

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

Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master en
Microbiologie Alimentaire et Sanitaire

Thème

Etude préliminaire du potentiel
d'adhésion de souches de bactéries
lactiques sur acier inoxydable.

Présenté par M^{elles}:

BOUCHELAGHEM Ahlam
BOUDRAHEM Tassadit

Membres du jury :

Président : M^r AISSAT K. MCA
Promotrice : M^{elle} BENDALI F. MCA
Examinatrice : M^{me} BENACHOUR K. MAA
Examineur : M^r LAADJOUZI R. MAA

Promotion 2012/2013



Remerciements

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée de l'université Abderrahmane Mira de Bejaïa dans l'équipe « Microbiologie de lait et probiotiques : MLP »

Nous voudrions exprimer nos sincères remerciements :

Au Professeur SADOUN D. qui nous a accueillis au sein de l'équipe du laboratoire.

Aux membres de jury Mr AISSAT K. d'avoir accepté de présider le jury, et l'examinatrice M^{me} BENACHOUR K. ainsi que l'examineur Mr LAADJOUZI R. pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

A M^{lle} BENDALI F. qui nous a donné la possibilité d'effectuer ce travail de fin de cycle. Nous la remercions vivement pour nous avoir apporté un appui constant et pour sa disponibilité.

Nos sincères remerciements à toute l'équipe MLP qui nous ont permis de mener ce travail dans la bonne humeur et la bonne ambiance.

Finalement il nous est agréable d'adresser nos remerciements à tous les enseignants, doctorants et les ingénieurs du laboratoire pour leur aide, leur optimisme, leurs encouragements et leurs nombreux conseils.



Dédicaces

À mes chers parents que j'aime tant.

À ma sœur Sihem.

À mes grands parents, oncles et tantes.

À ma camarade et amie Tassadit et sa famille.

À mes cousins et cousines.

À mes neveux et nièces.

*À mes chers amis (es) : Lyes, Sarra, Rima, Kami, Mima,
Midou, Farid, Latifa, Dyhia, Halla, Mina et Anis.*

Ahlem



Dédicaces

À mes chers parents que j'aime tant.

À mes frères Toufik, Mohand, Hakim et sa femme Soraya.

À mes grands parents, oncles et tantes Nadjet et Nabila.

À ma camarade et amie Ahlem et sa famille.

À mes cousins et cousines Hassiba et Yasmina.

À mes nièces Sabine et Ikrane.

À mes chers amis (es) : Lyes, Kahina, Wassila, Dyhia, Halla,

Mina et Selma.

Tassadit

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de Normalisation

Cr: Chrome

CPS: Capsular Polysaccharides

EPS: Exocellular Polymeric Substances = Exopolysaccharides

GRAS : Generally Recognized As Safe

Lb.: *Lactobacillus*

Lc. : *Lactococcus*

L.: *Listeria*

Mo: Molybdène

MRS: de Man Rogosa et Sharpe

Ni: Nickel

PP: Polysaccharides Pariétaux

PrtP : Protéase de Paroi

S.: *Staphylococcus*

TIAC: Toxi-Infections Alimentaires Collectives

TSB- YE: Trypticase -Soja Broth-Yeast-Extract

TSA-YE: Trypticase -Soja Agar -Yeast-Extract

TS: Tryptone -Sel

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique

I. Biofilms en industrie agroalimentaire	3
I. 1. Biofilms « négatifs »	3
I. 2. Biofilms « positifs »	3
I. 2. 1. Exemple de <i>Lactococcus lactis</i>	3
I. 2. 2. Exemple de <i>Staphylococcus sciuri</i>	4
I. 2. 3. Exemple de <i>Brevibacterium linens</i> et <i>Staphylococcus xylosus</i>	4
I. 2. 4. Exemple de <i>Streptococcus thermophilus</i>	4
I.2.5. Exemple de <i>Lactobacillus sakei 1</i>	4
I. 3. Etapes de formation des biofilms	5
I. 3. 1. Formation du film de conditionnement et transport de la bactérie au contact du support	5
I.3.2.Adhésions initiales réversible (non spécifique) et irréversible (spécifique)	5
I. 3. 3. Colonisation du support et formation de microcolonies	5
I. 3. 4. Maturation du biofilm.....	6
I.3.5. Détachement et dispersion.....	6
I. 4. Facteurs influençant la formation d'un biofilm	6
II. Bactéries lactiques	7
II. 1. Composition et structure de la surface cellulaire	7
II.1.1. Acides teichoïques et lipoteichoïques	7
II.1.2.Protéines.....	8
II.1.3.Polyosides	8

III. Acier inoxydable	9
III. 1. Aciers ferritiques	10
III. 2. Aciers martensitiques	10
III. 3. Aciers austénitiques	10
III. 4. Aciers austéno-ferritiques	11

Matériel et méthodes

1. Origine des souches utilisées.....	12
2. Vérification de la pureté des souches utilisées.....	12
3. Tests d'adhésion sur acier inoxydable.....	12
3.1. Choix du support.....	12
3.2. Procédure de nettoyage et de désinfection de l'acier.....	14
3.3. Test d'adhésion sur acier.....	14

Résultats et Discussion

1. Vérification de la pureté des souches utilisées	15
2. Test d'adhésion sur acier inoxydable.....	15
2. 1. Adhésion sur l'acier 304L	16
2. 2. Adhésion sur l'acier 316L	17
2.3. Comparaison du potentiel d'adhésion sur les deux types d'acier inoxydable.....	18
3. Discussion générale.....	19
Conclusion	22

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Depuis la découverte des bactéries par Antoine Van Leeuwenhoek en 1668, la majorité des recherches a été menée sur des microorganismes en suspension dans des liquides. Il a fallu attendre les travaux de J. W. Costerton dans les années quatre-vingt pour que le mode de vie majoritaire des microorganismes soit mis en lumière : des communautés microbiennes adhérentes à des surfaces. Ces microorganismes étant omniprésents et capables de s'adapter à des environnements extrêmes tels que les sources d'eau chaude ou les glaces polaires, il apparaît maintenant évident que toutes les surfaces qui nous entourent, depuis les matériaux inertes jusqu'aux tissus végétaux et animaux, sont potentiellement colonisées par ces communautés microbiennes (Dessaigne *et al.*, 2008).

Le terme « biofilm » est proposé pour la première fois en 1978 par John William Costerton *et al.* ces derniers les avaient définis comme étant des populations de bactéries, adhérents les unes aux autres et/ou à des surfaces ou interfaces et englobées dans une matrice. La notion de biofilm n'a cessé d'évoluer depuis, en fonction des avancements des travaux visant la compréhension profonde de ce phénomène (Burin, 2002).

Le développement tridimensionnel du biofilm conduit à la création de gradients physicochimiques. Ainsi, contrairement aux cultures classiques réalisées en milieux liquides agités, le biofilm n'est pas un environnement homogène car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, qui présentent des valeurs de pH différentes. Cette hétérogénéité physicochimique s'accompagne d'une hétérogénéité métabolique, source de microenvironnements qui permet la coexistence organisée d'espèces bactériennes aux propriétés métaboliques différentes et souvent complémentaires (Roux et Ghigo, 2006).

Les biofilms colonisent des surfaces très variées et sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans les domaines de la santé publique et de l'industrie générant des charges économiques importantes. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus, on peut citer les maladies nosocomiales, les contaminations de produits alimentaires, la biodétérioration des matériaux (en particulier la biocorrosion) (Parot, 2007).

L'industrie agroalimentaire est particulièrement concernée car les biofilms peuvent conduire, non seulement à la dégradation des qualités organoleptiques des produits, mais également au développement de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) du fait de

l'accumulation de microorganismes pathogènes (*Salmonella* spp. et *Listeria* spp. pour les espèces les plus fréquentes) à la surface des équipements (Guillemot, 2006).

Néanmoins, tous les biofilms ne sont pas néfastes pour l'Homme et ils jouent un rôle positif dans bien des domaines. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail qui a pour objectif d'étudier la capacité d'adhésion de 16 souches de bactéries lactiques parmi plus de 130 souches isolées à partir des surfaces de matériel de traite utilisé au niveau de deux fermes de la région de Béjaia, sur la surface d'un matériau de choix pour l'industrie agroalimentaire qui est « l'acier inoxydable » .

Cette étude est structurée en deux parties dont une synthèse bibliographique mettant en avant quelques notions sur les biofilms en particulier les biofilms positifs ainsi que sur l'acier inoxydable.

La deuxième partie regroupe l'ensemble des techniques et la méthodologie utilisée pour la réalisation de ce travail, ainsi que les résultats générés associés à leur discussion.

I. Biofilms en industrie agroalimentaire

On peut distinguer des biofilms dits « négatifs » et des biofilms dits « positifs »

I. 1. Biofilms « négatifs »

En industrie alimentaire, le développement des biofilms bactériens sur les installations est très problématique. En effet, un biofilm peut se développer en quelques heures seulement et est difficile à éradiquer car très résistants aux lavages et aux désinfections. Par ailleurs, la présence de biofilms sur les appareils industriels « biofouling » entraîne une perte d'efficacité des processus (Marchal, 2010). Les biofilms sont responsables de la contamination des produits transformés. Les recherches en la matière sont néanmoins récentes. Les biofilms affectent également les transferts de chaleur et donc augmentent le temps de stérilisation par autoclavage et y modifient aussi la résistance à la vapeur et au formol. Ils sont sources de difficultés de nettoyage et de désinfection des surfaces, des instruments et de l'équipement. Ils se forment sur les surfaces et les recoins des chaînes de production (Burin, 2002).

I. 2. Biofilms « positifs »

Les bactéries lactiques peuvent être utilisées comme d'autres flores pour coloniser les surfaces en contact avec les aliments et empêcher ainsi l'implantation des microorganismes pathogènes. Cette voie de maîtrise de la bio-contamination, dite des « biofilms positifs », a fait l'objet de nombreuses études depuis une dizaine d'années (Garry *et al.*, 2008). On peut citer quelques exemples :

I. 2. 1. Exemple de *Lactococcus lactis*

La formation des biofilms par *Listeria monocytogenes* dans les environnements de transformation des aliments est devenue un sujet de préoccupation pour les fabricants de produits alimentaires. La capacité des cellules de *L. monocytogenes* à adhérer et à coloniser les surfaces inertes tels que le polypropylène, le caoutchouc, l'acier inoxydable et le verre, est maintenant bien établie (Mariani *et al.*, 2011). Par ailleurs, le rôle de biofilms « positifs » composés d'une souche de *Lc. lactis*, productrice de nisine, a été démontré dans l'inhibition de l'adhésion de cette espèce sur les surfaces inertes (Berche *et al.*, 2000).

I. 2. 2. Exemple de *Staphylococcus sciuri*

Dans certaines industries agroalimentaires, la colonisation des surfaces par des bactéries saprophytes peut être utile afin de créer une compétition avec des bactéries d'altération ou pathogènes. Ainsi, certaines souches de *S. sciuri* inhibent l'adhésion et la croissance de *L. monocytogenes* sur l'acier (Planchon, 2006).

I. 2. 3. Exemple de *Brevibacterium linens* et *Staphylococcus xylosus*

Les matériaux en contact avec les aliments sont exposés à de nombreux microorganismes (bactéries, levures...). Lorsque les bactéries sont non pathogènes, la colonisation de la surface par ces bactéries peut être utile. Il s'agit par exemple de l'utilisation de *Brevibacterium linens* ou de *S. xylosus* dans les salles d'affinage des fromageries. Ces bactéries rendent la croûte de certains fromages rouge et odorante (Bulard, 2012).

I. 2. 4. Exemple de *Streptococcus thermophilus*

Les patients après laryngectomie due à une tumeur maligne du larynx doivent respirer à travers une trachéotomie et recevoir une prothèse vocale pour rééducation de la parole. Mais la surface hydrophobe des prothèses fabriquées en caoutchouc devient colonisée rapidement avec un biofilm épais, constitué d'une variété de souches de bactéries et de levures (Busscher *et al.*, 1997).

Il existe des preuves anecdotiques chez les patients qui consomment du yaourt dont la présence des deux souches probiotiques à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, peuvent interférer avec l'adhérence des levures au caoutchouc notamment *Candida* spp. La libération de biosurfactants par la souche *Streptococcus thermophilus* a été efficace pour réduire l'adhérence des souches de *Candida albicans*. Ainsi ces biosurfactants constituent une barrière empêchant à une post-adhésion par d'autres souches (Busscher *et al.*, 1997).

I.2.5. Exemple de *Lactobacillus sakei* 1

Il a été démontré que *Lb. sakei* 1 et sa bactériocine « la sakacine 1 » pourrait être efficace pour inhiber les premiers stades d'adhésion de *L. monocytogenes* sur les surfaces en acier inoxydable (Winkelstroter *et al.*, 2011).

Ainsi la capacité d'adhésion des cellules de *L. monocytogenes* à l'acier inoxydable a été étudiée en co-culture avec *Lb. sakei* 1, productrice de sakacine 1. Les résultats obtenus ont montré que la population des cellules adhérentes de *L. monocytogenes* était réduite de 10^3 UFC/cm² en présence de *Lb. sakei* 1 (Winkelstroter *et al.*, 2011).

I. 3. Etapes de formation des biofilms

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (Parot, 2007). La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes (Fig.01) (Roux et Ghigo, 2006) :

I. 3. 1. Formation du film de conditionnement et transport de la bactérie au contact du support

Après le conditionnement très rapide de la surface, les bactéries se déplacent dans le milieu liquide grâce à la force du flux, à la gravitation et/ou aux mouvements de leurs flagelles.

I. 3. 2. Adhésions initiales réversible (non spécifique) et irréversible (spécifique)

Une fois que les bactéries sont au voisinage d'une surface, des forces d'attraction physicochimiques interviennent et conduisent à une interaction réversible avec la surface.

A mesure que les cellules se divisent, le nombre de bactéries associées à la surface augmente et l'adhésion devient irréversible. Cette transition vers une adhésion irréversible correspond à la synthèse de structures à la surface de la bactérie, qui s'accompagne d'une profonde modification du profil d'expression des gènes.

Les bactéries forment alors des amas à la surface et produisent des exopolysaccharides.

I. 3. 3. Colonisation du support et formation de microcolonies

La troisième étape est caractérisée par la formation de microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et de bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation.

I. 3. 4. Maturation du biofilm

Le stade de maturation correspond au développement des microcolonies et à la structuration du biofilm : les microcolonies se développent en piliers d'épaisseur variable au sein desquels les cellules sont englobées dans la matrice extracellulaire.

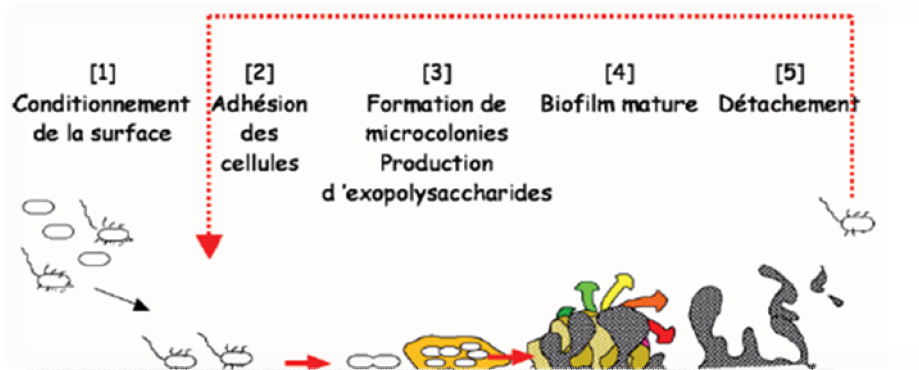


Figure 01. Modèle représentant les étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Roux et Ghigo, 2006).

I. 3. 5. Détachement et dispersion

Les espaces séparant les microcolonies deviennent les canaux du biofilm à l'intérieur desquels les fluides nutritifs peuvent circuler. Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm mature et rentrer dans la phase de dissémination. Cette dernière étape permet la colonisation de nouvelles surfaces (Roux et Ghigo, 2006).

I. 4. Facteurs influençant la formation d'un biofilm

L'affinité avec laquelle la bactérie adhère à un support est influencée à la fois par les caractéristiques du support et par les propriétés de surface de la cellule bactérienne (Planchon, 2006).

L'adhésion initiale des microorganismes à la surface d'un matériau est un phénomène physicochimique contrôlé par des interactions physicochimiques agissant à longue et à courte distance ainsi que des forces hydrodynamiques (Marconnet, 2007).

Etant donné l'importance du processus d'adhésion dans la formation des biofilms, il est nécessaire de connaître les paramètres qui l'influencent, afin de pouvoir chercher les mesures préventives à leur formation. Ces paramètres peuvent se résumer en facteurs liés aux microorganismes, au support et à l'environnement (Tableau I) (Boutaleb, 2007).

Tableau I. Principaux paramètres influençant l'adhésion des microorganismes aux surfaces (Boutaleb, 2007).

Facteurs liés au support	Facteurs liés aux microorganismes	Facteurs liés à l'environnement
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Contaminations organiques ; ✓ Film de conditionnement ; ✓ Nature chimique de la surface ; ✓ Rugosité et « microtopographie » ; ✓ Charge de surface ; ✓ Balance hydrophobe/hydrophile. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Contaminations microbiennes ; ✓ Espèce ; ✓ Composition et structure de la surface cellulaire ; ✓ Caractéristiques physicochimiques de la surface microbienne (hydrophobie, charge); ✓ Phase de croissance (état physiologique) ; ✓ Adaptation phénotypique. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Temps de contact ; ✓ Température ; ✓ Force ionique et nature des sels ; ✓ pH ; ✓ Concentration des éléments nutritifs ; ✓ Conditions hydrodynamiques.

II. Bactéries lactiques

II. 1. Composition et structure de la surface cellulaire

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, se présentant sous forme de coques ou de bacilles (Baliarda, 2003). La paroi cellulaire constitue la structure vitale de la bactérie. La paroi des bactéries à Gram positif est constituée seulement d'une couche homogène de peptidoglycane (muréine ou mucopeptide) de 20 à 80 nm d'épaisseur. Différentes structures se greffent sur le peptidoglycane (30 à 50%) tels que les acides teichoïques, les polysides ou des protéines. Quant à son rôle au niveau de l'adhésion, les interactions physicochimiques entre un support donné et une bactérie font intervenir les fonctions chimiques exposées à leur surface qui détermineront leur caractère extérieur apparent (acide ou basique, hydrophobe ou hydrophile...) (Boutaleb, 2007).

II.1.1. Acides teichoïques et lipoteichoïques

Ce sont les deuxièmes composés majeurs de la paroi des bactéries à Gram positif. Leur charge négative est essentielle pour maintenir et réguler près de la paroi une concentration en cations favorable. Ils ont un rôle majeur dans l'adhésion (Prisca et Ubbink, 2003).

Les acides teichoïques forment une classe diversifiée de substances dont la structure de base est un polymère linéaire d'un polyol (tel que le glycérol ou différents monosaccharides) reliés par des ponts phosphodiester. Quant aux acides lipoteichoïques, ils

correspondent à des glycosides qui sont ancrés dans la membrane cytoplasmique par leur queue lipidique (Prisca et Ubbink, 2003).

II. 1. 2. Protéines

Les protéines de surface les plus abondantes chez de nombreuses espèces de *Lactobacillus* sont les protéines de la couche S. Jusqu'à présent, la couche S a été retrouvée chez les espèces *Lb. brevis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. helveticus*, *Lb. amylovorus* et *Lb. gallinarum* mais pas chez d'autres espèces comme *Lb. johnsonii* et *Lb. gasseri* (Prisca et Ubbink, 2003).

Pour les bactéries à Gram positif, la couche S est située à la périphérie du peptidoglycane. Cette dernière est constituée de petites protéines de 40 à 60 kDa avec généralement une structure tertiaire très stable. Les protéines de la couche S chez les lactobacilles sont fortement basiques avec un point isoélectrique $pH_i = 9$ (Prisca et Ubbink, 2003).

Les fonctions de la couche S sont encore peu connues, mais on peut la considérer comme une barrière filtrant permettant la concentration, dans un environnement proche, des molécules excrétées par la bactérie. Elle retient ainsi un certain nombre d'exo-enzymes qui vont pouvoir agir à la surface de la bactérie, par exemple dans le métabolisme des exopolysaccharides de surface (Boutaleb, 2007).

II. 1. 3. Polyosides

Les bactéries synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés en trois groupes selon leur localisation (Lahaye, 2006) :

- Les polysaccharides pariétaux (PP) ;
- Les polysaccharides capsulaires (CPS) ;
- Les exopolysaccharides (EPS).

En général, les bactéries lactiques produisent des polysaccharides hétérogènes neutres dont la composition en monomères varie peu et se résume souvent au glucose et au galactose. Les EPS sont très hydratés car ils peuvent fixer une grande quantité d'eau via des liaisons hydrogène. Leur composition et leur structure déterminent la conformation du biofilm; ils

jouent un rôle protecteur en recouvrant les cellules microbiennes formant ainsi le biofilm (Lahaye, 2006).

III. Acier inoxydable

Les aciers inoxydables ont été inventés il y a près d'un siècle par Monnartz en 1911. Ces derniers sont des matériaux très largement utilisés dans les applications où la résistance à la corrosion est un facteur important. Les aciers inoxydables ont une nature résistante à la corrosion, découlant de la présence d'un alliage de fer et de carbone principalement contenant 12% de chrome (Christiansen et Somers, 2006).

Ces aciers possèdent la propriété de matériaux métalliques inoxydables en raison de la formation d'un film mince riche en oxyde de chrome, invisible et adhérent. D'autres éléments peuvent être ajoutés pour conférer à l'alliage des caractéristiques spécifiques, dont le nickel, le molybdène, le cuivre, le titane, l'aluminium, le silicium et l'azote. Le carbone est habituellement présent en quantités de moins de 0,03% à plus de 0,1% dans certains types d'aciers martensitiques (Lartundo-Rojas, 2007).

Il existe de multiples nuances d'aciers dits «inoxydables» désignées, par la Normalisation Américaine AISI (American Iron and Steel Institute), «304», «304L», «316L», qui correspondent à des compositions différentes. Chaque nuance est préconisée pour certains types d'environnements, son utilisation dans d'autres environnements serait déconseillée car ceci pourrait entraîner une corrosion du matériau (Tableau II) (Demilly, 2006).

Tableau II. Types d'aciers inoxydables utilisés dans différents domaines rencontrant des contaminations avec certaines bactéries (d'après Demilly, 2006).

Applications	Microorganismes	Types de microorganismes	Aciers inoxydables
Industrie agroalimentaire	<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram (+)	AISI 304
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Gram (-)	AISI 316L*
	<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)	
Restauration collective	<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram (+)	AISI 304
	<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)	

(*) : Utilisé en cas d'exposition à des milieux chlorurés ou à des protocoles de nettoyage et de désinfection potentiellement corrosifs.

La famille des aciers inoxydables peut être décrite par une multitude de caractéristiques mais la manière la plus précise est en se référant à la structure cristalline qu'ils prennent après un traitement bien déterminé (Demilly, 2006) :

- Aciers ferritiques ;
- Aciers martensitiques ;
- Aciers austénitiques ;
- Aciers austénoferritiques.

III. 1. Aciers ferritiques

Les aciers inoxydables ferritiques sont des alliages binaires (fer/chrome) ou ternaires (fer/chrome/molybdène) avec une structure de type cubique centré. Leur teneur en chrome varie de 10,5 à 28 %, une teneur en carbone qui n'excède pas les 0,08 % et une teneur très faible en nickel < 1 %. On peut citer l'exemple de l'acier 430 (16 à 18 % de Cr) utilisé pour la fabrication des outils de cuisine (Lartundo-Rojas, 2007).

III. 2. Aciers martensitiques

Les aciers martensitiques sont souvent choisis autant pour leurs propriétés mécaniques que pour leur résistance à la corrosion. Au-delà d'un pourcentage de 16 % de chrome (avec du nickel), ils résistent à de l'eau de mer et à des atmosphères marines.

Les aciers les plus courants titrent 13 % de chrome avec au moins 0,08 % de carbone. Exemple d'utilisation : lames de couteaux de cuisine (Demilly, 2006).

III. 3. Aciers austénitiques

Présentant une grande dureté et une ténacité élevée, sont de loin les plus nombreux, en raison de leur résistance chimique très élevée et aussi de leurs bonnes caractéristiques mécaniques. Les aciers de type austénitique sont composés soit de chrome-nickel (Cr : 18 %, Ni : 10 %) tel que l'exemple de l'acier AISI 304 L, soit de chrome-nickel-molybdène (Cr : 18%, Ni : 10 %, Mo : 2 %) pour le type AISI 316 L. Ils sont très résistants à la corrosion grâce à la présence du chrome et du nickel (Texier, 2005).

Les aciers austénitiques sont largement utilisés en biotechnologies, pharmacie et industrie agroalimentaire.

III. 4. Aciers austénoferritiques

Ces derniers ont des propriétés intermédiaires entre les deux catégories précédentes et parmi eux se trouvent des alliages particulièrement aptes à la soudure et d'autres très résistants à la corrosion intergranulaire (Demilly, 2006).

Le choix de la nuance se fait selon le prix réduit, la bonne résistance mécanique, une résistance accrue à la corrosion, une longévité conséquente mais également une forte résistance à l'abrasion (Guillemot, 2006).

L'ensemble de ces propriétés fait de l'acier inoxydable un matériau de choix pour l'industrie agroalimentaire car il conservera ses qualités « hygiéniques » au fil des années (Guillemot, 2006).

Les nomenclatures les plus courantes et les domaines d'applications des différents types d'aciers sont présentés dans le tableau III.

Tableau III. Nomenclatures les plus courantes et domaines d'applications des différents types d'aciers (Mehanna, 2009).

AISI	AFNOR	Classification des nuances	Qualités de l'inox	Domaines d'utilisation
Américaine	Française			
1145	XC45	Au carbone	Faible résistance à la corrosion	Industrie pétrolière. Usage général.
403	Z6C13	Ferritique	Ductile, résistant à la corrosion dans un milieu neutre ou faiblement chloruré.	Industrie chimique.
304L	Z3CN18 09	Austénitique	Très bonne résistance à la corrosion, intergranulaire. Bonne soudabilité.	Industrie chimique peu agressive. Chaudronnerie. Tuyauterie. Usage général.
316L	Z6CND17 12	Austénitique	Acier au molybdène à très bas carbone. Très bonne résistance à la corrosion, intergranulaire et en milieu chloré et marin.	Chaudronnerie. Tuyauterie pour l'industrie chimique très agressive. La construction navale. L'accastillage.

Cette étude est réalisée au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

1. Origine des souches utilisées

16 souches de bactéries lactiques, nouvellement isolées à partir de matériel de traite utilisé dans deux fermes de la région de Bejaia (tableau IV), sont utilisées dans cette étude. L'appartenance au groupe des bactéries lactiques est basée sur l'aspect macroscopique sur géloses MRS et M17, l'aspect microscopique (cocci /bâtonnets), le Gram (Gram+) et absence de la catalase. Ces souches ont été identifiées par les tests phénotypiques classiques par M^{elle} AITOUALI F. (Doctorante LMA, Bejaia) (tableau IV).

2. Vérification de la pureté des souches utilisées

Les souches de bactéries lactiques, conservées dans le milieu de de Man, Rogosa et Sharpe (MRS, CONDA, Pronadisa, Espagne, annexe I) à 4°C, sont repiquées dans 5 ml de bouillon Trypticase-Soja –Yeast Extract (TSB-YE, Trypticase-Soja additionné de 0,6% d'extrait de levures, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, annexe I) puis incubées à l'étuve (Mettler, Allemagne) à 30°C/24 h.

3. Tests d'adhésion sur acier inoxydable

3. 1. Choix du support

Au cours de cette étude, les deux types d'aciers utilisés appartiennent à la classe austénitique. Il s'agit des aciers AISI 316L et 304L. Le type 316L contient du molybdène, absent de la composition du 304L, qui lui confère une résistance accrue à la corrosion en milieu chloré ; en dehors de cette différence, ils sont en tous points identiques.

Tableau IV. Origine et caractéristiques des souches de bactéries lactiques utilisées.

S	F	Matériel	Caractéristiques			
			Forme	Croissance à 44°C	Gaz/ glucose	Désamination de l'arginine
S ₁	F ₁	Bidon de 5 L utilisé pour la récolte de lait	Coques	(-)	(-)	/
S ₂	F ₁	Bidon récent de 15 L utilisé pour la récolte de lait	Bacilles	(-)	(+)	(+)
S ₃	F ₁	Manchons non utilisés de la machine à traire	Coques	(+)	(-)	/
S ₄	F ₁	Citerne de stockage de lait	Bacilles	(-)	(+)	(-)
S ₅	F ₁	Manchons non utilisés d'une machine à traire	Coques	(+)	(-)	/
S ₆	F ₁	Ancien bidon de 15 L utilisé pour la récolte de lait	Coques	(+)	(-)	/
S ₇	F ₁	Manchons utilisés de la machine à traire	Coques	(-)	(+)	/
S ₈	F ₁	Manchons utilisés d'une machine à traire	Bacilles	(-)	(-)	(-)
S ₉	F ₁	Bidon récent de 15 L utilisé pour la récolte de lait	Coques	(+)	(-)	/
S ₁₀	F ₁	Ancien bidon de 15 L utilisé pour la récolte de lait	Coques	(+)	(-)	/
S ₁₁	F ₁	Manchons utilisés de la machine à traire	Bacilles	(-)	(-)	(+)
S ₁₂	F ₁	Cuve utilisée pour le transport de lait	Bacilles	(-)	(+)	(-)
S ₁₃	F ₂	Cuve utilisée pour le transport de lait	Bacilles	(-)	(+)	(-)
S ₁₄	F ₂	Cuve utilisée pour le transport de lait	Bacilles	(-)	(-)	(-)
S ₁₅	F ₂	Manchons utilisés d'une machine à traire	Bacilles	(-)	(-)	(-)
S ₁₆	F ₂	Manchons utilisés d'une machine à traire	Bacilles	(-)	(+)	(-)

S. : Souche, F. : Ferme, (-) : caractère négatif, (+) caractère positif, / : caractère non recherché

3. 2. Procédure de nettoyage et de désinfection de l'acier

Dans le but d'éliminer les impuretés minérales et organiques présentes à la surface de l'acier, et de le désinfecter, les traitements suivants sont appliqués (Chavant *et al.*, 2002) :

- Emersion dans l'éthanol absolu pendant 10 min ;
- Lavage 10 min dans un détergent RBS 35;
- Rinçage dans de l'eau chaude (50°C) ;
- Rinçage 5 fois dans de l'eau distillée stérile ;
- Séchage au Four Pasteur (Heraeus GS geprufte sicherheit, Allemagne) ;
- Enrobage dans du papier aluminium ;
- Autoclavage à 120°C/20 min.

3. 3. Test d'adhésion sur acier

Les tests d'adhésion sur l'acier sont effectués selon le protocole suivant (Chavant *et al.*, 2002) : Après repiquage de 5 colonies caractéristiques dans le bouillon TSB-YE, les cultures obtenues au bout de 18 h à 30°C, sont centrifugées à 3000 g/20 min, à 4°C (centrifugeuse ROTINA 380R Hettick Zentrifugen, Allemagne). Après lavage, les culots bactériens sont remis en suspension dans un diluant Tryptone-Sel (TS, annexe I) stérile et fortement homogénéisés à l'aide d'un vortex (Vortex-Genic2, Allemagne).

Les coupons d'acier sont déposés dans des boîtes de Pétri puis recouverts avec les suspensions bactériennes et incubées à 30°C pendant 3 h. Après incubation, chaque coupon est lavé avec du TS stérile et les cellules sont détachées par agitation vigoureuse dans un erlen stérile contenant 10 ml de TS et des billes en verre stériles. Après agitation, un dénombrement des bactéries viables adhérentes est effectué en masse dans la gélose Trypticase-Soja (TSA, annexe I) après une période d'incubation de 48 h à 30°C.

1. Vérification de la pureté des souches utilisées

Les souches de bactéries lactiques, cultivées sur gélose TSB-YE, ont formé des colonies de même aspect : circulaires et lenticulaires, de petites taille (environ 1 mm de diamètre), de couleur blanchâtre ou laiteuse, de surface lisse légèrement bombée et d'un contour régulier, ce qui témoigne de leur pureté.

2. Test d'adhésion sur acier inoxydable

Dans le but d'étudier l'adhésion des souches de bactéries lactiques sur des surfaces inertes, des supports en acier (AISI 304L et AISI 316L) nettoyés et désinfectés ont été mis en contact avec des suspensions bactériennes pendant 3 h à 30°C dans une solution Tryptone-Sel (TS). Le nombre de cellules adhérentes (à t_{3h}) est ensuite déterminé, après détachement, par dénombrement sur gélose TSA-YE. Le nombre de cellules initial (à t_0) étant déterminé avant la réalisation du test (dénombrement).

Les résultats obtenus montrent clairement que les 16 souches testées adhèrent à l'acier inoxydable. Les taux d'adhésion vont de 10^2 UFC/ml à 10^6 UFC/ml. Etant donné que l'acier étudié est un acier usé ayant subi de nombreux nettoyages, permettant de mimer celui utilisé en industrie, ce dernier présente des crevasses susceptibles de contribuer à l'adhésion bactérienne. En effet, selon Van Houdt et Michiels, (2010) les propriétés de la surface de fixation sont des facteurs importants qui affectent et déterminent le potentiel de formation de biofilms par les cellules bactériennes. Les propriétés telles que la rugosité de la surface, et la vulnérabilité à l'usure peuvent influencer la capacité des cellules à adhérer à une surface particulière.

Egalement, Whitehead et Verran, (2009) affirment que l'adhésion primaire des cellules aux surfaces est dictée par un certain nombre de paramètres : Dans un environnement aqueux (liquide-solide), les cellules vont d'abord aborder une surface par des forces naturelles telles que la diffusion, la gravitation et le mouvement brownien. Cependant, une fois dans le voisinage d'une surface, les paramètres physicochimiques entrent en jeu et l'influence des forces Lifshitz-Van der Waals, des forces électrostatiques et des liaisons hydrogène va influencer l'approche des cellules et l'attachement par la suite à la surface. Il semble évident que la physicochimie, la chimie et la topographie ont une influence sur les propriétés du support. Cependant, les propriétés de la surface de la cellule doivent également être prises en considération.

2. 1. Adhésion sur l'acier 304L

Le dénombrement des bactéries viables et adhérentes sur l'acier inoxydable est effectué après une période de contact de 3 h, pour l'étude des premières étapes d'adhésion.

Après 3 h de contact (bactérie-support), les résultats obtenus montrent que l'adhésion des bactéries lactiques est un phénomène rapide. Cependant, les souches ont tendance à adhérer à l'acier à des taux différents. Le taux d'adhésion le plus élevé sur l'acier 304L est déterminé en comparant entre le nombre de cellules planctoniques et le nombre de bactéries adhérentes. Dans ce cas se sont les souches S₁₁ et S₁₅ qui ont la meilleure capacité d'adhésion (à partir d'un taux de départ de 8 log UFC/ml, 6 log UFC/ml de bactéries ont pu adhérer).

Les résultats des dénombrements des bactéries viables, cultivables et adhérentes en fonction du temps de contact sont présentés sur la figure 02.

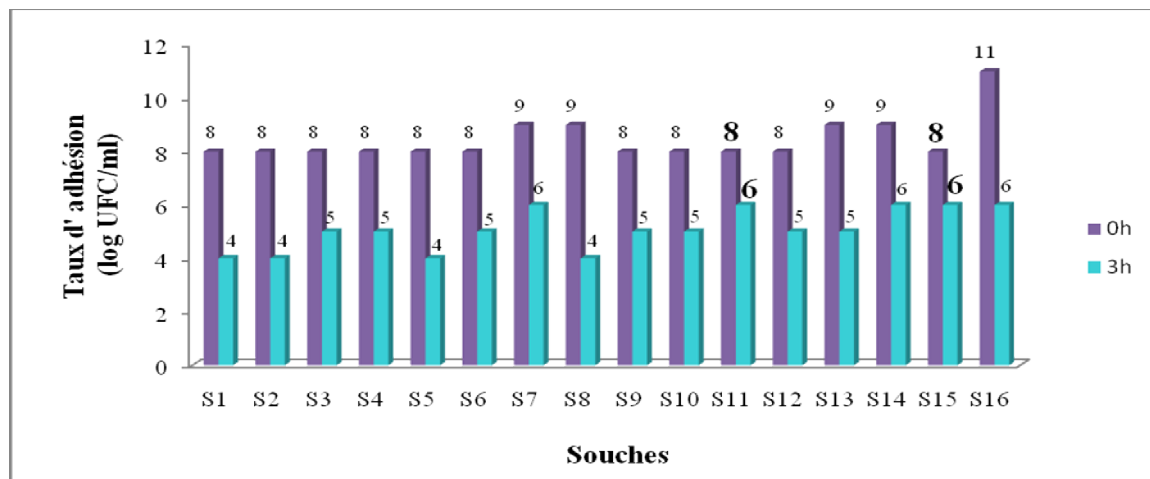


Figure 02. Taux d'adhésion des différentes souches de bactéries lactiques sur l'acier 304L.

En se basant sur les résultats obtenus dans les tests d'adhésion des souches sur l'acier 304L, il est observé que parmi les souches ayant un taux de départ de 8 log UFC/ml (S₁-S₆, S₉-S₁₂ et S₁₅), la meilleure adhésion est obtenue avec les souches S₁₁ et S₁₅ (de l'ordre de 6 log UFC/ml) et pour les souches ayant un taux de départ de 9 log UFC/ml (S₇, S₈, S₁₃ et S₁₄) celles qui adhèrent le mieux sont S₇ et S₁₄ (de l'ordre de 6 log UFC/ml).

Enfin la souche S₁₆ adhère à 6 log UFC/ml par rapport à un nombre de départ de 11 log UFC/ml.

Donc parmi toutes ces souches, les plus adhérentes sont S₁₁ et S₁₅, et les moins adhérentes sont S₈ et S₁₆.

D'après les résultats observés, il est à noter qu'au sein du même genre le taux d'adhésion est différent (cas observé avec les lactobacilles) vu que le taux le plus élevé est enregistré avec les souches S₁₁ et S₁₅ (lactobacilles) comme il peut être le plus faible avec S₈ et S₁₆ (lactobacilles). Cette différence de taux remarqué également au niveau des autres genres (lactocoques et entérocoques), pourrait revenir probablement aux propriétés de surface fonction de l'espèce tel que rapporté par Boutaleb (2007).

Vu que les souches lactiques utilisées sont des bactéries à Gram positif, elles possèdent une paroi cellulaire qui joue un rôle au niveau de l'adhésion grâce à ses composés tel que les acides teichoïques, protéines et polysaccharides. En effet selon Ibrahim *et al.* (2004) l'attachement des lactocoques aux surfaces inertes revient à leurs composants de surface, principalement les protéines et les polysaccharides, leur conférant un caractère hydrophile. Dans ce contexte, l'implication dans l'adhésion d'une protéine de paroi des lactocoques, PrtP (ayant une activité caséinasique) a été étudiée par ces auteurs, afin d'établir l'influence de cette dernière sur le rapport hydrophile/hydrophobe et le comportement bio-adhésif de *Lactococcus lactis*. L'ensemble de leurs observations suggère que l'expression de PrtP est évidente dans les produits laitiers et confère à ces derniers des propriétés physicochimiques de surface qui leur procurent un pouvoir adhésif plus grand sur des surfaces hydrophobes.

Leriche *et al.* (1999) ont observé qu'après un contact de 3 h de cellules de *L. monocytogenes* (taux de 10⁸ UFC/ml) avec un biofilm de 20 h d'une souche de *Lc. lactis* (productrice de nisine, taux de 10⁸ UFC/ml) sur l'acier 304L, seulement 10⁴ cellules viables/ml de *Listeria* ont pu adhérer.

Dans une étude réalisée par Planchon *et al.* (2006) *Staphylococcus xylosus*, une espèce utilisée comme ferment et convoitée pour sa capacité à former des biofilms positifs en industrie de charcuterie, a été étudiée sur l'acier 304L. Après 2 h de contact (bactérie-support) à 30°C en présence du TS, les résultats obtenus montrent que la souche adhère d'une manière importante (4,5.10⁷ UFC/ml) sur l'acier 304L avec un taux de départ de 9,5.10⁷ UFC/ml.

2. 2. Adhésion sur acier 316L

L'adhésion sur l'acier 316L pendant la même période de contact (3 h) montre que le nombre maximum de bactéries viables adhérentes est obtenu avec les souches S₄, S₁₃- S₁₅ (à partir d'un taux de départ de 8 log UFC/ml, 6 log UFC/ml de bactéries ont pu adhérer).

Les taux de bactéries viables adhérentes sont présentés sur la figure 03 ci-dessous.

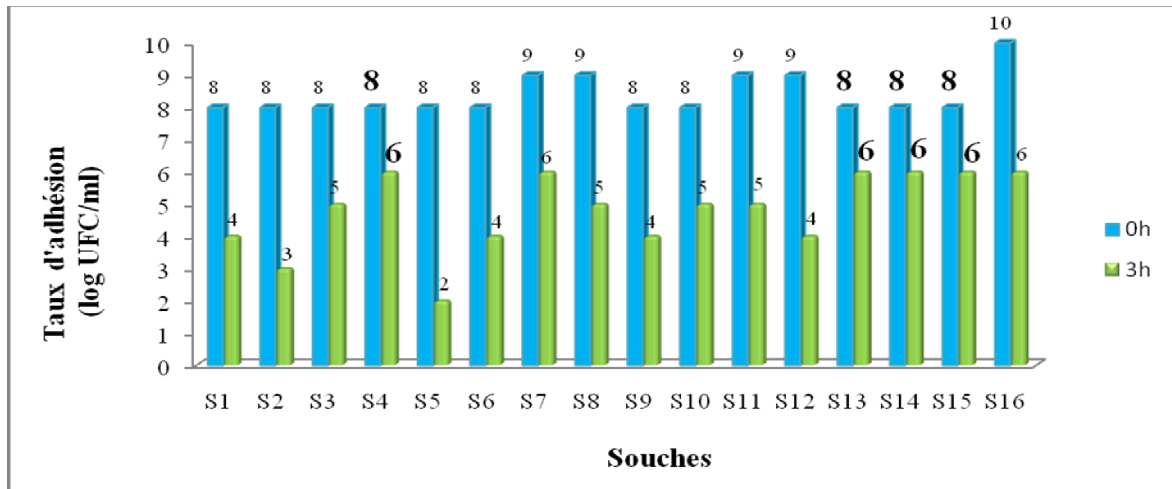


Figure 03. Taux d'adhésion des différentes souches de bactéries lactiques sur l'acier 316L.

Il est également notable que parmi les souches ayant un taux de départ de 8 log UFC/ml (S₁-S₆, S₉, S₁₀, S₁₃- S₁₅), la meilleure adhésion est obtenue avec les souches S₄, S₁₃-S₁₅ (de l'ordre de 6 log UFC/ml) et pour les souches ayant un taux de départ de 9 log UFC/ml (S₇, S₈, S₁₁ et S₁₂), la plus adhérente étant S₇ (de même ordre 6 log UFC/ml).

Enfin la souche S₁₆ adhère à un taux de 6 log UFC/ml avec un nombre de départ de l'ordre de 10 log UFC/ml.

Donc parmi toutes ces souches, les plus adhérentes sont S₄, S₁₃-S₁₅ (6 log UFC/ml) et les moins adhérentes sont S₅ (2 log UFC/ml) et S₁₂ (4 log UFC/ml).

Les mêmes remarques concernant la différence du taux d'adhésion au sein du même genre (lactobacilles, lactocoques et entérocoques) ont été observées sur l'acier 316L.

L'étude menée par Winkelstroter *et al.* (2011) concernant l'adhésion de *Lb. sakei* 1 sur l'acier inoxydable après un temps de contact de 3, 6, 9, 12, 24 et 48 h montre une adhésion dès les premières heures d'incubation (3 h); après 9 h, le taux est $>10^3$ UFC/cm² et de l'ordre de 3,1 log UFC/cm² après 48 h.

2. 3. Potentiel d'adhésion sur les deux types d'acier inoxydable

Afin de déterminer la capacité d'adhésion sur les deux types d'acier, le taux de bactéries lactiques non adhérentes est calculé et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 04 ci-dessous.

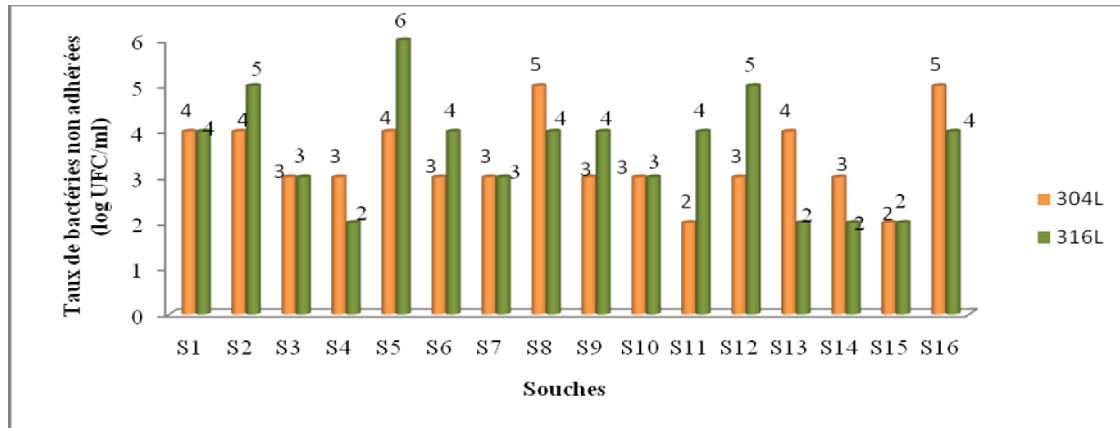


Figure 04. Taux de bactéries lactiques non adhérees sur les deux types d’aciers inoxydables.

Les résultats obtenus montrent que les souches S₁, S₃, S₇, S₁₀ et S₁₅ présentent le même taux d’adhésion sur les deux types d’aciers. Par contre les 5 souches (S₄, S₈, S₁₃, S₁₄ et S₁₆) présentent un taux de bactéries non adhérees plus élevé sur l’acier 304L par rapport à l’acier 316L (différences de : 1, 1, 2,1,1 log UFC/ml respectivement), alors que 6 souches (S₂, S₅, S₆, S₉, S₁₁ et S₁₂) présentent un taux de non adhérence plus élevé sur l’acier 316L par rapport à l’acier 304L (différences de : 1, 2, 1,1,2,2 log UFC/ml respectivement).

A priori, nous ne pouvons pas conclure à une différence de potentiel d’adhésion sur les deux types d’aciers. Seule une étude plus approfondie permettrait d’affirmer ou d’infirmes les résultats obtenus.

Les résultats obtenus montrent que :

- ❖ Toutes les souches testées ont une capacité d’adhésion sur les deux types d’aciers inoxydables ;
- ❖ Quelle que soit la souche étudiée, le nombre de bactéries viables cultivables est nettement inférieur au nombre de bactéries totales.

3. Discussion générale

Dans l’industrie agroalimentaire, l’adhésion de microorganismes contaminants sur les surfaces induit des effets néfastes notamment la contamination des produits alimentaires tout au long de la chaîne de fabrication et en restauration collective. Cependant, il existe une solution : les biofilms « positifs », ces derniers sont des microorganismes bénéfiques, parmi les mieux classés on a les bactéries lactiques qui répondent au statut GRAS.

Ces dernières sont des protecteurs susceptibles de modifier les propriétés physicochimiques des supports, avec pour conséquence positive, une altération de l'implantation de microorganismes planctoniques indésirables entrant à leur contact.

L'acier inoxydable est largement utilisé dans les industries alimentaires. L'un des principaux critères de son utilisation en relation avec les aliments est l'hygiène, un aspect en relation directe avec la rugosité de surface (Van Os, 2011).

Dans ce contexte, Leriche *et al.* (1999) ont rapporté que *L. monocytogenes* est capable de se fixer sur une variété de surfaces tels que les joints en acier inoxydable, en plastique et en caoutchouc et les résultats d'études épidémiologiques ont conduit à la conviction que l'adhésion et la croissance de *L. monocytogenes* sur les surfaces peuvent être régies par la présence d'autres microorganismes notamment les biofilms « positifs ».

D'après Zhao *et al.* (2004) le contrôle de *L. monocytogenes* (taux de 10^3 UFC/ml) sur des coupons en acier inoxydable à différentes températures 37, 15, 8 et 4°C par des biofilms préalablement établis sur les surfaces des installations de transformation des aliments révèle une activité anti-*Listeria* sous l'effet d'exclusion par des microorganismes concurrentiels principalement *Enterococcus durans*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* et *Lb. plantarum* (taux de 10^5 UFC/ml). Leurs résultats ont révélé qu'*Enterococcus durans* et *Lc. lactis* étaient fortement inhibiteur de *L. monocytogenes* (inhibition de la croissance $> 5 \log_{10}$ UFC/ml).

L'étude de Leriche et Carpentier, (2000) concernant la mise en place d'un biofilm limitant l'adhésion et le développement de *L. monocytogenes* sur les surfaces en acier inoxydable (AISI 304L), a montré que sur les dix biofilms monomicrobiens étudiés, la meilleure activité a été obtenue avec un *Staphylococcus sciuri* dont le biofilm présente des propriétés antiadhésives vis-à-vis de *L. monocytogenes* de part la nature de ses exopolysides. *Staphylococcus sciuri* peut aussi limiter la croissance de la bactérie pathogène grâce à la compétition pour les nutriments.

Enfin, il est évidant que l'industrie alimentaire est soumise à de sévères exigences en matière d'hygiène afin de lutter contre la prolifération indésirable des microorganismes (bactéries et moisissures). Cette prolifération s'organise notamment dans les microfissures et autres défauts, qui ne sont généralement pas visibles à l'œil nu. L'utilisation de bactéries lactiques comme biofilms positifs est un des moyens innovants de lutte contre les agents pathogènes.

Le nettoyage permet aussi de détacher d'une surface les souillures visibles ou invisibles, formées de molécules organiques et minérales pouvant s'y trouver. La tendance actuelle est l'utilisation de détergents capables d'éliminer la flore indésirable tout en préservant les biofilms « positifs » préalablement établis (Leriche et Carpentier, 2000).

Conclusion générale et perspectives

Les travaux mis en œuvre et présentés dans ce manuscrit font partie d'une recherche innovante qui s'intensifie au fil des années. La synthèse bibliographique a en effet montré que les connaissances sur les biofilms positifs en sont encore à leurs débuts et que ceux-ci suscitent un intérêt grandissant. L'essentiel des travaux actuellement menés s'attache à déterminer la capacité d'adhésion de souches de bactéries lactiques sur les surfaces des différents matériaux notamment l'acier inoxydable qui est le matériau de choix pour l'industrie agroalimentaire afin de lutter contre les agents pathogènes d'origine alimentaire.

Dans ce cadre, le présent travail réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, avait pour but d'étudier le potentiel d'adhésion de 16 souches lactiques sur deux types d'aciers AISI 304L et AISI 316L.

Les résultats obtenus indiquent que les 16 souches ont une capacité d'adhésion sur les deux types d'aciers. Mais la meilleure adhésion a été obtenue avec S₁₁ et S₁₅ (de l'ordre de 6 log UFC/ml) sur l'acier 304L. Alors que sur l'acier 316L le taux d'adhésion le plus élevé est obtenu avec les souches S₄, S₁₃, S₁₄ et S₁₅ (de même ordre de grandeur respectivement).

Egalement, les différences de taux d'adhésion observées démontrent la présence d'une variabilité entre les espèces et les souches au sein du même genre.

L'étude des 16 souches lactiques nouvellement isolées est la première réalisée au niveau du laboratoire, elle reste donc préliminaire. Des études plus approfondies sont envisagées et en cours de réalisation dans le but de :

- ❖ Répéter les tests et étudier la signification des résultats obtenus (études statistiques) ;
- ❖ Déterminer la nature et les propriétés physicochimiques de surface des souches bactériennes et de l'acier utilisés dans les tests d'adhésion afin de comprendre les interactions bactérie-support ;
- ❖ Etudier l'effet inhibiteur des biofilms formés sur acier par ces souches lactiques à l'égard de souches pathogènes d'origine alimentaire.

B

- **Baliarda A.** (2003). Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologique et génétique. Thèse de Doctorat. Spécialité Sciences des Aliments et Nutrition. Ecole Doctorale des Sciences du Vivant, Géosciences, Science de l'Environnement. Université de Bordeaux 1, Bordeaux, p18. 175p.

- **Berche P, Brisabois A, Catteau M, Flandrois J.P, Labadie J.C, Labadie J.C, Rocourt J, Salvat G, Vaissaire J, Vaillant V, Vidon D, Vranckx R.** (2000). Rapport de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*. <<http://www.ladocumentationfrancaise.fr/var/storage/rapports-publics/054000123/0000.pdf>> p32. 144p. (accessed 25.03.13).

- **Boutaleb N.** (2007). Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de Doctorat en Chimie. Université de Bretagne-Sud, Bretagne, pp. 6-31. 174p.

- **Bulard E.** (2012). L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire. Thèse de Doctorat en Physique. Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay ISMO. Université Paris-Sud, Paris, p9, 185p.

- **Burin M.** (2002). Les biofilms. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Ecole National Vétérinaire d'Alfort, Faculté de Médecine de Créteil, Paris, pp. 5-10. 79p.

- **Busscher H.J, Hoogmoed C.G, Geertsema-Doornbusch G.I, Kuijl-Booij M, Mei H.C.** (1997). *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on Silicone Rubber. Appl. Environ. Microbiol. 63(10), 3810-3817.

C

- **Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, Bellon-Fontaine M.N, Hebraud M.** (2002). Physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. Appl. Environ. Microbiol. 68(2), 728-737.

- **Christiansen T, Somers M.** (2006). Caractérisation de l'acier inoxydable après trempe superficielle à basse température. Revue de Matérialographie Struers. 9, 2-17.

D

- Demilly M. (2006). Cinétique de détachement de microorganismes modèles adsorbés sur des surfaces d'acier inoxydable : Effet de la rugosité et de l'orientation cristallographique. Thèse de Doctorat en Biologie Cellulaire. Université de Joseph Fourier Grenoble I, Grenoble, pp. 12- 15. 139p.
- Dessaigne S, Herry J.M, Briandet R. (2008). Les biofilms microbiens, des écosystèmes structurés qui colonisent les surfaces. UBHM. Inra AgroParisTech. pp. 1-3.

G

- Garry P, Christieans S, Cartier P. (2008). Food biopreservation strategies. Int. J. Food Sci. Technol. 28, 327-334.
- Guillemot G. (2006). Compréhension des mécanismes à l'origine de l'adhésion de *Saccharomyces cerevisiae* sur acier inoxydable-Implications pour l'hygiène des surfaces en industrie agroalimentaire. Thèse de Doctorat. Spécialité : Microbiologie et Biocatalyse Industrielles. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse, pp. 18-60. 135p.

I

- Ibrahim M, Briandet R, Mistou M.Y, Chrétien A, Tremblay J, Kulakauskas S. (2004). Immobilisation des lactocoques. Revue Lait. 84, 103-114.

L

- Lahaye E. (2006). Rôle structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien. Thèse de Doctorat en Biologie .Université Bretagne Sud, Bretagne, pp. 15-17. 148p.
- Lartundo-Rojas L. (2007). Influence de l'adsorption de protéine (BSA) sur le comportement électrochimique et la composition de surface d'un alliage Fe-17 Cr en solution aqueuse. Thèse de Doctorat. Spécialité : Métallurgie et Matériaux. Université Paris VI, Paris, pp. 43-44. 180p.
- Larousse (2013). Dictionnaire "le petit Larousse illustré", Edition 2013, Jaques Florent 1904p.

- Leriche V, Chassaing D, Carpentier B. (1999). Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. Int. J. Food Microbiol.51, 169–182.
- Leriche V, Carpentier B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. J. Appl. Microbiol. 88, 594-605.

M

- Marchal M. (2010). Etude de biofilms bactériens arsénite- oxydants. Thèse de Doctorat. Ecole Doctorale des Sciences du Vivant. Université de Strasbourg, Strasbourg, pp. 46-47. 213p.
- Marconnet C. (2007). Influence de l'adhésion et de l'activité enzymatique du biofilm sur le comportement électrochimique des aciers inoxydables immergés en eaux de rivière. Thèse de Doctorat. Spécialité : Electrochimie-Biocorrosion, Ecole Centrale Paris, Paris, p47, 325p.
- Mariani C, Oulahal N, Chamba J.F, Dubois-Brissonnet F Briandet R. (2011). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. Food control. 22, 1357-1362.
- Mehanna M. (2009). Mécanismes de transfert direct en corrosion microbienne des aciers : Application à *Geobacter sulfurreducens* et à l'hydrogénase de *Clostridium acetobutylicum*. Thèse de Doctorat. Spécialité : Génie des Procédés et de l'Environnement. Université de Toulouse, Toulouse, p33. 203p.

P

- Parot S. (2007). Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanisme. Thèse de Doctorat. Spécialité : Génie des Procédés et de l'Environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, pp. 3-10. 247p.
- Planchon S. (2006). Aptitude de *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus xylosus* à former des biofilms. Etude d'une souche "biofilm-positif" par une approche protéomique. Thèse de doctorat. Spécialité : Sciences des Aliments. Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, pp. 10-21. 235p.

- **Planchon S, Gaillard-Martinie B, Dordet-Frisoni E, Bellon-Fontaine M.N, Leroy S, Labadie J, Hébraud M, Talon R.** (2006). Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Food Microbiol.*109, 88-96.

- **Prisca S.Z, Ubbink J.** (2003). The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations. *Biophysical Journal.* 85, 4076–4092.

R

- **Roux A, Ghigo J.M.** (2006). Bacterial biofilms. *Bulletin académique du groupe de Génétique des Biofilms, Institut Pasteur, Paris,* 159(3), 261-268.

T

- **Texier G.** (2005). Elaborations et caractérisations micro et nanostructurales d'alliages à base de titane à destination biomédicale. Thèse de Doctorat en Sciences des Matériaux, Option Métallurgie. Institut National des Sciences Appliquées de Rennes, Rennes, p26. 176p.

V

- **Van Houdt R, Michiels C.W.** (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.*109, 1117–1131.

- **Van Os T.** (2011). Le traitement de surface de l'inox en industries alimentaires et pharmaceutiques. <<http://fr.scribd.com/doc/76582922/Traitement-de-Surface-de-l-Inox-Aux-Industries-Aliment-a-Ire-Et-Pharmaceutique-Metallerie99-110>>. (accessed 25.05.13).

W

- **Whitehead K.A, Verran J.** (2009). The Effect of Substratum Properties on the Survival of Attached Microorganisms on Inert Surfaces. *Springer Series on Biofilms.* 4, 13-33.

- **Winkelstroter L.K, Gomes B.C, Thomas M.R.S, Souza V.M, Martinis C.P.** (2011). *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control.* 22, 1404-1407.

Z

- **Zhao T, Doyle M. P, Zhao P.** (2004). Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*70, 3996–4003.

Glossaire

Abrasion : Action fait d'abraser.

Abraser : User par frottement à l'aide d'abrasifs.

Accastillage : Ensemble des accessoires notamment de pont (manilles, poulies, taquets) que l'on trouve sur un navire de faible tonnage.

Alliage : Produit de caractère métallique résultant de l'incorporation d'un ou plusieurs éléments, métalliques ou non, à un métal.

Biofouling : Encrassement biologique, accumulation de microorganismes, plantes, algues sur toute surface humide.

Corrosion : Destruction progressive d'une substance, d'une surface par effet chimique : la corrosion des matériaux.

Détérioration : Action de détériorer ; fait d'être détérioré ; dégradation.

Ductile : Peut être étiré, allongé sans se rompre.

Laryngectomie : Ablation chirurgicale du larynx.

TIAC : Apparition d'au moins deux cas groupés similaire d'une symptomatologie, en général gastro-intestinal due à la consommation d'aliments contaminés par des microorganismes généralement des bactéries (*Salmonella*, Staphylocoques, *Clostridium*) et certains virus comme les rotavirus.

Topographie : Technique de représentation sur un plan des formes d'un terrain avec ses détails naturels ou artificiels.

Trachéotomie : Ouverture chirurgicale de la trachée au niveau du cou pour l'a mettre en communication avec l'extérieur au moyen d'une canule, lorsqu'il y a risque d'asphyxie.

(Larousse, 2013)

Annexe I. Composition des milieux de culture

Bouillon MRS (de Man Rogosa et Sharpe)

Composant	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1 ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate triammoniacale	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Eau distillée	Qsp 1L

pH 6,5

Pour milieu gélosé, ajouter 15g/l d'agar.

Bouillon TSB-YE (Trypticase-Soja Broth- Yeast Extract)

Composant	g/l
Peptone de caséine	17
Peptone de soja	3
Glucose	2,5
Phosphate dipotassique	2,5
NaCl	5
Extrait de levure	6
Eau distillée	Qsp 1L

pH 7

Pour milieu gélosé, ajouter 15g/l d'agar.

Solution TS (Tryptone-Sel)

Tryptone 1 g
Chlorure de sodium 9 g
Eau distillée 1 L

Résumé

La capacité d'adhésion des bactéries lactiques aux surfaces et la formation de biofilms positifs ont une importance majeure dans l'industrie agroalimentaire, en particulier dans les ateliers artisanaux. La formation d'un biofilm est déterminée non seulement par les caractéristiques de la cellule bactérienne mais aussi par la nature de la surface de fixation, et par des facteurs environnementaux. Ce travail a été entrepris afin d'étudier le potentiel d'adhésion de 16 souches lactiques, isolées de matériel de traite, sur un matériau largement utilisé en industrie agroalimentaire : acier inoxydable. Deux types d'aciers ont été étudiés : AISI 316L et 304L. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches lactiques sont adhérentes (2 à 6 log UFC/ml) sur les deux surfaces. Les souches avec le potentiel le plus élevé ayant été enregistré avec S₁₁ et S₁₅ (de l'ordre de 6 log UFC/ml) sur l'acier 304L et les souches S₄, S₁₃, S₁₄ et S₁₅ (de l'ordre de 6 log UFC/ml) sur l'acier 316L après un temps de contact de seulement 3 h et à 30°C. De plus, une grande variabilité a été obtenue entre les souches d'un même genre.

Mots clés : Biofilms, bactéries lactiques, adhésion, acier inoxydable, industrie agroalimentaire.

Abstract

Ability of lactic acid bacteria to adhere to surfaces and to form positive biofilms has major implications in a variety of food industries especially artisanal plants. The biofilm potential formation is not only determined by the bacterial cell characteristics but also by the nature of the attachment surface and by environmental factors. This work was undertaken in order to study the adhesion potential of 16 lactic acid bacteria strains isolated from milking equipment on the most used material in the food industry: stainless steel. Two types of steel were studied: AISI 316L and 304L. The results show that all the strains were adherent (2 to 6 log CFU/ml) with the best adhesion level registered with the strains S₁₁ and S₁₅ (about 6 log CFU/ml) on the 304L and the strains S₄, S₁₃, S₁₄ and S₁₅ (about 6 log CFU/ml) on the 316L stainless steels after only 3 h time contact at 30°C. Furthermore, a large variability was observed among strains of the same genus.

Keywords: Biofilms, lactic acid bacteria, adhesion, stainless steel, food industry.