discoloration defect in cheese, *MSystems.* 1 (2016) e00023-16. doi:10.1128/mSystems.00023-16.
- Quigley.L, O. O'Sullivan, C. Stanton, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, et al.,(2013) The complex microbiota of raw milk, *FEMS Microbiol. Rev.* (37)664–698. doi:10.1111/1574-6976.12030.
- Roberson, E. B., Firestone, M. K.(1992) Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 58,1284–1291.
- Raffaella, C., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., and Baffone, W. (2017). Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 132–140. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.021
- Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., et al. (2005). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J. Bacteriol.* 187, 1799–1814. doi: 10.1128/JB.187.5.1799-1814.2005

- Rai, M., Ingle, A. P., Gaikwad, S., Gupta, I., and Gade, A. (2015). Nanotechnology based anti-infectives to fight microbial intrusions. *J. Appl. Microbiol.* 120, 527–542. doi: 10.1111/jam.13010
- Roy, R., M. Tiwari, G. Donelli et V. Tiwari, (2018) « Stratégies de lutte contre les biofilms bactériens : focus sur les agents anti-biofilm et leurs mécanismes d'action », *Virulence*, vol. 9, non. 1, p. 522–554, Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- RMDonlan, (2002) « Biofilms : vie microbienne sur les surfaces », *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, non. 9, pages 881–890, Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- Solano, C., M. Echeverz et I. Lasa, (2014) « Biofilm dispersion and quorum sensing », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 18, p. 96–104, Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- Stoica, I. M., E. Vitzilaiou, H. Lyng Røder, M. Burmølle, D. Thaysen, S. Knøchel, et al., (2018) Biofouling on RO membranes used for water recovery in the dairy industry, *J. Water Process Eng.* (24) 1–10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.05.004>.
- Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton et D. G. Davies, (2009) « *Pseudomonas aeruginosa* affiche plusieurs phénotypes au cours du développement en tant que biofilm », *Journal Of Bacteriology*, vol. 184, non. 4, p. 1140–1154, Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- Singh Parul, G. Basak, Barkha Sharma, Udit Jain, Raghavendra Mishra and Vaishali, 2019. *The Pharma Innovation Journal* 2021; SP-10(8): 809-817
- Squinazi F (2013). *Biofilm & Matériaux : des réseaux intérieurs de distribution de l'eau*. Edition 2013 p: 4-10.
- Suchita Bhosale, Priyanka Brahmane, Ashwini Kubade. *The Pharma Innovation Journal* 2021; SP-10(8): 809-817
- Slany, M., Oppelt, J., and Cincaro, L. (2017). Formation of *Staphylococcus aureus* biofilm in the presence of sub-lethal concentrations of disinfectants: a transcriptomic analysis using RNA-seq. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e01643-17. doi: 10.1128/AEM.01643-17
- Schelin, J., Susilo, Y. B., and Johler, S. (2017). Expression of Staphylococcal enterotoxins under stress encountered during food production and preservation. *Toxins* 9:E401. doi: 10.3390/toxins9120401
- Santos, L. M., Oliveira, F. A., Ferreira, E. H., and Rosenthal, A. (2017). Application and possible benefits of high hydrostatic pressure or high-pressure homogenization on beer processing: a review. *Food Sci. Technol. Int.* 23, 561–581. doi: 10.1177/1082013217714670

- Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., and Julak, J. (2015). Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Adv.* 33, 1108–1119. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.002
- Strobel G & Daisy B. (2003). Bioprospecting for Microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews.* 67(4) : 491-502
- Seale, B., P. Bremer, S. Flint, J. Brooks, J. Palmer, (2015) Overview of the problems resulting from biofilm contamination in the dairy industry, in: K.H. Teh, S. Flint, J. Brooks, G. Knight (Eds.), *Biofilms Dairy Ind.*, Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Inc., pp. 49–64. doi:10.1002/9781118876282.ch4.
- Scoffone, V.S., G. Trespidi, L.R. Chiarelli, G. Barbieri et S. Buroni, (2019) « Quorum sensing as antiviral target in cystic fibrosis pathogens », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, non. 8, p. 1838. Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- Toyofuku, M., T. Inaba, T. Kiyokawa, N. Obana, Y. Yawata et N. Nomura, (2016) « Facteurs environnementaux qui façonnent la formation de biofilms », *Bioscience, biotechnologie et biochimie*, vol. 80, non. 1, p. 7–12, 2016. Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)
- Thibaut SAUR (2014) Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multiespèces : de l'adhésion au biofilm mature. Thèse de doctorat. UNIVERSITE MONTPELLIER 2 ()225
- von Neubeck, M., C. Baur, M. Krewinkel, M. Stoeckel, B. Kranz, T. Stressler, et al., (2015) Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential, *Int. J. Food Microbiol.* (211)57–65. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001.
- Vilain, S., Pretorius, J. M., Theron, J., and Brozel, V. S. (2009). DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2861–2868. doi: 10.1128/AEM.01317-08
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 25:365–404.
- Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2003. Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 317–323.
- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., and Zhou, G. (2013b). In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 293–302. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005

- Wilks S.A., Michels H.T., Keevil C.W. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: Implications for cross-contamination. *Int. J. Food Microbiol.*2006;111:93–98. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.037. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- Zhao.X, F. Zhao, J. Wang et N. Zhong,(2017) « Formation de biofilms et stratégies de contrôle des agents pathogènes d'origine alimentaire : perspectives de sécurité alimentaire », *RSC Advances* , vol. 7, non. 58, pages 36670–36683,.Afficher sur : [Site de l'éditeur](#) | [Google Scholar](#)