

REPUBLIQUE ALGERIENNE DE<sup>2</sup>MOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



UNIVERSITE  
Abdelhamid Ibn Badis  
MOSTAGANEM

جامعة عبد الحميد ابن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة والحياة

## Département des Sciences Alimentaires

### MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**LATROCH Imene**

Pour l'obtention du diplôme de

### **MASTER**

**Spécialité : PRODUCTION ET TRANSFORMATION LAITIÈRE**

### THÈME

**LUTTE CONTRE LES BIOFILMS LAITIERS DES LIGNES  
DE RÉCEPTION D'UNE LAITIÈRE**

Soutenu le : 23/06/2025

Présidente : Dr TAHLAITI Hafida

MCA

UMAB Mostaganem

Encadreur : Dr DAHOU Abdelkader El Amine

MCA

UMAB Mostaganem

Examinatrice : Dr ALACHAHER Fatima Zohra

MCB

UMAB Mostaganem

*Travail réalisé au du Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale*

*Année Universitaire : 2024-2025*

# *Remerciements*

Avant tout, je rends grâce à Allah mon Grand Dieu de m'avoir accordé la force, la patience et la capacité nécessaires pour mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Recteur de l'Université et à M le Doyen de la faculté, ainsi qu'à l'ensemble des enseignants du département des sciences alimentaires pour la qualité de leur encadrement tout au long de mon parcours.

Mes remerciements les plus sincères vont à mon encadreur, Dr **DAHOU Abdelkader El Amine**, pour sa bienveillance, sa disponibilité constante, ses conseils éclairés, et pour la confiance qu'il m'a accordé. Il a toujours su répondre à mes interrogations avec patience et professionnalisme, malgré ses nombreuses responsabilités.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Ma reconnaissance va en particulier à **Dr TAHLAITI Hafida**, présidente du jury, pour ses remarques pertinentes et ses conseils précieux, ainsi qu'à **Dr ALACHAHER Fatima Zohra** pour le temps qu'elle a consacré à l'examen de ce mémoire et pour ses observations constructives.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement le personnel du laboratoire de la laiterie, ainsi que **M. BENHARRAT Noureddine**, ingénieur au laboratoire de recherche en Sciences et Techniques de Production Animale de l'Université de Mostaganem, pour leur soutien technique et logistique.

Mes remerciements les plus affectueux vont à mon père, pour son soutien indéfectible et ses encouragements constants. J'espère que ce modeste travail sera reçu comme une humble preuve de reconnaissance de la part de sa fille unique.

À ma chère mère, pour son amour inconditionnel, sa patience et sa compréhension sans limites : ce mémoire est aussi l'accomplissement de vos vœux.

Je n'oublie pas mes frères, ma famille, mes proches et mes camarades de formation, qui m'ont soutenue moralement tout au long de cette aventure académique.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

## Résumé

La contamination microbienne des surfaces reste un sujet d'actualité dans de nombreux secteurs de l'industrie agroalimentaire, notamment dans le secteur laitier. La présence dans le lait collecté d'une flore microbienne diversifiée, constituant des biofilms laitiers natifs des élevages, est alarmante pour les professionnels de l'industrie laitière, car ces contaminants sont reconnus comme étant à l'origine de problèmes économiques et sanitaires majeurs. Dans cette étude, nous avons pu isoler des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus* à partir d'eaux de rinçage récupérées lors d'un nettoyage en place (CIP) de la ligne de réception du lait frais d'une laiterie. Notre contribution a été de caractériser les biofilms bactériens sur une ligne de réception de lait frais (c'est-à-dire la flore d'altération et la flore pathogène), d'effectuer la cinétique de nettoyage et de la modéliser afin d'optimiser le nettoyage en place avec l'équipement disponible. Notre contribution scientifique a été de discriminer les actions respectives de chaque étape ou activité impliquée dans le nettoyage, c'est-à-dire le trempage par hydratation dans de l'eau traitée combinée à une attaque chimique, le rinçage par action mécanique seule, le nettoyage par combinaison d'une action mécanique et d'une action chimique. Cette approche a permis de proposer des solutions pour lutter contre les contaminants caractérisés comme initiateurs de biofilms laitiers dangereux, et d'expliquer la réponse à modéliser par l'action de phénomènes physiques, biologiques et/ou chimiques. L'inactivation bactérienne est plus ou moins facilement éliminée par une action mécanique adaptée, liée à la chimie via la concentration, combinant le passage de deux solutions, l'une alcaline et l'autre acide, à une désinfection biocide.

Mots clés : Biofilm bactérien, Ligne de réception, NEP, Action chimique, Action mécanique.

## Abstract

Microbial contamination of surfaces remains a topical issue in many sectors of the agri-food industry, particularly in the dairy sector. The presence in collected milk of a diverse microbial flora, constituting dairy biofilms native to livestock farms, is alarming for dairy industry professionals, as these contaminants are recognized as the source of major economic and health problems. In this study, we were able to isolate strains of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* from rinsing water recovered from a CIP cleaning-in-place of a dairy's fresh milk reception line. Our contribution was to characterize bacterial biofilm patterns on a dairy receiving line (i.e. spoilage and pathogenic flora), carry out cleaning kinetics and model them in order to optimize CIP with available equipment. Our scientific contribution was to

discriminate between the respective actions of each stage or activity involved in cleaning, i.e. soaking by hydration in treated water combined with chemical attack, rinsing by mechanical action alone, cleaning by combining mechanical action with chemical action. This approach has enabled us to put forward solutions for combating the contaminants characterized as initiators of dangerous dairy biofilms, and to explain the response to be modeled by the action of physical, biological and/or chemical phenomena. Bacterial inactivation is more or less easily eliminated by an adapted mechanical action, linked to chemistry via concentration, combining the passage of two solutions, one alkaline and the other acidic, to a biocidal disinfection.

**Key words:** Bacterial biofilm, Receiving line, CIP, Chemical action, Mechanical action.

## ملخص

لا يزال التلوث الميكروبي للأسطح يمثل مشكلة موضوعية في العديد من قطاعات صناعة الأغذية الزراعية، لا سيما في قطاع الألبان. إن وجود الملوثات الميكروبية المتنوعة في الحليب الذي تم جمعه والتي تشكل الأغشية الحيوية في مزارع انتاج الألبان الأصلية يثير قلق المتخصصين في الصناعة التحويلية للألبان، حيث أن هذه الملوثات تعتبر مصدرًا لمشاكل اقتصادية وصحية كبيرة. في هذه الدراسة، تمكنا من عزل سلالات من المكورات العنقودية الذهبية والعصيات المخية من مياه الشطف المستخرجة من التنظيف المكاني CIP لخط استقبال الحليب الطازج في أحد مصانع الألبان. وتمثلت مساهمتنا في توصيف أنماط الأغشية الحيوية البكتيرية على خط استقبال الألبان (أي البكتيريا الملوثة والمضرة)، وإجراء حركية التنظيف ونمذجتها من أجل تحسين التنظيف المكاني باستخدام المعدات المتاحة. وتمثلت مساهمتنا العلمية في التمييز بين الإجراءات الخاصة بكل مرحلة أو نشاط من أنشطة التنظيف، أي النقع عن طريق الترطيب في المياه المعالجة مع الهجوم الكيميائي، والشطف عن طريق العمل الميكانيكي وحده، والتنظيف عن طريق الجمع بين العمل الميكانيكي والعمل الكيميائي. وقد مكنا هذا النهج من طرح حلول لمكافحة الملوثات التي تتميز بأنها مسببات للأغشية الحيوية الرقيقة الخطيرة في انتاج الألبان، وتفسير الاستجابة التي يجب أن تكون على غرار عمل الظواهر الفيزيائية والبيولوجية و/أو الكيميائية. يتم القضاء على التعطيل البكتيري بشكل أو بآخر بسهولة عن طريق عمل ميكانيكي متكيف، مرتبط بالكيمياء عن طريق التركيز، والجمع بين مرور محلولين، أحدهما قلوي والآخر حمضي، إلى تطهير بواسطة مبيد حيوي.

الكلمات الرئيسية: الغشاء الحيوي الرقيق البكتيري، خط الاستقبال، التنظيف المكاني، العمل الكيميائي، العمل الميكانيكي.

## Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BT : Bacille Tuberculeux

CIP : Clean In Place

EPS : Exo-Poly-Saccharide

HNO<sub>3</sub> : Acide nitrique

HOCL : Acide Hypochlorique

ISO 21871/2006 : Norme de l'International organization for standardization applicable for « Microbiology of food and animal feeding stuffs » (Microbiologie des denrées alimentaires et des aliments pour animaux)

ISO 7932/2004 : Méthode certifiée de l'International organization pour le dénombrement de Bacillus cereus

MYP : Mannitol Yolk Polymyxin

NaOH : Soude caustique

NEP : Nettoyage En Place

UFC : Unité Formant Colonie

UHT : Ultra Haute Température

TACT : Température- Action-Concentration- Temps

TIAC : Toxi Infection Alimentaire Collective

## Liste des figures et des tableaux

### 1/ Liste des figures

N°ordre	Intitulé	Page
01	Schéma de la formation d'un biofilm	18
02	Bactéries lactiques au sein d'une transformation laitière	20
03	Exemples de bactéries infectieuses	21
04	Procédé de standardisation de la matière grasse à l'aide d'un clarificateur-séparateur-normalisateur	25
05	Cercle de Sinner des 04 paramètres d'un nettoyage parfait	30
06	Process de réception de la laiterie (Plan de montage de la laiterie Alfa Laval, 2015)	37
07	Station NEP de l'usine (Plan de montage de la laiterie Alfa Laval, 2015)	38
08	Espèce présumée à <i>Staphylococcus aureus</i>	44
09	Fermentation du mannitol (à droite) et <i>Staphylococcus coagulase</i> négative (à gauche) et <i>Staphylococcus aureus</i> (à droite)	44
10	Colonies gluantes et granuleuses de l'espèce présumée à <i>Bacillus cereus</i>	45
11	Observation microscopique de <i>Bacillus cereus</i>	46
12	Observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	46
13	Aspect macroscopique de <i>Bacillus cereus</i> sur le milieu gélosé de Mossel	47
14	Tests de catalase (a), d'oxydase (b), d'hydrolyse de l'amidon (c) et de précipitation de la caséine kappa (d) chez l'espèce <i>Bacillus cereus</i>	47
15	Tests de coagulase (a) et d'oxydase (b) chez l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	48

### 2/ Liste des tableaux

N°ordre	Intitulé	Page
01	Inventaire de la diversité (à l'échelle des genres) des bactéries et levures dans des laits crus de vache et de chèvre	21
02	Les éléments du nettoyage « 6 T »	29
03	Caractères macro et micro-morphologiques distinctifs des souches testées	40
04	Comptage bactérien des biofilms laitiers caractérisés sur la ligne de réception du lait avant et après modélisation du NEP	50

## Table des matières

Remerciements.....	2
Résumé, Abstract, ملخص.....	3
Liste des abréviations.....	4
Listes des figures et des tableaux.....	5
Introduction.....	9
<b>PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>12</b>
<b>CHAPITRE I : Les biofilms.....</b>	<b>12</b>
1. Définition.....	12
2. Historique.....	12
3. Diversité des biofilms.....	13
3.1 Nature des biofilms.....	13
3.2 Structure des biofilms.....	15
3.3 Constituants d'un biofilm.....	15
4. Formation d'un biofilm.....	17
5. Germes contaminants le lait en industrie laitière.....	18
5.1 Flore caractéristique du lait.....	18
5.2 Flore indigène (originelle).....	18
5.3 Flore de contamination.....	19
6. Origine de contamination.....	21
6.1 Contamination au cours du transport.....	21
6.2 Contamination au cours de la production.....	22
6.3 Contamination par l'animal.....	22
6.4 Contamination au cours de la traite.....	22
6.5 Contamination par les équipements.....	22
7- Etapes de la transformation laitière.....	23
<b>CHAPITRE II : Lutte contre les biofilms au niveau de l'industrie laitière.....</b>	<b>28</b>
1. Introduction.....	28
2. Nettoyage en industrie agroalimentaire.....	29
2.1 Nettoyage en place.....	29
2.1.1 L'action chimique.....	29
2.1.2 L'action mécanique.....	30
2.1.3 La température.....	30
2.1.4 Le temps de contact.....	30
2.2 Les agents de nettoyage.....	31
2.2.1 Les agents de nettoyage alcalins.....	31
2.2.2 Les agents de nettoyage acides.....	31
2.2.3 Les détergents enzymatiques.....	32
2.3 La désinfection.....	32
2.3.1 Halogènes et dérivés.....	33
2.3.2 Aldéhydes.....	33
2.3.3 Les alcools.....	33
2.3.4 Oxydants.....	34
2.3.5 Les dérivés phénoliques.....	34
2.3.6 Les ammoniums quaternaires.....	34
2.3.7 Les biguanides.....	34
<b>PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>35</b>
<b>CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>36</b>
1- Cadre de l'étude.....	36
2. Matériel.....	36

2.1 Matériel biologique et milieux de culture spécifiques.....	36
2.2 Matériel non biologique .....	37
3. Méthodes .....	38
3.1 Echantillonnage .....	38
3.2 Analyses microbiologiques.....	39
3.2.1 Traitement des échantillons.....	39
3.2.2 Isolement et purification des souches.....	39
3.2.3 Identification des souches.....	39
3.2.4 Conservation finale des souches .....	41
3.3- Etude comparative de différentes conditions de nettoyage. ....	41
3.3.1- Le modèle de la mini-laiterie adopté.....	41
3.3.2- Le modèle amélioré selon les préconisations .....	41
3.3.3- Le modèle formulé scientifiquement .....	42
 CHAPITRE II : Résultats et discussion.....	 43
1- Caractérisation morphologique des isolats des souches contaminantes.....	43
1.1- Examen macroscopique des isolats.....	43
1.2- Examen microscopique des isolats.....	44
1.2.1- Aspect de Bacillus cereus sous microscope optique.....	45
1.2.2- Aspect de Staphylococcus aureus sous microscope optique.....	45
1.3- Identification de Bacillus cereus et de Staphylococcus aureus.....	46
1.3.1- Identification de Bacillus cereus.....	46
1.3.2- Identification de Staphylococcus aureus.....	47
2- Etude comparative des différentes conditions de nettoyage.....	47
Conclusion.....	50
Références bibliographiques.....	52
Annexes.....	58

## Introduction

Un biofilm est un amas structuré de micro-organismes (bactéries, champignons, algues) enrobés d'une matrice polymérique et attaché à une surface. Il présente une structure très organisée. En effet, les micro-organismes d'un biofilm vont acquérir certains caractères qui leur permettent de s'adapter à ce mode de vie et aux micro-organismes qui les entourent. Le biofilm est recouvert d'une matrice extracellulaire, elle va servir de protection contre les facteurs environnementaux. Sa destruction sera donc difficile (Boukhelifa, 2017 ; Goetz *et al.*, 2024 ; Racha *et al.*, 2012 ).

Le contrôle du biofilm est un enjeu majeur dans le secteur industriel. Les biofilms des industries alimentaires sont reconnus être la source de lourds problèmes économiques et sanitaires. Ils sont responsables de la diminution des rendements et de l'augmentation des coûts de production, dues aux altérations des produits transformés et aux détériorations des appareils et des matériaux (LaPointe *et al.*, 2024 ; Titouche, 2018). D'une part, les biofilms sont une source de contamination des aliments transformés par des germes indésirables et sont largement incriminés dans la dégradation de la qualité organoleptique et sanitaire des produits finis et la diminution de leur durée de vie. D'autre part, l'encrassement des lignes de production et des échangeurs thermiques tels que les refroidisseurs, les pasteurisateurs et les problèmes de corrosion diminuent l'efficacité de ces appareils avec des répercussions, notamment sur la qualité des produits traités. Dans les entreprises de transformation laitière la lutte contre les biofilms s'inscrit dans les démarches visant l'amélioration de la qualité microbiologique des produits finis. En industrie laitière, la contamination disséminée à partir des surfaces industrielles est largement reconnue (Hamirouche *et al.*, 2014 ; Mansour, 2015 ; Maukonen *et al.*, 2003). L'environnement des laiteries est propice au développement des biofilms ; en effet, la nature des espèces qui composent ces écosystèmes microbiens est largement influencée par les conditions des processus technologiques (Blel *et al.*, 2007 ; Branda *et al.*, 2005)

Dans l'industrie laitière, on trouve différents micro-organismes sur les lignes de transformation et de stockage. Ces derniers ont la capacité à former un biofilm s'ils ne sont pas éliminés (Chmielewski et Frank, 2003). Or, la présence de biofilm en industrie laitière est une problématique. Une contamination des laits engendrera des accidents de fabrication, une perte économique et également un risque pour la santé du consommateur (Gundz et Tuncel, 2006 ; Sharma et Anand, 2002).

Parmi ces microorganismes, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* qui sont deux pathogènes

régulièrement rencontrés, en particulier dans les lignes de production et de transformation laitière et doués d'une capacité à former les biofilms

A travers ce mémoire, deux objectifs sont visés :

- Rechercher des souches de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus* ayant la capacité de former des biofilms laitiers dans une ligne de réception d'une mini-laiterie installée à Mostaganem
- Chercher comment optimiser l'élimination de ces biofilms installés dans la ligne de réception des laits.

La dégradation des biofilms étant difficile, il faut agir en amont afin d'éviter leur formation. La première condition pour éviter la formation de biofilms est de maintenir une bonne hygiène sur les lignes de transformation laitière. Nous allons donc décortiquer une ligne de réception des laits, caractériser les biofilms laitiers de la ligne, vérifier le nettoyage en place, identifier les différents produits de nettoyage et de désinfection, ensuite voir comment proposer un bon procédé de nettoyage avec des produits adaptés à l'élimination et à une lutte efficace contre les biofilms installés.

**PARTIE :**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **CHAPITRE 1 : LES BIOFILMS**

### **1. Définition**

Un biofilm est une couche de micro-organismes constituée de différentes espèces (bactéries, algues, champignons et/ou protozoaires), dans lequel des cellules s'associent et adhèrent à une surface pour s'y développer. Ils établissent une forte relation d'adhérence entre eux par la synthèse de substances polymères qui forment une matrice qui englobe leurs cellules (Clamerland, 2018 ; Tremblay *et al.*, 2014 ; Verstraeten *et al.*, 2008 ).

Les biofilms sont présents sur la plupart des objets que nous utilisons, mais aussi sur les aliments. Ils sont responsables de la « bio salissure » : Biofouling en anglais, c'est la formation d'une couche gênante d'êtres vivants sur une surface artificielle en contact permanent ou fréquent avec de l'eau. Citons par exemple : les équipements industriels en industrie laitière, ceux de traitement des eaux potable (Caroline *et al.*, 2010)

### **2. Historique**

Les biofilms sont observés depuis longtemps, leurs caractéristiques et leurs structures n'étaient pas encore connues. Durant les années 1600, Antoni Van Leeuwenhoek, commerçant et scientifique néerlandais, a été le premier à observer et décrire les micro-organismes (à l'origine appelés « animalcules ») à l'aide d'un microscope fabriqué à la main. Il a utilisé un échantillon issu de sa surface dentaire (Hall-Stoodley *et al.*, 2002).

Les méthodes d'observation des biofilms étant peu performantes, leur mise en évidence a été difficile. C'est en 1933, en effectuant des expériences sur la croissance des algues placées sur une lame de verre et plongées dans un aquarium qu'Arthur Henrici va observer l'existence des biofilms. Il s'aperçoit que les micro-organismes, en milieux aqueux, vivent en communauté organisées, fixées sur un support, entourées d'une matrice et non sous forme planctonique (cellules isolées, flottantes dans un milieu liquide). Bien que le terme « biofilm » ne soit pas encore utilisé, le concept est né.

Deux ans après les études d'Henrici, Claude Ephraim Zobell qui a été le pionnier de la recherche sur les micro-organismes et les processus microbiens dans l'océan (précurseur dans le domaine de la microbiologie marine), a poursuivi les études sur les biofilms. Il a également observé le comportement des micro-organismes (bactéries) dans un milieu aquatique : les phénomènes de la fixation réversible/irréversible ainsi que la formation de micro-colonies qui sont les premières étapes de la formation d'un biofilm (Prescott *et al.*, 2010 ; Sanchez *et al.*,

2013).

En 1969, les études de Jones *et al.*, utilisant la microscopie électronique à balayage et de transmission pour examiner les biofilms sur les filtres dans une station de traitement des eaux usées ont montré qu'ils étaient composés d'une variété d'organismes (grâce à l'observation de la morphologie cellulaire).

C'est à partir des années 1970, par l'apparition de nouvelles techniques, que l'étude des biofilms a pris véritablement son essor. Les techniques utilisées étaient principalement la microscopie électronique à balayage et les cultures microbiologiques. En utilisant un colorant spécifique de polysaccharide (le rouge de Ruthénium) couplé à un fixateur (le tétr oxyde d'osmium), les chercheurs ont été en mesure de montrer que la matrice entourant et enfermant des cellules dans ces biofilms était un polysaccharide.

Dès 1973, Characklis par l'étude des boues microbiennes dans les systèmes industriels d'eau a montré que les biofilms étaient aussi très résistantes aux désinfectants comme le chlore (Simoes *et al.*, 2010). Quelques années plus tard, par l'observation de la plaque dentaire et des communautés sessiles dans les cours d'eau de montagne, Costerton et son équipe ont présenté la théorie sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des micro-organismes sur les matériaux vivants et non vivants. Le terme de « biofilms » est proposé pour la première fois, en supposant que ce serait le mode de vie naturel adopté par de nombreux micro-organismes (Quigley *et al.*, 2013).

Aujourd'hui, de nombreuses études sur les biofilms ont été réalisées, que ce soit dans le domaine médical, industriel ou dans le milieu naturel.

### **3. Diversité des biofilms**

Dans la nature, les bactéries existent sous deux formes : la forme planctonique (les bactéries sont libres et flottent dans leur environnement) et sous forme de biofilm (Bos *et al.*, 2000 ). Elles peuvent passer d'une forme à l'autre. Lorsqu'elles sont sous forme planctonique, les bactéries prolifèrent et colonisent les milieux où elles sont présentes. Cette forme est minoritaire. Le mode de vie dominant des bactéries dans l'environnement est sous forme de biofilm. Les bactéries sous forme libre (sous forme planctonique) vont s'attacher sur une surface de façon irréversible et vont croître. Durant cette croissance, elles vont produire des polymères extracellulaires qui vont s'accumuler et former une matrice extracellulaire à forte teneur en eau. Les bactéries vont être immobilisées dans cette matrice, leur proximité va permettre de réaliser des échanges de nutriments et de signaux (Daniel *et al.*, 2004).

Le mode de vie en biofilm permet à une colonie bactérienne de vivre en ayant une protection contre un certain nombre de stress environnementaux (par exemple l'action d'agents antimicrobiens/antibactériens), ainsi, elle peut persister dans un milieu sans même proliférer (Gundz et Tuncel, 2006).

Les biofilms présentent une grande diversité au niveau structurale, ils peuvent être composés d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes, l'épaisseur de la couche de micro-organismes est variable (une couche ou plusieurs couches de micro-organismes) ; l'organisation va être différente d'un biofilm à l'autre.

### **3.1- Nature des biofilms**

Les biofilms sont hétérogènes aussi bien dans les temps que dans l'espace (Mc Meekin et al., 2002). On distingue les biofilms homogènes des biofilms hétérogènes. Un biofilm homogène est constitué d'une seule espèce de micro-organismes. Quant au biofilm hétérogène, il est composé des plusieurs espèces. La présence d'une espèce de micro-organisme dans le biofilm va dépendre des conditions environnementales dans lesquelles il est. Les biofilms présents dans un environnement éclairé par de la lumière (lumière du soleil par exemple) seront constitués d'organismes majoritairement phototrophes, ils vont mettre à profit l'énergie lumineuse pour réaliser la synthèse de leurs aliments (algues unicellulaires, cyanobactéries...). Quant aux biofilms présents dans un environnement dépourvu de lumière, les micro-organismes seront principalement hétérotrophes, des micro-organismes qui vont dégrader la matière organique et chimiotrophes, qui utilisent l'énergie des composés chimiques comme source d'énergie (Simoes *et al.*, 2005).

Une diversité est aussi observée au niveau des supports colonisés, en effet les biofilms peuvent se développer sur des surfaces inertes ou vivantes. Ils peuvent se développer sur des surfaces minérales (roches, interfaces liquides/air), des surfaces organiques (peau, tractus intestinal, rhizosphère des plantes), des surfaces industrielles (canalisation et lignes de transformation, la coque des navires), ou sur des surfaces médicales (pacemaker, sonde, cathéter). Les propriétés physico-chimiques de la surface jouent un rôle dans les mécanismes de formation du biofilm. L'organisation structurale d'un biofilm va être différente selon le type de support sur lequel il se forme (Clamerland, 2018). Par exemple, un biofilm qui se forme dans une canalisation aura une structure complexe car il va contenir des composants divers (mélange de boue avec de la matière organique, pierre à lait, produit provenant de la réaction de corrosion...).

Une surface solide peut avoir plusieurs caractéristiques importantes impliquées dans le processus de fixation. Les études de (Blanpain-Avet *et al.*, 2011) ont montré que l'étendue de la colonisation microbienne semble augmenter lorsque que la rugosité de la surface augmente. Cela est dû au fait que les forces de cisaillement sont diminuées, et la surface est plus élevée sur les surfaces plus rugueuses. Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent également exercer une forte influence sur le taux et l'étendue de la fixation. La plupart des chercheurs ont trouvé que les micro-organismes se fixent plus rapidement à des surfaces hydrophobes et non polaires tels que le téflon et d'autres matières plastiques que des matériaux hydrophiles tels que le verre ou les métaux (Branda, 2005). Les résultats de ces études sont parfois contradictoires car il n'existe pas de méthode standardisée pour déterminer l'hydrophobicité de la surface.

Les biofilms n'ont pas tous la même épaisseur. En effet un biofilm qui vient de se former aura moins de couche de micro-organismes (souvent monocouche) contrairement à un biofilm plus ancien qui aura beaucoup plus de couches (Chen *et al.*, 2007). Selon les conditions nutritives, un biofilm aura une architecture plus ou moins complexe. La formation d'un biofilm nécessite un bon apport en nutriments, d'autant plus qu'ils sont constamment remodelés. Mais, l'étape de développement tardif est possible dans des conditions nutritives moins bonnes.

### **3.2- Structure des biofilms**

D'un point de vue structural les biofilms sont hétérogène ; ils peuvent se développer sur des surfaces différentes, ils peuvent avoir des épaisseurs variées et, ils sont constitués de micro-organismes divers (c'est un mélange d'espèces et des genres de micro-organismes). Malgré ces différences, on peut tout de même observer quelques similitudes structurales entre les biofilms (Jefferson, 2004) . Ils ont une base commune composée d'une couche de cellules fixée sur un support, ensuite des couches de cellules englobées dans une matrice polysaccharidique avec des canaux aqueux.

### **3.3- Constituants d'un biofilm**

Un biofilm est constitué de micro-organismes agglomérés entourés de la matrice qu'ils synthétisent. La matrice inclut tous les éléments du biofilm. L'un des composant principale est l'eau (la quantité d'eau dans un biofilm peut aller jusqu'à 97%) d'où la propriété hydrophile de la plupart des biofilms (certains biofilms peuvent être hydrophobes). Un biofilm est aussi

composé de polysaccharides sécrétés par les micro-organismes, de produits de dégradation et de substances issues du milieu extérieur. Il y a également de l'ADN, ARN et des lipides. Des canaux et pores sont aussi présents pour permettre le flux d'eau, d'oxygène, de nutriments, et d'ions... Ils auront également un rôle dans l'élimination des déchets (Lequette *et al.*, 2010)

Au sein d'un biofilm, les micro-organismes représentent 2 à 15 % du matériel. Quant à la matrice extracellulaire, elle représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée d'un biofilm. La matrice d'exopolysaccharides a un rôle structural important, sa présence présente des avantages comme par exemple la protection des micro-organismes contre les facteurs environnementaux, de plus il confère une résistance contre les agents de dégradation des micro-organismes (Clamerland, 2018). En se liant aux agents anti-microbiens, la matrice les empêche de pénétrer dans le biofilm. Ainsi, elle joue aussi un rôle dans les propriétés d'antibiorésistance (Liu et Zhao, 2005).

La matrice est créée grâce à la production de substances polymériques extracellulaires (EPS, Extracellular polymeric substances) par les micro-organismes.

Les organismes produisent des quantités différentes d'EPS et cette quantité augmente avec l'âge du biofilm. Les EPS peuvent s'associer à des ions métalliques, des cations divalents, et à d'autres macromolécules, telles que des protéines, des ADN, des lipides... (Merouani-Gadri *et al.*, 2010). La production d'EPS est connue pour être affectée par l'état nutritif du milieu dans lequel il croît. Un excès en carbone disponible et une quantité faible en azote, en potassium ou en phosphate favorisent la synthèse des EPS. Une croissance bactérienne lente augmentera également la production des EPS (Moetro *et al.*, 2003).

D'un biofilm à l'autre, les propriétés physico-chimiques de la matrice d'exopolysaccharides sont variables. La matrice ayant une forte capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogènes peut lutter contre la dessiccation dans certains milieux naturels. La couche la plus externe de la matrice se déshydrate parfois dans le but de former une interface sèche et ainsi d'empêcher une dessiccation plus marquée (Palmer *et al.*, 2007).

Au sein d'un biofilm, la matrice d'exopolysaccharides joue un rôle très important. En effet, elle a un rôle structural (maintien des micro-organismes en communauté) mais aussi un rôle de protection, barrière de protection contre certaines substances, protection contre la dessiccation... (Brisabois *et al.*, 2016).

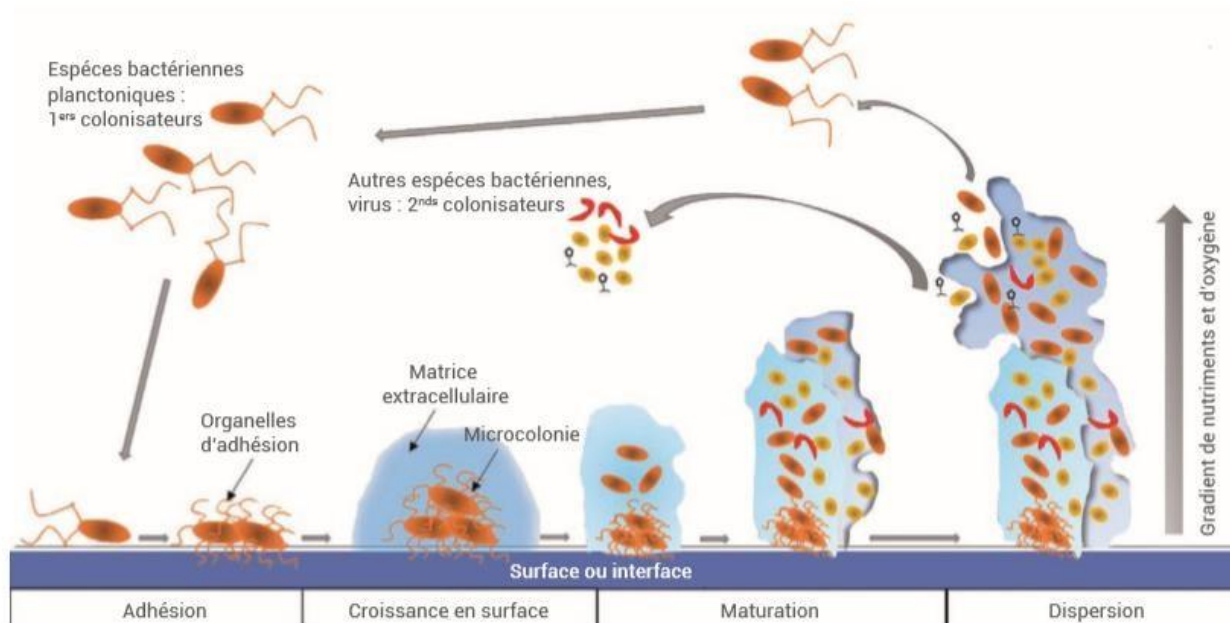
#### 4. Formation d'un biofilm

Le mécanisme de formation d'un biofilm passe par plusieurs étapes, les chercheurs en ont identifié cinq (**Figure 01**). Les micro-organismes sont présents dans un milieu liquide, ils se déplacent grâce à la force du flux, à la gravitation et aux mouvements de leurs flagelles. En s'approchant d'une surface, des forces d'attraction physico- chimiques interviennent, elles vont conduire à une interaction réversible entre l'organisme et la surface. Les micro-organismes vont se lier par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals, c'est l'étape d'adhérence (adsorption). Ensuite, ils vont se diviser, leur nombre va donc augmenter et l'adhésion va devenir irréversible et spécifique (Clamerland, 2018). Des molécules d'adhésion vont être impliquées (synthèse de structure à la surface des micro-organismes et modification du profil d'expression des gènes). Les micro-organismes vont poursuivre leur développement et former des amas cellulaires à la surface et, ils vont produire des polysaccharides extracellulaires. On parle alors de l'étape d'adhésion.

Après cette étape d'adhésion, c'est la phase de croissance : les amas cellulaires vont former des micro-colonies qui seront composées de micro-organismes qui se divisent, mais aussi de micro-organismes qui vont s'attacher sur le biofilm en formation.

Puis vient l'étape de maturation qui consiste au développement des micro-colonies et à leur structuration. Elles vont se développer en piliers d'épaisseur variable et vont être englobées dans la matrice extracellulaire. Les espaces qui séparent des micro-colonies vont devenir les canaux du biofilm.

Certains micro-organismes vont pouvoir se détacher du biofilm mature sous l'effet de facteurs environnementaux et se disperser sous la forme planctonique. Ils pourront aller coloniser de nouvelles surfaces. C'est l'étape de dispersion.



**Figure 01** : Schéma de la formation d'un biofilm (Clamerland, 2018)

## 5. Germes contaminants le lait en industrie laitière

Le lait de vache constitue un excellent siège pour le développement des microorganismes qui provoquent des transformations nuisibles à la qualité des produits. En effet, la qualité du lait se trouve renforcée lorsque les normes de gestions sont rigoureusement respectées. Bien qu'elles engagent des ressources financières supplémentaires afin que le consommateur reçoive son lait sainement, elles demeurent toutefois un rempart à la prolifération des microorganismes (Bachtarzi *et al.*, 2015 ; Von Neubeck *et al.*, 2015).

### 5.1- Flore caractéristique du lait

Le lait par sa composition et par les différents parcours qu'il subit avant son utilisation, soit par le consommateur ou bien par le transformateur, il constitue un vecteur de transmission et un milieu propice pour le développement des microorganismes (Billon, 2009).

Les microorganismes du lait, selon leurs importances sont répartis en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore de contamination. Cette dernière est divisée en deux sous classes : la flore d'altération et la flore pathogène (Ghazi et Niar, 2011).

### 5.2- Flore indigène (originelle)

Le lait contient relativement peu de microorganismes quand il est sécrété de la mamelle d'un animal en bonne santé et dans de bonnes conditions. Il devrait contenir moins de 5000

UFC. Il est protégé par des substances inhibitrices appelées « Lacténines » à activité limitée dans le temps, une heure environ après la traite (Hamirouche *et al.*, 2014 ; Maiworé *et al.*, 2018).

La flore originelle se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés à la sortie du pis, qui n'a aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (Si Tayeb, 2018).

### 5.3- Flore de contamination

L'hygiène dans la production, la conservation et la transformation du lait est un aspect critique pour la santé des populations. Ces conditions exigent un approvisionnement régulier afin de préserver la qualité hygiénique du lait qui est souvent instable et douteuse (Titouche, 2018).

La flore de contamination se définit comme l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération qui causera des défauts sensoriels, ce qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse d'un point de vue sanitaire (Gunduz et Tuncel, 2006).

#### 5.3-1. Germes d'altération

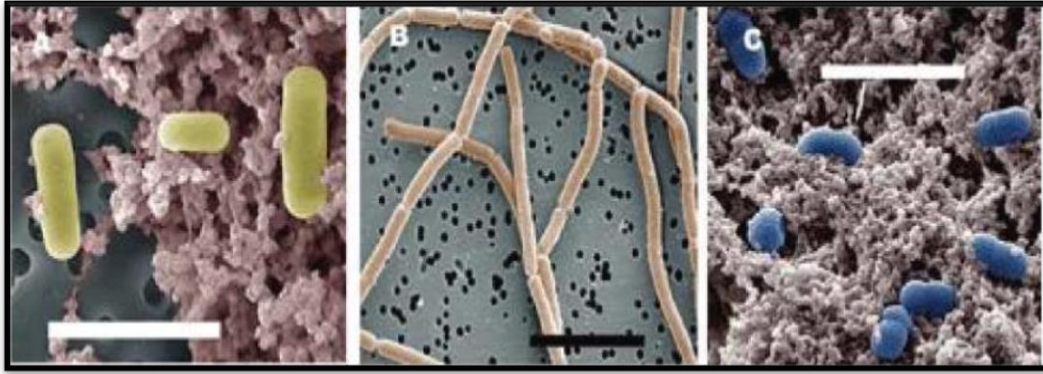
Ce sont des germes apportés par la contamination, provoquant des défauts sensoriels du goût, d'arôme et d'apparence (la détérioration des produits), sans nécessairement avoir une incidence sur la santé du consommateur, parce que leur présence en grande quantité est visible par l'état du produit, changement d'aspect, odeur indésirable... (Bokulich et Mills, 2013). Ils regroupent:

##### 5.3-1.1. Bactéries de type coliforme

Les coliformes sont des Entérobactéries (bacilles Gram-, non sporulés, oxydase- et aérobies ou anaérobies facultatifs), qui comprennent les genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (Brisabois *et al.*, 2016). Leur présence dans le lait est l'indice d'une contamination fécale qui peut provoquer des intoxications alimentaires.

##### 5.3-1.2. Les Streptocoques lactiques et les Lactobacilles

Les *Streptocoques lactiques* et les *Lactobacilles* sont des bactéries lactiques à Gram+ ayant des formes en coques ou en bâtonnets. Elles ont une grande importance dans l'industrie laitière notamment pour l'attention qu'elles reçoivent dans la fabrication des produits laitiers et principalement du fromage mais aussi pour leur capacité à acidifier le lait, ce qui provoque par la suite sa coagulation (Burgess *et al.*, 2010) (**Figure 02**).



**Figure 02** : Bactéries lactiques au sein d'une transformation laitière (Burgess *et al.*, 2010).  
**(A)**: *Lactobacillus helveticus*. **(B)**: *Lactobacillus delbrueckii*. **(C)**: *Lactococcus lactis*

### 5.3-1.3. *Bacillus cereus*

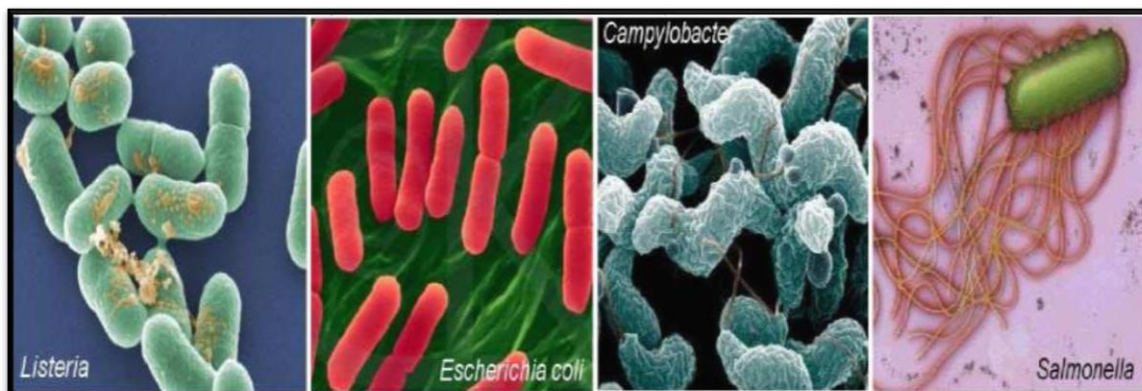
*Bacillus cereus* est un pathogène opportuniste qui peut être isolé à partir du sol, des végétaux, des tissus animaux et d'aliments. Ce sont des bactéries Gram+, aérobies ou anaérobies facultatives, mobiles ou immobiles. Leurs températures optimales de croissance sont généralement situées entre 25 °C et 37 °C (Frank *et al.*, 2003). Les symptômes provoqués par *Bacillus cereus* lors d'une contamination alimentaire sont manifestés par des troubles du tube digestif dus à l'ingestion de la bactérie (Didouh, 2015).

### 5.3-2. Germes pathogènes

La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, suite à une excrétion mammaire de l'animal malade ; ou bien d'origine exogène, suite à un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (Fotou *et al.*, 2011). Les germes les plus souvent évoqués sont :

#### 5.3-2.1. Bactéries infectieuses

Ce sont des bactéries qui peuvent causer le dérèglement du système une fois ingérées. Elles doivent être vivantes dans l'aliment lors de sa consommation pour agir et avoir de l'effet. Apparaissent alors divers symptômes connus, tels que la diarrhée, les vomissements, les maux de tête...etc. (Frank *et al.*, 2003). Les principaux microorganismes infectieux sont démontrés dans la **Figure 03**.



**Figure 03** : Exemples de bactéries infectieuses (Frank *et al.*, 2003).

### 5.3-2.2. Bactéries toxigènes

Ce sont des bactéries qui produisent une toxine au niveau de l'aliment qui est responsable de l'intoxication du consommateur. Parmi les principaux microorganismes toxigènes on peut citer comme exemple (selon Bentiba, 2017 ; Dagnra *et al.*, 2000 ; Goetz *et al.*, 2016 ):

#### - Staphylococcus aureus

Les Staphylocoques sont des germes ubiquistes que l'on retrouve dans l'air, le sol et les eaux, et ils appartiennent à la flore commensale de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux (Dagnra *et al.*, 2000).

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des cocci à Gram positif, non sporulés, regroupés en amas, immobiles et anaérobies facultatifs. La présence des staphylocoques dans les aliments représente un risque pour la santé humaine, puisque certaines souches appartenant principalement à l'espèce *Staphylococcus aureus* produisent des entérotoxines dont l'ingestion provoque une toxiinfection alimentaire qui se manifeste par des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et maux de tête (Boukhelifa, 2017).

## 6. Origine des contaminations

L'hygiène dans la production, la conservation et la transformation du lait est un aspect critique que ce soit sur la santé humaine ou sur l'aspect financier (engendrer des pertes financières importantes) (Ghazi et Niar, 2011).

### 6.1- Contamination au cours du transport

Le lait, une fois récolté dans les fermes, il est acheminé vers les unités de

transformations par moyen de camions citernes, réfrigérés. Lors de ce transport, un certain nombre de règles légales doit être respecté afin de préserver et de livrer un lait de bonne qualité, notamment par le maintien du lait au froid permettant d'arrêter le développement des microorganismes (Bachtarzi *et al.*, 2015).

#### 6.2- Contamination au cours de la production

Le lait recueilli à la ferme par traite mécanique ou manuelle est soit directement transporté au centre de ramassage où il est réfrigéré, soit stocké dans des réservoirs réfrigérés avant transport dans le cas d'exploitations importantes. Dans ces conditions, la flore microbienne est stabilisée mais elle n'arrive pas à empêcher complètement la croissance de tous les microorganismes (Ghazi et Niar, 2011).

#### 6.3- Contamination par l'animal

L'animal constitue la principale source de contamination du lait par les bactéries. En général, on distingue deux types de germes : les contagieux vivant sur le pis de la vache et qui se transmettent d'une vache à l'autre et ceux vivant dans l'environnement de la vache comme les fèces, la boue et la litière et qui infectent directement le pis. La propreté des vaches a un impact significatif sur la santé du pis et en particulier sur le taux de mammites environnementales. Le maintien de la propreté du pis et des membres des vaches permet de diminuer la propagation d'agents pathogènes de l'environnement vers le canal du trayon (Fotou *et al.*, 2011).

#### 6.4- Contamination au cours de la traite

C'est en surface des trayons que l'on retrouve la plus grande diversité de groupes microbiens : une douzaine de groupes microbiens parmi les flores utiles, flores d'altération et pathogène, qui sont systématiquement détectés. Pour un même réservoir, des différences de niveaux et de composition microbienne existent et sont liées à la saison. Ainsi, en été, les surfaces des trayons abritent des niveaux moindres de tous les groupes microbiens, par contre, dans les lactoducs, en été, on extrait des niveaux plus importants de *Pseudomonas*, germes d'altération (Billon, 2009).

#### 6.5- Contamination par les équipements

Le niveau et le type de contamination du lait *via* le matériel de traite dépend largement de la procédure de nettoyage appliquée qui est souvent caractérisée par la formation des biofilms laitiers. La formation de ces biofilms sur les équipements peut entraîner de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques dues à la détérioration des aliments (Bénézech *et al.*, 2002).

**Tableau 01 :** Inventaire de la diversité (à l'échelle des genres\*) des bactéries et levures dans des laits crus de vache et de chèvre (Callon *et al.*,2007)

Groupes* microbiens	Lait de vache <sup>(1)</sup>	Lait de chèvre <sup>(2)</sup>
Bactéries lactiques	<i>Aerococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i>
Staphylocoques et bactéries corynéformes	<i>Arthrobacter</i> ,  <i>Clavibacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Macrococcus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Leucobacter</i> , <i>Leifsonia</i> , <i>Rothia</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Staphylococcus</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Dietza</i> , <i>Jeotgalicoccus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Macrococcus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Ornithinicoccus</i> , <i>Rothia</i> , <i>Salinicoccus</i> , <i>Staphylococcus</i>
Levures	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Issatchenkia</i> , <i>Kazachstania</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Trichosporon</i>	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> ,  <i>Trichosporon</i>
Bactéries sporulantes (dont butyriques)	<i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>
Entérobactéries (dont coliformes)	<i>Enterobacter</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Yersinia</i>	<i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pantoea</i>
Autres bactéries à Gram négatif (don't psychrotrophes)	<i>Acinetobacter</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Shingobacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Xanthomonas</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Delftia</i> , <i>Exigobacterium</i> , <i>Hahella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i>

## 7. Étapes de la transformation laitière : Conduite de la production à la transformation

Excellent milieu de croissance pour les micro-organismes, le lait est un aliment nutritif très périssable. La transformation permet la conservation de ce produit pendant plusieurs jours, ainsi que la prolongation de sa durée de vie utile. Ceci est réalisé à travers un certain nombre de techniques, notamment le refroidissement ou la fermentation. La transformation du lait cru en produits laitiers traités peut participer à faire face aux fluctuations saisonnières de la production

laitière, et ce en générant des emplois non agricoles dans le cadre de la collecte, du transport, de la transformation ainsi que de la commercialisation du lait.

Un produit laitier est défini par le Codex Alimentarius comme un produit réalisé à partir d'un traitement- transformation du lait. Par ailleurs, cette transformation passe par un certain nombre d'étapes allant de la traite, jusqu'à l'homogénéisation (Vignola, 2002).

#### 7.1- **La traite**

D'abord, la traite des vaches, choisies pour la qualité et la quantité de leur lait, délivre des volumes de lait qui sont collectés, réfrigérés, puis analysés, pour être acheminés par la suite vers le marché. Cependant, le transport à partir de la ferme doit être fait par des camions-citernes isothermes pour permettre une protection maximale dans le but de garder toutes ses qualités.

#### 7.2- **Réception**

Il faut vérifier la saveur du lait avant son transvasement ainsi que sa température (4°C maintenue juste après la traite jusqu'à l'arrivée à l'usine). Par conséquent, à la réception du lait, des analyses de qualité doivent être faites (Teixeira *et al.*, 2005 ; Von Neubeck *et al.*, 2015):

- Test des sédiments : La qualité du lait est déduite en fonction des impuretés visuelles.
- Test de la Résazurine : la Résazurine est un colorant bleu. Sa décoloration est proportionnelle au nombre de bactéries présentes dans le lait.
- Dénombrement des cellules somatiques : L'animal souffre de mammites si le nombre de ces cellules est supérieur à 500 000 par chaque millilitre de lait.
- Dénombrement microbien : L'énumération des bactéries totales peut donner une idée du pouvoir de conservation du lait pasteurisé.
- Taux protéique : Ce taux est mesuré par infrarouge.
- Taux butyrique : Ce taux est mesuré par la méthode de Gerber.
- Point de congélation : Le lait normal a un point de congélation de -0.54 à -0.59°C. Notons que plus l'eau est ajoutée, plus le point de congélation est plus grand.

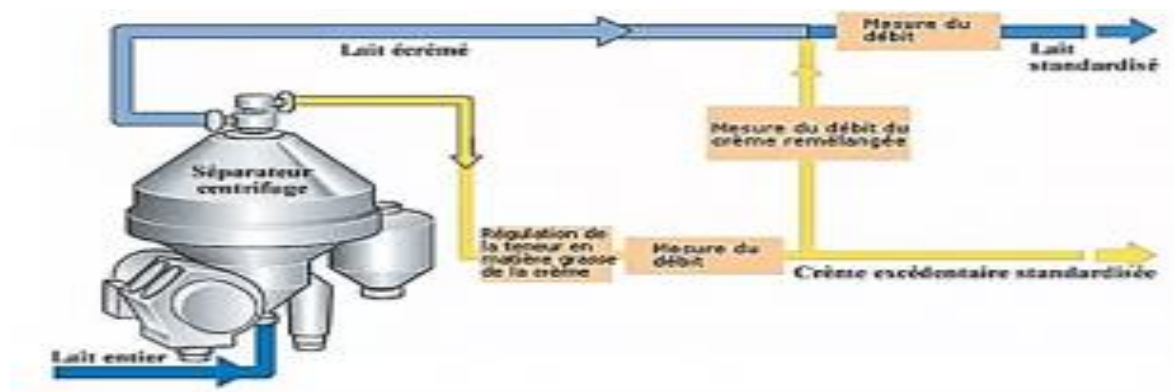
#### 7.3- **Clarification**

Afin d'en extraire les particules les plus denses (débris cellulaires, leucocytes et matières étrangères), le lait est soumis à une forte centrifuge (Brugnoni *et al.*, 2007).

#### 7.4- **Standardisation**

En effet, l'industrie laitière est dans l'obligation de respecter les normes établies pour chacune de ces teneurs. Ainsi, la standardisation est la technique utilisée pour respecter cette réglementation.

En conséquence, ce procédé, plus ou moins automatique, consiste à mélanger deux produits dont on connaît le taux de matière grasse, grâce à un clarificateur-séparateur-normalisateur. Ce dernier permet de mélanger le lait écrémé et la crème séparés dans un premier temps.



**Figure 04 :** Procédé de standardisation de la matière grasse à l'aide d'un clarificateur-séparateur-normalisateur (Vignola, 2002)

#### 7.5- Homogénéisation du lait

Il s'agit d'une opération ayant pour objectif la stabilisation d'une émulsion à travers un procédé physique. En effet, elle est pratiquée afin de stabiliser la phase grasse du lait et éviter la montée de la crème, et ce en faisant éclater les globules de la matière grasse en fines particules. Ainsi, ces dernières se répartissent de façon homogène dans la phase aqueuse du lait et ne remontent pas à la surface, ce qui empêche la séparation de la crème, même après entreposage (Vignola, 2002).

Le lait est homogénéisé mécaniquement. En effet, il est forcé dans un étroit orifice annulaire, avec une pression d'environ 100 bars pour le lait destiné à la pasteurisation, et une pression qui s'élève à 250 bars pour le lait qui sera chauffé à ultra haute température (UHT). Par conséquent, la taille des globules gras qui en résultent est déterminée par la température et la pression.

Pour résumer, le diamètre des globules gras est d'environ 3 à 6 microns. Il est réduit à 1 microns après homogénéisation.

- Effets de l'homogénéisation sur la structure physique du lait :
- Des globules gras plus petits n'entraînant pas la formation d'une couche de crème.
- Une couleur plus blanche et plus appétissante.
- Une réduction de la sensibilité à l'oxydation.
- Un goût plus affirmé.
- Une stabilité supérieure des produits à base de lait fermenté.

## 7.6- Traitements thermiques du lait

### 7.6.1- La pasteurisation

Le lait subit un certain nombre de traitements thermiques, on en cite : la pasteurisation. En effet, cette dernière vise à réduire le nombre de micro-organismes présents dans l'aliment de façon significative, de manière à assurer son innocuité et une plus longue conservation.

Lait pasteurisé : Un lait ayant subi un traitement thermique approprié permettant la destruction totale des germes pathogènes et presque la totalité de la flore banale qu'il contient tout en préservant au maximum ses caractéristiques physico-chimiques, organoleptiques et sa valeur nutritive (Petermeier *et al.*, 2002).

Ainsi, elle est réalisée par un traitement impliquant :

- Une température élevée pendant une courte période (un minimum de 72 °C pendant 15 secondes), ou
- Une température modérée pendant une longue période (un minimum de 63°C pendant 30 minutes).

Cependant, certains organismes résistent à la chaleur. Le plus résistant est le bacille tuberculeux (B.T). Il est donc considéré comme l'organisme indicateur de la pasteurisation : tout traitement thermique détruisant le B.T peut être considéré comme détruisant tous les autres pathogènes du lait.

Egalement, un autre indicateur est l'absence de l'enzyme phosphatase.

En effet, le test de la phosphatase n'est pas utilisé pour les produits dont la teneur en matière grasse est supérieure à 8%. Le traitement thermique devra en outre être plus intense, vu que la matière grasse est un mauvais conducteur de la chaleur. Une autre enzyme est donc utilisée, la peroxydase, pour contrôler le résultat de la pasteurisation de la crème (Dahou, 2021).

### 7.6.2- La stérilisation

Après standardisation de la matière grasse, homogénéisation et chauffage, le lait est conditionné dans des récipients propres -notamment des bouteilles en verre ou en plastique pour le lait et des boîtes pour le lait concentré-. Par ailleurs, le produit chauffé est transféré à des autoclaves en production discontinue, ou à un stérilisateur hydrostatique à colonnes en production continue (Petermeier *et al.*, 2002) .

Deux couples temps/température peuvent être appliqués :

- 120°C pendant 20 minutes, ou
- 140°C pendant 4 secondes, dans le cas de la stérilisation UHT (Ultra haute température).

### **7.6.3- Traitement UHT**

En effet, il s'agit d'un procédé continu qui s'effectue dans un circuit fermé englobant des phases successives rapides de chauffage et de refroidissement, pour empêcher toute contamination du produit par les micro-organismes en suspension dans l'air (Vignola, 2002).

Ainsi, deux méthodes sont utilisées dans ce traitement :

- Chauffage direct par injection de vapeur ou infusion du lait dans la vapeur et refroidissement par détente-flash sous vide.
- Chauffage et refroidissement indirect dans des échangeurs de chaleur.

Pour rappel, la valorisation du lait se fait à travers sa consommation et sa transformation en produits laitiers. Seuls les procédés physiques et les réactions biochimiques sont utilisés dans cette transformation, aucun traitement chimique n'est mis en œuvre. En parallèle, de plus en plus de produits laitiers à forte valeur ajoutée sont mis sur le marché et exploités dans plusieurs industries (Dahou, 2021).

## CHAPITRE II : Lutte contre les biofilms au niveau de l'industrie laitière

### 1. Introduction

La présence de biofilms dans l'industrie laitière est un réel problème. En effet leurs présences présentent un risque de contamination des laits et dérivés et donc un risque pour la santé des consommateurs. Ils peuvent être à l'origine de TIAC (Toxi Infection Alimentaire Collective). Les biofilms laitiers peuvent être présents sur différentes surfaces dans l'industrie laitière ; au sein de l'atelier de production (équipements, murs, sols, circuits de lait, aération), dans les équipements fermés (circuits de fabrication, circuit de nettoyage) et également sur les ustensiles, flexibles, raccords,... (Blel *et al.*, 2007)

Pour lutter contre les biofilms laitiers, il est donc nécessaire de nettoyer et désinfecter les équipements, matériaux (ligne de production, ustensiles...) qui vont entrer en contact avec les laits en transformation.

Autrefois, les équipements utilisés pour la transformation des laits étaient ouverts et nettoyés individuellement. De nos jours, la production à grande échelle dans les industries a conduit à la mise en place de systèmes de Nettoyage-En-Place (NEP). Ils permettent le nettoyage des équipements soit par la circulation de fluides nettoyants, soit par un nettoyage chimique et mécanique, soit par l'impact de jets(par exemple dans le cas des cuves) Christian, 2004.

Le nettoyage comporte généralement des séquences par cycle de nettoyage, voici un exemple :

- Récupération des restes des produits laitiers encore présents dans les installations afin de les éliminer des surfaces (pousse à l'eau ou à l'air)
- Pré rinçage : circulation d'eau chaude ou de l'eau froide pour éliminer les substances liées à la surface
- Ajout de détergent : action chimique du nettoyage (acide ou alcalin) qui va agir sur le dépôt de pour favoriser son élimination de la surface
- Post-rinçage : (on parle aussi de rinçage final ou de rinçage intermédiaire) pour éliminer les résidus chimiques par la circulation d'eau avant la désinfection
- Désinfection
- Rinçage final par circulation d'eau avant une nouvelle transformation des laits.

## 2. Nettoyage en industrie agroalimentaire

### 2.1. Nettoyage en place

Le rôle du nettoyage est d'éliminer toutes traces de salissure présente sur les équipements et matériaux en contact avec les laits. Ce nettoyage doit se faire, dans la mesure du possible, sans démontage. L'efficacité du nettoyage va dépendre de certains facteurs qui sont : l'action mécanique, l'action chimique (choix du produit de nettoyage), la température et le temps de contact. Ces quatre éléments forment le cercle de Sinner (Faille *et al.*, 2010). Il définit et structure la base d'un nettoyage « parfait ». Un nettoyage parfait nécessite l'utilisation de produits adaptés à l'action recherchée (dégraissage, détartrage...), mais aussi aux types de supports à nettoyer. Si l'un des facteurs est diminué, il doit être compensé par les autres facteurs (Somers et Wrong, 2004).

Selon **Bacarić (2004)**, l'efficacité de nettoyage dépend totalement du fonctionnement correct des 6 T présentée dans le **Tableau N° 02**. Un changement ou une erreur dans l'un des T perturbe l'équilibre total et mènera aux défaillances de nettoyage.

**Tableau 02** : Les éléments du nettoyage « 6 T » (**Bacarić, 2004**)

6 T	Caractéristiques
Turbulence	Vitesse du flux dans toutes les parties du système nettoyé
Temps	Durée de chaque étape et la durée totale de la procédure
Température	Des solutions de nettoyage et de l'eau au début et à la fin du circuit
Titration	Concentration des solutions de nettoyage dans les circuits
Technologie	Le design de la ligne entière incluant tous les circuits vers et à partir des Cuves de produits chimiques et de l'eau
Training	Des séances de formation pratiques pour les opérateurs et également de Sensibilisation

#### 2.1.1.L'action chimique

C'est l'action d'un produit alcalin/acide ou d'un détergent sur une surface. La méthode et le produit à employer dépendent de la nature de la souillure et de la surface à nettoyer (type de

matériel, fragilité).

### 2.1.2.L'action mécanique

L'action mécanique c'est l'action de frotter. Elle vise à remettre en suspension les salissures et à les éliminer. Cette action améliore donc l'efficacité des produits de nettoyage en éliminant mécaniquement une partie importante de matières organiques collées à la surface.

### 2.1.3.La température

Elle correspond à la température de l'eau. La température joue un rôle important sur l'efficacité des produits de nettoyage. Il est important de respecter la température recommandée par le fabricant pour optimiser l'efficacité du produit.

### 2.1.4.Le temps de contact

Ce facteur, le temps d'action ou temps de contact, c'est le temps nécessaire pour que le détergent réagisse avec les salissures afin de pouvoir les déloger. Pour un désinfectant, c'est la durée nécessaire pour que celui-ci inactive un organisme. Ce temps est évalué en laboratoire. Lors de l'application d'un désinfectant sur une surface, il est important de respecter les recommandations du fabricant.

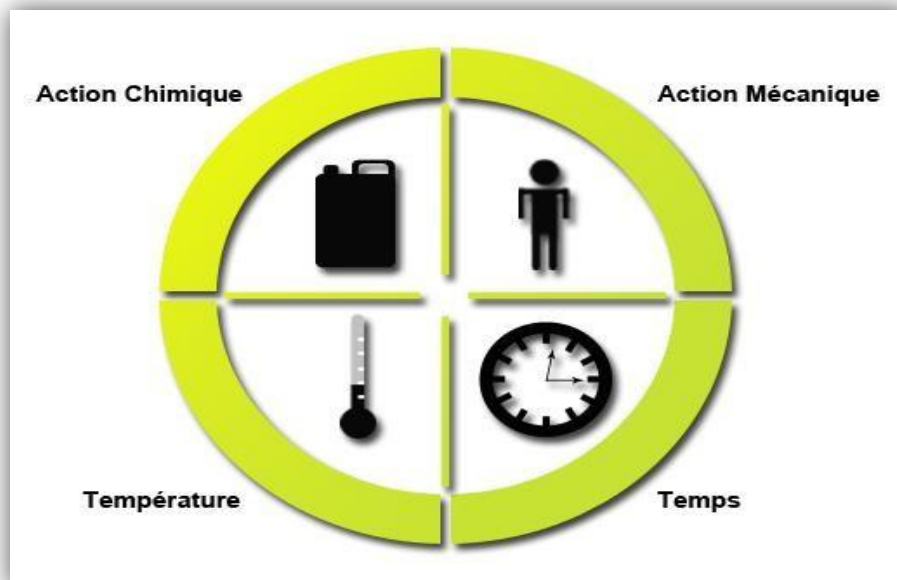


Figure 05 : Cercle de Sinner des 04 paramètres d'un nettoyage parfait

## **2.2. Les agents de nettoyage**

### **2.2.1. Les agents de nettoyage alcalins**

Les produits de nettoyage alcalins ont un pH supérieur ou égal à 8. Ils ont différents rôles : enlever la croûte organique collée sur la surface par des traitements de chaleur, saponifier les lipides saponifiables, dissoudre les matières grasses et dégrader les protéines en acides aminés les ioniser puis les solubiliser. Il y a quatre classes d'agents alcalins décrits ci-dessous (Jensen *et al.*, 2007).

#### Les alcalins forts

Les alcalins forts ont une action très puissante sur les résidus organiques. Cependant, cette catégorie d'agents est corrosive, il est donc préférable de limiter leur utilisation sur les métaux mous et le caoutchouc. (Durr, 2002).

#### Les alcalins moyens

Cette classe contient principalement les phosphates, ils ont un bon pouvoir adoucissant sur l'eau. L'utilisation des alcalins moyens est de plus en plus limitée car ils ont des effets néfastes sur l'environnement (Christian, 2004).

#### Les alcalins doux

Cette catégorie d'alcalin regroupe principalement des carbonates. Les alcalins doux sont utilisés pour le nettoyage d'équipements en aluminium ou tout autre métal mou. Ils sont également utilisés pour le nettoyage manuel nécessitant un brossage. (Jensen *et al.*, 2007).

#### Les alcalins chlorés

Ils sont souvent utilisés pour aider à décoller les résidus protéiques. L'inconvénient majeur de ces produits est qu'avec le temps, ils endommagent les équipements, surtout si les concentrations recommandées par le fabricant ne sont pas respectées (Jensen *et al.*, 2007).

### **2.2.2. Les agents de nettoyage acides**

Le rôle des produits de nettoyage acides est de dissoudre les résidus minéraux résultant des laits, de l'eau ou des réactions chimiques (par exemple : eau/laits ou eau/laits/produits de lavage alcalin). On distingue deux classes parmi les agents de nettoyage acides : les acides minéraux

et les acides organiques (Christian, 2004).

#### **2.2.2.1- Les acides minéraux**

Les acides minéraux sont couramment utilisés pour leurs propriétés détartrantes et désincrustantes. Les plus courants sont l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique, l'acide phosphorique, l'acide sulfurique et l'acide sulfamique. Tous ces acides sont corrosifs et oxydants même pour l'inox (Durr, 2002).

#### **2.2.2.2- Les acides organiques**

Les acides organiques sont moins dangereux et moins corrosifs que les acides minéraux, car ce sont des acides faibles. Ils ont un pouvoir séquestrant sur certains minéraux. Les acides organiques ayant une plus faible corrosivité peuvent être utilisés sur les métaux mous tel l'aluminium. Les acides lactiques, citriques, gluconiques, et hydroxyacétiques sont les plus utilisés (Bénézech *et al.*, 2002).

#### **2.2.3. Les détergents enzymatiques**

Les détergents enzymatiques sont constitués d'un ou de plusieurs enzymes. Leur utilisation peut être judicieuse pour surmonter le problème des biofilms dans l'industrie laitière. La matrice d'exopolysaccharides étant hétérogène, un mélange d'enzymes peut être nécessaire pour sa dégradation (Blél *et al.*, 2008). Les mélanges peuvent être composés d'enzymes telles que les protéases (pour dégrader les protéines), les lipases (pour dégrader les lipides) ou les amylases (pour dégrader l'amidon).

### **2.3. La désinfection**

La désinfection est l'utilisation de produits antimicrobiens pour inactiver, détruire les micro-organismes présents sur un objet ou sur une surface. Elle a pour but de réduire les cellules viables restantes après le nettoyage et d'empêcher leur croissance sur les surfaces après nettoyage. En absence de matière organique (par exemple graisse ou sucre), les désinfectants sont plus efficaces, la désinfection ne peut être efficace qu'après un nettoyage. L'efficacité est également influencée par d'autres paramètres tels que la concentration et le temps de contact du produit, le pH, la température, la dureté de l'eau (Jensen *et al.*, 2007).

Le résultat de la désinfection est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération. Elle n'empêche pas les contaminations ultérieures, c'est pourquoi elle doit être renouvelée régulièrement dans les zones sensibles.

En industrie laitière, la désinfection a pour but de réduire le nombre de micro-organismes afin qu'ils ne puissent pas affecter la qualité et la sûreté des produits laitiers (Bénézech *et al.*, 2002).

Il existe différentes classes de désinfectants selon leur action.

### **2.3.1. Halogènes et dérivés**

En industrie laitière, l'un des produits désinfectants le plus couramment utilisé est l'hypochlorite de sodium (eau de javel). Ce composé possède une puissante activité désodorisante ainsi qu'un large spectre d'activité sur les micro-organismes. Les halogènes vont détruire les micro-organismes en détruisant les protéines membranaires et chromosomiques. L'hypochlorite de sodium va libérer un agent antimicrobien lors de sa dissociation dans l'eau : de l'acide hypochlorique (HOCl). Cet agent traverse facilement les parois et membrane des micro-organismes. Il agit ensuite par un mécanisme d'oxydation générale entraînant la dénaturation des protéines, provoquant ainsi l'arrêt des réactions du métabolisme et la mort cellulaire.

Les halogènes et dérivés sont efficaces à basse température et il ne laisse pas de résidus sur les surfaces. De plus ils ne coûtent pas cher (Blel *et al.*, 2008).

### **2.3.2. Aldéhydes**

Les aldéhydes sont bactéricides à des concentrations élevées sur les bactéries Gram négative. Ils ont également des qualités fongicides, virucides, mycobactéricides et sporicides. Ils provoquent une dénaturation des acides nucléiques et des protéines des micro-organismes. Les principaux produits faisant partie de cette catégorie de désinfectants sont : le formaldéhyde, le glutaraldéhyde et l'aldéhyde succinique (Blel *et al.*, 2008).

En présence d'une solution alcaline, l'activité des aldéhydes diminue.

L'activité des aldéhydes diminue en présence d'une solution alcaline. En industrie laitière, le formaldéhyde n'est actuellement plus utilisé car il est suspecté cancérigène. Le glutaraldéhyde présente un spectre d'activité large. Il est utilisé en association avec des ammoniums quaternaires (Jensen *et al.*, 2007).

### **2.3.3. Les alcools**

Les alcools agissent rapidement contre les bactéries Gram négative et Gram positive (en 30 secondes). Ils dénaturent les protéines cytoplasmiques et membranaires et inhibent la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Parmi les alcools les plus utilisés, on trouve les l'éthanol et l'isopropanol.

L'alcool est souvent utilisé en association avec d'autres substances, par exemple les dérivés du phénol, cela permet d'en améliorer les capacités bactéricides. L'alcool est inefficace contre les spores et les virus. Il s'évapore rapidement et, est inactivé par les matières organiques. Il a

tendance à faire coller les débris organiques sur les supports (Blel *et al.*, 2008).

#### **2.3.4. Oxydants**

Les oxydants agissent en formant des radicaux libres qui vont interagir avec les lipides membranaires, ADN et ribosomes. Un oxydant utilisé en industrie : le peroxyde d'hydrogène. Les produits à base de peroxyde d'hydrogène réagissent très rapidement avec la matière (de quelques secondes à quelques minutes). Ils endommagent peu les surfaces inertes sauf les celles composées de fer, facilement oxydables (Bénézech *et al.*, 2002).

#### **2.3.5. Les dérivés phénoliques**

Ils possèdent une action bactéricide et fongicide. Les dérivés phénoliques sont bactériostatiques à une concentration de 0,2 % et bactéricides à partir de 1 %. Lorsqu'ils sont dissous dans l'eau, ils ont une excellente activité contre les mycobactéries et les virus (Caroline *et al.*, 2010).

Ces produits désinfectants sont inactivés par les détergents, les matières organiques et l'eau dure. Leur activité est réduite en augmentant le pH de la solution. De plus, ils sont incompatibles avec le fer, l'hypochlorite et les ammoniums quaternaires. Les phénols sont corrosifs pour les métaux et de nombreux autres matériaux lorsqu'ils sont présents à concentration élevée (Gunduz et Tuncel, 2006).

#### **2.3.6. Les ammoniums quaternaires**

Les ammoniums quaternaires ont un pouvoir détergent donc, ils entrent dans la composition de nombreux produits détergents/désinfectants. Ils ont une activité bactériostatique sur les bactéries Gram négative et bactéricide sur les bactéries Gram positive, leur activité est variable sur les virus enveloppés et nulle sur les virus nus. Ils sont également fongistatiques, par contre ils n'ont aucune action sur les spores.

La plupart des ammoniums quaternaires sont peu toxiques et ils s'attaquent peu aux surfaces. Ils sont stables dans l'eau chaude. Les souillures protéiques et la dureté de l'eau réduisent fortement l'efficacité de ces composés (Caroline *et al.*, 2010).

#### **2.3.7. Les biguanides**

Ces molécules vont modifier la perméabilité de la membrane cellulaire en se liant aux acides gras et aux groupes phosphates. Le constituant cellulaire va être libéré. Les biguanides sont inactivés par les dérivés anioniques, sulfates et sulfonates. Elles sont compatibles avec les acides, les ammoniums quaternaires et les détergents non ioniques. Les biguanides ont l'avantage de ne pas être corrosifs et d'être faiblement toxiques (Blel *et al.*, 2008).

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

### 1- Cadre de l'étude

Les bactéries forment des communautés spatiales hautement organisées et résistantes aux agents antimicrobiens : ce sont les biofilms. Dans les industries alimentaires, et plus précisément laitières, les biofilms sont une source de contamination qui impacte la qualité hygiénique et sanitaire des aliments transformés, avec des conséquences sur leur durée de vie et la santé du consommateur. La connaissance de la microflore constitutive des biofilms est, de ce fait, un préalable à la mise au point des techniques visant leur élimination des surfaces industrielles. Dans cette étude, nous avons tout d'abord mis en évidence, sur les équipements laitiers de réception de la matière première, d'une flore persistante impossible à éviter connaissant la source de contamination initiale, à savoir les laits frais collectés des différentes exploitations laitières. Ceci a été possible via la caractérisation phénotypique de la microflore des biofilms formés à l'intérieur du système de canalisations de transfert et d'échange thermique. Les taux de contamination correspondant au nombre de bactéries adhérents par unité de surface (ufc/cm<sup>2</sup>), ont été évalués par les techniques propres à la microbiologie des surfaces, en termes d'échantillonnage, de culture et de dénombrement des bactéries.

Les biofilms formés dans les canalisations de comptage, l'échangeur thermique de refroidissement et sur la ligne de transfert vers le stockage seront caractérisés sur les plans du décompte de leurs bactéries constitutives, de leur structure microscopique et de leur comportement vis-à-vis des plans de nettoyage en place classiques d'usage courant en industrie laitière. L'aptitude des biofilms à ré-adhérer après un nettoyage acido-alcalin a été évaluée par une technique simple de caractérisation microbiologique sur des milieux spécifiques.

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de recherche des Sciences et Techniques de Production Animale de l'université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem, durant une période qui s'étend de la fin du mois de Février jusqu'à la fin du mois d'Avril 2025.

Il a pour objectif l'isolement et la caractérisation des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus* isolées des eaux de rinçage à trois niveaux de la ligne de réception des laits frais collectés d'une mini-laiterie de la ville de Mostaganem, l'étude de leur capacité à former un biofilm et aussi la mise en place d'un moyen de lutte par NEP contre le biofilm formé

#### . 2. Matériel

##### 2.1. Matériel biologique et milieux de culture spécifiques

- Eaux de rinçage à trois niveaux du processus de réception des laits frais
- Milieux de culture spécifiques

- Le milieu sélectif pour *Bacillus cereus* selon Mossel est utilisée pour la détection et le dénombrement des spores et formes végétatives de *Bacillus cereus* dans l'industrie alimentaire. La formule-type répond à la composition de la gélose MYP (au mannitol, jaune d'œuf et polymyxine) définie dans les normes ISO 7932/2004 et ISO 21871/2006.
- Le milieu sélectif CHAPMAN ou milieu au sel de mannitol est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement, le dénombrement et la différenciation des *Staphylococcus* à partir d'échantillons cliniques, alimentaires, antiseptiques et cosmétiques. Ce milieu est à la fois une gélose sélective et différentielle. Le milieu sélectionnera des organismes qui peuvent vivre dans des zones à forte concentration en sel (chlorure de sodium) et la fermentation du mannitol, mise en évidence par le virage au jaune de l'indicateur pH (rouge de phénol), permet d'orienter le diagnostic.

## 2.2. Matériel non biologique

L'ensemble du matériel utilisé et des différents points de prélèvement des eaux rinçage sont définis sur la figure suivante (figure 06) :

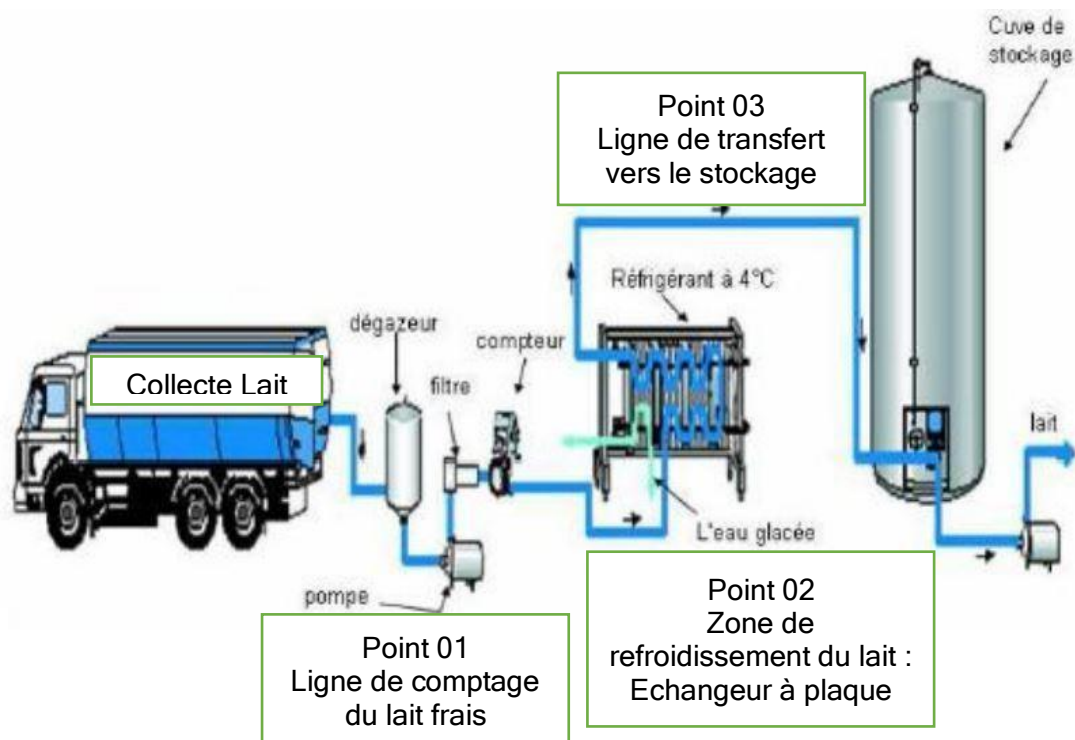


Figure 06 : Process de réception de la laiterie (Plan de montage de la laiterie Alfa Laval, 2015)

### Station NEP de l'usine :

La station NEP dans l'usine a pour rôle de nettoyer les différentes installations au sein de l'usine. La zone consacrée aux installations du NEP est constituée de six cuves (figure 07) :

- **Cuve de l'eau récupérée ou de rinçage** : contient l'eau de rinçage, elle sera utilisée pour le pré- rinçage dans la session suivante de nettoyage.
- **Cuve de la soude (NaOH)** : remplie de la lessive de soude à une concentration massique située entre 1g/100ml et 3g/100ml d'eau et une température entre 70°C et 80°C.
- **Cuve de l'acide (HNO<sub>3</sub>)** : remplie de l'acide nitrique à une concentration de 0,3g/100ml et 1g/100ml d'eau et une température Entre 55°C et 65°C.
- **Cuve d'eau de lavage** : remplie d'eau propre, utilisée pour le lavage final de l'installation.
- **Cuve de l'eau chaude** : remplie d'eau chaude à une température de 90°C pour la désinfection.

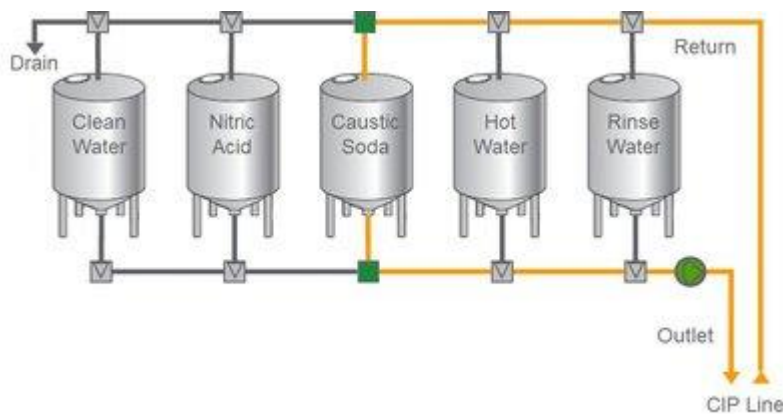


Figure 07 : Station NEP de l'usine (Plan de montage de la laiterie Alfa Laval, 2015)

## 3. Méthodes

### 3.1. Echantillonnage

#### 3.1.1. Prélèvements et techniques

Des prélèvements des eaux de rinçage ont été effectués chaque semaine durant une période qui

s'étend de la fin du mois de Février jusqu'à la fin du mois de Mars 2025, au niveau des 03 points de la réception des laits frais de la mini-laiterie. (Protocole établi selon les recommandations de Prescott *et al.*, 2010). Ces prélèvements sont réalisés après les opérations de nettoyage et en respectant les bonnes pratiques appliquées à l'échantillonnage et aux prélèvements des analyses de l'hygiène microbiologique des lignes de production.

Le prélèvement s'effectue par usage des méthodes classiques, aseptiquement (dans un environnement de travail aseptique : sous flamme) dans un flacon stérile avec un bouchon à vis (Guiraud, 2003).

### 3.2. Analyses microbiologiques

La vérification de la qualité microbiologique des eaux de rinçage d'un nettoyage en place appliqué aux lignes de réception est une étape importante qui vise d'une part à contrôler l'efficacité du nettoyage et d'autre part à déterminer les points de défaillance du nettoyage en délimitant les points à risque d'adhésion des contaminants et de prévenir l'installation des biofilms. Cette analyse se porte sur la recherche d'un certain nombre de microorganismes susceptibles d'être présents, plus précisément les deux espèces ; *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* qui sont deux germes assez fréquents dans la filière laitière (Vignola, 2002).

#### 3.2.1. Traitement des échantillons

Un aliquote est prélevé aseptiquement du flacon de prélèvement est mis dans un tube stérile contenant 9mL de Tryptone-sel-eau (TSE), qui va être agité pendant au moins une minute au vortex pour une dilution homogène des cellules bactériennes recherchées. Selon la même démarche, trois échantillons de chaque point de prélèvement ont été préparés (Peng, 2001).

#### 3.2.2. Isolement et purification des souches

Après avoir préparé les échantillons, les ensemencements se font dans des boîtes Petri contenant de la gélose spécifique et l'incubation dure 05 jours à 25°C. (Peng *et al.*, 2002).

#### 3.2.3. Identification des souches

##### 3.2.3.1. Caractérisation morphologique des isolats

###### 3.2.3.1.1 Aspect macroscopique des isolats

L'examen macroscopique permet la description des colonies, à savoir: la forme, la taille, la couleur, l'aspect de surface, le contour...etc (Guiraud, 2003).

###### 3.2.3.1.2. Aspect microscopique des isolats

L'examen consiste à vérifier la morphologie, l'arrangement cellulaire et la réponse à la coloration de Gram. C'est une coloration différentielle qui permet de diviser les bactéries en deux grands groupes (Gram positif et Gram négatif), selon leur affinité pour les colorants liés à la structure générale de leur paroi. Caractères macro et micro-morphologiques distinctifs des

isolats testées sont portés sur le tableau 03.

La technique de l'examen microscopique des isolats s'applique comme suit :

Réalisation d'un frottis, et fixation de ce dernier par la chaleur. Coloration au violet de Gentiane en planant la lame dans la solution pendant 1 minute, ensuite le rinçage avec de l'eau distillée. Mordançage au lugol en étalant le lugol sur la lame et en laissant agir 1 minute, puis un rinçage avec de l'eau distillée est effectué. Décoloration à l'alcool par le versement de quelques gouttes sur la lame, laissez agir 30 secondes et un autre rinçage est appliqué avec de l'eau distillée. Contre coloration avec la fushine pendant 1 minute, puis un rinçage est délicatement fait avec de l'eau distillée. Séchage de la lame et observation au microscope photonique au grossissement 100 en ajoutant quelques gouttes d'une huile à immersion (Gram, 1884). Les souches qui étaient en faveur de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*, sont conservées en les portant sur des tubes inclinés contenant d'une part, un milieu gélosé de Mossel et d'autre part, un milieu gélosé de Chapman, incubées à 37°C pendant 24 heures, respectivement (Peng *et al.*, 2002).

Tableau 03 : Caractères macro et micro-morphologiques distinctifs des souches testées

Macro-morphologie	Micro-morphologie	Température °C et PH de croissance	Groupes
Colonies granuleuses blanches de 2 à 7 mm de diamètre	gros bacilles (1µm x 5µm), Gram+, mobiles, avec ciliés péritriches	10 à 20 Avec un optimum à 37 PH= 4,5 à 9,5	Classe : Bacilli <i>Bacillus cereus</i> De la famille des Bacillaceae selon Schleifer & Bell, 2010
Colonies convexes, crémeuses, lisses, brillantes avec des coquilles Gram positives de 4 mm de diamètre	Gram+, arrondies, en grappes ou paires régulières, de 0,7 à 1 µm de diamètre et immobiles	06 à 45 Avec un optimum de 20 à 35	Classe : Bacilli <i>Staphylococcus aureus</i> De la famille des Staphylococcaceae selon Schleifer & Bell, 2010

### 3.2.3.2. Etude des caractères biochimiques

#### 3.2.3.2.1. Test de catalase

La présence de la catalase est mise en évidence en déposant à l'aide d'une anse une quantité suffisante de la colonie sur une lame en verre contenant une goutte d'eau oxygénée. La présence de l'enzyme se traduit, en quelques secondes, par l'apparition de bulles d'air et dégagement gazeux (Guiraud, 2003).

#### 3.2.3.2.2. Test de désoxyribonucléase (ADN ase)

Le test est utilisé pour déterminer la capacité d'un organisme à hydrolyser l'ADN, grâce à une

enzyme, l'ADN ase. Cette enzyme est recherchée par la culture des souches à tester sur des boîtes de Petri contenant de la gélose à ADN. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24h. La mise en évidence de cette enzyme se traduit par la présence d'une zone claire tout autour de la culture bactérienne, après inondation de la boîte Petri avec une solution de bleu de toluidine (Prescott *et al.*, 2010).

#### 3.2.3.2.3. Test de coagulase

L'identification des *Staphylococcus aureus* se base sur la morphologie coloniale, les caractéristiques biochimiques et l'examen microscopique. Toutefois, la détection de la coagulase est le critère le plus généralisé pour différencier une espèce d'une autre. L'essai est réalisé par le mélange de 0.5 mL d'une culture de *Staphylococcus aureus* sur bouillon cœur cervelle (BHIB) à un tube stérile contenant le plasma, l'incubation se fait à 37°C pendant une durée maximale de 4 heures. La formation d'un caillot indique la production de coagulase (Dagnra *et al.*, 2000).

#### 3.2.4. Conservation finale des souches

Les souches obtenues après l'ensemble des analyses, vont faire l'objet d'une conservation à 4 °C dans du TSB (Bouillon Tryptone Soja) additionné du glycérol et aussi dans des tubes de gélose nutritive inclinés (Peng *et al.*, 2002).

### 3.3- Etude comparative des différentes conditions de nettoyage.

Pour lutter contre les biofilms laitiers caractérisés plusieurs modèles de nettoyage en place ont été étudiés :

#### 3.3.1. le modèle de la mini-laiterie adopté

Vidange des conduites : par pousse à l'eau pour récupérer le lait encore présent dans les installations et les éliminer des surfaces ;

Pré rinçage : circulation d'eau chaude à 40°C pour éliminer les éléments organiques du lait faiblement liés à la surface de la ligne ;

Phase de détergence :

- 1<sup>ère</sup> action chimique du nettoyage (alcalin solution de soude à 1%, à une température de 65°C, à un débit de 5m<sup>3</sup>/H, une pression de circulation de 1 bar et un temps de contact de 10 minutes) ayant pour but d'agir sur le dépôt organique, de façon à

favoriser son élimination de la surface de la ligne de réception ;

- Rinçage intermédiaire : par circulation d'eau froide pendant 5 minutes
- 2ème action chimique du nettoyage (acide solution d'acide nitrique à 0,25%, à une température de 50°C, à un débit de 5m<sup>3</sup>/H, une pression de circulation de 1 bar et un temps de contact de 05 minutes) ayant pour but d'agir sur le dépôt minéral, de façon à favoriser son élimination de la surface de la ligne de réception ;

Rinçage final : par circulation d'eau froide pendant 5 minutes avant une nouvelle autorisation pour la réception des laits frais.

### 3.3.2. le modèle amélioré selon les préconisations

Vidange des conduites : par pousse à l'eau pour récupérer le lait encore présent dans les installations et les éliminer des surfaces ;

Pré rinçage : circulation d'eau chaude à 40°C pour éliminer les éléments organiques du lait faiblement liés à la surface de la ligne ;

Phase de détergence :

- 1<sup>ère</sup> action chimique du nettoyage (alcalin solution de soude à 2,5%, à une température de 80°C, à un débit de 10 m<sup>3</sup>/H, une pression de circulation de 1,5 bars et un temps de contact de 15 minutes) ayant pour but d'agir sur le dépôt organique, de façon à favoriser son élimination de la surface de la ligne de réception ;
- Rinçage intermédiaire : par circulation d'eau chaude à 45°C pendant 10 minutes
- 2ème action chimique du nettoyage (acide solution d'acide nitrique à 1%, à une température de 65°C, à un débit de 10 m<sup>3</sup>/H, une pression de circulation de 1,5 bars et un temps de contact de 15 minutes) ayant pour but d'agir sur le dépôt minéral, de façon à favoriser son élimination de la surface de la ligne de réception ;

Rinçage final : par circulation d'eau froide aseptisée pendant 20 minutes (contrôle du pH neutre) avant une nouvelle autorisation pour la réception des laits frais.

### 3.3.3- le modèle formulé scientifiquement

Le modèle formulé est un plan à 7 classes :

1. Rinçage 15 min, eau à 40-45°C
2. lavage avec une solution de soude chaude à 2.5% pH=11 à 11,5, 80°C, 15 min, débit de circulation 10m<sup>3</sup>/H pression 1,5 bars (pour les circuits) et 3 bars pour l'échangeur à plaque 15 m<sup>3</sup>/H
3. rinçage avec de l'eau à 40-45°C pendant 10 min
4. Lavage avec une solution d'acide nitrique chaude à 1% pH 2,5 à 3, 65°C, 15 min, débit de circulation 10m<sup>3</sup>/H pression 1,5 bars (pour les circuits) et 3 bars pour l'échangeur à plaque 15 m<sup>3</sup>/H
5. Rinçage, eau à 40°C pendant 15 min
6. Passage d'une solution désinfectante (Biocide à 0,5%) à 40°C pendant 10 min
7. Rinçage final (eau potable et stérile) pendant 20 à 30 min pour atteindre un pH de 7

## CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Caractérisation morphologique des isolats des souches contaminantes

#### 1.1.Examen macroscopique des isolats :

L'espèce présumée à *Staphylococcus aureus* a un aspect sur gélose Chapman (voir figure 08) : en aérobiose, de colonies assez grandes d'environ 1 mm de diamètre, rondes, régulières, bombées, lisses et brillantes. Elles ont une couleur crème à jaune or.

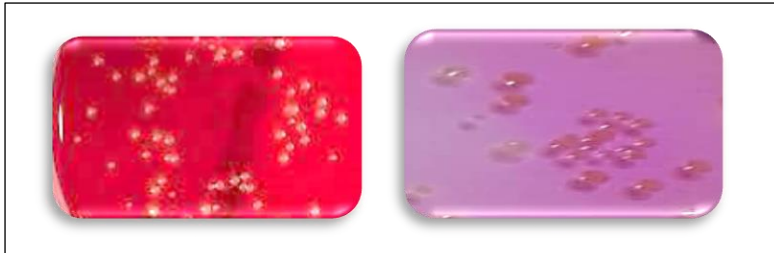


Figure 08 : Espèce présumée à *Staphylococcus aureus*

La sélectivité de ce milieu de Chapman est basée sur la présence de chlorures de sodium (7.5%) qui évite la prolifération des autres bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

- La différenciation est basée sur la capacité à fermenter ou non le mannitol (le seul sucre du milieu). S'il y a fermentation, cela induit une acidification qui entraîne, à des niveaux de pH inférieurs à 6.9, une coloration jaune du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur de pH) voir figure 09.



Figure 09 : Fermentation du mannitol (à droite) et *Staphylococcus coagulase négative* (à gauche) et *Staphylococcus aureus* (à droite)

- Dans nos isolats présumés, ceux positifs au mannitol sont évocateurs de *Staphylococcus aureus*.
- Observation : les isolats des colonies non fermentantes qui résistent à la concentration élevée en sel donne une zone rouge à rose en raison de la dégradation de la peptone et ne sont pas ainsi présumés à *Staphylococcus aureus*

*Bacillus cereus* présente des colonies gluantes blanches d'aspect cireux avec une texture granuleuse et font entre 2 et 7 mm de diamètre (figure 10)

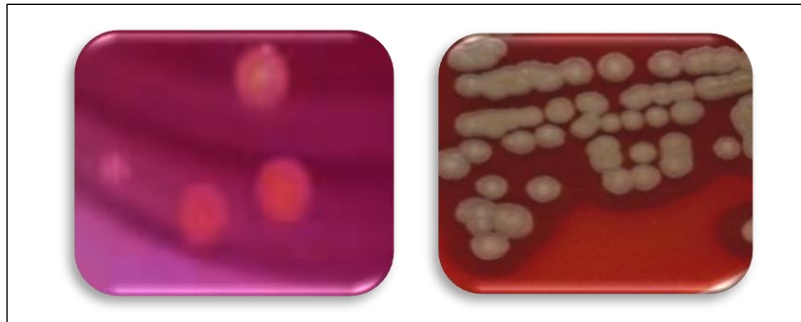


Figure 10 : Colonies gluantes et granuleuses de l'espèce présumée à *Bacillus cereus*

Nos résultats microbiologiques ont montré que le nombre de bactéries isolées au niveau du point 01, zone de comptage de la réception des laits est différent du nombre de bactéries isolées au niveau du point 02 , zone de refroidissement par échange thermique sur échangeur à plaques et aussi au niveau du point 03, zone de la ligne de transfert vers la cuve de stockage , que ce soit pour les Bacilles ou bien pour Staphylocoques. Cela est probablement lié à plusieurs raisons :

- L'efficacité du protocole de nettoyage appliqué sur la zone d'étude : la ligne de réception, la zone à risques au niveau d'une laiterie,
- Le suivi des solutions et des paramètres de nettoyage en place,
- Le contrôle de l'efficacité du couple action physique et action chimique lors du nettoyage en place.

#### 1.2. Examen microscopique des isolats (après coloration de Gram)

L'observation des caractères cultureux des colonies est le premier examen qui a été effectué après une incubation de 05 jours à 25°C sur gélose spécifique.

L'observation de la forme des cellules et de leurs arrangements a été réalisée avec un microscope optique au grossissement ( $\times 100$ ), en additionnant de l'huile à immersion.

L'aspect microscopique des différentes bactéries isolées à partir des 03 points de prélèvement effectué après un nettoyage en place appliqué à la mini-laiterie se caractérise comme suit :

Les résultats obtenus par la coloration de Gram : La totalité des bactéries sont des Gram positifs apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations. On retrouve deux gammes de bactéries ; des bacilles ayant une coloration Gram+, et aussi des Cocci Gram + qui se trouvent en abondance.

### 1.2.1. Aspect de *Bacillus cereus* sous microscope optique

Les souches de *B. cereus*, observées au microscope optique, sont constituées de bacilles Gram positif de 1,4  $\mu\text{m}$  habituellement observés en paires ou en bâtonnet de grande et de petite taille (figure 11).

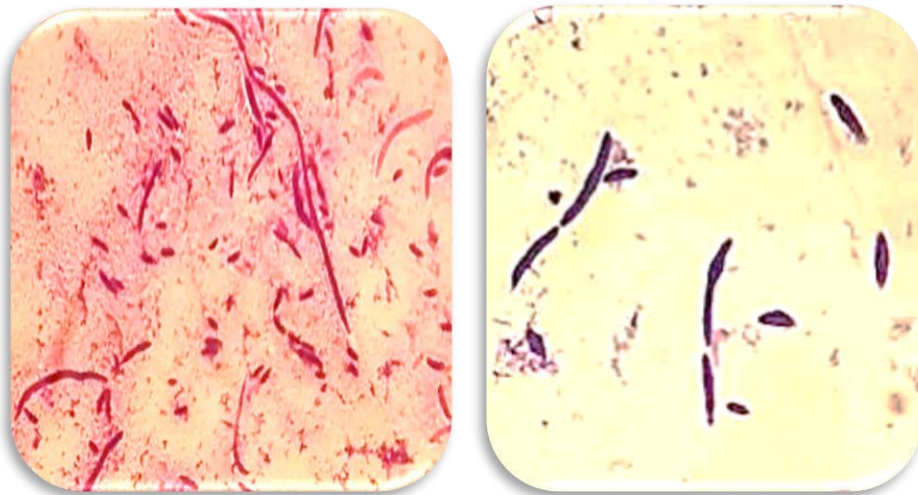


Figure 11 : Observation microscopique de *Bacillus cereus*

### 1.2.2. Aspect de *Staphylococcus aureus* sous microscope optique.

*Staphylococcus aureus* sont sous forme de coccus, de forme arrondie, qui se présente sous la forme de diplocoques (des cocci associés par deux) ou sous la forme d'amas ayant la forme de grappes de raisin (figure 12).

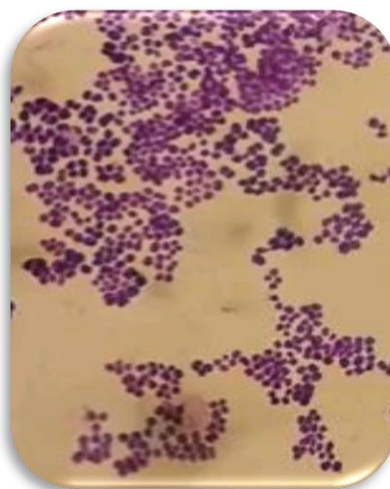


Figure 12 : Observation microscopique de *Staphylococcus aureus*

### 1.3- Identification de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*

Après l'examen microscopique des 02 souches isolées on s'est focaliser à la conservation des deux espèces ; *B. cereus* et *S. aureus*.

#### 1.3.1- Identification de *Bacillus cereus*

La reculture des isolats sur leur milieu spécifique a donné d'une part, après incubation à 37°C pendant 24h à 48h :

- Un virage de la couleur du milieu vers le rose perçue comme le démontre la figure 13, ce qui confirme que c'est des souches de *B. cereus*.
- De grandes colonies régulières, crémeuses plates avec un centre plus opaque.



Figure 13 : Aspect macroscopique de *Bacillus cereus* sur le milieu gélosé de Mossel  
*Bacillus cereus* est anaérobie facultatif, mobile grâce à une ciliature pérित्रique (voir figure 11), catalase positif, oxydase négatif, hydrolyse l'amidon, précipite la caséine Béta et Kappa. De plus leur croissance est observée à des pH de 4,5 à 9,5 et à des températures se situant entre 10-25°C et 35-45 °C (optimum de 37°C). Les caractères de croissance sont illustrés sur le tableau 11 (partie matériel et méthodes)

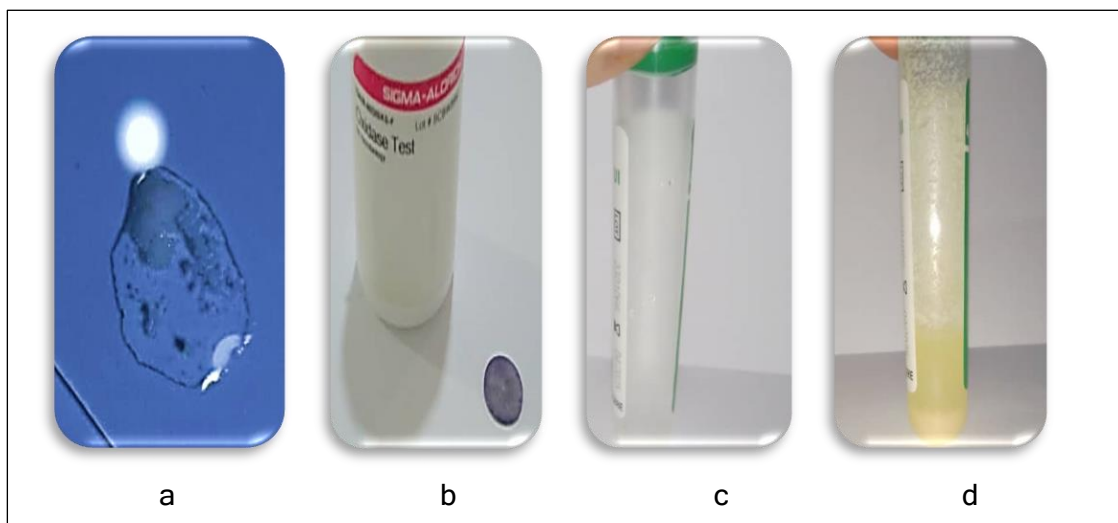


Figure 14 : Tests de catalase (a), d'oxydase (b), d'hydrolyse de l'amidon (c) et de

précipitation de la caséine kappa (d) chez l'espèce *Bacillus cereus*

### 1.3.2- Identification de *Staphylococcus* présumé à *S. aureus*

L'étude préliminaire a permis de sélectionner des souches du genre *Staphylococcus*. Après la confirmation du genre avec coloration de Gram et le test de catalase, l'identification est faite par :

- des tests biochimiques (coagulase). L'ensemencement est fait sur le milieu gélosé de Chapman, après incubation pendant 24h, les colonies apparaissent pigmentées (jaune doré) dans l'ensemble de la boîte. L'espèce présumée à *Staphylococcus aureus* est catalase positif, coagulase positif et oxydase négatif, aérobies - anaérobies facultatifs, fermentant le glucose sans gaz, avec une tolérance au NaCl à 7,5%, une fermentation du mannitol.

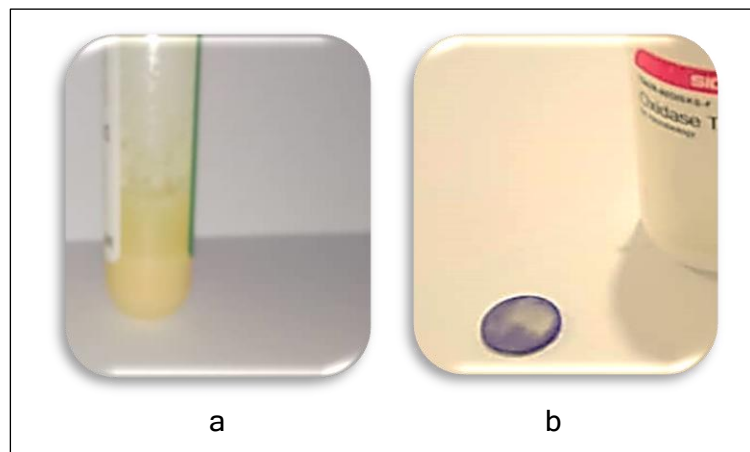


Figure 15 : Tests de coagulase (a) et d'oxydase (b) chez l'espèce *Staphylococcus aureus*  
Au regard des résultats obtenus, le taux de contamination de la ligne de réception, sur les 03 points de prélèvement, par *S. aureus* et *B. cereus* est important et assez variable en fonction des points après les deux premiers modèles de nettoyages en places appliqués (A et B). Sachant que *B. cereus* est un germe qui se transmet par l'alimentation des vaches laitières et surtout les ensilages fourragers, alors que l'origine de *S. aureus* est due aux pratiques et à l'hygiène de la traite.

## 2- Etude comparative des différentes conditions de nettoyage

Pour lutter contre les biofilms laitiers plusieurs modèles de nettoyage en place ont été étudiés :

- A- le modèle de la mini-laiterie adopté
- B- le modèle amélioré selon les préconisations
- C- le modèle formulé scientifiquement

Dans cette partie nous avons comparé non seulement les conditions d'élimination des biofilms à *Bacillus* et à *Staphylococcus* par l'association de l'effet mécanique à celui

chimique. De plus, il a été constaté clairement le maintien d'une contamination viable sur la surface des 03 parties de la ligne de réception sur un nettoyage classique réalisé par la laiterie se basant sur des cycles de nettoyage standards sans le respect du TACT.

Un programme de nettoyage et une désinfection efficace sont la principale méthode de contrôle de la contamination des surfaces. Si les procédures d'hygiène ne sont pas efficaces, les micro-organismes et les résidus du lait resteront à des concentrations qui peuvent affecter la qualité et la sécurité du produit laitier transformé.

Pour prendre en charge cette contamination, il nous a été nécessaire de se conformer aux procédures appliquées en hygiène industrielle : le mouillage des dépôts par le produit chimique de nettoyage, la réaction de la substance chimique pour faciliter l'élimination des souillures de la surface, une action mécanique destinée à arracher les souillures et la prévention de la redéposition suivi éventuellement par une désinfection des surfaces propres (Faille *et al.*, 2007 ; Herrera *et al.*, 2007 ; Julien *et al.*, 2003). Cette étude, nous a permis :

- de confirmer les conclusions faite par Oulahal *et al.*, 2008, que lors du contact du biofilm avec les désinfectants, la dissolution de celui-ci engendre sa déstructuration l'arrachement des amas,
- d'identifier le rôle du détergent seul puis de la combinaison actions mécaniques et chimiques sur les contaminants caractérisés.

Pour rappel, le nettoyage industriel des surfaces fermées est un processus qui fait intervenir plusieurs facteurs que sont l'énergie mécanique (hydrodynamique) employée pour enlever physiquement les souillures, l'énergie chimique (détergent) qui va découper les souillures, les dissoudre, les hydrater, réduire les forces d'interaction surface/souillure pour les rendre plus faciles à enlever, l'énergie thermique (température) quant à elle agit sur les réactions chimiques, sur la facilité à hydrater les souillures organiques et le temps de nettoyage, c'est-à-dire, le temps de contact entre les souillures et le liquide aux concentrations ou aux températures variables. La soude (NaOH) est le principal composant utilisé dans les détergents alcalins destinés au NEP. C'est une base forte reconnue comme excellente pour l'élimination des souillures protéiques (dénaturation, hydratation...) et grasses (saponification) (Sharma et Anand, 2002). C'est la principale molécule utilisée en industrie laitière pour l'élimination des dépôts formés sur les surfaces des échangeurs de chaleur et a fait l'objet de nombreux travaux appliqués à ces industries (Chmielewski et Frank, 2003).

Il a été bien observé que le plan de nettoyage proposé en associant le modèle diphasique associant l'action chimique, (NaOH 2,5% à 80°C + Rinçage + HN03 1% à 65°C) à une action action mécanique ciblée sur les 03 parties de la ligne de réception, (1,5 à 3 bars et 10m<sup>3</sup>/H de

débit) et l'effet combiné d'une désinfection biocide.

Les résultats après modélisation sont présentés dans le tableau N°04

Tableau N°04 : Comptage bactérien des biofilms laitiers caractérisés sur la ligne de réception du lait avant et après modélisation du NEP

Zone de réception du lait	Comptage bactérien UFC/ml				Comptage bactérien UFC/ml			
Point d'échantillonnage 1	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Bacillus cereus</i>			
	Avant	A	B	C	Avant	A	B	C
Réservoir tampon - dégazeur	870	690	402	Abs	8	6	2	Abs
Filtre	920	730	425	Abs	12	9	3	Abs
Compteur	950	770	436	Abs	10	7	2	Abs
Point d'échantillonnage 2								
Entrée de l'échangeur de refroidissement	760	630	320	Abs	5	5	3	Abs
Sortie de l'échangeur de refroidissement	680	540	290	Abs	3	2	1	Abs
Pompe volumétrique	620	480	210	Abs	4	3	2	Abs
Point d'échantillonnage 3								
Ligne de transfert vers le stockage	570	410	180	Abs	3	3	2	Abs

La qualité du nettoyage en place (NEP) est essentielle dans l'industrie laitière. L'efficacité est la clé, tant en termes de résultat de nettoyage qu'en termes d'économie. L'économie du nettoyage en place est dictée par le coût et le temps. Il est essentiel de réduire les déchets ; un équipement de nettoyage, de pompage et de chauffage bien configuré et efficace est nécessaire pour que le liquide de nettoyage puisse être utilisé correctement sur les surfaces.

Cette étude nous a permis de montrer aussi l'importance de la force de cisaillement dans la désorganisation et l'arrachement des couches superficielle des biofilms. Ainsi, plus de 99% de la population bactérienne adhérente est éliminée par les rinçages après actions chimiques confirmé par le contrôle des eaux de rinçage ou si cela est disponible par des observations directes des biofilms sur des sections faites sur les lignes de production. Les auteurs dans la littérature (Faille *et al.*, 2010 ; Mah et O'Toole, 2001 ; Simmonds *et al.*, 2003 ; Tauveron *et al.*, 2006) ont souvent souligné la résistance des biofilms aux NEP. Cette résistance est liée à la

structure complexe des biofilms et à la présence d'EPS qui joue le rôle de barrière à l'action de ces molécules nettoyante et désinfectante en les inactivant.

Les procédures de nettoyage sont utilisées pour assurer l'hygiène des lignes de transformation par l'élimination complète des bactéries provenant des surfaces de transformation des laits. Il est facilement concevable que certaines de ces bactéries détachées soient capables de se redéposer en aval. Dans cette étude, nous avons réussi à démontrer que les spores de *Bacillus*, détachées des surfaces contaminées au cours du processus de nettoyage ont pu récontaminer les surfaces en aval surtout au niveau de l'échangeur à plaque (refroidisseur), partie 02 de la ligne de réception. Cette contrainte est due à la présence au niveau de l'échangeur à plaque de zones de recirculation favorisant le piégeage (les plaques) facilitant la réadhésion du biofilm laitier par les contaminants caractérisés. Cela a été mis en évidence lors d'études antérieures, la forme de l'écoulement liée à la géométrie des systèmes et à l'organisation des lignes peuvent être la source de création de zones ou points critiques. Ce qui nous a amené par notre contribution scientifique à la mise en place d'un concept hygiénique, un outil permettant d'éliminer les incrustations organiques entre les plaques, l'installation des contaminants et la prolifération des biofilms et leur adhésion aux plaques des échangeurs à plaques.

## Conclusion

La contamination microbienne des surfaces reste un problème d'actualité dans de nombreux secteurs d'industries agro-alimentaires, notamment dans le secteur de l'industrie laitière. La présence de la flore microbienne constitutive de biofilm dans le lait de vache est préoccupante, du fait que les biofilms sont reconnus être la source de lourds problèmes économiques et sanitaires. Dans le cadre de cette étude, nous avons pu isoler des souches de *S. aureus* et de *B. cereus* à partir des eaux de rinçage récupérées d'un NEP de la ligne de réception des laits frais d'une laiterie (le foyer des points à risque d'une laiterie).

Dans les industries laitières, le maintien des surfaces en contact avec les laits doit être assuré par un processus de nettoyage complet, contrôlé et adapté. Cela passe par une bonne pratique des procédures de nettoyage qui doivent assurer l'élimination des souillures micro et macroscopiques des surfaces. L'élimination de ces résidus organiques sources de nutriments pour les bactéries est essentielle pour assurer une production saine. Le nettoyage des surfaces fermées est un phénomène complexe qui fait intervenir plusieurs paramètres. Ces paramètres sont liés, d'une part à la conception même des équipements de production (matériaux et géométrie), à la microflore ramenée par le lait et à la contamination bactérienne qui peut s'y produire et donc être à la base d'une adhésion entre contaminants et surface de production, soit aux conditions opératoires utilisées pour le nettoyage (détergent, temps, températures). Ces dernières décennies ont vu l'émergence de savoir-faire industriel et de contraintes légales au cours de la production laitière. Les procédures de NEP étant une étape clé de la production, une meilleure connaissance de l'influence de ces différents facteurs s'est imposée. Notre contribution a visé trois objectifs. Le premier objectif était de caractériser les modèles de biofilm bactérien d'une ligne de réception d'une laiterie (soit une flore d'altération et une flore pathogène), de réaliser des cinétiques de nettoyage et de modéliser ces cinétiques d'élimination lors du nettoyage afin de prédire les opérations de nettoyage en identifiant l'action respective des paramètres liés aux conditions de nettoyage. Un objectif secondaire était de discriminer entre les actions respectives de chaque étape ou activités intervenant dans le nettoyage à savoir le trempage (hydratation dans l'eau traitée combinée à une attaque chimique), le rinçage (action mécanique seule), le nettoyage (combinaison action mécanique et action chimique). Cette approche a permis d'émettre des solutions de lutte contre les contaminants caractérisés initiateurs de biofilms laitiers dangereux et d'expliquer la réponse à modéliser par l'action de phénomènes physiques, biologiques et/ou chimiques. L'inactivation bactérienne se traduit ici par une élimination plus ou moins aisée que nous avons relié aux actions respectives de l'écoulement l'action mécanique lié à la chimie via la concentration en combinant l'action

alcaline-acide et désinfection biocide. Nous pouvons conclure que l'arrachement sans retour s'est fait par élimination de la couche superficielle du biofilm, laissant sur la surface les cellules directement en contact avec le matériau. L'arrachement de cette couche entraîne l'élimination de toute la substance extracellulaire (EPS) éliminée avec les cellules bactériennes intégrées dans ces structures tridimensionnelles pour des biofilms relativement « jeunes » sur lesquels l'action du NEP a été facilitée. L'action combinée de la chimie et de la force de cisaillement a conduit à un taux d'élimination maximum de 100% de la population bactérienne contaminante.

- Au vu des résultats de nos expériences, il serait intéressant d'envisager pour le nettoyage des lignes de transformation l'installation d'un système de nettoyage avant et après des équipements tels que les échangeurs à plaques.

- A partir de la modélisation des cinétiques proposées, et de la connaissance des zones à risques (points critiques) de proposer des conditions de nettoyage adaptée aux contaminants et à la charge bactérienne dénombrée. Quels sont les conditions de surfaces des matériaux, de l'organisation des écoulements donc de géométries qui favorisent ou non le développement de biofilms vrais.

- La chimie du nettoyage semble avoir ici une très grande importance, on peut effectivement pour faire face aux biofilms laitiers proposer d'augmenter la concentration en soude et les températures.

En perspectives

Tenant compte de l'impact négatif des produits de nettoyage chimique sur l'environnement et les exigences actuelles imposées aux industries agro-alimentaires pour la protection de l'environnement.

Il serait très important d'explorer des techniques alternatives permettant soit de limiter le détergent, soit proposer des détergents « bio » type enzymatiques, ou encore le couplage avec des techniques physiques (favorisant l'action mécanique tels les débits pulsés, les systèmes à microbulles...) et cela nous renvoie aux techniques appliquées en génie des procédés laitiers : Déterminer un mécanisme d'arrachement spécifique à la structure du biofilm laitier caractérisé.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Bacarić. N., 2004. Technical Manual for Cleaning-in-Place.PTC Konolfingen Nestec Ltd. 1800 Vevey, Switzerland, 260 pages
- 2- Bachtarzi N., Amourache L., Dehkal G. (2015). Qualité du lait cru destiné à la fabrication d'un fromage à pâte molle type Camembert dans une laiterie de Constantine (Est algérien). International Journal of Innovation and Scientific Research ISSN 2351-8014, 17, 34-42.
- 3- Bénézech, T., Lelièvre, C., Membré, J.M., Viet, A.F., & Faille, C. (2002). A new test method for in-place cleanability of food processing equipment. Journal of Food Engineering, 54, 7- 15.
- 4- Bentiba K., Bentiba L. (2017). Evaluation de la capacité des souches de Staphylococcus spp à former des biofilms dans l'industrie laitière. Mémoire de master en analyses biochimique. Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, 72pp.
- 5- Billon P., Sauve O. (2009). Traite des vaches laitières. 3ème édition, France, 555 p.
- 6- Blanpain-Avet, P., C. Faille, G. Delaplace, T. Bénézech. ; (2011) Cell adhesion and related fouling mechanism on a tubular ceramic microfiltration membrane using Bacillus cereus spores. Journal of Membrane Science, In Press, Accepted Manuscript, Available online 4 October 2011
- 7- Blel, W. Bénézech, T., Legentilhomme, P., Legrand, J., & Le Gentil-Lelièvre, C. (2007). Effect of flow arrangement on the removal of Bacillus spores from stainless steel equipment surfaces during a Cleaning In Place procedure. Chemical Engineering Science, 62, 3798-3808.
- 8- Blel, W. Legentilhomme, P., Legrand, J., Bénézech, T., & Le Gentil-Lelièvre, C. (2008). Hygienic design: effect of hydrodynamics on the cleanability of a food processing line. AIChE Journal, 54, 2553-2566.
- 9- Boukhelifa H. (2017). Formation de biofilm in vitro par des souches cliniques de Staphylococcus aureus isolées de sondes urinaires. Mémoire de MASTER en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 64pp.
- 10- Bokulich N.A., Mills D.A. (2013). Facility-Specific "House" Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheese making Plants. Applied and Environmental Microbiology, 17(79), 5214-5223.
- 11- Bos, R., Van der Mei, H. C., Gold, J., & Busscher, H. J. (2000). Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. FEMS Microbiology Letter, 189(2), 311-315.

- 12- Branda, Steven S. Åshild Vik, Lisa Friedman, Roberto Kolter. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, 20-26
- 13- Brisabois A., Lafarge V., Thorel M. F. (2016). Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Revue scientifique et technique. Off. int. Epiz*, 16 (1): 452-471.
- 14- Brugnoli, L.I., Lozano, J.E. & Cubitto, M.A. (2007). Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International*, 40, 332–340.
- 15- Burfoot, D, K.E. Middleton, J.T. Holah. (2009) Removal of biofilms and stubborn soil by pressure washing *Trends in Food Science and Technology*, 20, S45-S47
- 16- Burgess S.A., Lindsay D., Flint S.H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 215- 225.
- 17- Callon C, Duthoit F, Delbes C, Ferrand M, Lefrileux Y, De Cremoux R, Montel MC. 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year : Molecular approaches. *Syst.Appl. Microbiol.* 30, 547-560
- 18- Caroline Le Gentil, Yahaya Sylla, Christine Faille.(2010). Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *Journal of Food Engineering*, 96, 37-42
- 19- Clamerland J. (2018). Etude des biofilms dans les systèmes de filtration en industrie laitière: mécanisme de formation ,caractérisation stratégies de contrôle .Thèse de doctorat en science et technologie des aliments. Université LAVAL (Canada), 104pp.
- 20- Chen, J., Rossman, M. L., & Pawar, D. M. (2007). Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. *LWT – Food Science and Biofilms Science and Technology*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 529–549
- 21- Chmielewski, R.A.N. & Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 22–32.
- 22- Christian G K (2004) Cleaning of carbohydrate and dairy deposits. PhD thesis, University of Birmingham, UK.
- 23- Dahou. A. (2021). Lait et Production Laitière. Polycopié de cours destiné aux étudiants des Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem. 78 pages.
- 24- Daniel. R., Vanderleyden, J., & Michels, J. (2004). Quorum sensing and swarming

- migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 261-289.
- 25- Dagnra A.Y., Faye-Ketté H., Hounkpati A., David M., Dosso M. (2000). Évaluation de deux tests d'identification de *Staphylococcus aureus*. *Médecine et maladies infectieuses*, 30: 533-9.
- 26- Didouh N. (2015). Caractérisations de spores de *Bacillus cereus* isolés d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilms et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfections. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen (Algérie), 99 pp.
- 27- Dürr H. (2002). Milk Heat Exchanger Cleaning: Modelling of Deposit Removal II *Food and Bioproducts Processing*, 80, 253-259
- 28- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, C., & Bénézech, T. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 728-738.
- 29- Faille, Y. Sylla, C. Le Gentil, T. Bénézech, C. Slomianny, Y. Lequette. (2010). Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment *Food Microbiology*, 27, 769-776.
- 30- Faille, C., Tauveron, G., Gentil-Lelievre, L.C. & Slomianny, C. (2007). Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of Food Protection*, 70, 2346–2353.
- 31- Fotou K., Tzora A., Bezirtzoglou. (2011). Isolation of microbial pathogens of subclinical, mastitis from raw sheeps milk of Epirus (Grecce) and their role in its hygiene. *Anaerobe*, 17: 315-319.
- 32- Frank, J. F., Ehlers, J., & Wicker, L. (2003). Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. *Food Protection Trends*, 23, 654–663.
- 33- Ghazi N., Niar A. (2011). Qualité hygiénique du lait cru de vache dans différents élevages de la wilaya de Tiaret (Algérie). *Tropicultura*, 29 (4): 193-196.
- 34- Goetz, C., Sanschagrín, L., Jubinville, E., Jacques, M., Jean, J. 2024. Recent progress in antibiofilm strategies in the dairy industry. *J. Dairy Sci.* TBC. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25554>. 19p.
- 35- Goetz C., Dufour S., Aechambault M., Mlouin F., Jacques M. (2016). Importance et contrôle de biofilms formés par les Staphylocoques lors d'infections intramammaires chez la vache laitière. *Médecine vétérinaire*, 167, 7-8, 215-229.
- 36- Gram C. (1884). On the isolated coloring of the Schizomycetes in cut and dry preparations.

- 37- Guiraud J. P. (2003). *Microbiologie Alimentaire*. Edition Dunod. Paris, 136-139.
- 38- Gunduz, G. T., & Tuncel, G. (2006). Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(3e4), 329-336.
- 39- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 228–233.
- 40- Hamiroune M., Berber A., Boubekeur S. (2014). Qualité bactériologique du lait cru de vaches locales et améliorées vendu dans les régions de Jijel et de Blida (Algérie) et impact sur la santé publique. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 158: 137-144. I
- 41- Herrera, J.J.R., Cabo, M.L., Gonzalez, A., Pazos, I., & Pastoriza, L. (2007). Adhesion and detachment kinetics of several strains of strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiology*, 24, 585-591
- 42- Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163–173.
- 43- Jensen, B.B.B., Stenby, M., & Nielsen, D.R. (2007). Improving cleaning effect by cleaning average velocity. *Trends in Food Science & Technology*, 18, S52-S63.
- 44- Jullien, C., Bénézech, T., Carpentier, B., Lebret, V., & Faille, C. (2003). Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 56, 77-87.
- 45- LaPointe, G., Wilson, T., Tarrah, A., Gagnon, M., Roy, D. 2024. BIOFILM DAIRY FOODS REVIEW: Microbial Community Tracking from Dairy Farm to Factory: Insights on Biofilm Management for Enhanced Food Safety and Quality. *J. Dairy Sci. TBC* <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25397>. 19p.
- 46- Lequette Yannick, Christine Faille, Annette Ronse, Christian Slomianny, Estelle Garénaux, Yann Guerardel. (2010). Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 125-135
- 47- Liu, Y. et Zhao, Q. (2005), Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. *Biophysical Chemistry*, 117, 39 – 45.
- 48- Mah, T.-F., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9, 34–39
- 49- Maïworé J., Baane M. P., Montet D. (2018). Influence des conditions de la traite sur les qualités physico-chimiques et microbiologiques du lait cru collecté à Maroua, Cameroun. *Afrique SCIENCE*, 14 (4): 235-248.
- 50- Mansour L. M. (2015). Etude de l'influence des pratiques d'élevage sur la qualité du lait:

effet de l'alimentation. Thèse de doctorat en science agronomie. Université Ferhat Abbas Setif1, 123 pp.

- 51- Marouani-Gadri Nesrine, Olivier Firmesse, Danielle Chassaing, Dennis Sandris-Nielsen, Nils Arneborg, Brigitte Carpentier. (2010). Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment *International Journal of Food Microbiology*, 144, 96-103
- 52- Maukonen, J., Maatto, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 327–356.
- 53- McMeekin, T. A., J. Olley, D. A. Ratkowsky, et T. Ross. 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 73 : 95-407.
- 54- Møretrø, T., Hermansen, L., Holck, A.L., Sidhu, M.S., Rudi, K., Langsrud, S., 2003. Biofilm formation and the presence of the intracellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5648–5655.
- 55- Oulahal, N., Brice, W., Martial, A., & Degraeve, P. (2008). Quantitative analysis of survival *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces : propylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control*, 19, 178–185.
- 56- Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34, 577-588
- 57- Peng, J.S., Tsai, W.C., & Chou, C.C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 11-18.
- 58- Petermeier H, Benning R, Delgado A, Kulozik U, Hinrichs J and Becker T (2002) Hybrid model of the fouling process in tubular heat exchangers for the dairy industry. *Journal of Food Engineering* 55 9–17.
- 59- Prescott L.M., Harley J., Klein D.A. (2010). *Microbiologie* 2ème édition. De Boeck, paris, p. 979.
- 60- Priest F. G., Barker M., Maiden M. C. J. (2004). Population structure and Evolution of the *Bacillus cereus* group. *Journal of Bacteriology*, 23 (186): 7959-7970.
- 61- Quigley L., Sullivan O.O., Stanton C., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Cotter P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37: 664-698.
- 62- Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S. (2012). Biofilm formation and presence of

- icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medical. Human and Genetic* .13: 269–274.
- 63- Sanchez C.J., Mende K., Beckius M.L., Akers K.S., Romano D.R., Wenke J.C., Murray C.K. (2013). Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC infectious diseases* 13(1): 47.
- 64- Sharma, M. & Anand, S.K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food‡ dairy processing industry – a case. *Food Control*, 13, 469–477.
- 65- Si Tayeb S. (2018). Etude de la qualité hygiénique et microbiologique du lait cru de vache de la ferme de Hassi Mameche. Master en biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie), 77pp.
- 66- Simmonds, P., B. L. Mossel, T. Intraphan, and H. C. Deeth. 2003. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *J Food Prod* 66, 2070-2075
- 67- Simões, M., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2005). Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Research*, 39, 5142–5152.
- 68- Simões M., Simões L.C., Vieira M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*. 43:573–583.
- 69- Titouche Y. (2018). Risque de contamination microbienne du lait cru produit dans la Wilaya de Tizi Ouzou: Caractérisation phénotypique et génotypique de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat en science biologique. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 114pp.
- 70- Somers, E. B., & Wong, A. C. (2004). Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue. *Journal of Food Protection*, 67, 2218–2229.
- 71- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., & Faille, C. (2006). Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 254-262.
- 72- Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R. & Vieira, M.J. (2005). Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology*, 22, 247–251.
- 73- Tremblay Y.D.N., Hathroubi S., Jacques M. (2014). Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian journal of Veterinary Research*, 78 : 100-116.
- 74- Upasana H. (2015). Enterotoxigenic *bacillus cereus* and *bacillus thuringiensis* Spores in

- U.S Retail Spices. Mémoire de master en science alimentaire. Université Massachusells in partial fulfillment, 55pp.
- 75- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16, 496–506.
- 76- Vignola C. (2002). *Science et Technologie du lait: Transformation du Lait*. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada, 3-75.
- 77- Von Neubeck M., Baur C., Krewinkel M., Stoeckel M., Kranz B., Stressler T., Fischer L., Hinrichs J., Scherer S., Wenning M., (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*, 211: 57-65.
- 78- Wilson D I, Fryer P J and Hasting A P M (eds) (2002) *Fouling, Cleaning and Disinfection in Food Processing*, p 263 Cambridge: Department of Chemical Engineering, University of Cambridge, 2002.

# **ANNEXES**

## ANNEXES

### Annexe 01 : Composition des milieux sélectifs

Pour 1 litre de milieu :

<b><u>Composition du milieu sélectif Chapman</u></b>	
<b>Ingrédients</b>	<b>gramme/litre</b>
Peptone	10 g
Extrait de viande de bœuf	1 g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0,025g
Agar	15g
pH final	7,4 ± 0,2

### **Composition du milieu sélectif MOSSEL**

- Peptone 10,0 g.
- Extrait de viande 1,0 g.
- Mannitol 10,0 g.
- Jaune d'œuf à 20 % 10 %
- Sulfate de Polymyxine B 0,01 g.
- Rouge de phénol 0,025 g.
- Chlorure de sodium 10,0 g.
- Agar 14,0 g.

## **Annexe 02 : Critères de choix d'un détergent :**

### *1- Critères concernant les propriétés de détergent :*

- **Toxicité** : Un détergent doit être le moins toxique possible pour le personnel mais également le plus respectueux possible de l'environnement, biodégradable et correspondre à la législation sur les rejets.

- **L'efficacité du détergent** : Il faut éviter au maximum de multiplier les étapes de nettoyage. Un détergent devra avoir un bon pouvoir mouillant, émulsionnant, anti-redéposition. Il devra être stable à des températures élevées. Son rinçage et son élimination devront être aisés.

- **DéTECTABLE** : Un bon détergent doit pouvoir être dosable à de faibles concentrations. Ce paramètre est requis dans le cas de la validation du nettoyage.

- **RENTABLE** : Le produit doit avoir un coût de mise en œuvre avantageux (temps de cycle, temps de contact, et temps de rinçage ne devront pas être trop élevés afin de ne pas immobiliser les équipements pendant une durée trop importante).

- **Stabilité** : Le produit à l'état pur (ou la solution diluée si la dilution n'est pas faite extemporanément) doit avoir une stabilité et une date de péremption connues dans les conditions de stockages indiquées sur la fiche technique.

- **Nature et état des souillures** : Organiques ou minérales, humides ou séchées et de leur degré d'incrustation dans le matériel.

- **Nature du matériel** ou du support : Le détergent ne doit pas présenter de caractère agressif vis-à-vis des surfaces à nettoyer (Le maintien de l'intégrité de la surface est le facteur critique (en particulier pour les joints et appareils de mesure). La liste des matériaux destinés à être en contact avec le produit doit être établie et leur compatibilité avec l'agent de nettoyage vérifiée.

- **Qualité de l'eau utilisée** : Dureté, caractère corrosif et éventuellement qualité Microbiologique. Une eau avec une dureté élevée nécessitera la présence de complexant.

• **Mode de nettoyage** : On utilisera :

- des produits peu moussants en cas de nettoyage manuel.
- des produits moussants pour les canons à mousse.
- des produits non moussants pour les nettoyages en place. La mousse peut entraver la performance de nettoyage, elle fait caviter des pompes comme résultat de l'introduction d'air dans les lignes.

*2-Critères concernant le fabricant :*

• **Certification** : Il doit disposer d'un système d'assurance qualité certifié.

• Il doit pouvoir fournir la fiche technique du produit, sa composition (au moins qualitative) et informer son client lors d'un changement dans la formule.

## **Annexe 03 : Fiche technique du désinfectant Biocide SDS du Divosan OSA-N**

### **Divosan OSA-N VS37**

#### **Divosan.**

*Phosphate free acidic detergent disinfectant / terminal disinfectant for CIP applications*

#### **Description**

**Divosan OSA - N** is a concentrated low foaming phosphate free acidic detergent disinfectant / terminal disinfectant for CIP applications in the brewing, beverage, dairy and processed food industries

#### **Key properties**

**Divosan OSA . N** has low foam characteristics making the product ideal for CIP use

**Divosan OSA . N** provides effective detergency for single stage cleaning in many scenarios.

**Divosan OSA . N** is effective against a wide range of spoilage organisms including yeast, bacteria and mould

**Divosan OSA . N** is highly effective at removing inorganic scale deposits, including calcium phosphate and calcium oxalate

**Divosan OSA . N** has free rinsing characteristics reducing rinsing time. **Divosan OSA . N** concentrations can be measured by conductivity. **Divosan OSA . N** solutions can be reclaimed and reused

**Divosan OSA . N** is effective at low temperatures

**Divosan OSA . N** can be used in carbon dioxide atmospheres without evacuation

**Divosan OSA . N** has shown not to have any effect on beer head retention at recommended use concentrations

**Divosan OSA . N** is safe on epoxy lined vessels

**Divosan OSA . N** is free of oxidising halogens, no AOX or halide related corrosion

**Divosan OSA . N** is free of phosphate and is fully biodegradable

#### **Benefits**

Provides effective cleaning and or disinfection, ensuring equipment hygiene and product quality assurance

Suitable for single stage cleaning and disinfection in many scenarios reducing cleaning times and utility usage, increasing production capacity whilst reducing total costs

Suitable for use at ambient temperatures in many scenarios, reducing utility costs and heat stress

Reduced corrosion potential and thermal stress minimises maintenance requirements

Low environmental impact, particularly suitable where phosphate restrictions apply

Effective in carbon dioxide environments reducing total cleaning time and gas replacement costs

Product reclaim lowers usage rates and effluent discharge volumes

Suitable for automatic dosing and control by conductivity, ensuring consistent delivery of product and performance

#### **Use instructions**

**Divosan OSA. N** should be used at concentrations between 0.6 . 1.7% w/w (0.5 . 1.5% v/v), dependent on soil loading, temperature and application.

Always rinse thoroughly after use. **Diversey Eastern and Central Africa Ltd** Kaptagat Road, Loresho

P.O Box 41939 -00100 GPO

Tel. +254 (20) 4224 888 / 4180 481

Fax +254 (20) 4224 888 / 4180 481

[www.diversey.com](http://www.diversey.com)

#### **Technical data**

Appearance Clear colourless liquid Relative Density at 20°C 1.15

pH (1% solution at 20°C) 1.6

Chemical Oxygen Demand (COD) 303 gO<sub>2</sub>/kg Nitrogen Content (N) 42 g/kg

Phosphorus Content (P) none