

Sensibility and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from Algerian dairy plants to *Thymus ciliatus* (Desf) essential oil-based solutions.

(Sensibilité et diversité génétique des souches de *Bacillus cereus* isolées des laiteries Algériennes à des solutions désinfectantes de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* (Desf))

Auteurs: Amina Kalai-Hacini^{1*}, Fadila Malek¹, Leila Bousmaha-Marroki²

(1) *Université Abou Bekr Belkaid, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Département de Biologie, Tlemcen, Algérie.*

(2) *Université Djilali Liabès, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Sidi-Bel-Abbès, Algérie.*

***Corresponding Author; Email:** kalaiaamina@yahoo.com

Received 14 March 2018, Revised 15 April 2018, Accepted 27 May 2018

Résumé. Les biofilms de *Bacillus cereus* présentent un risque imminent pour la sécurité et la qualité des produits laitiers et provoquent des dommages économiques au niveau des laiteries; où les méthodes de contrôle conventionnelles deviennent inefficaces, nécessitant la recherche de nouvelles stratégies. Dans ce contexte, l'effet désinfectant et antibiofilm de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*(Desf.)*Benth.ssp.eu-ciliatus* (HTC) ont été évalués sur des souches de *B.cereus*; dont une souche de référence (ATCC11778) et 6 souches isolées à partir des laiteries de l'ouest de l'Algérie après avoir été identifiées et caractérisées par M13-PCR. Une étude comparative de l'effet de l'HTC ainsi que 3 composés phénoliques (catéchine, acide gallique et tannique) et 3 acides organiques (acide acétique, citrique et lactique) a été effectuée in vitro, séparément et en combinaison sur des cultures planctoniques de *B.cereus* et en biofilms. De même, des solutions de l'HTC en combinaison avec NaOH et HNO₃ ont été testées sur des biofilms formés. Utilisés seuls, l'HTC s'est révélée plus efficace que les agents antimicrobiens testés. En outre, sa combinaison avec le NaOH, le HNO₃ et l'acide acétique a augmenté son efficacité et éradiqué les biofilms à *B.cereus*. D'après ces résultats, l'utilisation de l'HTC peut être proposée comme une nouvelle approche naturelle pour prévenir la contamination par des récurrents génotypes de *B.cereus* dans les laiteries.

Mots-clés: *Bacillus cereus*- Huile de *Thymus ciliatus*- Désinfectant - Antibiofilm- laiterie.

Abstract. *Bacillus cereus* biofilms present an imminent risk to the safety and quality of dairy products and cause economic damage in dairy plants; where conventional control methods become ineffective, requiring the search for new strategies. In this context, the disinfectant and antibiofilm effect of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) *Benth.ssp.eu-ciliatus* (TCO) have been evaluated on *B.cereus* strains; including a reference strain (ATCC11778) and 6 strains isolated from dairy industries in the west of Algérie after being identified and characterized by M13-PCR. A comparative study of the effect of TCO as well as 3 phenolic compounds (catechin, gallic acid and tannic acid) and 3 organic acids (acetic, citric and lactic acid) was realised in

vitro, separately and in combination on *B.cereus* planktonic cultures and biofilms. Similarly, solutions of TCO in combination with NaOH and HNO₃ have been tested on established biofilms. Used alone, TCO has been shown to be more effective than the antimicrobial agents tested. In addition, its combination with NaOH, HNO₃ and acetic acid increased its effectiveness and eradicated *B.cereus* biofilms. According to these findings, the use of TCO can be proposed as a new natural approach to prevent contamination by recurring *B.cereus* genotypes in dairy plant.

Keywords: *Bacillus cereus*– *Thymus ciliatus* oil-Desinfectant- Antibiofilm- Dairy plant.

1. Introduction

Le groupe *Bacillus cereus* sensu lato renferme une large gamme d'espèces présentant une grande similarité phénotypique et génotypique [1]. Omniprésentes dans l'environnement, ces espèces sont considérées comme le principal problème microbiologique dans l'industrie laitière [2]. L'incrimination de *Bacillus cereus* est due à sa capacité de former des spores hydrophobes très résistantes aux traitements thermiques classiques comme la pasteurisation et aux systèmes de nettoyage en place appliqués [3], de plus ce germe présente un grand pouvoir d'adhésion aux surfaces inertes des équipements et des installations, favorisant ainsi la formation des biofilms[4]; un complexe multicellulaire dynamique qui permet aux bactéries de se lier entre elles et à une surface, en étant entourées d'une matrice protectrice composée d'une substance exopolymérique qui les protège des attaques extérieures[5]. Ces particularités rendent *B. cereus* difficile à éradiquer et affectent la sécurité, la fonctionnalité et la qualité des produits laitiers avec des risques potentiels pour la santé et des pertes économiques énormes [6,7].

En raison de l'impact économique et des préoccupations des consommateurs, l'accent est mis sur le développement de nouvelles stratégies de contrôle des biofilms. Cependant une recherche intensive d'alternatives naturelles a été développée ces dernières années, où les activités antibactériennes et antibiofilm de certains produits naturels et extraits végétaux, ont été étudiées afin d'être utilisés comme substituts des agents antimicrobiens synthétiques [8, 9,10]. En outre, une large gamme de composés phyto-chimiques tels que les acides tannique, gallique et les catéchines attirent des scientifiques dans plusieurs domaines [11]. En particulier, il a été démontré que ces molécules d'origine végétale ont des activités inhibitrices contre les pathogènes bactériens et fongiques d'intérêt alimentaire [12, 13]. D'autre part, les acides organiques comme l'acide acétique, citrique et lactique, naturellement reconnus comme des substances sans danger et approuvés comme additifs alimentaires, sont principalement utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme conservateurs, en raison de leur activité antibactérienne [14, 15].

L'objectif de ce travail est l'étude de l'effet antimicrobien et antibiofilm de l'huile essentielle du *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth ssp. *eu-ciliatus* (HTC) sur des souches de différents génotypes récurrents de *Bacillus cereus* isolées à partir des laiteries de l'ouest de l'Algérie. C'est une parmi de nombreuses espèces du *Thymus* qui poussent à l'état sauvage et qui sont largement utilisées en Algérie, une espèce endémique d'Afrique du Nord qui a montré une activité antibactérienne et antifongique significative [16]. L'effet de l'HTC est testé et comparé séparément et en combinaison avec d'autres agents naturels antimicrobiens, sur les souches de *B.cereus* à l'état libre et en biofilms formés in vitro. Afin de tester de nouveaux produits antimicrobiens. Des solutions désinfectantes à base de l'HTC à différentes concentrations en combinaison avec le NaOH, le HNO₃ et les acides organiques sont appliquées sur les biofilms de *B.cereus*.

2. Matériel et Méthodes:

2.1. Isolement et identification des souches de *B. cereus*:

25 souches appartenant à l'espèce *B.cereus* ont été isolées par des échantillonnages à partir des lignes de production d'une laiterie de l'ouest Algérien. Tous les isolats étaient des bâtonnets à Gram positif,

producteurs de spores, catalase positive, mobiles, produisent des réactions typiques sur le milieu MYP gélosé et des hémolysines sur la gélose au sang. 3 souches de ces 25 isolats, ont été sélectionnées pour un typage moléculaire plus précis, en fonction de leur origine et de l'aspect morphologique des colonies. La caractérisation phénotypique supplémentaire comprend la croissance à des températures variables [17]. Sur la base de l'identification phénotypique, six groupes ont été définis et leur identification au groupe *B. cereus* a été confirmée par une amplification des gènes de la sous-unité B de l'ADN gyrase (*gyrB*) selon Park et al [18], en utilisant la souche représentative de chaque groupe phénotypique. En outre, leur diversité génétique a été déterminée par le typage M13-PCR selon Guinebretière et Nguyen-The [19]. Malek et al [20] ont montré qu'il existe une très faible diversité génétique parmi les génotypes récurrents de *B. cereus* dans les laiteries Algériennes. Effectivement, selon les empreintes digitales de la M13-PCR, toutes les souches ont été assignées à un seul génotype. 3 souches sur six ont été sélectionnées pour des études ultérieures: Bc15, Bc23 et Bc32 et 3 souches du génotype M13-PCR dominant trouvées par ces auteurs (Bc03, Bc07 et Bc10) ont fait l'objet des mêmes investigations dans la présente étude. Une souche de référence *B. cereus* (ATCC11778) a également été incluse à des fins de comparaison. Ainsi, un total de 7 souches ont été retenues pour cette étude (Tableau 1).

Tableau 1: Typage moléculaire (M13-PCR) et affiliation phylogénétique des souches de *Bacillus cereus* isolées à partir des laiteries Algériennes. a : selon la classification des groupes phylogénétique déterminée par Guinebretière et al., (2008, 2010). ND : non déterminé.

| Origine des souches | Année | Génotype M13 | Group phylogénétique | Identification (%) ^a |
|---------------------------------------|-------|--------------|----------------------|---------------------------------|
| Segments de Pré-pasteurisation | | | | |
| BC3 | 2010 | B | Group III | 100 |
| BC7 | 2010 | A | Group III | 99.72 |
| BC10 | 2006 | A | Group III | 99.72 |
| Lait Reconstitué | | | | |
| BC15 | 2015 | C | ND | / |
| BC32 | 2015 | C | ND | / |
| Lait cru | | | | |
| BC23 | 2015 | C | ND | / |
| Souche de Référence | | | | |
| ATCC11778 | / | / | ND | / |

2.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents agents étudiés:

L'activité de 7 agents antimicrobiens : HTC (T2, fournie par Bousmaha et al [16], 3 composés poly-phénoliques : catéchine (290,27 g/mol, Sigma), acide gallique (188,14 g/mol, Biochem), acide tannique (1701,20g/mol, Biochem) et 3 acides organiques : acide acétique (60,04 g/mol, Biochem), acide citrique (192,14 g/mol, Prolabo) et acide lactique (90,08 g/mol, Biochem) ; a été déterminée par la méthode de diffusion sur disque [21]. Des cultures jeunes de *B. cereus* (10^5 ufc mL⁻¹) ont été étalées à l'aide des écouvillons stériles sur toutes les surfaces des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton (MH, Conda Pronadisa, Espagne) en raison de 15ml par boîte). Des disques stériles de papier wattman (6 mm de diamètre) ont été imprégnés de 10µL des solutions d'HTC (10, 30 et 60mg/mL-Tw80 à 10% v/v), des composés poly-phénoliques (10, 30 et 60 mg/mL) et des acides organiques (10, 50 et 100 mg/mL) en dilution dans l'eau distillée stérile (EDS), puis ils ont été placés sur la surface du MH gélosé. La gentamicine a été utilisée comme une référence positive de résistance pour les souches de *B. cereus* (2µg/mL) [22]. Des disques sans échantillons ont été utilisés comme contrôle négatif et imprégnés de 10µL d'EDS. Les boîtes ont été conservées à 4°C pendant 30min et incubées à 30°C pendant 24h. L'activité

antimicrobienne a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (ZI) de croissance en millimètres et comparé aux témoins. Toutes les déterminations ont été répétées trois fois.

2.3 Détermination de l'effet antimicrobien de l'HTC et des acides organiques:

La concentration minimale inhibitrice de l'HTC sur les souches de *B.cereus* à l'état planctonique (CMI) a été déterminée par la technique du contact direct en milieu gélosé [23]. Une émulsion initiale de l'HTC a été préparée à 0,1 g/mL dans l'EDS avec 10%(v/v) de Tween80 pour améliorer sa solubilité [16]. À partir de cette suspension mère, des dilutions décimales étaient réalisées dans Tw 80 à 10%(v/v). Le volume approprié de chaque dilution a été ajouté au milieu gélosé (MH) pour produire la gamme de concentration nécessaire de l'HTC (100-1000 µg/mL). Les solutions d'agar résultantes ont été mélangées et immédiatement versé dans des boîtes de pétri stériles. Les boîtes ont été ensuite inoculées avec un inoculum de *B.cereus* (10^5 ufc/mL). Toutes les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 24 h pour. Un contrôle de la croissance sans HTC, un contrôle du solvant et un contrôle de la stérilité ont été ensemencés. La gentamicine a été utilisée comme témoin de résistance pour les cellules de *B.cereus* à 2µg/ml [22]. Chaque test a été réalisé en triple.

Pour les acides organiques, les CMI ont été déterminées par la méthode de microdilution [24] selon la technique décrite par Nostro et al. [25] avec quelques modifications. Des solutions mères de chaque acide ont été préparées à 0.1g/ml puis diluées dans du bouillon MH à des concentrations variables (5000 - 50000 µg/mL) dans les puits des plaques en polystyrène, comprenant un contrôle de la croissance, du solvant et un contrôle de la stérilité. Ensuite, 10µL des cultures jeunes de *B.cereus* (10^5 ufc/mL) ont été inoculés dans chaque puits. Les plaques de microtitration ont été incubées à 30°C pendant 24h. Des tests de viabilité ont été réalisés par des cultures sur milieu Lysogeny solide (LB; 10g de tryptone, 5g d'extrait de levure, 5g de NaCl et 15g d'agar/litre). Pour les deux méthodes, les CMI ont été déterminées comme étant la concentration la plus faible de l'agent antibactérien ne démontrant aucune croissance bactérienne visible. Toutes les déterminations ont été effectuées en trois répétitions.

2.4 Détermination de l'effet antibiofilm de l'HTC et des acides organiques sur *B.cereus*:

L'activité antibiofilm exercée par HTC et les acides organiques sur les biofilms de *B.cereus* a été déterminée selon Nostro et al. [25] par la méthode de microdilution avec quelques modifications.

2.4.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices des biofilms (CMIB):

Des dilutions de l'HTC et des acides organiques ont été préparées dans les puits des plaques contenant du MHB (0,26 à 1,18 MIC pour l'HTC et de 0,11 à 1,43 MIC pour les acides organiques) puis inoculées avec 10µl des cultures de *B.cereus* standardisées. Après incubation à 30°C pendant 24h, les contenus des puits ont été jetés, lavés 3 fois avec de l'EDS et colorés pendant 15 min avec 200 µl de solution de cristal violet(CV) à 1%. Les puits ont été lavés 3 fois avec l'EDS puis vidés et laissés sécher. Les puits sans agents antibactériens ont servi de témoins positifs et le bouillon seul a servi de témoin négatif. La concentration la plus faible produisant une inhibition maximale du biofilm a été considérée comme la CMIB (absence de colorisation avec le CV) par rapport au témoin positif. Toutes les déterminations ont été répétées trois fois.

2.4.2 Détermination des concentrations minimales éradicatrices des biofilms (CMEB):

Tous les isolats de *B.cereus* ont été cultivés sous forme de biofilms de 24h dans les puits des plaques en polystyrène en inoculant 150µl de MHB avec 10µl de cultures de *B.cereus* (10^5 ufc/mL). Les plaques de microtitration ont été incubées pendant 24 h à 30°C, les cellules en phase planctonique ont été aspirées doucement et les puits lavés avec de l'EDS. Les agents antimicrobiens sont dilués dans le MHB à des concentrations allant de la MIC à 8 MIC pour chaque extrait. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 20 Min et 24h pour l'HTC afin d'estimer l'effet du temps de contact, et pendant 20 Min à 30°C pour les acides organiques. Les cellules adhérentes restantes ont été récupérées à partir de chaque puits et

dénombrées sur le milieu LB solide. Deux témoins de biofilms consistant en milieu MHB et MHB additionné des agents antibactériens ont été inclus. Les données de trois répétitions ont été évaluées.

Dans le même contexte et par la même technique ; L'effet antibiofilm des solutions désinfectantes à base d'HTC en combinaison avec les acides organiques a été évalué sur les biofilms de 24h de 2 souches de *B.cereus* (Bc10 et Bc32) représentatives des deux génotypes étudiés et retenues en fonction de leur résistance aux traitements préalablement effectués. L'HTC est incorporée à des concentrations croissantes (de 0.5 CMI, CMI, 2 CMI et 3 CMI) dans 0.5% TW 80(v/v) tout en fixant la concentration de chaque acide organique à 1% [26]. Les données de trois répétitions ont été évaluées. La CMEB a été déterminée comme la plus faible concentration à laquelle aucune croissance bactérienne ne s'est produite après dénombrement des cellules viables sur milieu LB solide.

2.5 Sensibilité des biofilms à *B.cereus* formés sur l'acier inoxydable aux solutions désinfectantes à base de l'HTC:

2.5.1 Formation des Biofilms:

Les biofilms de *B.cereus* ont été formés in vitro sur des lames d'acier inoxydable A.I.S.I 304 découpées dans des dimensions de (5x1 cm) puis traitées selon Peng et al [27]. Ces lames sont submergées dans un mélange d'éthanol et d'acétone (v/v) durant 1 heure, puis rincées à l'EDS et submergées dans une solution de NaOH (40g/mol, Sigma-Aldrich) à 2 % pendant 5 min à 75°C. Un rinçage intermédiaire des lames à l'EDS est effectué, puis elles sont submergées de nouveau dans une solution de HNO₃ (63.01g/mol, Sigma-Aldrich) à 1% pendant 5min à 75°C). Enfin elles subissent un dernier rinçage à l'EDS. Après séchage à l'air libre, un carré d'un cm² est délimité sur la surface de chaque lame. Les lames d'acier inoxydable traitées sont enveloppées puis stérilisées. Les biofilms sont réalisés in vitro selon Maris in Larpent [28]; 100µl des cultures de *B.cereus* sur bouillon LB (10⁷ ufc/ml) sont inoculés sur la surface délimitée des lames, puis incubés à 30°C pendant 3 heures pour favoriser l'adhésion des cellules, les lames sont par la suite rincées à l'EDS pour éliminer les cellules qui n'ont pas adhérentes et inoculées avec 100µl de LB bouillon puis incubée à 30°C pendant 24h, permettant ainsi la formation des biofilms.

2.5.2 Traitement des biofilms par les solutions désinfectantes à base de l'HTC:

Pour vérifier l'efficacité de l'HTC sur des biofilms de *B.cereus*, cette dernière est évaluée après l'application d'un traitement de nettoyage en place classique (NEP) identique à celui effectué au niveau des laiteries algériennes ; Où les biofilms de *B.cereus* (Bc10 et Bc32) âgés de 24h formés sur les lames en acier inoxydable sont d'abord rincés à l'EDS, puis traités d'une part par un traitement alcalin (NaOH 2%, à 80 °C pendant 10 min) et d'une autre par l'application d'un NEP consistant en un lavage alcalin (NaOH à 2% à 80°C pendant 10 min) puis un rinçage à l'EDS froide, suivi d'un lavage acide (HNO₃ à 1% à 70°C pendant 5 min) et un rinçage final à l'EDS froide. L'HTC est appliquée après chaque traitement en dilution à la CMI (dans Tw 80 à 10%) à 30°C durant 20 min. Les lames sont rincées à l'EDS. Les cellules adhérentes sont récupérées par écouvillonnage à partir des surfaces inoculées et dénombrées sur milieu LB solide afin d'estimer La charge initiale et après désinfection des biofilms. les résultats de 3 répétitions ont été évalués.

Les solutios désinfectantes à base de l'HTC en dilution dans des solutions alcalines et acides [26] ont été testés sur les biofilms (Bc10 et Bc32) de 24h formés sur les lames en acier inoxydable afin d'estimer la ou les bonnes combinaisons permettant une meilleur inhibition ou une éventuelle éradication. L'HTC a été appliquée à plusieurs concentrations en dilution dans deux types de solutions: l'HTC à la CMI en dilution dans NaOH à 1%/Tw 80 à 0.5% (v/v), l'HTC à 2CMI en dilution dans NaOH à 1%/Tw 80 à 0.5% (v/v), l'HTC à la CMI en dilution dans NaOH à 2%/Tw 80 à 0.5% (v/v), l'HTC à la CMI en dilution dans HNO₃ à 1%/Tw 80 à 0.5% (v/v) et l'HTC à 2CMI en dilution dans HNO₃ à 1%/Tw 80 à 0.5% (v/v). Tous les traitements ont été appliqués à 30°C pendant 20min. En se basant sur les résultats obtenus, les combinaisons ayant permit un grand effet inhibiteur sur les biofilms de 24h, ont été appliquées sur des biofilms de 7 jours. D'après sa résistante aux différents traitements, Bc32 a été retenu pour cette partie de

l'étude. Toutes les épreuves ont été réalisées à 30°C pendant 20 et 40 min. En quantifiant le nombre des cellules viables en biofilms après la désinfection, l'effet de chaque solution désinfectante a été exprimé en tant que réduction logarithmique. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

2.6. Analyse des données:

Le test t de Student au seuil théorique de la probabilité $P=0,05$ a été utilisé pour étudier la signification de toutes les déterminations réalisées dans cette étude. Toutes les investigations ont été considérées comme significatives avec des valeurs de P inférieures à 0,05. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel SPSS version 24.

3. Résultats:

3.1 Typage moléculaire par M13-PCR:

Après électrophorèse sur gel des produits de M13-PCR (figure 1) pour chacune des 03 souches analysées (Bc15, Bc23, Bc32), un profil relativement identique des fragments d'ADN a été obtenu (figure1). Ainsi, tous les isolats ont été facilement classés en un seul génotype M13. En se basant sur la confirmation au groupe *B.cereus* par une amplification des gènes de la sous-unité B de l'ADN gyrase (*gyrB*) et des températures de croissance citées pour chaque espèce comme décrit dans Guinebretière [17]; on peut affilier ces souches au groupe phylogénétique III.

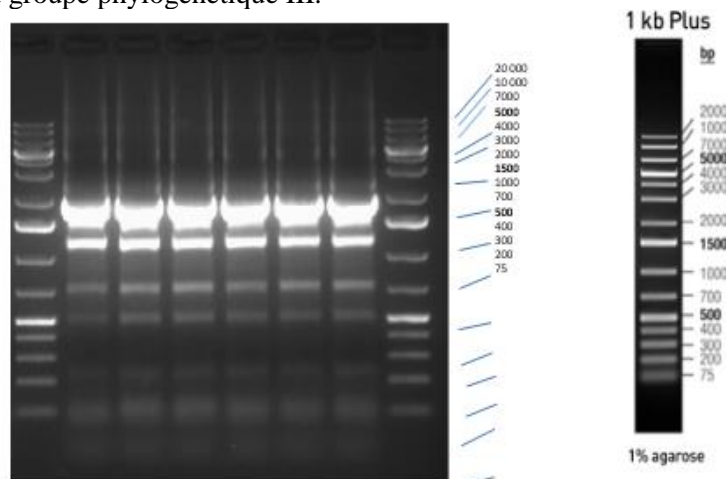


Figure 1: Les profils M13-PCR des souches de *B.cereus*. Bandes numérotées = souches identifiées. Bande M= Marqueur de masse moléculaire de l'AND (ADN Ladder, Thermo Scientific). adder, Thermo Scientific).

3.2 Effet antimicrobien et antibiofilm de l'HTC et les différents agents sur les souches de *B. cereus*:

D'après les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents agents étudiés sur les souches de *B.cereus*, l'HTC était visiblement plus efficace (ZI= 7,5-10,66mm à 10mg/ml et ZI= 11,5-20,66mm à 60mg/ml) que le reste des molécules testées; Suivi par l'acide acétique (ZI= 7.5-10.66mm à 10 mg/ml et ZI=11.33-18.33mm à 100 mg/ml) et l'acide tannique, qui ont exercé une activité modérément proche (ZI = 7,5-10,66mm à 10mg/ml ; ZI= 11,83-14,5 mm à 60mg/ml). L'acide citrique et l'acide lactique se sont révélés moins efficaces avec respectivement : ZI= 6-8mm, ZI= 6-9.66mm à 10mg/ml et ZI=6.5-16.16mm, ZI=7.16-15mm à 100mg/ml. Quand à la catéchine et l'acide gallique ils se sont montrés presque inactifs à 10 mg/ml (ZI = 6mm) et à 60 mg/ml avec respectivement ZI = 6-7.16mm et ZI=6-11.33) (figure 2, 3).

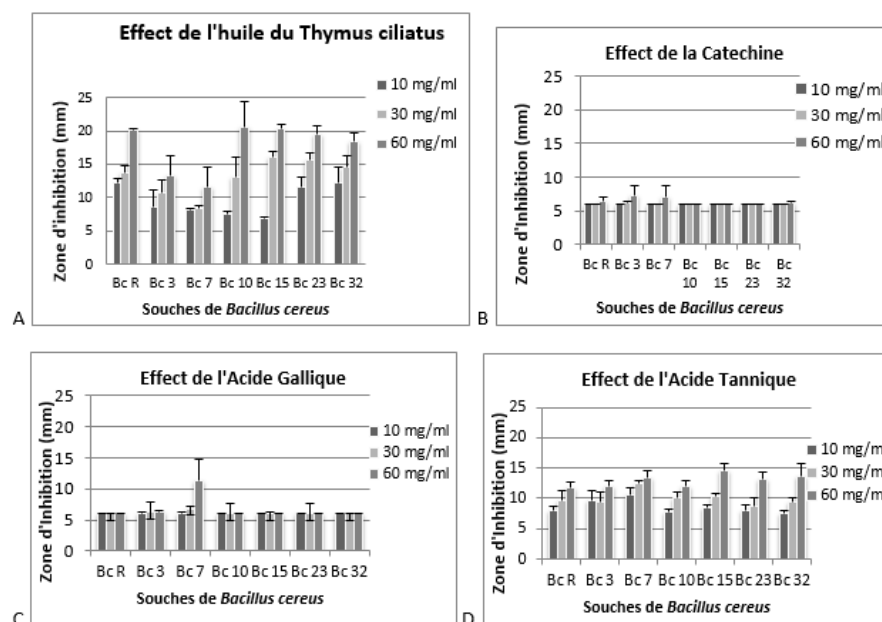


Figure 2: Détermination de l'effet antimicrobien de A: l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*, B: catéchine, C: acide gallique et D: acide tannique, sur les souches de *B.cereus* par la méthode des disques de diffusion. Les résultats sont équivalents à la moyenne de 3 répétitions; les barres d'erreur représentent l'écart-type

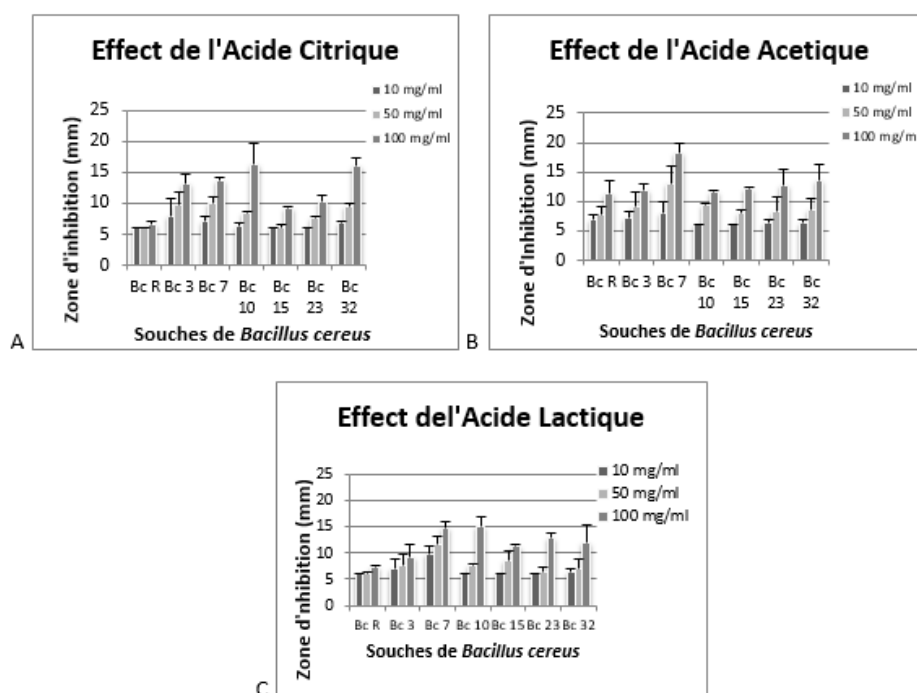


Figure 3: Détermination de l'effet antimicrobien de A: acide citrique, B: acide acétique et C: acide lactique, sur les souches de *B.cereus* par la méthode des disques de diffusion. Les résultats sont équivalents à la moyenne de 3 répétitions; les barres d'erreur représentent l'écart-type

Les données obtenues dans cette étude ont révélé un effet inhibiteur de l'HTC avec des CMI= 820-880 $\mu\text{g/ml}$ et CMIB=760 $\mu\text{g/ml}$ pour toutes les souches traitées; la CMEB a été confirmée à 5MIC après 20min et 24h de contact sauf pour le biofilm à Bc10 qui était le plus résistant avec BEC=6MIC à 20min et BEC=5MIC à 24h de contact. D'autre part, l'acide acétique s'est montré actif avec CMI=35-45 mg/mL et un effet antibiofilm distinct (CMIB=10-15 mg/mL, CMEB = 2CMI-4CMI). Or en utilisant l'acide citrique, les conditions optimales de l'inactivation des biofilms à *B.cereus* étaient : CMIB=20-30mg/mL;

CMEB=5CMI lorsque la CMI=35-40 mg/mL. Par ailleurs, l'application de l'acide lactique a révélé une faible activité antimicrobienne comparé au reste des acides organiques (CMI=45-50mg/ml) et un très faible effet antibiofilm (CMIB=35-50mg/ml; CMEB=5-7 CMI) (Tableau 2).

L'application des solutions désinfectantes à base de l'HTC à plusieurs concentrations (0.5CMI, CMI, 2CMI, 3CMI) en combinaisons avec les acides organiques à 1% sur des biofilms de Bc10 et Bc32 a montré que l'HTC en combinaison à 0.5CMI n'a pas d'effet inhibiteur sur les biofilms et exerce une activité moyenne (réduction logarithmique des cellules; Log N=1.56-3.94) à la CMI; Sauf pour l'acide acétique qui a potentialisé l'effet de l'huile (Log N=1.36 à 0.5CMI/Bc10 ; Log N=1.93 à 0.5CMI/Bc32). Tandis qu'à la CMI on a pu constater un effet inhibiteur meilleur (Log N=0.6 à CMI/Bc10; Log N=1.17 à CMI/Bc32) et éradiquant des biofilms en appliquant l'HTC à 2CMI et 3CMI. Quand au reste des combinaisons testées pour l'acide citrique et l'acide lactique l'HTC s'est révélée d'une activité inhibitrice moyenne à 2CMI et remarquable une fois appliquée à 3CMI. (Figure 4)

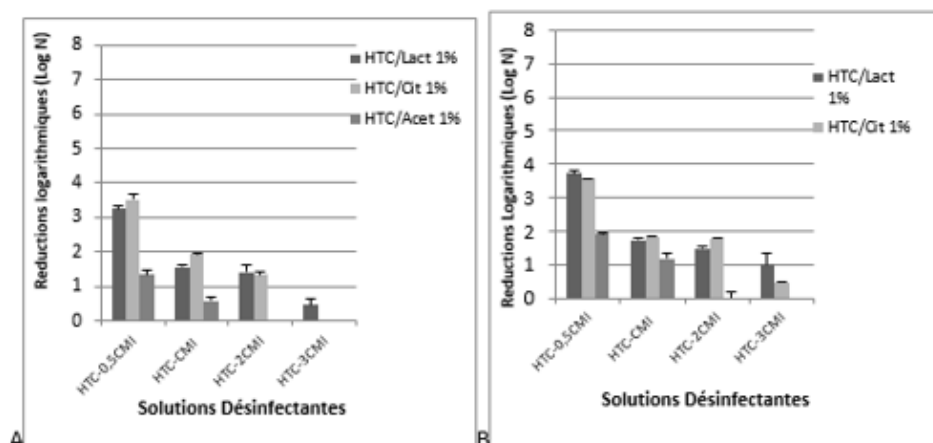


Figure 4: Résultats des traitements appliqués sur *B.cereus*10(A) et 32(B) en biofilm de 24h par des solutions à base de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* en combinaisons avec les acides organiques. Les résultats sont équivalents à la moyenne de 3 répétitions; les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Selon les résultats représentés dans la figure 5, les traitements classiques appliqués sur les souches de *B.cereus* ont entraîné une inhibition moyenne des biofilms (Log N=3.31/Bc10; Log N=3.39/Bc32) après le traitement au NEP et (Log N=3.23/Bc10; Log N=3.32/Bc32) après le traitement alcalin avec NaOH à 2%. D'autre part, l'application de l'HTC en dilution à CMI/Tw 80 à 10% après les deux traitements a amélioré la désinfection avec des réductions de 1.75Log/Bc10 et 1.92Log/Bc32 (HTC après NEP) et 1.56Log/Bc10 et 1.52Log/Bc32 (HTC après NaOH/2%). D'autre part, le traitement des biofilms de *B.cereus* avec l'HTC à la CMI en dilution dans des solutions de NaOH à 1 % et HNO₃ à 1 % a mené à une réduction remarquable des cellules adhérentes (Log N=3.09/Bc10 et Log N=3.31/Bc32 avec NaOH à 1 % ; Log N=0.67/Bc10 et Log N=0.97/Bc32 avec HNO₃ à 1 %). Alors qu'en dilution dans NaOH à 2%, l'HTC a éradiqué le biofilm (Log N=0) de Bc10 et diminué le nombre des cellules du biofilm à Bc32 (Log N=0.7). En outre, l'application de l'HTC à 2CMI en dilution dans NaOH à 1 % et HNO₃ à 1 % a éradiqué tous les biofilms sauf pour Bc32 ou on a enregistré une réduction de 0.37 Log (traitement avec HTC-2CMI/NaOH-1%).

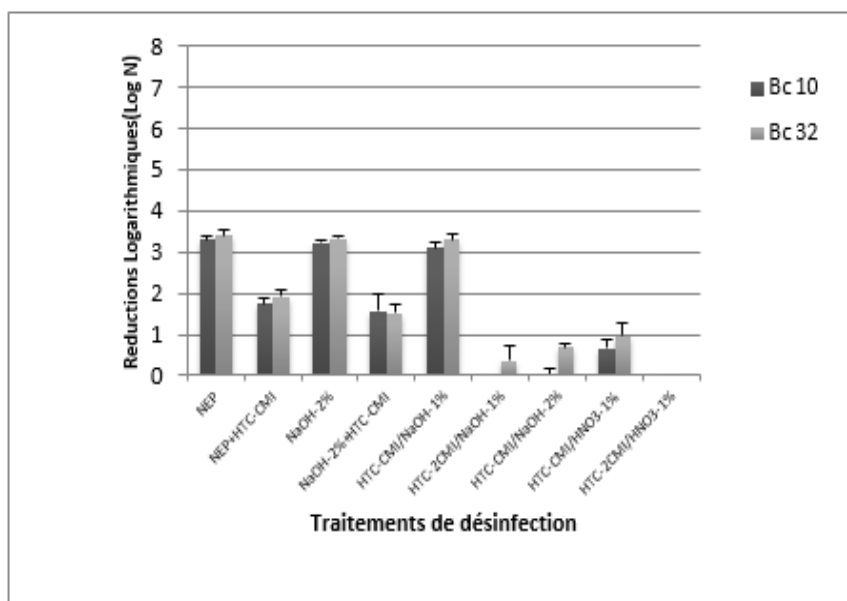


Figure 5: Résultats des traitements appliqués sur *B.cereus*10(A) et 32(B) en biofilm de 24h par application du système de nettoyage en place (NEP) et l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* HTC en dilution dans des solutions de NaOH et HNO₃. Les résultats sont équivalents à la moyenne de 3 répétitions; les barres d'erreur représentent l'écart-type.

L'application des solutions désinfectantes : HTC-2CMI/NaOH-1%, HTC-2CMI/HNO₃-1% et HTC-2CMI/Acet-1% sur les cellules de Bc32 en biofilms de 7 jours sur des lames en acier inoxydable à 30°C a révélé des résultats remarquables avec un effet inhibiteur important suite à l'augmentation du temps de contact. Or, on a pu enregistrer des réductions logarithmiques respectives de 3.87 et 2.43log après 20 et 40Min de contact (HTC-2CMI/NaOH-1%), un effet équivalent a été observé lors de l'application de l'HTC-2CMI/HNO₃-1% (Log N= 4; Log N=2.32). Quand au traitement avec l'HTC-2CMI/Acet-1%, les résultats indiquent une faible efficacité (Log N=3.9/20min; Log N=3.87/40min)(Figure 6).

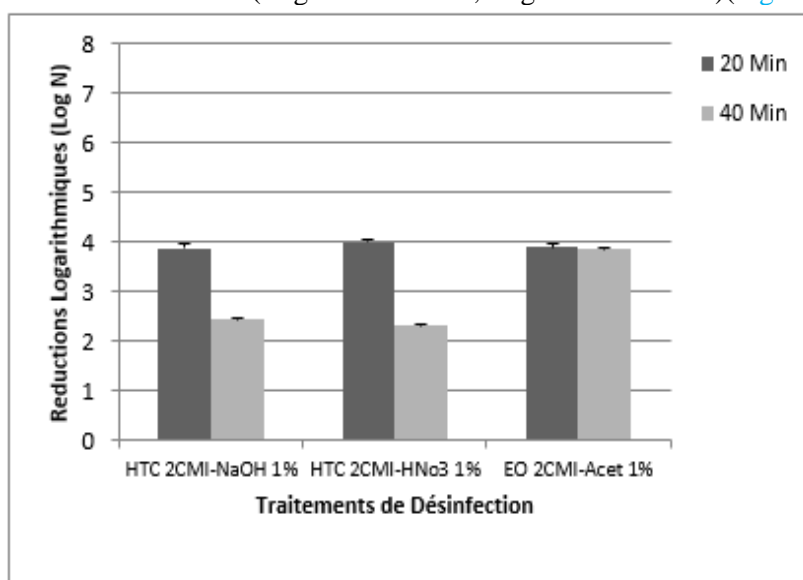


Figure 6: Résultats des traitements appliqués sur des biofilms à *B.cereus* 32 de 7 jours par l'application de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* (HTC) en combinaison avec: NaOH, HNO₃ et l'acide acétique durant 20 et 40 min. Les résultats sont équivalents à la moyenne de 3 répétitions; les barres d'erreur représentent l'écart-type.

4. Discussion

Un très faible niveau de diversité génétique a été identifié entre les souches de *B.cereus* malgré leurs origines différentes. Les souches isolées de la poudre de lait et celle du lait cru étaient similaires; Suggérant que *B.cereus* montre une diversité écologique avec des espèces étroitement apparentées génétiquement comme rapporté par Malek et al [20]. L'affiliation de ces souches au groupe phylogénétique III indique leur fort potentiel entérotoxique et leur implication dans le risque sanitaire par les intoxications alimentaires (généralement associée au syndrome diarrhéique) puisqu'elles ont été classés dans le groupe le plus cytotoxique [29]. D'après cette découverte et celles précédemment rapportées par Malek et al [20] et Cherif-Antar et al [30] il existe une sélection de ce groupe dans l'environnement des laiteries en Algérie. D'après les mêmes auteurs, les procédures de nettoyage et d'élimination classiques et les produits chimiques appliqués dans les industries laitières algériennes se sont révélés inefficaces sur l'adhérence et la formation des biofilms des bactéries à Gram positives telles que *B.cereus*. Ils peuvent même affecter l'hydrophobicité de la surface des spores et constituer des stratégies possibles par lesquelles ce germe persiste dans les lignes de production laitière [31].

Au cours des dernières années, la communauté scientifique a montré un considérable intérêt pour l'étude des composés antimicrobiens naturels en tant que sources de nouveaux composés inhibant la croissance microbienne [32] et influençant la formation des biofilms microbiens par différents mécanismes [25]. Certaines études ont prouvé que les extraits végétaux avaient un effet antimicrobien et pouvaient inhiber une vaste gamme d'espèces bactériennes Gram-positives et Gram-négatives [13]. Par contre, Mabe et al. [33] a rapporté que le gallate d'épigallocatechine de catéchine s'est révélé le plus fort des catéchines de thé testées contre *Helicobacter pylori* en inhibant 50% des souches (MIC=8mg/ml). Ce qui explique la résistance des souches traitées lors de la présente étude et la faible activité inhibitrice de la catéchine et l'acide gallique testé séparément aux trois concentrations testées (ZI=6-7mm/ catéchine, ZI=6mm/l'acide gallique). L'activité antimicrobienne modérée de l'acide tannique a été confirmée à une concentration supérieure à 30 mg/ml (ZI = 9,5 -12,33 mm) mais uniquement sur les cellules planctoniques, ce qui n'est pas intéressant à explorer sur la formation des biofilms étant donné la forte concentration trouvée. Alors que certains travaux indiquent que l'acide tannique peut être un agent adjuvant utile et suggérant que l'activité antibiofilm des tanins pourrait être le résultat de l'inhibition de la détection du quorum. [12].

Tableau 2 : Détermination de l'effet antimicrobien (concentration minimale inhibitrice,CMI) et l'effet antibiofilm (concentration minimale inhibitrice de la formation du biofilm, CMIB; concentration minimale éradicatrice du biofilm, CMEB) de l'Huile essentielle de *Thymus ciliatus*(HTC), l'acide Acétique (AA), l'acide Citrique (AC) et l'acide Lactique (AL) sur les souches de *B.cereus*.

| souches | HTC | | | AA | | | AC | | | AL | | |
|---------|-------------|----------|-------|-------------|----------|-------|-------------|----------|-------|-------------|----------|-------|
| | CMI (mg/ml) | CMIB | CMEB | CMI (mg/ml) | CMIB | CMEB | CMI (mg/ml) | CMIB | CMEB | CMI (mg/ml) | CMIB | CMEB |
| Bc3 | 0.880 | 0.86 CMI | 5 CMI | 45 | 0.22 CMI | 4 CMI | 35 | 0.57 CMI | 5 CMI | 50 | 0.8 CMI | 7 CMI |
| Bc7 | 0.880 | 0.86 CMI | 5 CMI | 40 | 0.37 CMI | 3 CMI | 35 | 0.71 CMI | 5 CMI | 50 | 0.9 CMI | 6 CMI |
| Bc10 | 0.880 | 0.86 CMI | 6 CMI | 40 | 0.37 CMI | 3 CMI | 40 | 0.62 CMI | 5 CMI | 50 | 0.8 CMI | 6 CMI |
| Bc15 | 0.820 | 0.93 CMI | 5 CMI | 45 | 0.33 CMI | 3 CMI | 40 | 0.62 CMI | 5 CMI | 45 | 1.11 CMI | 4 CMI |
| BC23 | 0.820 | 0.93 CMI | 5 CMI | 35 | 0.43 CMI | 3 CMI | 40 | 0.87 CMI | 5 CMI | 50 | CMI | 5 CMI |
| Bc32 | 0.820 | 0.93 CMI | 5 CMI | 40 | 0.25 CMI | 3 CMI | 40 | 0.62 CMI | 5 CMI | 45 | 1.11 CMI | 5 CMI |
| BcR | 0.840 | 0.9 CMI | 5 CMI | 35 | 0.29 CMI | 2 CMI | 40 | 0.75 CMI | 5 CMI | 50 | 0.7 CMI | 6 CMI |

D'autres travaux ont indiqué que les traitements par les acides organiques pourraient remplacer les traitements par le chlore en inhibant et éliminant des biofilms d'*E.coli* formés sur différentes surfaces en

contact avec les aliments [34]. Il paraît que ces traitements sont des alternatives potentielles sûres pour réduire le risque associé aux agents pathogènes dans les produits alimentaires et peuvent être utilisés comme désinfectant pour lutter contre les biofilms dans l'industrie laitière [35, 15]. De même, certains auteurs ont signalé que l'acide acétique est efficace à de faibles concentrations et ont décrit l'éradication complète des biofilms à bactéries Gram-positifs et négatifs [36]. Par contre les données obtenues dans cette étude ont révélé un potentiel antimicrobien moyen de l'acide acétique avec une CMI= 35-45 mg/mL. D'autre part Tsai et al. [35] ont montré que l'acide citrique pourrait éliminer plus de 99,999% des bactéries hétérotrophes et 99,95% des coliformes à 10 mg/ml pendant 60 minutes de contact. Alors que nos résultats ont montré une activité inhibitrice moyenne de l'acide citrique sur les souches de *B.cereus* (CMI=35-40 mg/ml). Par ailleurs, l'application de l'acide lactique s'est révélé le moins actif comparé au reste des acides organiques (CMI 45-50mg/ml). Effectivement, l'acide lactique est particulièrement efficace contre les bactéries à Gram négatif et inactif sur les bactéries à Gram positif mais son activité peut être améliorée par les surfactants ce qui donne une activité antimicrobienne à large spectre dans les produits nettoyants [37].

De nombreuses huiles essentielles présentent une activité antimicrobienne qui est évidemment due au carvacrol, l'un des terpènes les plus actifs contre les bactéries [38]. La nature antimicrobienne de l'HTC est apparemment liée à sa teneur élevée en composés phénoliques, en particulier le carvacrol (74,2%) [16], cette découverte est en accord avec un rapport antérieur où le carvacrol a été suggéré possédant des mécanismes biocides représentés par l'interaction de surface cellulaire microbienne dans la fuite des constituants intracellulaires, la perturbation de la membrane cytoplasmique et l'épuisement du pool d'ATP, la destruction des protéines membranaires, l'inhibition de la respiration cellulaire et des altérations du transport ionique, ce qui entraîne la mort des bactéries. [39, 40]. Il est considéré comme le meilleur inhibiteur de la production de masse de biofilm [41]. L'activité antibiofilm du carvacrol semble être liée aussi à l'interférence avec le quorum sensing bactérien puisque d'autres phénomènes induits par le QS sont également affectés [42]. La manière et les concentrations dont les huiles essentielles sont appliquées sont des facteurs importants liés à leur efficacité; pouvant être la cause des changements de saveur, d'odeur et autres caractéristiques des produits alimentaires. Or, des combinaisons ont été appliquées avec succès dans plusieurs expériences in vitro et ont montré que certaines espèces bactériennes pourraient être inhibées par une application directe sans affecter la qualité organoleptique des produits [43].

Les mécanismes des acides organiques et des huiles essentielles ont été largement étudiés. Cependant, une étude détaillée est nécessaire pour clarifier les mécanismes qui régissent la réaction entre ces deux classes d'agents antimicrobiens naturels. En se basant sur les résultats de la présente étude, l'application de la combinaison: acide acétique et HTC peut être une stratégie prometteuse qui nécessitera des recherches supplémentaires pour améliorer son efficacité contre les biofilms de *B.cereus* et affiner les conditions de son application dans les industries laitières.

Mattila et al [44] ont testé l'efficacité du traitement alcalin dans la chaîne de traite et ont montré que le NaOH seul pouvait être efficace contre les cellules en suspension mais ne pouvait pas enlever les cellules attachées à la surface pendant 5 min à température ambiante. Même si l'efficacité du nettoyage alcalin peut être améliorée en modifiant le temps, la température et les concentrations, il est évident qu'un traitement supplémentaire est nécessaire pour maintenir les conditions d'hygiène. Ces résultats concordent avec ceux qu'on a trouvé où l'effet du NEP et du NaOH a été amélioré par l'application de l'HTC. En se basant sur ces résultats on remarque aussi que le traitement des biofilms à *B.cereus* avec les solutions désinfectantes à base de l'HTC durant 20min à 30°C s'est montré très efficace et parfois éradiquant, indiquant l'effet synergique des associations. On peut déduire aussi que la dilution de l'HTC dans des solutions de NaOH à 2% et HNO₃ à 1% a augmenté son efficacité. Cette opportunité peut être utilisée par la suite pour contrôler la qualité et la sécurité du lait et des produits laitiers algériens et prévenir la contamination et l'apparition des maladies dues aux génotypes de *B.cereus* producteurs de toxines.

Le but de tester plusieurs souches dans cette recherche était d'estimer la diversité au sein des biofilms à *B.cereus* pour améliorer la prévention de la formation de ces derniers. Malheureusement, les 7 souches testées lors de l'expérimentation n'ont pas montré de diversité notable dans la réaction aux traitements appliqués, à l'exception de quelques faibles disparités entre les trois génotypes inspectés (A, B et C) malgré leurs différentes origines.

5. Conclusions :

Nous avons montré que l'huile essentielle du *Thymus ciliatus* présentait une action antibactérienne sur les souches *B.cereus* à l'état planctonique et était capable d'inhiber la formation des biofilms sur les surfaces de polystyrène et d'acier inoxydable. Elle a également éradiqué le biofilm établi au niveau de 5MIC (4100-4400 µg/ml) en comparaison avec le reste des agents antimicrobiens testés; qui ont montré divers degrés d'activité antimicrobienne et antibiofilm sur les microorganismes testés. Il a été montré aussi que l'application de l'HTC en combinaison avec les acides organique notamment l'acide acétique à 1% et en dilution dans des solutions alcaline (NaOH) et acide (HNO₃) a nettement amélioré son effet inhibiteur. Par conséquent, l'HTC pourrait servir de composé dans la recherche d'un nouvel agent antimicrobien. Des recherches supplémentaires devraient être menées pour déterminer si ces observations s'étendent aux biofilms formés sur d'autres surfaces, en particulier celles trouvées dans les laiteries, pour améliorer la qualité, la durée de conservation et la sécurité du lait et des produits laitiers.

Remerciements

L'identification et la caractérisation moléculaire par M13-PCR des isolats laitiers de *Bacillus cereus* ont été réalisées au CIRM-Bactéries, pathogènes INRA.Centre de Tours-France.

Référence :

1. J. Owusu-Kwarteng, A. Wuni, F. Akabanda, K. Tano-Debrah, L. Jespersen. « Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products ». **BMC Microbiology**. **17:65** (2017)
2. B. Svensson, K. Ekelund, H. Ogura, A. Christiansson. « Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants ». **International dairy Journal**. **14:17-27** (2004)
3. S. Kumari, P.K. Sarkar, « In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology ». **Food Control**. **36:1153-158** (2014)
4. C. Faille, C. Jullien, F. Fontaine, M.N. Bellon-Fontaine, C. Slomianny, T. Benezech. « Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity ». **Canadian Journal of Microbiology**. **48:728-738** (2002)
5. J.G.E. Wijman, P.P.L.A. de Leeuw, R. Moezelaar, M.H. Zwietering, T. Abee. « Air liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation and Dispersion ». **Applied Environmental Microbiology**. **73:1481-1488** (2007).
6. L P S Arnesen, A Fogerlund, ad P. E. Granum. « From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins ». **FEMS Microbiology Reviews**. **32:579-606** (2008).
7. A. Gillis, J. Mahillon. « Prevalence, Genetic Diversity, and Host Range of Tectiviruses among Members of the *Bacillus cereus* Group ». **Applied and Environmental Microbiology**. **4138-4152** (2014).
8. E.C. Adukwu, S.C. Allen, C.A. Phillips. « The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus* ». **Journal of Applied Microbiology**. **113(5):1217-27** (2012).
9. E.B. Kerekes, É. Deák, M. Takó, R. Tserennadmid, T. Petkovits, C Vágvölgyi et al. « Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms ». **Journal of Applied Microbiology**. **115(4):933-42** (2013).
10. M.M. Bazargani, J. Rohloff. « Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms ». **Food Control**. **61 : 156-164** (2016).
11. Y. Hara-Kudo, T. Okubo, S. Tanaka, D.C. Chu, L.R. Juneja., N. Saito et al. « Bactericidal action of green tea extract and damage to the membrane of *Escherichia coli* O157:H7 ». **Biocontrol Science**. **6 :57-61** (2001).
12. H. Akiyama, K. Fujii, O. Yamasaki, T. Oono, K. Iwatsuki. « Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus* ». **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. **48 :487-491** (2001).
13. P.W. Taylor, M.T. Jeremy, H. Miller, P.D. Stapleton. « Antimicrobial properties of green tea catechins ». **Food Science and Technology Bulletin**. **2: 71-81**(2005).
14. E. Gonzalez-Fandos, B. Herrera. « Efficacy of propionic acid against *Listeria monocytogenes* attached in poultry skin during refrigerated storage ». **Food Control**, **34 : 601-606** (2013).
15. A.N. Olaimat, A.A. Al-Nabulsi, T.M. Osaili, M. Al-Holy, M.M. Ayyash, G.F. Mehyar et al. « Survival and inhibition of *Staphylococcus aureus* in commercial and hydrated tahini using acetic and citric acids ». **Food Control**. **77 :179-186** (2017).

16. L. Bousmaha-Marroki, J. Casanova, F. Tomi, F. Atik-Bekkara. « Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth.ssp. eu-ciliatus Maire from Algeria ». **Journal of Essential Oil Research**. **19** :401-404 (2007).
17. M.H. Guinebretière, F.L. Thompson, A. Sorokin, P. Normand, P. Dawyndt, M. Ehling-schulz et al. « Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group ». **Environmental Microbiology**. **10**:851-865 (2008).
18. S.H. Park, H.J. Kim, J.H. Kim, T.W. Kim, H.Y. Kim. « Simultaneous D t ction and Identification of *Bacillus cereus* Group Bacteria Using Multiplex PCR ». **Journal of Microbiology and Biotechnology**. **17(7)**:1177-82 (2007).
19. M.H. Guinebretière, C.Nguyen-The. « Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini pur e processing line, differentiated by two PCR-based methods ». **FEMS Microbiology Ecology**. **43**: 207-215 (2003).
20. F. Malek, B. Moussa-Boudjemaa, A. Aouar-Metri, K. Mabrouk. « Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria ». **Dairy Science Technology**. **93**:73-82 (2013).
21. CLSI a. « Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard». Ninth Edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Wayne, PA, USA. M2-A9. 26(01)** (2006).
22. J.W. Gigantelli, J.T. Gomez, M.S. Osato. « In Vitro Susceptibilities of Ocular *Bacillus cereus* Isolates to Clindamycin, Gentamicin, and Vancomycin Alone or in Combination ». **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. **35(1)** : 201-202 (1991).
23. A. M. Jansen, J. J. C. Scheffer, A. Baerheim-Svendsen. « Antimicrobial activity of essential oil: 1976–1986 literature review aspects of the test methods ». **Planta Medica**. **53** : 395–398 (1987).
24. CLSI b. « Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard ». Seventh Edition. Clinical Laboratory Standards institute. **Wayne, PA, USA. M7-A7. 26** : (02) (2006).
25. A. Nostro, A.S. Roccaro, G. Bisignano, A. Marino, M.A. Cannatelli, F.C. Pizzimenti et al. « Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms ». **Journal of Medical Microbiology**, **56** : 519-523 (2007).
26. C. Valeriano, T. L. C. Oliveira, S.M. Carvalho, M.G. Cardoso, E. Alves, R.H. Piccoli. « The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel ». **Food Control**. **25** : 673-677 (2012).
27. J. S Peng, W. C. Tsai, C. C. Chou. « Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent ». **International Journal of Food Microbiology**. **77**:11–18 (2002).
28. J. P. Larpent. « Microbiologie alimentaire : Techniques de laboratoire ». Ed. **Lavoisier. P : 521-534** (1997).
29. M. H. Guinebretière, P. Velge, O. Couvert, F. Carlin, M. L. Debuyser, C. Nguyen-The. « Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation ». **Journal of Clinical Microbiology**. **48**:3388–3391 (2010)
30. A. Cherif-Antar, B. Moussa–Boudjem a, N. Didouh, K. Medjahdi, B. Mayo, A-B Fl rez. « Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant ». **Dairy Science. & Technology**. **96**: 27-38 (2016).
31. F. Malek. « Hydrophobicity and specific biofilm features of *Bacillus cereus* spores subjected to pH stresses ». **African Journal of Microbiology Research**. **10(21)** : 744-751 (2016).
32. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar. « Biological effects of essential oils—a review ». **Food and Chemecal Toxicology**. **46**:446–475 (2008).
33. K. Mabe, M. Yamada, I. Oguni, T. Takahashi. « In Vitro and In Vivo Activities of Tea Catechins against *Helicobacter pylori* ». **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, **1788–1791** (1999).
34. M. Y. Akbas. « Effectiveness of Organic Acid Treatments for Inhibition and Removal of *E. coli* Biofilms ». **Hacettepe Journal Biology Chemistry**. **44 (1)** : 35–45 (2016).
35. Y. P. Tsai, T. Y. Pai, J. Y. Hsin, T. J. Wan. « Biofilm bacteria inactivation by citric acid and resuspension evaluations for drinking water production systems ». **Water Science Technology**. **48(11-12)**:463-72. **2003**
36. F. D. Halstead, M. Rauf, N. S. Moimen, A. Bamford, C. M. Wearn, A. P. Fraise et al. «The Antibacterial Activity of Acetic Acid against Biofilm-Producing Pathogens of Relevance to Burns Patients ». **PLoS ONE**. **10(9)**:1-15 (2015).
37. B. Boomsma, E. Bikker. E. Lansdaal, P. Stuut. « L-Lactic Acid – A Safe Antimicrobial for Home- and Personal Care Formulations ». **SOFW Journal**.**141** :10-15 (2015).
38. A. Nostro, T. Papalia. « Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives ». **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, **7(1)**. 28-35 (2012).
39. A. Ultee, M. H. J. Bennik, R. Moezelaar. « The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus* ». **Applied And Environmental Microbiology**. **1561–1568** (2002).
40. M. M. M. Oliveira, D. F. Brugnera, M. G. Cardoso, E. Alves, R. H. Piccoli. « Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface ». **Food Control**. **21**: 549-553 (2010).
41. L. Espina, R. Pag n, D. López, D. García-Gonzalo. « Individual Constituents from Essential Oils Inhibit Biofilm Mass Production by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus* ». **Molecules**. **20** :11357-11372 (2015).

42. S. A. Burt, V. T. A. Ojo-Fakunle, J. Woertman, E. J. A. Veldhuizen. « The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations ». **PLoS ONE**. **9(4): e93414 (2014)**.
43. M. M. Tajkarimi, S. A. Ibrahim, D. O. Cliver. « Antimicrobial herb and spice compounds in food ». **Food Control**. **21 :1199–1218 (2010)**.
44. T. Mattila, M. Manninen, A. Kyläsiurola. « Effect of cleaning-in-place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line ». **Journal of Dairy Research**. **57(1):33 (1990)**.

(2018) ;<http://revues.imist.ma/?journal=mjpas&page=index>