

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
العلمي والبحث العالي التعليم وزارة
MINISTERE DE L'ENSEIGEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
بالأغواط تليجي عمار جامعة
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
البيولوجيا قسم
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION
D'UN DIPLOME – UNE STARTUP /UN BREVENT D'INVENTION**

Filière : *Sciences Biologiques*
Option : *Microbiologie Fondamentale et Appliquée*

THEME

**Développement d'un modèle prédictif de l'effet
combiné de la température et du pH sur la survie
de *Bacillus* dans le lait infantile**

Présenté par :
Bendouma asma
Bensaad soumia

Devant le jury :

Président Dr. Elhouiti Fatiha MCA
Rapporteur Dr. Benamar Ibrahim MCB
Examineur Dr. Messaoudi Omar MCA
Représentant de l'incubateur Dr. Abdesslam Amira MCA

Soutenu publiquement le 03/07/2024

Remerciements

On remercie Dieu le tout puissant de nous avoir guidé, aidé et donné la santé et la volonté d'entamer ce mémoire Tout d'abord, Nous remercions nos mamans et nos papas de nous avoir soutenus tout au long de nos études et de nous avoir aidés par leurs prières.

*Ce travail ne serait pas aussi riche en n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Dr. Benamar Ibrahim**, nous le remercions pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nous remercions le **Dr Messaoudi Omar** pour son aide chaque fois que nous en avons eu besoin au cours de nos études ou lors de la préparation de notre thèse finale d'étude.*

*Nous remercions aussi très sincèrement, les membres du jury :**Dr. Elhouiti Fatiha** et **Dr massaoudi Omar** d'avoir bien voulu accepter de faire la commission d'examineurs.*

*Je tiens tout d'abord à Remercier l'équipe de **l'incubateur et l'équipe de CRAPC** qui m'a accueilli et soutenu durant mes travaux .le leur expertise, leur disponibilité et leur bienveillance ont été des atouts inestimables pour mener à bien mon projet de recherche.*

*Nos remerciements à tous les membres de l'équipe de laboratoire de recherche de l'université Amar Telidji. **Ben Amar Djouhaïd Samer**.*

Nous tenons aussi à remercier tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience au long de nos études. Nos remerciements s'adressent à tous nos amis. Nos profonds remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail de près ou de loin

Asma et Scumia

ملخص

حليب الرضع ضروري في تغذية الرضع نظرًا لقيمته الغذائية العالية ويشكل أفضل بديل ممكن لحليب الأم. ومع ذلك يخلق هذا الحليب بيئة مواتية لانتشار الملوثات الميكروبية المختلفة، مما يؤدي إلى مشاكل صحية للأطفال. تعد *Bacillus* أكثر الأنواع اكتشافًا في منتجات الألبان. في هذا العمل، قمنا بتقييم فعالية طريقتين تستخدمهما الأمهات لإعادة تكوين حليب الرضع: المعالجة بالميكروويف بقوة مختلفة (W1200، W1000، W200 W,400 W700) على فترات زمنية مختلفة (10، 20، 30، 40، 50، و60 ثانية)، وغليان الماء في تعطيل *Bacillus* في حليب الرضع. تم دراسة أربع سلالات من *Bacillus* في الشكل الخضري (E1: 4.63 log cfu/g، E2: 4.67 log cfu/g، E3: 4.49 log cfu/g، E4: 4.77 log cfu/g) وشكل الأبواغ (E1: 7.45 log cfu/g، E2: 7.5 log cfu/g، E3: 4.49 log cfu/g، E4: 4.77 log cfu/g)، وكذلك تأثير الرقم الهيدروجيني على تعطيل *Bacillus*. قمنا أيضًا باختبار قدرة سلالات *Bacillus* على تكوين الأغشية الحيوية باستخدام عدة طرق، مثل طريقة microplaque 96 puits والطرق النوعية على rouge congo وعلى أسطح المواد المستخدمة في صناعة زجاجات الرضاعة (السيليكون وPTFE). قمنا بقياس خشونة مواد السيليكون وPTFE باستخدام AFM، قبل وبعد إجراءات التنظيف والتطهير لهذه المواد باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم لتقييم الفعالية. كما استهدفنا تطوير نموذج تنبؤي لـ *Bacillus* المرتبط باستهلاك حليب الرضع، بناءً على بيانات درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني، لتقييم الخطر المحتمل المرتبط بهذه البكتيريا. أظهرت طرق معالجة الميكروويف لتعطيل السلالات الأربعة من *Bacillus* فعاليتها عند الأوقات (40، 50، 60 ثانية) وعند القوى (700، 1000، 1200 W). كانت معالجة الماء المغلي فعالة في قتل جميع الأشكال الخضرية لـ *Bacillus* ولكنها لم تكن فعالة في تعطيل الأبواغ. كان تأثير درجة الحرارة على تعطيل *Bacillus* أكثر أهمية من تأثير الرقم الهيدروجيني. أظهرت اختبارات تكوين الأغشية الحيوية أن كل سلالات الأربعة كانت لديها القدرة على تكوين الأغشية الحيوية على السيليكون وPTFE، مع كون السلالة E2 هي الأقوى في تكوين الأغشية الحيوية. لم تكن طرق التطهير باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم فعالة في القضاء الكامل على جميع البكتيريا. من خلال نماذج تنبؤية weibull وLogarithmique يمكن فهم ديناميكيات القضاء *Bacillus* تحت ظروف معالجة مختلفة بشكل أفضل.

الكلمات الرئيسية: حليب الرضع، *Bacillus*، المعالجة الحرارية، المعالجة بالميكروويف، الأغشية الحيوية، النموذج التنبؤي.

résumé

Le lait infantile est essentiel dans l'alimentation des nourrissons en raison de sa valeur nutritive élevée, constituant la meilleure substitution possible au lait maternel. Cependant, ce lait crée un environnement propice à la propagation de diverses contaminations microbiennes, posant ainsi des problèmes sanitaires pour les bébés. Parmi les contaminants, *Bacillus* est fréquemment identifié dans les produits laitiers. Dans ce travail, nous avons évalué l'efficacité de deux méthodes couramment utilisées par les mamans pour la reconstitution du lait infantile : le traitement par micro-ondes à différentes puissances (200W, 400W, 700W, 1000W, et 1200W) sur des intervalles de temps variés (10, 20, 30, 40, 50, et 60 secondes), et l'eau bouillante, dans l'inactivation de *Bacillus* dans le lait infantile. Quatre souches de *Bacillus*, en forme végétative (E1 : 4.63 log ufc/g, E2 : 4.67 log ufc/g, E3 : 4.49 log ufc/g, E4 : 4.77 log ufc/g) et sporulante (E1 : 7.45 log ufc/g, E2 : 7.5 log ufc/g, E3 : 4.49 log ufc/g, E4 : 4.77 log ufc/g), ont été étudiées, ainsi que le pH, pour déterminer l'effet de ces paramètres sur l'inactivation de *Bacillus*. Nous avons également testé la capacité de formation de biofilm par les souches de *Bacillus* en utilisant plusieurs méthodes : la méthode de la microplaque 96puits, des méthodes qualitatives sur gélose rouge Congo, et sur des surfaces de matériaux utilisés dans la fabrication des biberons (silicone et PTFE). La rugosité des matériaux en silicone et PTFE a été mesurée avant et après des procédures de nettoyage et de désinfection par hypochlorite de sodium, en utilisant AFM, pour évaluer l'efficacité du nettoyage. Par ailleurs, nous avons développé un modèle prédictif de la survie de *Bacillus* lié à la consommation de lait infantile, basé sur les données de température et de pH, pour évaluer le risque potentiel associé à ce germe. Les résultats ont montré que les méthodes de traitement par micro-ondes étaient efficaces pour l'inactivation des quatre souches de

Bacillus à des temps de 40, 50, et 60 secondes et à des puissances de 700W, 1000W, et 1200W. Le traitement thermique par l'eau bouillante a été efficace pour tuer toutes les formes Végétatives de *Bacillus*, mais pas pour l'inactivation des spores l'effet de la température sur Inactivation de *Bacillus* est avéré plus important que celui du pH. Les tests de formation de biofilm ont révélé que les souches de *Bacillus* (E1, E2, E3, E4) avaient la capacité de former des biofilms sur silicone et PTFE, la souche E2 étant la plus fortement formatrice de biofilm. Les méthodes de désinfection par hypochlorite de sodium étaient pas efficaces pour éliminer complètement toutes les bactéries. Grâce aux modèles prédictifs Weibull et logarithmique, il est possible de mieux comprendre la dynamique de la destruction de *Bacillus* sous différentes conditions de traitement.

Mots-clés : lait infantile, *Bacillus*, traitement thermique, micro-ondes, biofilm, Weibull.

Abstract

Infant formula is essential in the nutrition of infants due to its high nutritional value, constituting the best possible substitute for breast milk. However, this milk creates an environment conducive to the spread of various microbial contaminants, posing health problems for babies. Among these contaminants, *Bacillus* is frequently identified in dairy products. In this work, we evaluated the effectiveness of two methods commonly used by mothers for the reconstitution of infant formula: microwave treatment at different power levels (200W, 400W, 700W, 1000W, and 1200W) for various time intervals (10, 20, 30, 40, 50, and 60 seconds), and boiling water, in the inactivation of *Bacillus* in infant formula. Four *Bacillus* strains, in vegetative form (E1: 4.63 log cfu/g, E2: 4.67 log cfu/g, E3: 4.49 log cfu/g, E4: 4.77 log cfu/g) and spore form (E1: 7.45 log cfu/g, E2: 7.5 log cfu/g, E3: 4.49 log cfu/g, E4: 4.77 log cfu/g), were studied, along with pH, to determine the effect of these parameters on the inactivation of *Bacillus*. We also tested the biofilm-forming ability of *Bacillus* strains using several methods: the 96-well microplate method, qualitative methods on Congo red agar, and on surfaces of materials used in bottle manufacturing (silicone and PTFE). The roughness of the silicone and PTFE materials was measured before and after cleaning and disinfection procedures using sodium hypochlorite, utilizing AFM to assess the effectiveness of the cleaning. Additionally, we developed a predictive model for *Bacillus* related to the consumption of infant formula, based on temperature and pH data, to evaluate the potential risk associated with this bacterium. The results showed that microwave treatment methods were effective in inactivating the four *Bacillus* strains at times of 40, 50, and 60 seconds and at power levels of 700W, 1000W, and 1200W. Boiling water treatment was effective in killing all vegetative forms of *Bacillus* but not for spore inactivation. The effect of

temperature on *Bacillus* inactivation was more significant than that of pH. Biofilm formation tests revealed that *Bacillus* strains (E1, E2, E3, E4) had the ability to form biofilms on silicone and PTFE, with strain E2 being the most strongly biofilm-forming. Disinfection methods using sodium hypochlorite were not effective in completely eliminating all bacteria. Through Weibull and logarithmic predictive models, it is possible to better understand the dynamics of *Bacillus* destruction under different treatment conditions.

Keywords: infant formula, *Bacillus*, thermal treatment, microwave, biofilm, Weibull.

-Liste des abréviations-

BHIB : Bouillon coeur-cervelle

GN: Gélose nutritive

Ufc:unité formant colonie

MW: traitement par micro-onde

HM: traitement par l'eau bouillante

AFM: microscope à force atomique

Cv: cristal violet

CIP: clean in -place

RMSE:Root mean square error

R2: coefficient de détermination

Do: rouge congo agar

MEB: microscope électronique a balayage .

-Liste des figures-

Figure n°1 : les étapes de fabrication du lait infantile.**P7**

Figure n°2 : a) formation des spores par *Bacillus cereus* formant des endospores. en cas de conditions environnementales défavorables, la cellule végétative se différencie et permet la morphogénèse des spores. les spores matures sont libérées et germeront pour donner naissance à une cellule végétative dans des conditions favorables. b) schéma de la structure des spores bactériennes.**P9**

Figure n°3: les étapes de formation de biofilm .**P11**

Figure n°4: la reconstitution de l'ait infantile par l'eau bouillante.**P12**

Figure n°5: la reconstitution de l'ait infantile par la micro-onde.**P13**

Figure n°6 : nettoyage des biberons.**P13**

Figure n°7 : la stérilisation des biberons par l'eau bouillante.**P14**

Figure n°8 : la stérilisation des biberons par micro-ondes.**P15**

Figure n°9 : caractéristique de surface (rugosité) (K.A. WHITEHEAD , et al.2006).**P16**

Figure n°10:angle de contact hydrophobe.**P16**

Figure n°11 : A, B, C ,D ,E , F sont des images représentant les étapes de traitement par microonde.**P22**

Figure n°12 : détection de biofilm sur forme végétative et sporulant.**P30**

Figure n°13 : Courbe de température de chaque puissance de la microonde en fonction de temps**P34**.

Figure n°14 : les courbes de Modèle logarithmique de la destruction des souches E1 et E2 dans traitement par MW sur différente puissance.**P35**

Figure n°15 : les courbes de Modèle logarithmique de la destruction des souches E3 et E4 dans traitement par MW sur différente puissance.**P36**

Figure n° 16: test tukey de comparaison multiple entre les puissances dans les souches E1 et E2.**P37**

Figure n°17 : test tukey de comparaison multiple entre les puissances dans les souches E3 et E4.**P38**

Figure n° 18: les courbes de Modèle weibull de la destruction des souches E1 dans traitement par MW sur différente puissance.**P39**

Figure n°19 : les courbes de Modèle weibull de la destruction des souches E2 dans traitement par MW sur différente puissance.**P40**

Figure n°20 : les courbes de Modèle weibull de la destruction des souches E3 dans traitement par MW sur différente puissance.**P41**

Figure n°21 : les courbes de Modèle weibull de la destruction des souches E4 dans traitement par MW sur différente puissance.**P42**

Figure n°22 : des cartes thermique de souche E3 et E4.**P43**

Figure n°23 : Effet de la température et PH sur l'inactivation de la souche E1 avec test tukey de comparaison multiple entre les deux effets en fonction du temps.**P46**

Figure n°24 : Effet de la température et PH sur l'inactivation de la souche E2 avec test tukey de comparaison multiple entre les deux effets en fonction du temps.**P47**

Figure n°25 : Effet de la température et PH sur l'inactivation de la souche E13 avec test tukey de comparaison multiple entre les deux effets en fonction du temps.**P48**

Figure n°26 : Effet de la température et PH sur l'inactivation de la souche E4 avec test tukey de comparaison multiple entre les deux effets en fonction du temps.**P49**

Figure n°27 : Courbe de l'effet de la température du lait sur l'inactivation des quatre souches de *Bacillus* testées en fonction du temps.**P51**

Figure n°28 : Les courbes du modèle logarithmique et du modèle Weibull en fonction de temps dans traitement par méthode HM appliqué sur la souche E1.**P52**

Figure n°29 : Les courbes du modèle logarithmique et du modèle Weibull en fonction de temps dans traitement par méthode HM appliqué sur la souche E2.**P53**

Figure n°30 : Les courbes du modèle logarithmique et du modèle Weibull en fonction de temps dans traitement par méthode HM appliqué sur la souche E3.**P53**

Figure n°31 : Les courbes du modèle logarithmique et du modèle Weibull en fonction de temps dans traitement par méthode HM appliqué sur la souche E4.**P54**

Figure n°32 : Courbe de l'effet de la température et du pH sur l'inactivation des quatre souches de *Bacillus* par la méthode de préparation par l'eau bouillante.**P57**

Figure n°33 : Résultat de production de biofilm des souches de *Bacillus* par RCA.**P62**

Figure n°34 : Graphe de log n ufc/g sur les surfaces traité et non traité (silicone et PTFE) dans les quatre souches.**P34**

-Liste des tableaux-

Figure n°1 : tableau illustrant la composition des formules infantiles, lait de femme et lait de vache entier. **P5**

Tableau n°2 : la valeur de D et Z et la comparaison entre Rsquare weibull et linière et entre RMSE et SYX, δ weibull. **P44**

Tableau n°3 : la comparaison entre Rsquare weibull et linière et entre RMSE et SYX, δ weibull. **P56**

Le Tableau n° 4 : présente les résultats de la densité optique (DO) des quatre souches de Bacillus en forme végétative. Ces résultats permettent d'évaluer la capacité de chaque souche à former un biofilm dans différents milieux de culture. **P61**

Tableau n°5 : résultats de la capacité à former le biofilm relatif aux DO des souches de forme sporulantes. **P62**

Tableau n°6 : Synthèse des résultats de l'AFM donnant les Ra avec l'image 3D de silicone et du PTFE avant et après traitement de souche E1. **P68**

Tableau n°7 : Synthèse des résultats de l'AFM donnant les Ra avec les images 3D de silicone et du PTFE avant et après traitement de souche E2. **P69**

-Sommaire -

| | |
|--|-----------|
| ملخص | II |
| Résumé | III |
| Abstract | V |
| Liste des abréviations | VII |
| Liste des figures | VIII |
| Liste des tableaux | X |
| Introduction Synthèse bibliographiques | |
| 1. Lait et les produits laitiers | 4 |
| 2. Le lait infantile | 4 |
| 3. Étapes de fabrication du lait infantile | 5 |
| 4. Qualité microbiologique du lait infantile | 7 |
| 4.1 <i>Bcillus</i> | 8 |
| 4.1.1. Sporulation | 9 |
| 4.1.2. Production des toxines | 10 |
| 4.1.3. problème formation de biofilm par Bacillus | 10 |
| 5. la reconstitution de lait infantile | 11 |
| 5.1. première méthode | 11 |
| 5.2. deuxième méthode | 12 |
| 6. nettoyage et stérilisation des biberons et tétines | 13 |
| 6.1. les stérilisations à chaud | 14 |
| 6.1.1. les stérilisations à l'eau bouillante | 14 |
| 6.1.2. la stérilisation a microondes | 14 |
| 6.2. hypochlorite de sodium | 15 |
| 6.3 les caractères influençant le procédé du nettoyage | 15 |
| 6.3.1. l'hydrophobicité et la topographie du support | 15 |
| 6.3.2. propriétés bactériennes | 16 |
| 6.4. système de nettoyage utilisée par industrie laitières | 17 |
| 7. la microbiologie prévisionnelle | 17 |
| 7.1. Outils de modélisation prédictive | 18 |
| 7.1.1. PMP | 18 |
| 7.1.2. ComBase | 18 |
| 7.1.3. DMFit | 19 |
| 7.1.4. Sym'previus | 19 |
| 8. Analyse des risques | 19 |

| Matériel et Méthode | |
|---|----|
| 1. Traitement des échantillon de lait infantile par Bacillus | 21 |
| 1.1. Traitement par microonde | 21 |
| 1.1.1. Forme végétatives | 21 |
| 1.1.2. Forme sporulante | 22 |
| 1.2. Traitement par l'eau bouillante | 22 |
| 1.2.1. Forme végétative | 23 |
| 1.2.2. Forme sporulante | 23 |
| 2. Modélisation et ajustement es résultats | 24 |
| 2.1.1. Modèle de Destruction Logarithmique | 24 |
| 2.1.2. Modèle de weibull Modifié par Mafart | 25 |
| 2.2. Modélisation Secondaire | 26 |
| 2.2.1. Modèle de rosso | 26 |
| 2.2.2. Modèle Lamda Modifiè par Mafart | 27 |
| 2.3.2. Valulation des Modèles par critères Statistiques | 28 |
| 2.3.1. Root Mean Square Error (RMSE) | 28 |
| 2.3.2. coefficient de Détermination (R ²) | 28 |
| 3. étude du potenteil des souches de <i>Bcillus</i> a former le Biofilm | 28 |
| 3.1. Méthodes de Quantification sur des Microplaques(96puits) | 29 |
| 3.1.1. Forme sporulante | 29 |
| 3.2. Détection par Méthode de Rouge Congo Agar | 30 |
| 4. Etude de la formation de biofilm sur surfaces en PTFE et silicone | 30 |
| 4.1. Préparation et Stérilisation des surfaces | 31 |
| 4.2. culture des surfaces | 31 |
| 4.2.2. Détachement du biofilm | 31 |
| 4.3. Méthodes d'AFM (Microplaque a force Atomique) | 32 |
| 4.3.1. Préparation des Coupon | 32 |
| 4.3.2. Traitement des surfaces | 32 |
| 4.3.3. Mesure de la Régusité | 32 |
| 5. Analyse Statistique | 32 |
| Résultats et discussions | |
| 1. Modélisation de l'inactivation des <i>Bacillus</i> | 34 |
| 1.1 Traitement par microondes (MW) | 34 |
| 1.1.1. Modèle logarithmique | 35 |
| 1.1.2. Modèle Weibull | 39 |
| 1.2. Effet de la température et du PH sur l'inactivation par microondes | 46 |
| 1.3. Traitement par l'eau bouillante (HM) | 52 |
| 1.4. Effet de la température et du PH sur l'inactivation par l'eau bouillante | 58 |

| | |
|--|----|
| 1.5. comparaison des Méthdes de Préparation de lait infantile (MW et HM) | 59 |
| 2. Etude du potentiel des souches de Bacillus à Former de biofilm | 60 |
| 2.1. Méthode de Quantification sur des microplaque (96puits) | 60 |
| 2.2. Détection par Méthode de Rouge Congo Agar | 63 |
| 2.3. étude de la formation de biofilm sur surfaces en PTFE et silicone | 64 |
| 2.4. Méthode d'AFM (microscopie a Force Atomique) | 66 |
| Conclusion | 70 |
| Lite de référence | 71 |

Introduction

Introduction

Le lait est connu comme l'aliment le plus complet de la nature (Park, 2009). Le lait et les produits laitiers sont des aliments riches en nutriments, qui fournissent de l'énergie et des protéines de haute qualité, ainsi qu'une série de minéraux essentiels, en particulier le calcium, le magnésium, le potassium, le zinc et le phosphore sous une forme facilement assimilable (Pfeuffer, M., 2017). Les minéraux du lait sont essentiels pour la santé et le développement de l'homme, mais surtout pendant l'enfance (Muehlhoff, E., 2014).

L'allaitement maternel est incontestablement la meilleure façon de nourrir les nouveaux nés, le lait maternel est non seulement une source indispensable de nutriments pour la croissance et le développement du nourrisson, mais il contient également divers composants immunologiques essentiels avec des activités anti-infectieuses et des rôles critiques dans la formation de l'immunité y compris des bactéries bénéfiques qui peuvent contribuer à la colonisation de l'intestin du nourrisson (Dae Yong Yi et al., 2021).

Lorsque l'allaitement n'est pas suffisant, possible ou souhaité, les préparations en poudre pour lait infantile constituent la meilleure alternative au lait maternel (Ahern et al., 2019). Ces préparations, comme d'autres produits alimentaires, contiennent des microorganismes (Chap et al., 2009). Les aliments pour nourrissons reconstitués sont considérés comme particulièrement risqués pour les nourrissons en raison de leur système immunitaire et métabolique sous-développé, ce qui les rend plus susceptibles aux infections causées par des agents pathogènes bactériens entériques (Vidic et al., 2020). Pour cette raison, la qualité microbiologique de ces formulations est essentielle (Sadek et al., 2018).

Les contaminants bactériens peuvent provoquer des maladies ou altérer le lait et ses produits dérivés. Les bactéries aérobies sporulantes, telles que *Bacillus*, sont particulièrement préoccupantes à cet égard car elles peuvent survivre à la pasteurisation industrielle et former des biofilms (Nidhi et al., 2015). Les espèces de *Bacillus* peuvent survivre aux traitements thermiques et se développer après la reconstitution de l'aliment pour nourrissons, étant associées à des maladies gastro-intestinales (Hilliard et al., 2003; Veyseyre et al. 2015).

Le lait doit être donné aux nourrissons à une température tiède pour éviter les risques de brûlures. En outre, la qualité microbiologique de la poudre de lait infantile nécessite des traitements thermiques rigoureux pour assurer sa sécurité. Pour la reconstitution du lait

infantile, deux méthodes peuvent être utilisées : soit faire bouillir de l'eau puis ajouter la poudre, soit reconstituer à froid puis chauffer au micro-ondes.

Dans le cadre de notre étude sur la sécurité microbiologique du lait infantile, nous avons défini plusieurs objectifs spécifiques visant à contribuer à l'évaluation des risques associés aux souches de Bacillus et à d'améliorer les méthodes de préparation du lait pour nourrissons.

Le premier objectif de cette étude consiste à identifier les barèmes des traitements thermiques des souches de Bacillus isolées de la poudre de lait infantile.

Le deuxième objectif vise également à évaluer les différentes méthodes de préparation du lait infantile, afin de minimiser les risques microbiologiques par l'évaluation de l'efficacité des traitements thermiques et des micro-ondes appliqués par les mamans.

Le troisième objectif de notre étude vise à caractériser les souches de Bacillus en termes de capacité de formation de biofilm sur les matériaux utilisés dans la fabrication des biberons.

Le quatrième objectif est de développer un modèle prédictif pour évaluer la présence potentielle de Bacillus dans le lait infantile, en se basant sur la température et le pH. À travers cette étude, nous pourrions estimer la dose potentiellement ingérée par les nourrissons.

Ce document s'articule donc autour des axes suivants : une partie bibliographique qui présente le lait infantile, Bacillus et ces différents facteurs de virulence. Une autre partie sur la méthodologie du travail adoptée. Ensuite, les résultats de cette étude seront discutés et ouvriront la voie à une conclusion récapitulant les issues de ce travail, des perspectives, des recommandations et des études ultérieures.

Synthèse bibliographique

1. Lait et les produits laitiers

Le lait et les produits laitiers sont des denrées alimentaires nutritives qui contiennent de nombreux nutriments essentiels (Anna Haug ,2007).et jouent un rôle central dans la plupart des recommandations alimentaires. Ils fournissent un ensemble de nutriments et de constituants bioactifs pour la santé.(Connie M Weaver,2014).le lait et le produits laitiers sont des sources naturellement riches d'un large éventail de nutriments tels que les protéines, les graisses, les oligosaccharides et les micronutriments, notamment les vitamines A, D, E et K, ainsi que Ca, Mg, P et Zn. (Haug et al., 2007) .

Le lait et les produits laitiers constituent une part importante du régime alimentaire des jeunes enfants, car ils sont une bonne source d'énergie et de protéines et contiennent un large éventail de vitamines et de minéraux, en particulier du calcium, dont les jeunes enfants ont besoin pour avoir des os et des dents en bonne santé. (Dror & Allen, 2014) .

Le lait maternel est la meilleure source de nutrition pour presque tous les nourrissons. Au-delà de la croissance somatique, le lait maternel, en tant que fluide biologique, présente toute une série d'autres avantages, notamment la modulation de la fonction intestinale postnatale, l'ontogenèse immunitaire et le développement du cerveau. Bien que l'allaitement maternel soit fortement recommandé, il n'est pas toujours possible, adapté ou suffisant. Les préparations pour nourrissons sont des substituts fabriqués industriellement pour la consommation des nourrissons. Les préparations pour nourrissons tentent de reproduire le plus fidèlement possible la composition nutritionnelle du lait maternel et sont à base de lait de vache ou de lait de soja. (Martin et al., 2016) .

2. Le lait infantile :

Les préparations pour nourrissons sont conçues comme un substitut efficace de l'alimentation infantile. Bien qu'il ne soit pas possible de produire un produit identique au lait maternel, tout a été mis en œuvre pour reproduire le profil nutritionnel du lait maternel pour une croissance et un développement normaux du nourrisson. Le lait de vache ou le lait de soja sont le plus souvent utilisés comme base, des ingrédients supplémentaires étant ajoutés pour mieux se rapprocher de la composition du lait maternel et pour obtenir des avantages pour la santé. (Stevens et al., 2009)

Les préparations pour nourrissons sont utilisées comme substitut du lait maternel et constituent la seule source de nourriture pour les nourrissons jusqu'à l'âge de 6 mois. La

préparation pour nourrissons est une poudre qui peut être reconstituée et utilisée pour remplacer le lait maternel. Ce produit est fabriqué à partir d'ingrédients combinés, tels que des protéines de lait, des prébiotiques, des protéines végétales, des vitamines et des oligo-éléments. (Portela et al., 2019)

| Pour 100 mL | Lait de vache | Préparations pour nourrissons | Lait de femme mature (après J ₄ -J ₅) |
|-----------------------------------|---------------|---------------------------------------|--|
| Poudre (g) | | 12,6-15 | |
| Calories (kcal) | 65 | 66-73 | 67 |
| Protides (g) | 3,7 | 1,5-1,9 | 1 |
| - Caséine (%) | 80 | 60-80* 44-50** | 40 |
| Lipides (g) | 3,5 | 2,6-3,8 | 3,5 |
| - Acide linoléique (mg) | 90 | 350-740 | 350 |
| - Acide α -linoléique (mg) | Traces | 30-100 | 37 |
| Glucides (g) | 4,5 | 6,7-9,5 | 7,5 |
| - Lactose (%) | 100 | 47-100 | 85 |
| - Dextrine-maltose (g) | 0 | 1,1-2,6 | 0 |
| - Autres sucres | Aucun | Amidon, glucose, fructose, saccharose | Oligosaccharides |
| Sels minéraux (mg) | 900 | 250-500 | 210 |
| - Sodium (mg) | 48 | 16-28 | 16 |
| - Calcium (mg) | 125 | 43-93 | 33 |
| - Calcium/Phosphore | 1,25 | 1,2-1,9 | 2 |
| - Fer (mg) | 0,03 | 0,7-1 | 0,05 |

Figure n°1 : tableau illustrant la composition des formules infantiles, lait de femme et lait de vache entier. (BOCQUET A, et al.2002)

3. Étapes de fabrication du lait infantile :

✚ Etape 1 : Écrémage et pasteurisation du lait

Tout commence avec le lait cru qui vient directement des fermes, où il est conservé à 4°C. Une première analyse est effectuée pour vérifier que tout est bien pour la santé de l'enfant. La transformation du lait en préparations pour nourrissons commence par la séparation de la matière grasse du lait entier. On obtient ainsi du lait écrémé d'une part et de la crème d'autre part. Cette opération est suivie d'une pasteurisation : Le lait est chauffé à une température très élevée à une vitesse très élevée. Il est ensuite refroidi à la même vitesse. La pasteurisation est une étape obligatoire pour inactiver toute bactérie pathogène existante (Kessler, 2002). Deux types de pasteurisation peuvent être appliqués. Le premier est un traitement standard à haute température et courte durée de 72-75 °C pendant au moins 15 s (HTST ; Kessler, 2002). L'autre est la pasteurisation à basse température et longue durée (LTLT) à 62 °C pendant au

moins 30 minutes, qui est un outil approprié pour maintenir les structures et les goûts du lait. Cela permet d'éliminer les micro-organismes qui peuvent être dangereux pour le bébé.

✚ ÉTAPE 2 : La préparation et le séchage

Le lait de vache est trois fois plus riche en protéines que le lait maternel. Et la proportion des différentes protéines n'est pas non plus la même il leur manquerait des éléments essentiels à croissance. Sa composition doit donc être retravaillée pour avoir la bonne teneur en protéines, glucides et lipides.

Par un jeu de dilution, on ajuste le ratio de protéines et on retire certains minéraux en trop. on ajoute aussi d'autres ingrédients, huiles végétales et dérivés du lait. on ajoute aussi des vitamines et des minéraux (ceux qui n'étaient pas en proportion suffisante pour répondre aux besoins de Bébé) Toute cette préparation liquide est ensuite concentrée (40 ,80 c°)et séchée pour obtenir une préparation sous forme de poudre. <https://www.popote-bebe.fr/lemag/les-coulisses-de-la-fabrication-dun-lait-infantile/>

✚ ÉTAPE 3 : Le mélange à sec

La préparation est alors presque prête. il ne reste qu'à ajouter les ingrédients dits « plus sensibles». Ce sont ceux dont la qualité nutritionnelle aurait pu être altérée s'ils avaient été ajoutés lors des étapes précédentes. Et on mélange. <https://www.popote-bebe.fr/lemag/les-coulisses-de-la-fabrication-dun-lait-infantile/>

✚ ÉTAPE 4 : Le conditionnement

Dernière étape de la fabrication d'un lait infantile. il ne reste plus qu'à doser la quantité de poudre nécessaire par boîte.

Une dernière analyse pour la route (en tout, une boîte de lait subit des centaines et des centaines d'analyses tout au long du processus).

Après, La boîte de lait Infantile est prête à être commercialisée. <https://www.popote-bebe.fr/lemag/les-coulisses-de-la-fabrication-dun-lait-infantile/>

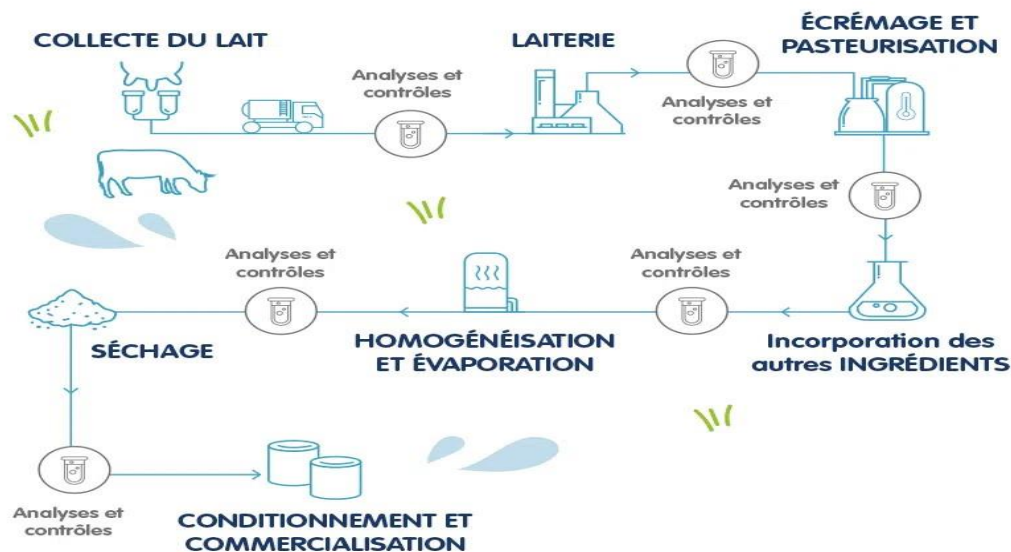


Figure n°1 : les étapes de fabrication du lait infantile.

<https://www.physiolac.com/conseil-expert/choix-lait-bebe/>

4. Qualité microbiologique du lait infantile :

Les préparations en poudre de lait Infantile, comme d'autres produits alimentaires, contiennent des micro-organismes qui diffèrent quantitativement et qualitativement.¹ Les nourrissons sont sensibles aux Infections bactériennes en raison de leur système immunitaire sous-développé. Pour cette raison la qualité microbiologique de ces formulations est essentielle.

L'alimentation des nourrissons avec des préparations en poudre et des aliments pour nourrissons prêts à l'emploi, de la naissance à l'âge de deux ans, permet de nourrir des millions d'enfants dans le monde. Ce type d'alimentation représente une riche source de nutriments et contient des Ingrédients d'origines diverses. Il est donc considéré comme un excellent support pour la croissance bactérienne et comporte un risque potentiel d'exposition à des agents pathogènes d'origine alimentaire. Les nourrissons et les bébés sont plus susceptibles d'être infectés par ces agents pathogènes en raison de leur système immunitaire moins développé et de l'absence d'une flore intestinale compétitive. (Townsend et al., 2008)

(Watterson et al., 2014) La microflore des poudres de lait dépend du nombre et du type de bactéries présentes dans le lait cru ou les sous-produits laitiers, de la température de préchauffage, des conditions d'exploitation, de l'évaporateur et/ou du sécheur et de l'hygiène de l'usine

Les Bactéries sporulant représentent la partie dominante des bactéries les plus identifiées dans les poudres laitières. Le genre *Bacillus* est le plus identifié dans les produits laitiers. Ces bactéries survivront au processus de séchage et aux traitements thermiques utilisés (Alvarenga et al., 2018) et peuvent germer et se développer après la reconstitution de l'aliment pour enfant. surtout si elles ne sont pas correctement stockées. (Yang et al., 2017)

4.1 *Bacillus* :

Le genre *Bacillus* est le plus identifié dans les produits laitiers, ce genre joue un rôle important dans les maladies d'origine alimentaire et la détérioration des aliments. Ils représentent une préoccupation importante pour l'industrie laitière. Les espèces de *Bacillus* ont une activité protéolytique extracellulaire élevée par rapport aux autres bactéries, et elles peuvent produire une variété d'enzymes extracellulaire telles que l'amylase, la protéase, la lipase et la lécithinase.

Les espèces de *Bacillus* sont des bactéries à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatives en forme bâtonnet, sporulantes tout en formant des endospores (Peter CB Turnbull, 1996). Leur température de croissance optimale se situe généralement entre 25°C et 37°C. Cependant, certaines souches (psychrotrophes) peuvent se développer à une basse température de 4 à 10°C, tandis que d'autres souches résistantes à la chaleur peuvent être cultivées à une température pouvant atteindre 55°C. Les limites de croissance de *Bacillus* en termes de pH sont définies comme étant de 4,5 à 9,5. *Bacillus licheniformis* et *B. cereus* sont les espèces de *Bacillus* les plus fréquemment isolées dans le lait à tous les chaînes de la transformation.

4.1.1 Sporulation :

Pour résister au stress environnemental, une stratégie adaptative des cellules de *Bacillus* consiste à se transformer en spores. Elles sont appelées des endospores parce qu'elles sont produites à l'intérieur d'une cellule mère . La bactérie peut rester dormante sans nutriments pendant une période indéterminée, mais elle germera et redeviendra une cellule végétative lorsque les conditions seront favorables. Il est intéressant de noter que certains traitements alimentaires, tels que l'exposition à une chaleur sublétales (entre 65 et 80 °C), peut déclencher la germination (Luu, 2015).

Les spores résistent à la chaleur, au froid, aux radiations, au dessèchement et aux désinfectants. Les spores ont le potentiel de conduire continuellement au développement de nouveaux biofilms (Lindsay et al., 2006). Elles sont des contaminants importants dans l'industrie laitière parce qu'elles sont omniprésentes dans la nature et elles peuvent entrer dans la chaîne du lait à partir de diverses sources (environnement de la ferme, lait cru, équipement de l'usine laitière). Elles peuvent aussi s'attacher à l'équipement de transformation et former des biofilms et affectent de manière significative la sécurité et la qualité des produits.

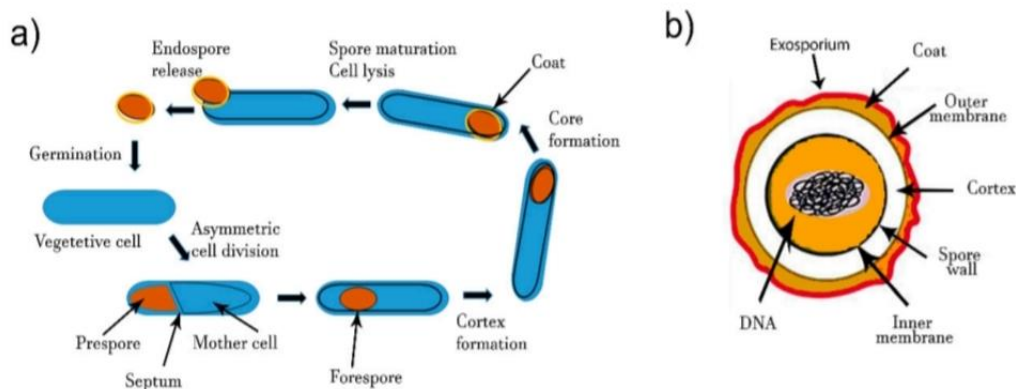


Figure n°2 : a) formation des spores par *Bacillus cereus* formant des endospores. en cas de conditions environnementales défavorables, la cellule végétative se différencie et permet la morphogénèse des spores. les spores matures sont libérées et germeront pour donner naissance à une cellule végétative dans des conditions favorables. b) schéma de la structure des spores bactériennes.

4.1.2 Production des toxines :

Les épidémies d'origine alimentaire causées par *Bacillus cereus* sont principalement en raison de ses toxines, notamment l'entérotoxine et la toxine céréulide. Ces deux toxines provoquent des intoxications alimentaires, des maladies avec diarrhée et des syndromes émétiques (Cadirci et al.,2018). L'entérotoxine est thermolabile et peut être inactivée par chauffage à 55C° pendant 5 min (Cadirci et al.,2018). En revanche, la céréulide préformé dans les aliments est très stable et résiste à des T°C qui peuvent dépasser les 100 °C (Rajkovic et al.,2008). Le seuil dangereux à atteindre où les cellules bactériennes peuvent commencer à produire la céréulide est de 5 log ufc/ml. (Bussda Silva et al.,2022).

4.1.3 Problème de formation de biofilm par *Bacillus* :

Le biofilm est un assemblage d'une communauté microbienne qui est enfermée dans des Substances polymériques extracellulaires (EPS) , il protège les spores de *B. cereus* et à l'intérieur des cellules . Le biofilm est un problème courant dans l'industrie alimentaire et peut être une source potentielle de contamination dans les produits laitiers (Weber et al.,2019). Dans l'industrie laitière, les spores et les cellules végétatives de *Bacillus cereus* peuvent adhérer aux surfaces des équipements, formant rapidement des biofilms. Si le biofilm n'est pas éradiqué à temps, la dispersion du biofilm de *B. cereus* peut libérer des spores dans les aliments ou les environnements de production (Wijman et al.,2007). Elles peuvent ensuite s'adhérer et se regrouper sur les surfaces en acier inoxydable, ce qui entraîne la formation de biofilms dans les cuves de stockage du lait et les lignes de traitement du lait (Sophie Marchand et al.,2012). La formation de biofilm est un processus cyclique qui peut être une source continue de contamination. Les stratégies pour traiter le biofilm peuvent Inclure la prévention de la formation de biofilm et l'élimination des biofilms développés. La formation de biofilm peut être perturbée dès la phase d'attachement initial en utilisant différents désinfectants tels que les solutions d'hypochlorite, l'ozone et les composés d'ammonium quaternaire (Zhao et al.,2017).

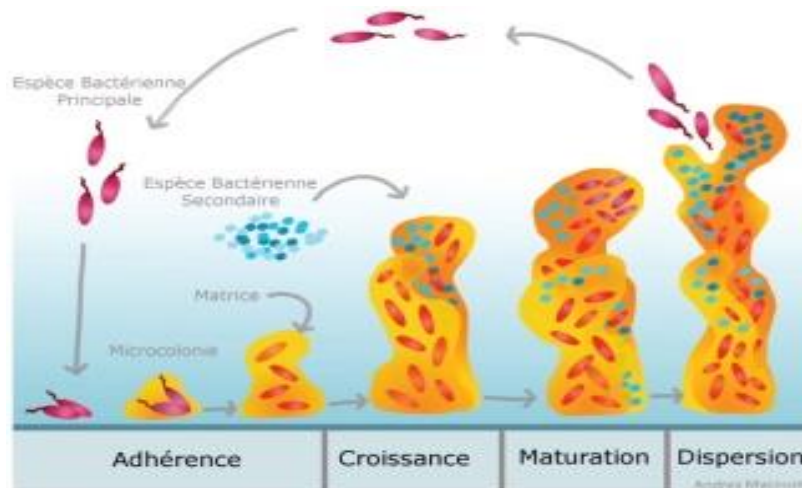


Figure n°3: les étapes de formation de biofilm (Yannick et al.,2014)

5. La reconstitution de l'ait infantile

Les formules de lait Infantiles reconstituées sont considérées comme une classe alimentaire de forte risque à cause de la susceptibilité de la population Infantile aux agents pathogènes bactériens entériques, une réponse grave à l'entérotoxine (Rowan et al.,1998). A la naissance, le système Intestinal du nouveau-né est exempt de tout germe. L'intestin est rapidement colonisé par les germes provenant de sa mère et aussi de l'entourage. Dans leur grande majorité ces germes sont bénéfiques. On dit souvent que cela permet à l'enfant de « faire ses anticorps ». Ils se feront effectivement peu à peu, mais il faut, selon les cas, de trois à six mois pour qu'une barrière Immunitaire digestive efficace se mette en place. C'est pourquoi il peut encore être conseillé de stériliser les biberons au moins les trois premiers mois. (Georges THIEBAULT.,2021)

Généralement les mamans optent pour deux méthodes dans la reconstitution du lait infantile :

5.2 Première méthode:

Pour les nourrissons, Il convient d'utiliser de l'eau bouillie pour éliminer les microbes. Après avoir fait bouillir l'eau, laissez-la refroidir pendant environ 5 minutes. Ensuite, versez-la dans un biberon propre et ajoutez le lait maternisé en suivant les instructions figurant sur l'emballage (Steven A.Abrams,2024).



Figure n°4: la reconstitution de l'ait infantile par l'eau bouillante.

<https://sympa-sympa.com/articles/pourquoi-il-ne-faut-pas-mettre-le-biberon-au-micro-ondes-et-comment-le-chauffer-avec-dautres-methodes-simples--1039965/>

5.3 Deuxième méthode:

Récemment, cette méthode est largement répandue, ou la reconstitution du lait en poudre se fait à froid suivie par l'utilisation des micro-ondes pour chauffer le biberon. Cette méthode ne prend pas beaucoup de temps par rapport à la précédente (Shadhin Mamun.2022). Le chauffage par micro-ondes (MW) a un rendement énergétique et efficacité énergétique supérieure plus élevé que le chauffage conventionnel, qui nécessite un temps de chauffage relativement court, et il présente l'avantage de préserver la qualité nutritionnelle des aliments (Martins et al.,2019). D'après la littérature, l'utilisation de microonde permet d'obtenir un minimum de changements sensoriels et nutritionnels, avec une sécurité microbiologique,et une durée de conservation plus longue (Sun.2014). Bien que le biberon puisse refroidir au toucher, le lait qu'il contient peut brûler la bouche, la gorge ou l'œsophage des bébés (Shadhin Mamun.,2022). Il faut Vérifier la température du lait avant de nourrir le bébé pour éviter les brûlures (Steven A. Abrams.,2024).



Figure n°5: la reconstitution de l'ait infantile par la micro-onde.

<https://www.nulie.com/can-i-warm-baby-bottle-in-a-microwave/>

6. Nettoyage et stérilisation des biberons et tétines :

Après chaque utilisation du biberon, doit être lavé et nettoyer et même les tétines et les anneaux dès que les nourrissons buvez, sans attendre, à l'aide d'une longue brosse en utilisant de l'eau et généralement le liquide de vaisselle car les bactéries se multiplient rapidement dans les résidus de lait (Georges THIEBAULT.2021).



Figure n°6 : nettoyage des biberons.

<https://www.laboratoires-novalac.fr/reponses-d-experts/du-sevrage-a-la-diversification/pour-nettoyer-le-biberon-de-bebe-ca-se-passe-comment>

6.1 Les stérilisateurs à chaud :

Il existe deux procédés

6.1.1 La stérilisation à l'eau bouillante :

C'est le système le plus ancien, utilisé par les mamans ou dans une grande casserole, remplie en eau qui s'est faite bouillie pendant au quart d'heure, ensuite elles plongent les biberons et tétines pendant 15 min (Georges THIEBAULT.2021).



Figure n°7 : la stérilisation des biberons par l'eau bouillante.

<https://www.bledina.com/steriliser-biberon/>

6.1.2 La stérilisation à micro-ondes :

Un appareil composé d'une base et d'un support pour biberon, ainsi qu'un couvercle, adapté pour être placé dans un micro-ondes. Après avoir nettoyé le biberon, il est placé à l'intérieur de cet appareil avec un peu d'eau, puis le couvercle est fermé et l'appareil est mis au micro-ondes à puissance maximale pendant une durée de 5 à 20 minutes à haute température (Georges THIEBAULT.2021).



Figure n°8 : la stérilisation des biberons par micro-ondes.

<https://goldenbabyshop.com/produit/sterilisateur-micro-ondes-a-vapeur-avent-philips/>

6.2 Hypochlorite de sodium:

La méthode la plus facile : placer dans un bac propre rempli d'eau froide les biberons, bagues et tétines avec d'hypochlorite de sodium. Il faut surtout veiller à ce que les biberons soient complètement remplis d'eau. La stérilisation se fait pendant environ 30 minutes. Cependant, il ne faut pas oublier de les rincer avant utilisation (Georges THIEBAULT.2021).

6.3 Les caractères influençant le procédé de nettoyage :

6.3.1 L'hydrophobicité et la topographie du support :

Les matériaux les plus couramment utilisés en industrie laitière sont les aciers inoxydables AISI 304 et 316 L (Bremer et al., 2009), parce qu'ils répondent exactement aux exigences des matériaux en contact avec les aliments (Marchand et al., 2012), ils sont faciles à nettoyer et résistants à la corrosion. (Bremer et al., 2009), plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micros-colonies est importante, (Characklis, 1990 ; Donlan et Costerton.,2002).

(Ra) est la moyenne arithmétique des valeurs absolues des déviations des hauteurs du Profil par rapport à la ligne moyenne enregistrée. La rugosité est déterminée par la MEB et la microscopie de force atomique (AFM) ainsi que par mesure au rugosimètre. Une surface avec une valeur Ra égale 0.8 μm est considérée comme une surface hygiénique en industrie alimentaire (Lisbeth R.Hilberta.,2003).

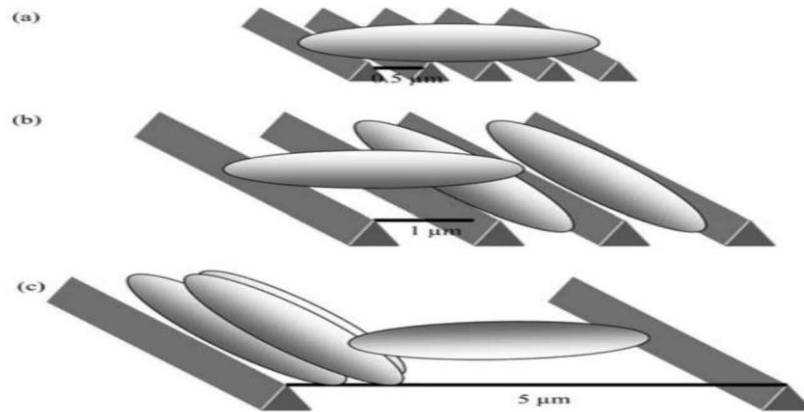


Figure n°9 : caractéristique de surface (rugosité) (K.A.WHITEHEAD , et al.2006).

6.3.2 Propriétés bactériennes :

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence des fimbriaes et des flagelles, et la production d'EPS Influencent l'adhésion des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante pour l'attachement des micro-organismes à cette dernière (Donlan,2002). La majorité des bactéries sont chargées négativement et présentent sur leur surface des zones hydrophobes. Cette hydrophobicité influencent l'attachement des bactéries sur une surface ; moins que les surfaces sont polarisées plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes (Donlan,2002). Les cellules dont la surface est hydrophobe adhèrent préférentiellement aux surfaces hydrophobes qu'aux surfaces hydrophiles et Inversement (Krasowska et al.,2014).

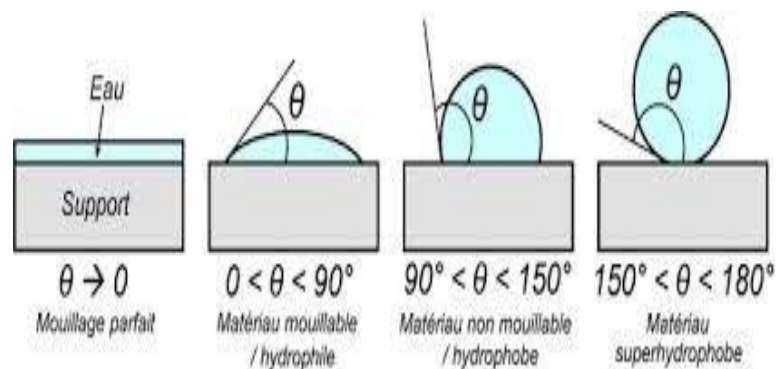


Figure n°10:angle de contact hydrophobe. <https://transformateur-film-plastique.rexor.com/surveillez-votre-tension-de-surface/>

6.4 Système de nettoyage utilisée par industrie laitières :

Les espèces du groupe *Bacillus cereus* ont la capacité d'adhérer et de former des biofilms sur des surfaces solides, y compris l'acier inoxydable, un matériau largement utilisé dans les industries alimentaires. Les biofilms permettent la recontamination pendant le traitement des aliments, et le système "clean-in-place" (CIP) est largement utilisé par les Industries pour les contrôler (Higor Oliveira Silva et al.,2018). Dans l'industrie, les résidus de lait peuvent parfois persister à la surface des équipements en acier inoxydable, formant une mince couche riche en nutriments, appelée film de conditionnement, rendant ces surfaces plus sujettes à l'adhérence bactérienne et à la formation conséquente de biofilms (Machado, 2005). Le système "clean-in-place" (CIP) est couramment utilisé par les industries pour contrôler les biofilms dans les lignes de traitement du lait. Il s'agit d'une procédure de désinfection qui comprend le nettoyage régulier des tuyaux et des équipements en utilisant des solutions acides et alcalines appliquées à haute température (Bremer et al., 2006).

Les systèmes CIP impliquent généralement l'utilisation caustique (hydroxyde de sodium) et acide (acide nitrique), et de produits chimiques initialement sélectionnés pour leur capacité à éliminer les couches de salissures organiques (protéines et graisses) et inorganiques (phosphate de calcium et autres minéraux) (Kessle,1981). Dans certains cas, des désinfectants sont également incorporés dans le système CIP (Kessler 1981; Bylund 1995). Le choix du processus de nettoyage est déterminé par le type et la composition de la matière à nettoyer ainsi que par la conception de l'équipement à nettoyer. (Kessler,1981)

7 La microbiologie prévisionnelle:

La microbiologie prédictive permet de mieux comprendre et contrôler les niveaux de contamination dans les aliments à risque (McMeekin,2002). Les modèles primaires, secondaires et tertiaires sont utilisés pour modéliser le comportement des microorganismes. Les modèles primaires surveillent l'évolution et/ou l'inactivation des microorganismes dans le temps dans un environnement donné. Les modèles secondaires décrivent l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres primaires. Les modèles tertiaires utilisent des systèmes experts et des bases de données pour relier les modèles primaires et décrire l'influence des facteurs environnementaux. Plusieurs modèles cinétiques de l'inactivation ont été décrits, tels que les modèles log-linéaire, weibull et Baranyi (Payne et al., 2007).

Les modèles primaires fournissent des données sur le temps de latence, le taux de croissance maximal et/ou le temps de réduction et la population maximale atteinte à partir d'un inoculum initial donné. À mesure que les conditions changent, ces valeurs changent et les modèles secondaires tentent de produire des formules mathématiques décrivant ces changements, comme l'effet de la température sur le temps de latence ou l'effet du pH sur le taux de croissance spécifique. L'objectif de tels modèles est de produire un modèle avec le moins de paramètres (parcimonie) possible, décrivant les paramètres de croissance observés pour permettre des prédictions (Ratkowsky.,1990). Les principaux facteurs étudiés pour leurs effets sur la croissance dans les modèles primaires disponibles sont la température, l'acidité, l'activité de l'eau, etc (Bassett et al., 2012).

7.1 Outils de modélisation prédictive

7.1.1 PMP

Le Programme de Modélisation des Pathogènes (PMP) est un ensemble de modèles utilisés pour prédire la croissance et l'inactivation de certains pathogènes alimentaires dans diverses conditions environnementales. Les prédictions reposent sur des documents spécifiques, principalement d'auteurs américains. Téléchargement gratuit (Bassett et al., 2012).

7.1.2 ComBase

ComBase est une base de données comprenant des milliers de courbes de croissance et de survie microbienne provenant de recherches et de publications. Elle constitue la base du Prédicteur ComBase (un ensemble de 23 modèles de croissance et six modèles de mort thermique pour prédire la réponse de nombreux microorganismes pathogènes alimentaires et de détérioration aux facteurs environnementaux clés). ComBase contient également le prédicteur Perfringens (pour prédire la croissance de *Clostridium perfringens* pendant le refroidissement des viandes) et la possibilité d'ajuster des modèles prédictifs aux données définies par l'utilisateur. Accès gratuit (Bassett et al., 2012).

7.1.3 DMFit

DMFit est un logiciel (un complément Excel) qui est utilisé pour estimer les taux de croissance spécifiques à partir de données expérimentales avec le modèle de Baranyi (Baranyi et Roberts, 1994). DMFit fait partie du système utilisé en interne à l'Institut de Recherche

Alimentaire pour modéliser la variation temporelle du logarithme des concentrations cellulaires des cultures bactériennes en batch. Téléchargement gratuit (Bassett et al., 2012).

7.1.4 Sym'previus

Sym'Previus est une collection d'outils pour les inspections de sécurité alimentaire conçus pour les entreprises du secteur alimentaire afin de renforcer les plans HACCP, développer de nouveaux produits, mieux comprendre et quantifier le comportement microbien, déterminer les durées de conservation et améliorer la sécurité alimentaire. Accessible après abonnement (Bassett et al., 2012).

8 Analyse des risques :

Il Convient de faire une distinction entre les « dangers » et les « risques ». On entend par danger Un agent biologique, chimique ou physique présent dans les denrées alimentaires pouvant avoir un effet néfaste. Par contraste, le risque est une estimation de la probabilité et de la gravité des effets néfastes sur la santé des populations exposées, du fait de la présence d'un Danger dans les aliments (Sanders.,1999).

L'évaluation des risques peut être une estimation qualitative ou quantitative d'un risque pour elle se fonde sur une procédure à quatre étapes: l'identification des dangers, la caractérisation des dangers (dose/réponse), l'évaluation de l'exposition, la caractérisation des risques, ainsi que l'estimation des probabilités globales de consommation et la gravité des effets sur la santé d'une population donnée de consommateurs

L'évaluation quantitative des risques se trouve à la base des nouveaux systèmes de maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments et devient prépondérante dans le commerce international des denrées alimentaires (Manual., 2005).

Matériel et Méthodes

1. Traitement des échantillons de lait infantile inoculé par *Bacillus*

A travaillé sur des quatre souches de *Bacillus* isolé du lait infantile en forme sporulée et végétative.

Dans le laboratoire de recherche scientifique de l'université Ammar Telidji a Laghouat.

Dans cette étude, nous visons à simuler les pratiques courantes des mamans dans la préparation et la reconstitution des laits pour bébés en utilisant deux méthodes de traitement : l'eau bouillante et les micro-ondes. Cette démarche nous permet de mieux comprendre l'impact de ces méthodes sur la survie et la croissance des bactéries dans le lait infantile, notamment en tenant compte de paramètres critiques tels que la température et le temps de traitement.

1.1. Traitement par micro-ondes

Les micro-ondes représentent une autre méthode courante de préparation du lait pour bébés. Cette méthode est pratique et rapide, mais l'effet des différentes intensités de micro-ondes sur les bactéries présentes dans le lait est moins bien documenté.

1.1.1. Forme végétative :

Pour la forme végétative, nous avons préparé la solution mère à partir de cultures jeunes des quatre souches dans BHIB. La préparation a été divisée en plusieurs échantillons, chacun contenant 90 ml d'eau distillée stérile et trois cuillères de lait infantile (13.8g) Nursie (0-6 mois). Le pH a été mesuré avant l'inoculation. Chaque échantillon a été inoculé avec 100 µl de culture jeune de chaque souche de N0 E1 (4,43 log ufc/g), E2 (4,67 log ufc/g), E3 (4,49 log ufc/g), et E4 (4,77 log ufc/g), puis homogénéisé pour assurer une dispersion uniforme des bactéries.

Les échantillons ont été exposés à différentes intensités de micro-ondes (200W, 400W, 700W, 1000W, et 1200W) pendant des intervalles de temps variés (10, 20, 30, 40, 50, et 60 secondes). Après traitement, des dilutions décimales ont été effectuées jusqu'à une concentration de 10^{-5} . Chaque dilution a étéensemencée avec 100 µl sur un milieu GN

et les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Le pH du lait a été mesuré après le traitement et à la sortie du laboratoire.

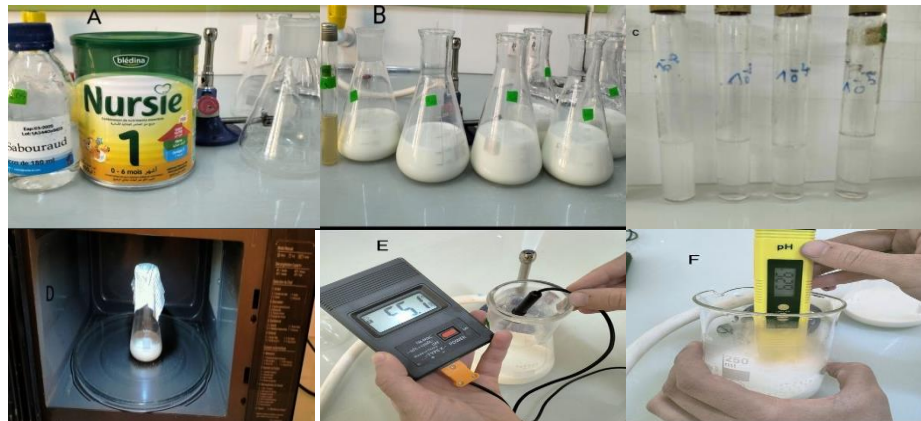


Figure n°11 : A, B, C, D, E, F sont des images représentant les étapes de traitement par microonde.

1.1.2. **Forme sporulante :**

Pour la forme sporulante, nous avons suivi une procédure similaire. La solution mère a été préparée avec 90 ml d'eau distillée stérile et trois cuillères de lait infantile (13.8g) Nursie (0-6 mois) dans chaque échantillon. Le pH a été mesuré avant l'inoculation. Chaque échantillon a été inoculé avec 10 µl de spores de chaque souche N0 : E1 : 7,4 log UFC, E2 : 7,50 log UFC, E3 : 7,50 log UFC, et E4 : 7,55 log UFC, puis homogénéisé pour assurer une dispersion uniforme des spores.

Les échantillons ont été exposés aux mêmes intensités de micro-ondes (200W, 400W, 700W, 1000W, et 1200W) et aux mêmes intervalles de temps (10, 20, 30, 40, 50, et 60 secondes). Après traitement, des dilutions décimales ont été effectuées jusqu'à une concentration de 10^{-5} . Chaque dilution a étéensemencée avec 100 µl sur un milieu GN et les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Le pH du lait a été mesuré après le traitement et à la sortie du laboratoire.

1.2. Traitement par l'eau bouillante

L'utilisation de l'eau bouillante pour préparer le lait infantile est une pratique répandue, recommandée pour éliminer les bactéries potentiellement dangereuses. Ce traitement consiste à ajouter du lait en poudre dans de l'eau distillée stérile bouillante, permettant ainsi de dissoudre la poudre tout en garantissant un certain niveau de stérilisation.

1.2.1. Forme végétative :

Pour préparer la solution mère de la forme végétative, nous avons cultivé quatre souches de bactéries dans un bouillon de culture (BHIB). Chaque culture jeune a ensuite été utilisée pour préparer une solution mère. Dans quatre erlenmeyers, nous avons ajouté 90 ml d'eau distillée stérile bouillante, chauffée sur une plaque chauffante. Nous avons ensuite ajouté trois cuillères de lait infantile (13.8g) Nursie (0-6 mois) à chaque erlenmeyer et mesuré le pH. Chaque erlenmeyer a été inoculé avec 100 µl de culture jeune de chaque souche, puis homogénéisé pour assurer une dispersion uniforme des bactéries. Les échantillons ont été laissés au repos pendant 30 minutes pour permettre l'adaptation des bactéries au lait.

Nous avons ensuite effectué des dilutions décimales de la solution mère jusqu'à une concentration de 10^{-5} . Chaque dilution a étéensemencée avec 100 µl sur un milieu GN et les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Le pH du lait a été mesuré lorsque celui-ci était tiède et à la sortie du laboratoire.

1.2.2. Forme sporulante :

Pour préparer la solution mère de la forme sporulante, nous avons utilisé une procédure similaire. Quatre erlenmeyers contenant 90 ml d'eau distillée stérile bouillante ont été chauffés sur une plaque chauffante. Trois cuillères de lait infantile (13.8g) Nursie (0-6 mois) ont été ajoutées à chaque erlenmeyer et le pH a été mesuré. Chaque erlenmeyer a été inoculé avec 10 µl de spores de quatre souches, puis homogénéisé pour assurer une dispersion uniforme des spores. Les échantillons ont été laissés au repos pendant 30 minutes pour permettre l'adaptation des spores.

Nous avons ensuite effectué des dilutions décimales de la solution mère jusqu'à une concentration de 10^{-5} . Chaque dilution a étéensemencée avec 100 μ l sur un milieu GN et les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Le pH du lait a été mesuré lorsque celui-ci était tiède et à la sortie du laboratoire.

2. Modélisation et Ajustement des Résultats

2.1. Modélisation primaire

Après le dénombrement des bactéries Bacillus, les résultats ont été ajustés en utilisant deux modèles couramment employés pour décrire l'inactivation des micro-organismes : le modèle de destruction logarithmique et le modèle de Weibull modifié par Mafart. Ces modèles permettent de tirer les paramètres d'inactivation et de mieux comprendre la dynamique de la destruction bactérienne sous différentes conditions de traitement.

2.1.1. Modèle de Destruction Logarithmique

Le modèle de destruction logarithmique est basé sur l'hypothèse que les bactéries sont inactivées de manière exponentielle avec le temps. L'équation de ce modèle est la suivante

$$N = N_0 10^{-t/D}$$

Où :

N: Nombre de bactéries survivantes après un temps tt.

N_0 : Nombre initial de bactéries.

tt: Temps de traitement.

D: Valeur D, temps nécessaire pour réduire le nombre de bactéries d'un facteur 10 (réduction de 90%).

Cette expression représente la réduction logarithmique du nombre de bactéries au cours du temps, ou la pente de la courbe de survie représente le temps de traitement (t)

proportionnel à la valeur (D) indique combien de temps il faut pour obtenir une réduction logarithmique de 1 unité (90%).

2.1.2. Modèle de Weibull Modifié par Mafart

Le modèle de Weibull modifié par Mafart est utilisé pour mieux représenter les courbes de survie non linéaires. L'équation de ce modèle est donnée par :

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p$$

Où :

N: Nombre de bactéries survivantes après un temps tt.

N0: Nombre initial de bactéries.

t: Temps de traitement.

δ : Paramètre de temps caractéristique, similaire à la valeur D mais spécifique au modèle de Weibull.

p: Paramètre de forme, décrivant la courbure de la courbe de survie (si $p > 1$, la courbe est convexe ; si $p < 1$, la courbe est concave).

Log (N/N₀) représente la réduction logarithmique du nombre de bactéries au cours du temps. $-(t/\delta)^p$ représente la forme de la courbe de survie. Le paramètre (δ) indique le temps caractéristique de réduction, et le paramètre (p) introduit une variabilité dans la courbure, permettant de mieux représenter la réalité des processus d'inactivation.

Ces deux modèles sont essentiels pour comprendre l'efficacité des traitements thermiques et par micro-ondes utilisés dans cette étude. En ajustant les résultats expérimentaux à ces modèles, nous pouvons obtenir des informations détaillées sur les paramètres d'inactivation des bactéries, ce qui est crucial pour optimiser les processus de reconstitution des laits infantiles et garantir une sécurité microbiologique maximale.

2.2.Modélisation Secondaire

Après avoir ajusté les résultats expérimentaux aux modèles de destruction logarithmique et de Weibull modifié pour obtenir les paramètres d'inactivation primaires, nous avons poursuivi notre analyse en utilisant la modélisation secondaire. L'objectif de cette phase est d'étudier l'effet de la température et du pH sur les paramètres d'inactivation obtenus de la modélisation primaire.

Pour évaluer l'influence de la température et du pH sur les paramètres d'inactivation, nous avons utilisé deux modèles :

2.2.1. Modèle de Rosso

Le modèle de Rosso permet de décrire l'influence de la température et du pH sur les paramètres primaires de croissance ou d'inactivation. Ce modèle est basé sur l'équation de la température cardinale et peut être exprimé comme suit :

$$\delta(T, pH) = \delta_{opt} \cdot \gamma(T) \cdot \gamma(pH)$$

Où :

$\delta(T, pH)$: Taux de croissance spécifique en fonction de la température et du pH.

δ_{opt} : Taux de croissance spécifique optimal.

T: Température actuelle.

T_{min} : Température minimale de croissance.

T_{opt} : Température optimale de croissance.

T_{max} : Température maximale de croissance.

n et m : Coefficients d'ajustement.

Ce modèle peut être adapté pour inclure l'effet du pH en ajoutant des termes similaires pour le pH minimum, optimal et maximum.

2.2.2. Modèle Lambda Concept Modifié par Mafart

Le modèle Lambda Concept, dérivé du Gamma Concept de Zwietering et modifié par Mafart, est utilisé pour décrire l'effet combiné de plusieurs facteurs environnementaux, comme la température et le pH, sur les paramètres d'inactivation.

L'équation peut être écrite comme suit :

$$\delta(T, pH) = \delta_{opt} \cdot \left(\frac{T - T_{min}}{T_{opt} - T_{min}} \right)^{h_1} \cdot \left(\frac{T_{max} - T}{T_{max} - T_{opt}} \right)^{h_2} \cdot \left(\frac{pH - pH_{min}}{pH_{opt} - pH_{min}} \right)^{h_3} \cdot \left(\frac{pH_{max} - pH}{pH_{max} - pH_{opt}} \right)^{h_4}$$

Où :

$\delta(T, pH)$: Paramètre d'inactivation en fonction de la température et du pH.

δ_{opt} : Paramètre d'inactivation optimal.

λ_T : Facteur gamma pour la température.

λ_{pH} : Facteur gamma pour le pH.

Ces modèles nous permettent de quantifier et de prédire l'influence de la température et du pH sur les paramètres d'inactivation des souches de Bacillus étudiées. En combinant les données expérimentales avec ces modèles, nous obtenons une meilleure compréhension des conditions optimales pour l'inactivation bactérienne et pouvons ainsi améliorer la sécurité des laits infantiles reconstitués.

2.3.Évaluation des Modèles par Critères Statistiques

Dans cette section, plusieurs critères statistiques ont été pris en compte pour comparer et vérifier la meilleure représentation de nos résultats obtenus par les modèles de destruction microbienne. Parmi les critères utilisés, nous avons principalement utilisé le RMSE (Root Mean Square Error) et le coefficient de détermination R^2 .

En utilisant le RMSE et R^2 , nous pouvons évaluer la capacité des modèles de destruction microbienne à ajuster nos données expérimentales, ce qui renforce la fiabilité de nos prédictions quant à l'inactivation des souches de Bacillus dans les conditions étudiées. Ces critères nous permettent ainsi de sélectionner le modèle le plus approprié pour décrire et prédire le comportement de Bacillus dans les produits alimentaires, notamment les laits infantiles.

2.3.1. Root Mean Square Error (RMSE)

Le RMSE est une mesure de l'écart moyen entre les valeurs prédites par le modèle et les valeurs observées dans les données expérimentales. Il est calculé comme la racine carrée de la moyenne des carrés des écarts entre les valeurs prédites et les valeurs observées. Un RMSE plus faible indique que le modèle prédit les données expérimentales avec une précision plus élevée.

2.3.2. Coefficient de Détermination (R^2)

Le coefficient de détermination R^2 mesure la proportion de la variance totale des données qui est expliquée par le modèle. Un R^2 proche de 1 indique que le modèle explique une grande partie de la variance des données observées, tandis qu'un R^2 proche de 0 signifie que le modèle ne parvient pas à expliquer les variations observées.

3. Étude du potentiel des Souches de Bacillus à Former le Biofilm

Cette partie vise à évaluer la capacité des souches de Bacillus à former des biofilms, une caractéristique cruciale dans leur pathogénicité et leur résistance aux conditions environnementales et aux traitements. Les méthodes utilisées permettent une quantification précise et une comparaison entre les conditions de croissance, contribuant

ainsi à une meilleure compréhension de la dynamique de formation de biofilm chez ces bactéries.

3.1.Méthode de Quantification sur des Microplaques (96 Puits)

3.1.1. Forme Végétative

Les souches ont été cultivées dans des tubes contenant 10 ml de BHIB et incubées pendant 24 heures à 37°C. Les cultures ont été ensuite inoculées à raison de 200 µL dans des puits de microplaques (souches E1 aux puits 1 et 2, puits 4 et 5 pour E2, puits 7 et 8 pour E3, et puits 10 et 11 pour E4, avec des puits vides alternés). De même, les souches ont été cultivées dans du lait stérile (autoclavé) et inoculées dans d'autres puits, avec un contrôle dans des puits contenant uniquement BHIB stérile ou du lait stérile.

3.1.2. Forme Sporulante

Les spores des souches ont étéensemencées dans des tubes contenant BHIB stérile ou de l'eau physiologique stérile, puis inoculées dans les puits de microplaques comme décrit précédemment. Une autre série de puits a été inoculée avec des spores dans du lait stérile ou BHIB stérile.

Les microplaques ont été incubées à 30°C pendant 24 heures. Après incubation, la suspension bactérienne a été aspirée, les puits ont été lavés avec de l'eau distillée pour éliminer les cellules planctoniques, puis séchés à température ambiante sur du papier absorbant. Les puits ont ensuite été colorés avec une solution de cristal violet à 1% pendant 15 minutes, suivie de lavages à l'eau distillée et d'une exposition à de l'éthanol à 70% pendant 10 minutes pour fixer le colorant. Après évaporation de l'éthanol, les bactéries colorées ont été solubilisées avec de l'éthanol à 95% et la densité optique (DO) a été mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Les valeurs de DO représentent l'indice des bactéries formant des biofilms sur la surface des puits.

3.2.Détection par la Méthode de Rouge Congo Agar

Cette méthode qualitative permet de visualiser les biofilms par leur capacité à colorer la gélose, indiquant ainsi la présence et l'étendue du biofilm formé. Le milieu a été préparé en ajoutant 0,08 g de Rouge Congo, 5 g de saccharose, 3,7 g de BHIB et 1 g d'agar dans 100 ml d'eau distillée. Les cultures de 24 heures des souches sur BHIB ont été

ensemencées sur cette gélose autoclavée en utilisant une pipette pasteur par des striures. Les plaques ont été incubées à 30°C pendant 48 heures.

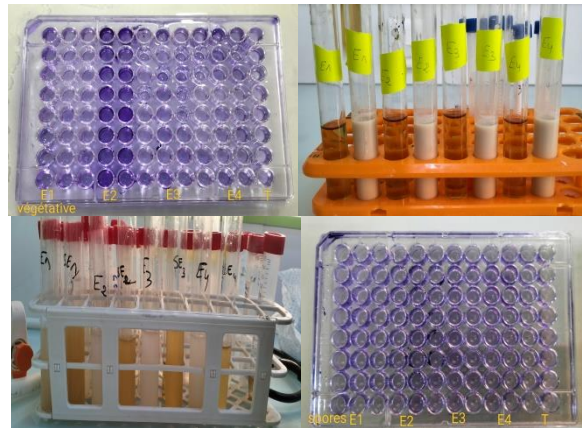


Figure n°12 : détection de biofilm sur forme végétative et sporulant

4. Étude de la Formation de Biofilm sur Surfaces en PTFE et Silicone

Cette partie vise à évaluer l'efficacité des méthodes de nettoyage domestique couramment utilisées pour réduire la formation de biofilm sur les surfaces de PTFE et de silicone. Les biofilms qui peuvent se former sur les surfaces et résister aux méthodes de nettoyage traditionnelles, constituant ainsi un risque potentiel pour la contamination des aliments et la santé des nourrissons.

Le choix des matériaux, notamment le PTFE (polytétrafluoroéthylène) et le silicone, n'est pas fortuit, mais plutôt délibéré en raison de leur utilisation répandue dans la fabrication des biberons et d'autres équipements liés à l'alimentation des nourrissons.

Le PTFE est un polymère fluoré connu pour ses propriétés antiadhésives et sa résistance à la chaleur, ce qui le rend idéal pour les applications où une faible friction et une haute résistance chimique sont nécessaires. Il est largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour ses caractéristiques inertes et sa capacité à résister aux températures élevées.

Le silicone, quant à lui, est un polymère synthétique flexible et résistant à la chaleur, souvent utilisé pour sa durabilité, sa transparence et son absence d'odeur ou de goût. Il est également non réactif et facile à nettoyer, ce qui en fait un choix populaire

pour les articles qui entrent en contact avec les aliments et les liquides, y compris les biberons.

En sélectionnant le PTFE et le silicone comme substrats d'étude, cette partie vise à simuler les conditions réelles d'utilisation des biberons et autres équipements, tout en évaluant l'efficacité des pratiques de nettoyage domestique pour maintenir des surfaces propres et sûres pour les nourrissons.

4.1.Préparation et Stérilisation des Surfaces

Avant leur utilisation, des coupons de PTFE et de silicone (2 cm x 1 cm) ont été préparés en les trempant pendant 2 heures dans de l'éthanol à 70%. Les coupons ont ensuite été lavés trois fois avec de l'eau distillée stérile, séchés et stérilisés à l'autoclave (Greetje A.A. Castelijn.,2013)

4.2.Dénombrement du Biofilm Adhéré sur les Coupons de PTFE et Silicone

Dans cette partie de l'étude, nous avons cherché à évaluer la capacité des souches bactériennes à former des biofilms sur des surfaces de PTFE et de silicone, simulant ainsi les conditions de contamination potentielles sur les surfaces de biberons.

4.2.1. Culture des Souches

Des cultures jeunes de quatre souches ont été préparées dans 10 ml de BHIB. Pour chaque souche, 5 ml de ces cultures ont été utilisés pour contaminer deux tubes de lait stérile, un avec des coupons de silicone et l'autre avec des coupons de PTFE. Les tubes ont été incubés à 30°C pendant un temps spécifié.

4.2.2. Détachement du Biofilm

Après incubation, les coupons ont été retirés des tubes et placés dans des tubes contenant 10 ml de BHIB stérile. Les tubes ont ensuite été placés dans un bain à ultrasons pendant 3 minutes à vitesse maximale pour détacher le biofilm adhérent. Une série de dilutions décimales jusqu'à 10^{-4} a été réalisée, et 100 µl des dilutions ont étéensemencées en surface sur milieu GN. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24 heures pour permettre la croissance des bactéries.

4.3.Méthode d'AFM (Microscopie à Force Atomique)

Cette partie a été réalisé dans le centre CRAPC Laghouat. Pour évaluer l'efficacité des méthodes de nettoyage et de désinfection utilisées couramment par les mamans pour

nettoyer les biberons, nous avons également mesuré la rugosité des surfaces de PTFE et de silicone avant et après traitement.

4.3.1. Préparation des Coupons

Les colonies des souches E1 et E2 ont étéensemencées dans 10 ml de BHIB et incubées à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, des coupons stériles de PTFE et de silicone ont été insérés dans des tubes contenant BHIB, un pour chaque type de surface (PTFE et silicone) par souche. Les tubes ont été incubés à 30°C pendant 24 heures.

4.3.2. Traitement des Surfaces :

Après incubation, une surface de PTFE et de silicone dans chaque groupe a été traitée avec de l'hypochlorite de sodium(Bref) 13°dilué (10 ml de javel dans 90 ml d'eau distillée) pendant 5 minutes sans action mécanique pour simuler le nettoyage courant effectué par les mamans sur les biberons. Les autres surfaces de PTFE et de silicone sont restées sans traitement.

4.3.3. Mesure de la Rugosité :

À l'aide du microscope à force atomique (AFM), la rugosité de toutes les surfaces a été mesurée avant et après le traitement à l'hypochlorite de sodium. Cette méthode permet d'évaluer les modifications de la structure de surface dues au biofilm ainsi que l'efficacité du traitement de nettoyage appliqué.

5. Analyse Statistique

Cette étude inclut une analyse statistique rigoureuse visant à évaluer divers aspects soulevés dans cette étude. Cette partie vise à évaluer les effets des traitements thermiques et des microondes sur les souches de Bacillus dans le lait infantile. L'étude intègre une comparaison statistique approfondie à l'aide d'ANOVA one-way pour les modèles primaires, du test de Tukey pour les comparaisons multiples, et d'ANOVA two-way pour évaluer l'amplitude des effets des variables indépendantes. Les logiciels GraphPad Prism 8.0.2 et Excel 2016 ont été utilisés pour analyser les données statistiques et pour générer les différentes courbes y compris celles du modèle Weibull.

Résultats et discussion

1. Modilisation de l'inactivation des bacillus

1.1. Traitement par microonde (MW)

Après le traitement par micro-ondes, nous avons effectué des tests sur du lait infantile inoculé avec quatre souches de *Bacillus* sous forme végétative. Nous avons ensuite modélisé les résultats du dénombrement des bactéries en utilisant des modèles logarithmiques et des modèles de Weibull. Ces modèles nous ont permis de mieux comprendre la destruction de *Bacillus* par le traitement micro-ondes.

Pour évaluer l'efficacité du traitement, nous avons également réalisé un test de Tukey. Ces modèles et analyses sont essentiels pour comprendre l'efficacité des traitements sur l'inactivation de *Bacillus*. En utilisant ces méthodes, nous pouvons optimiser les conditions de traitement pour garantir la sécurité et la qualité du lait infantile.

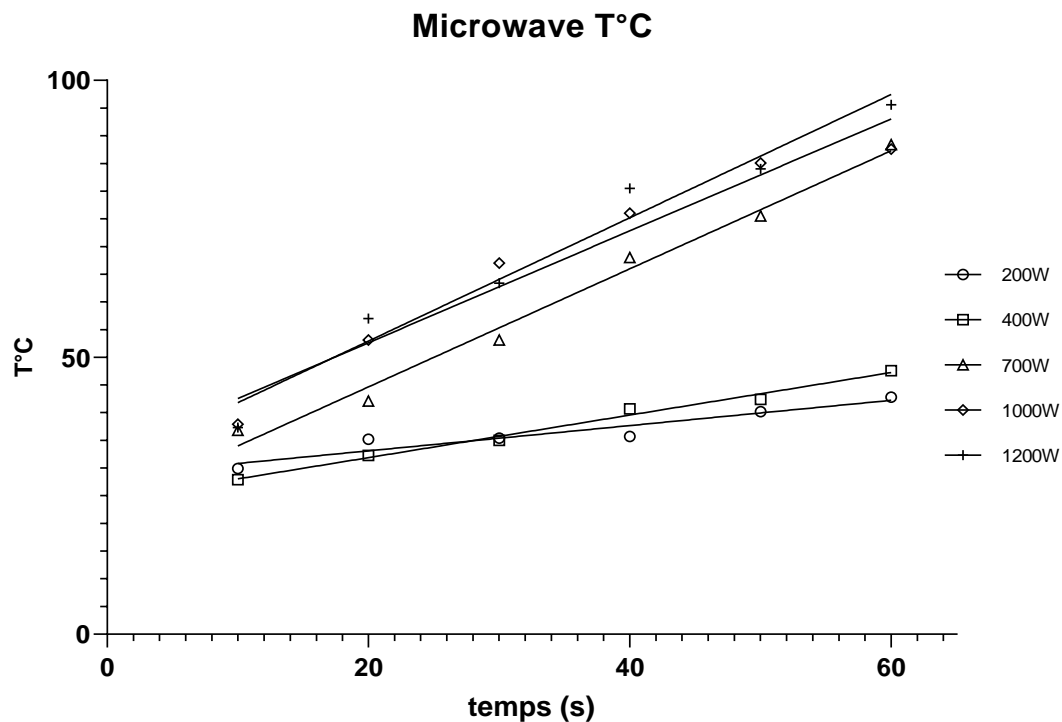


Figure n°13 : Courbe de température de chaque puissance de la microonde en fonction de temps.

Ce graphique illustre l'évolution de la température (en °C) en fonction du temps (en secondes) pour différentes puissances d'un four à micro-ondes. On observe que plus la puissance du micro-ondes est élevée, plus la température augmente rapidement.

Les niveaux de puissance élevés (700 W, 1000 W et 1200 W) montrent une augmentation rapide de la température en un laps de temps court, comparé aux puissances plus basses comme 200 W et 400 W. Cela démontre clairement l'impact significatif de la puissance sur le processus de chauffage par micro-ondes.

L'analyse de l'effet de la puissance révèle que des niveaux plus élevés entraînent non seulement une augmentation plus rapide de la température, mais aussi une élévation plus marquée de celle-ci. Ce phénomène est crucial dans les applications où la rapidité et l'intensité du chauffage sont essentielles.

En outre, le temps de traitement joue un rôle crucial dans l'efficacité globale du processus. Une durée prolongée de traitement favorise une efficacité accrue, permettant une diffusion et une homogénéisation thermique optimales.

1.1.1. Modèle logarithmique

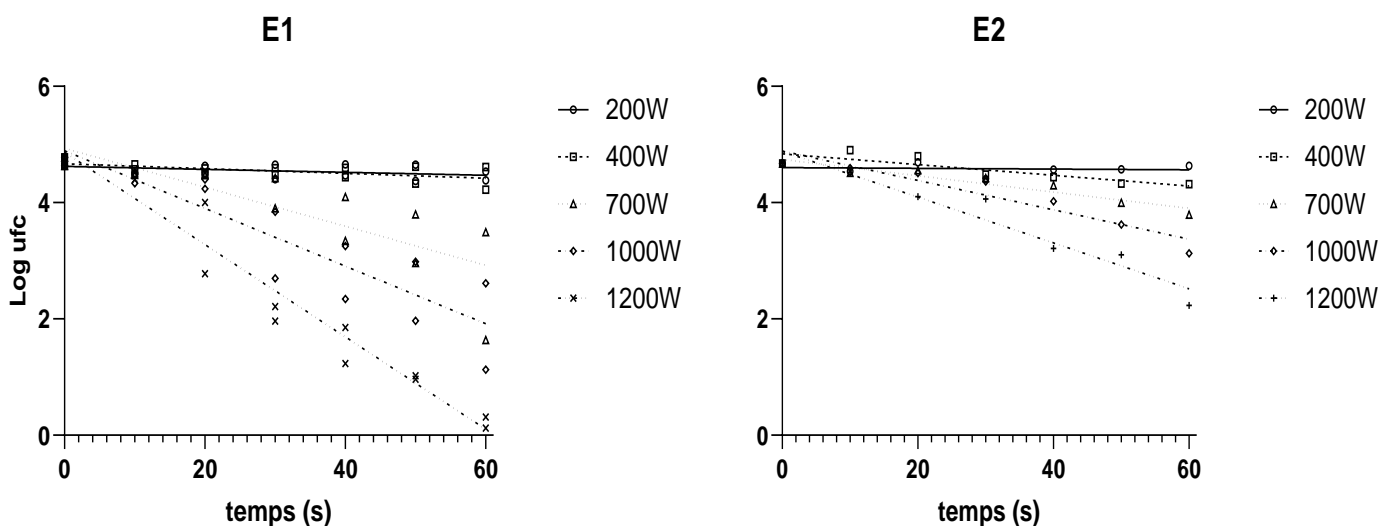


Figure n°14 : les courbes de Modèle logarithmique de la destruction des souches E1 et E2 dans traitement par MW sur différente puissance.

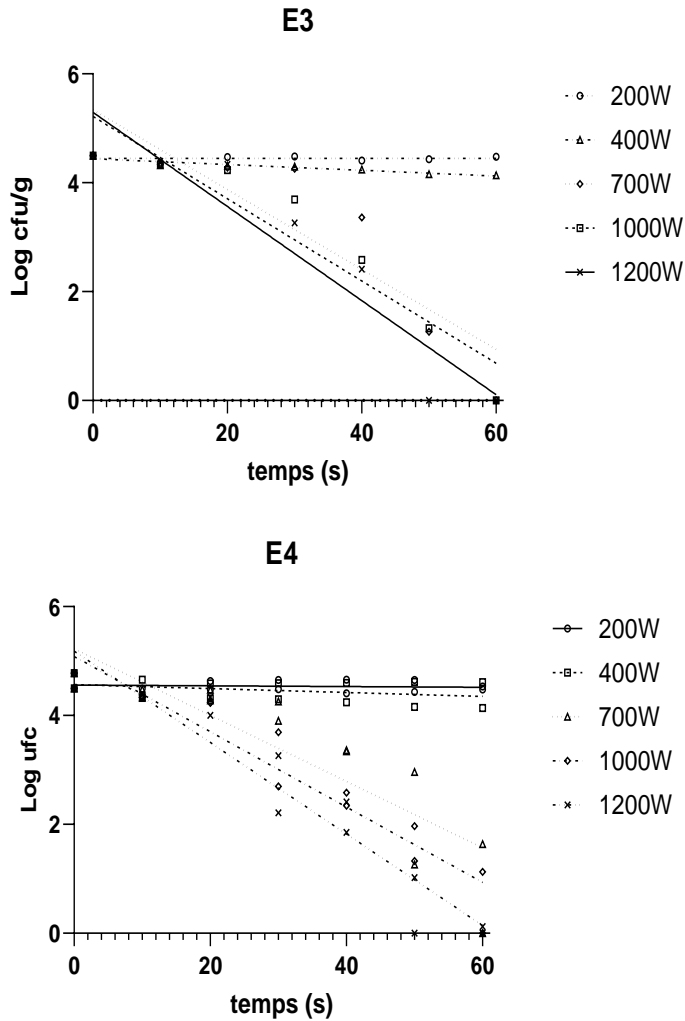


Figure n°15 : les courbes de Modèle logarithmique de la destruction des souches E3 et E4 dans traitement par MW sur différente puissance.

Les courbes logarithmiques $\log N(t)$ en fonction du temps pour les quatre souches à différentes puissances de traitement montrent des variations significatives. Les valeurs initiales de N_0 pour les souches sont les suivantes : E1 (4,43 log ufc/g), E2 (4,67 log ufc/g), E3 (4,49 log ufc/g), et E4 (4,77 log ufc/g). À des puissances de traitement de 700 W, la température varie de 81°C à 89°C, de 80°C à 95°C pour 1000 W, et de 89°C à 96°C pour 1200 W, toutes ces conditions entraînant une diminution de n_0 pour toutes les souches après 60 secondes.

En revanche, à 200 W (température de 42°C à 54°C) et à 400 W (température de 43°C à 52°C) pendant 60 secondes, on observe une diminution initiale de N_0 très faible pour toutes les souches.

Des études similaires ont été menées sur des préparations pour nourrissons, impliquant divers micro-organismes comme *Cronobacter sakazakii*. Koenig et Daschner (1996) ont évalué l'effet du chauffage par micro-ondes sur l'inactivation de plusieurs micro-organismes tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Cronobacter sakazakii*, et *Mycobacterium*, dans des préparations de lait pour nourrissons. Ils ont démontré une diminution significative de la population microbienne après traitement par micro-ondes, soulignant ainsi l'efficacité de cette méthode.

D'autres recherches ont examiné l'efficacité de différents paramètres de micro-ondes (de 400 à 900 W, variant de 0 à 120 secondes) pour l'inactivation de *C. sakazakii* dans des préparations pour nourrissons reconstituées. Ces études ont révélé que des puissances comprises entre 800 et 900 W permettaient de réduire la population initiale de *C. sakazakii* à des niveaux indétectables (≥ 8 cycles logarithmiques).

Dans le cas de notre étude, il est important de noter qu'il serait très difficile d'atteindre des taux élevés de réduction, en raison de la résistance significative des souches de *Bacillus* étudiées.

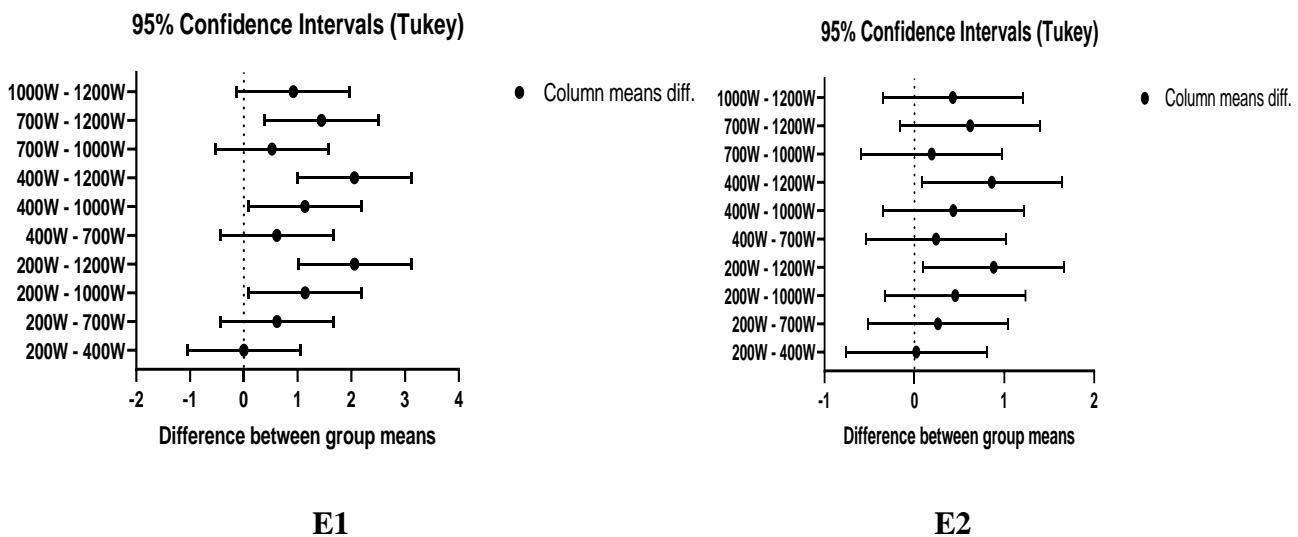


Figure n° 16: test tukey de comparaison multiple entre les puissances dans les souches E1 et E2.

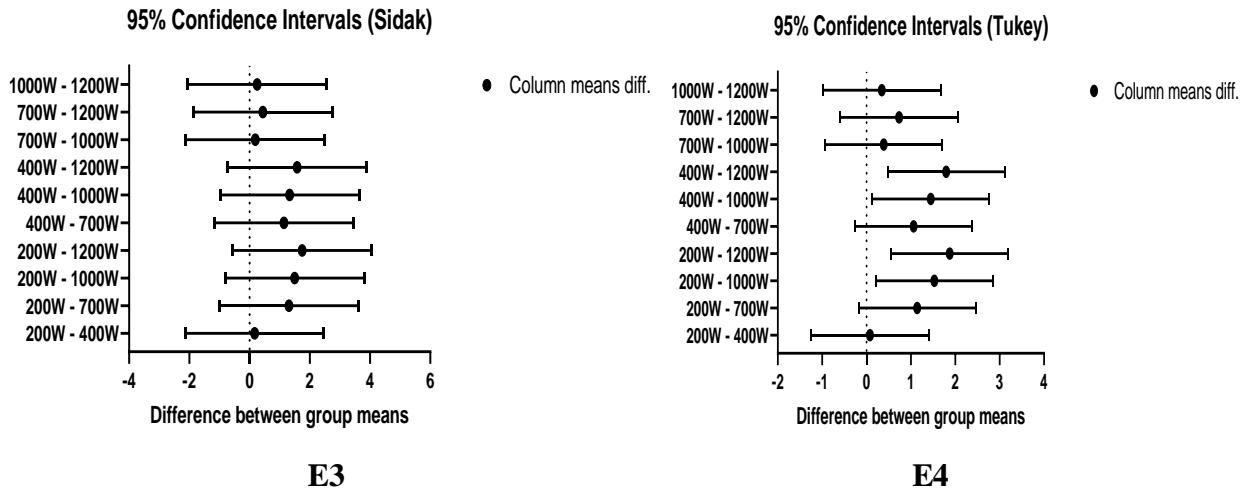


Figure n°17 : test tukey de comparaison multiple entre les puissances dans les souches E3 et E4.

Après avoir effectué une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Tukey pour comparer les différences minimales entre les puissances pour toutes les souches de Bacillus (E1, E2, E3, E4), les résultats indiquent ce qui suit :

Pour les comparaisons entre les intensités de 200 W avec 400 W d'une part, et de 1000 W avec 1200 W d'autre part, il n'y a pas de différence significative car les moyennes sont superposées. En revanche, entre les intensités de 200 W avec 700 W, 200 W avec 1000 W, et 200 W avec 1200 W, ainsi qu'entre 400 W avec 700 W, 400 W avec 1000 W, et 400 W avec 1200 W, et enfin entre 700 W avec 1000 W et 700 W avec 1200 W, il existe une différence significative car les moyennes diffèrent de manière notable.

Ces résultats s'interprètent de la manière suivante : lorsque les moyennes dans la comparaison multiple entre les intensités se chevauchent, cela indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ces intensités. En revanche, lorsque les moyennes diffèrent de manière notable, cela dénote une différence significative entre les intensités comparées.

1.1.2. Modèle Weibull :

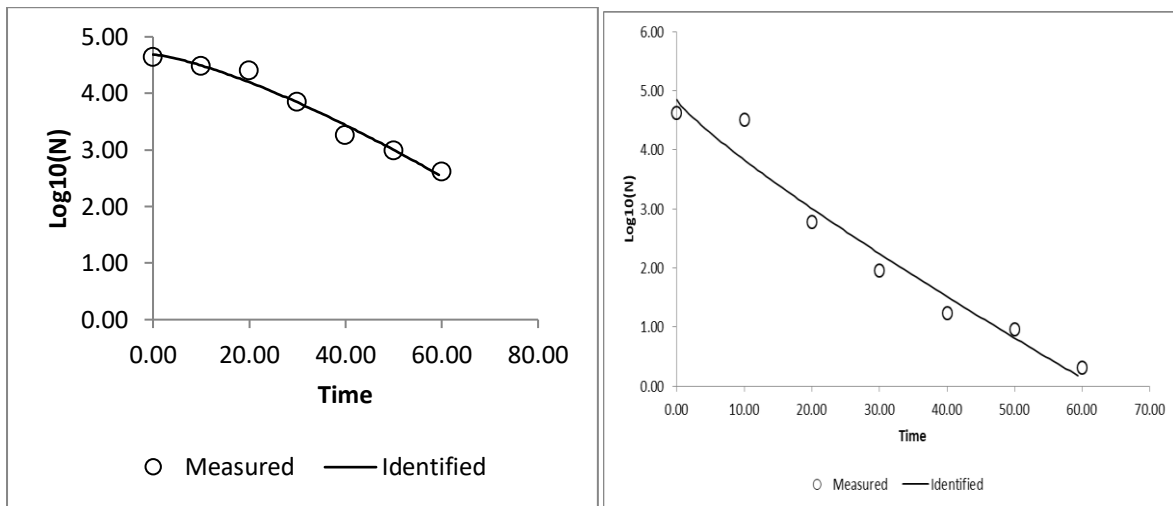
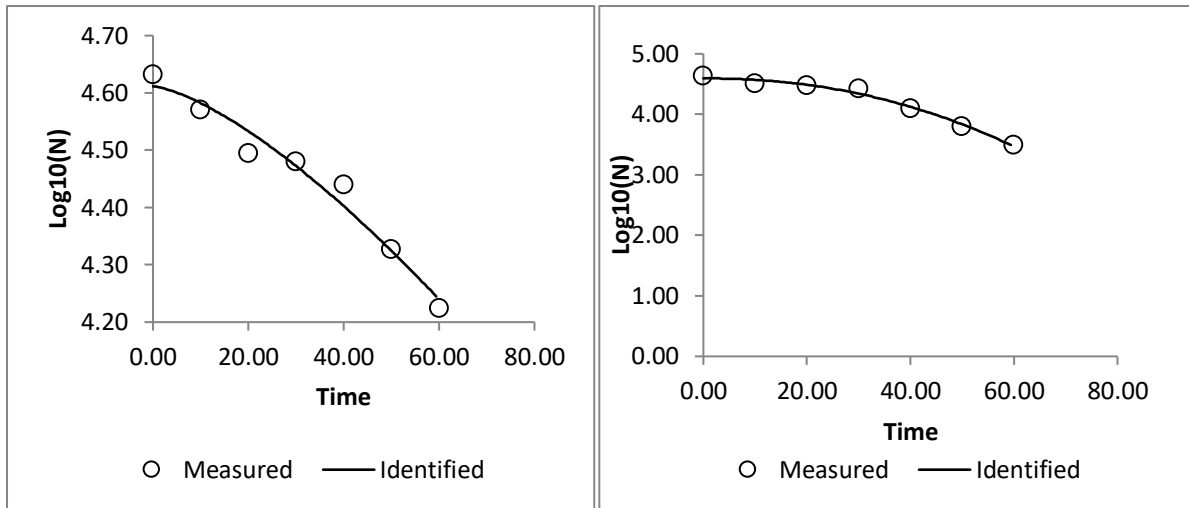
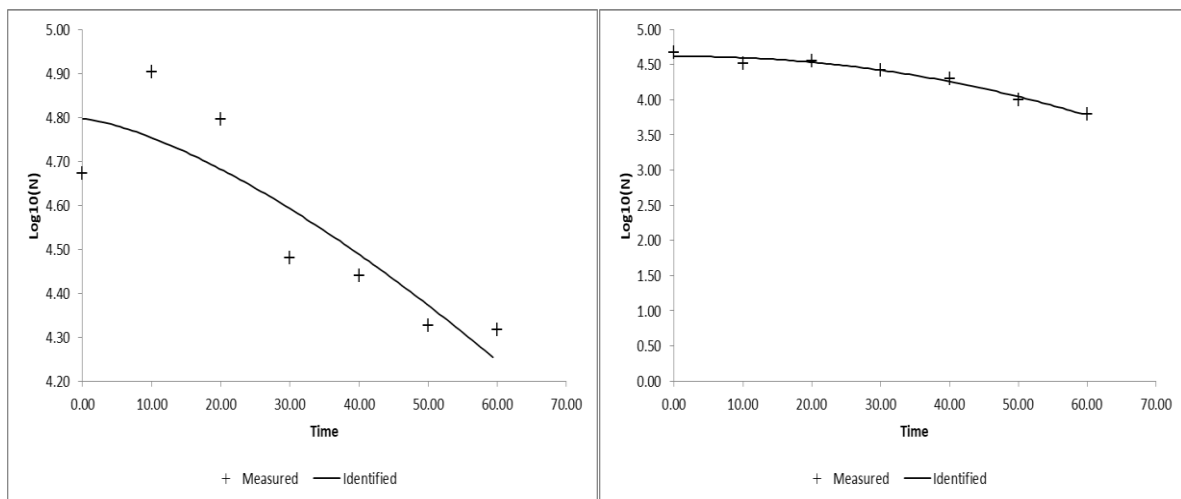


Figure n° 18: les courbes de Modèle weibull de la destruction des souches E1 dans traitement par MW sur différente puissance.



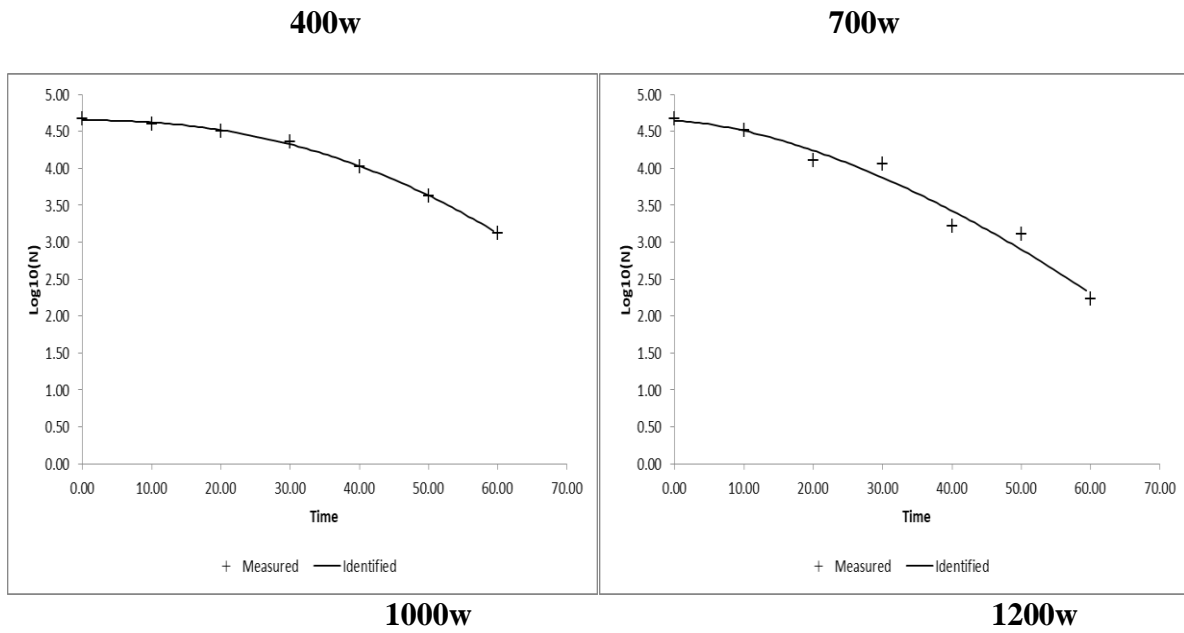
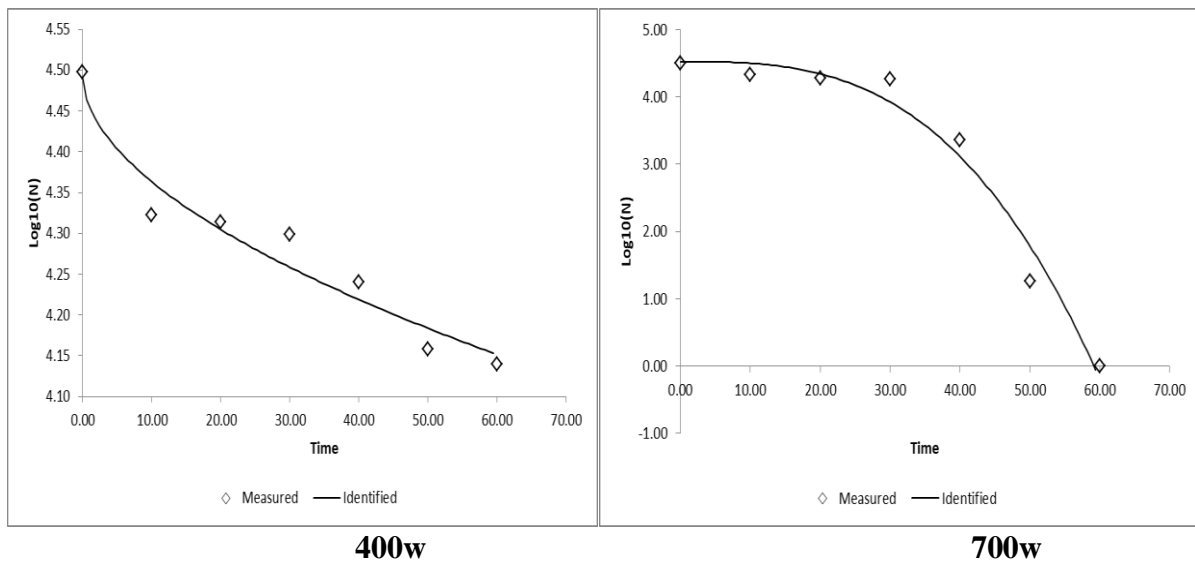


Figure n°19 : les courbes de Modèle weibull de la destruction des souches E2 dans traitement par MW sur différente puissance.



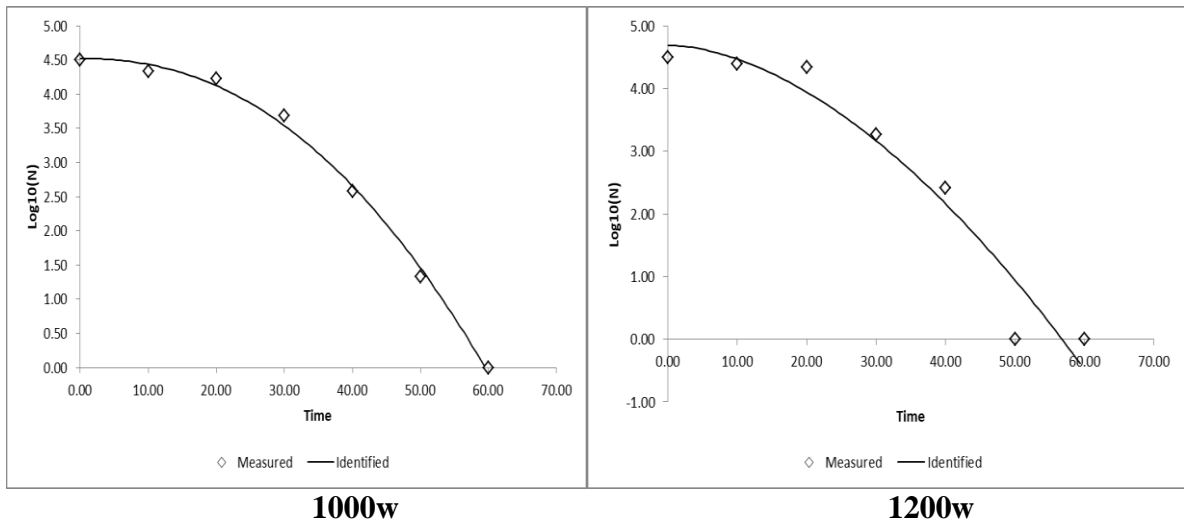
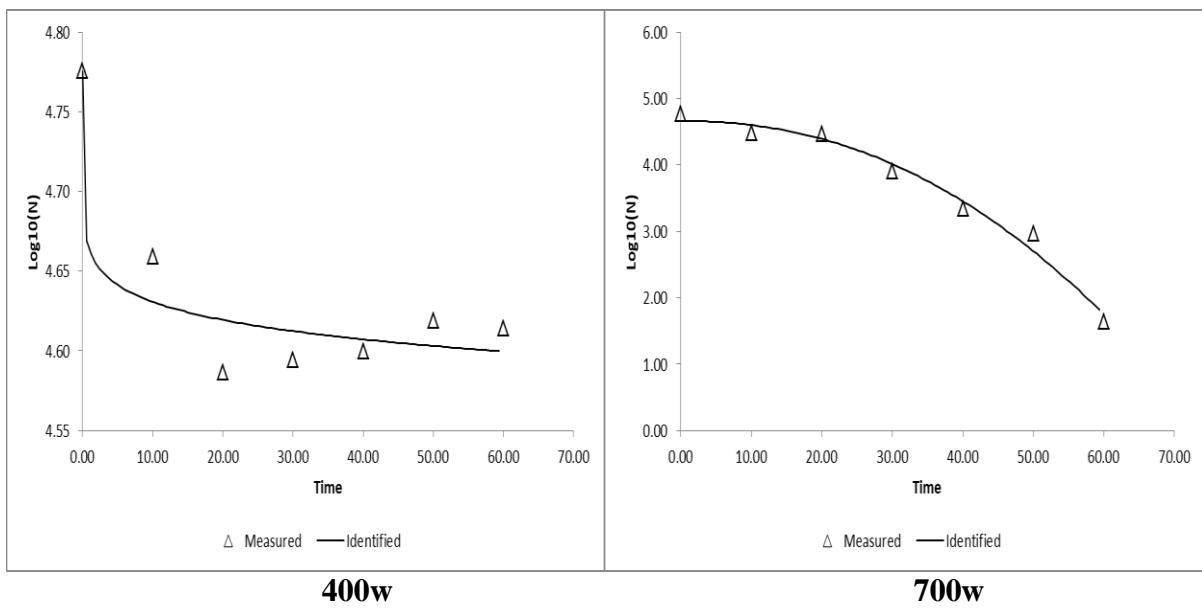


Figure n°20 : les courbes de Modèle weibull de la destruction des souches E3 dans traitement par MW sur différente puissance.



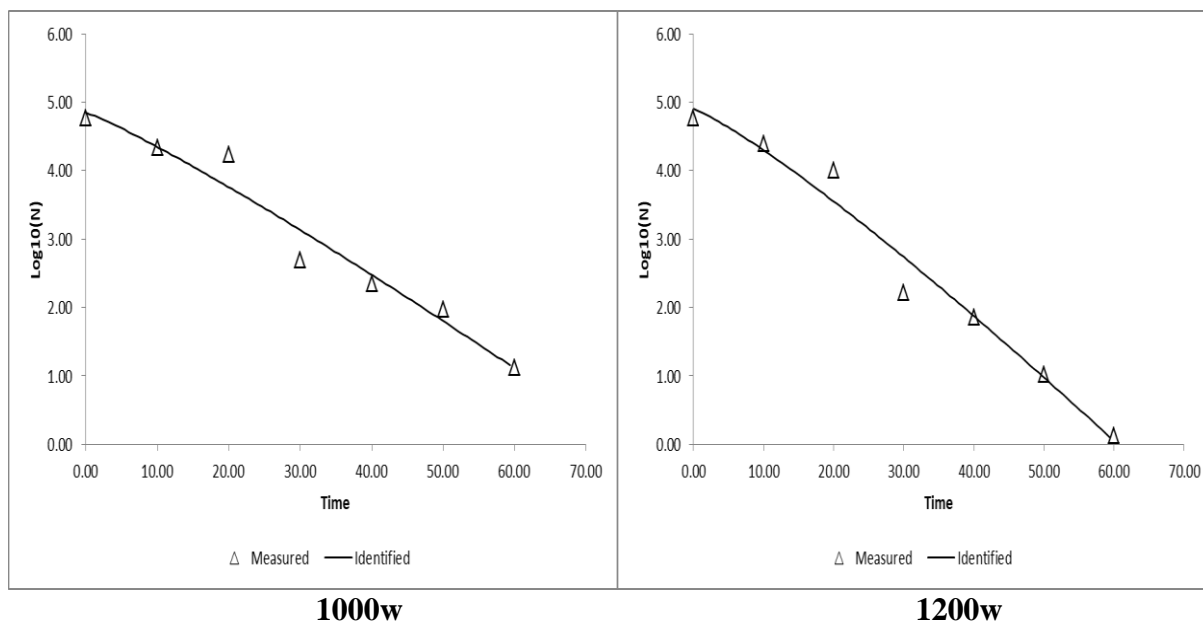


Figure n°21 : les courbes de Modèle weibull de la destruction des souches E4 dans traitement par MW sur différente puissance.

Le modèle de Weibull a été utilisée pour modéliser la réduction de la population bactérienne au fil du temps sous différentes puissances (400 W, 700 W, 1000 W, 1200 W) sur quatre souches de *Bacillus* (E1, E2, E3, E4). Les résultats révèlent que l'augmentation de la puissance du micro-ondes entraîne une élévation de la température, conduisant à une réduction de la valeur N pour toutes les souches.

Plus précisément, les traitements à 1000 W température (80°C à 95°C) et 1200W(89°C à 96°C) ont conduit à une inactivation presque complète de la valeur N pour les souches E3 et E4, tandis que les souches E1 et E2 ont montré une résistance notable, avec seulement une diminution de la population bactérienne observée à ces puissances, ce qui revêt une importance critique dans l'évaluation de la sécurité alimentaire des produits destinés aux nourrissons.

Il est essentiel de noter que les souches E1 et E2 se sont révélées particulièrement résistantes par rapport aux souches E3 et E4, soulignant ainsi la nécessité d'adapter les paramètres de traitement en fonction de la résistance spécifique des micro-organismes visés. Cette distinction met en lumière l'importance de la gestion efficace des processus de traitement pour garantir la qualité et la sécurité des produits alimentaires.

Ces observations sont cohérentes avec les conclusions de la littérature scientifique, soulignant que des niveaux élevés de puissance de micro-ondes sont nécessaires pour garantir une

inactivation totale des micro-organismes pathogènes, en particulier dans les produits alimentaires sensibles comme les préparations pour nourrissons.

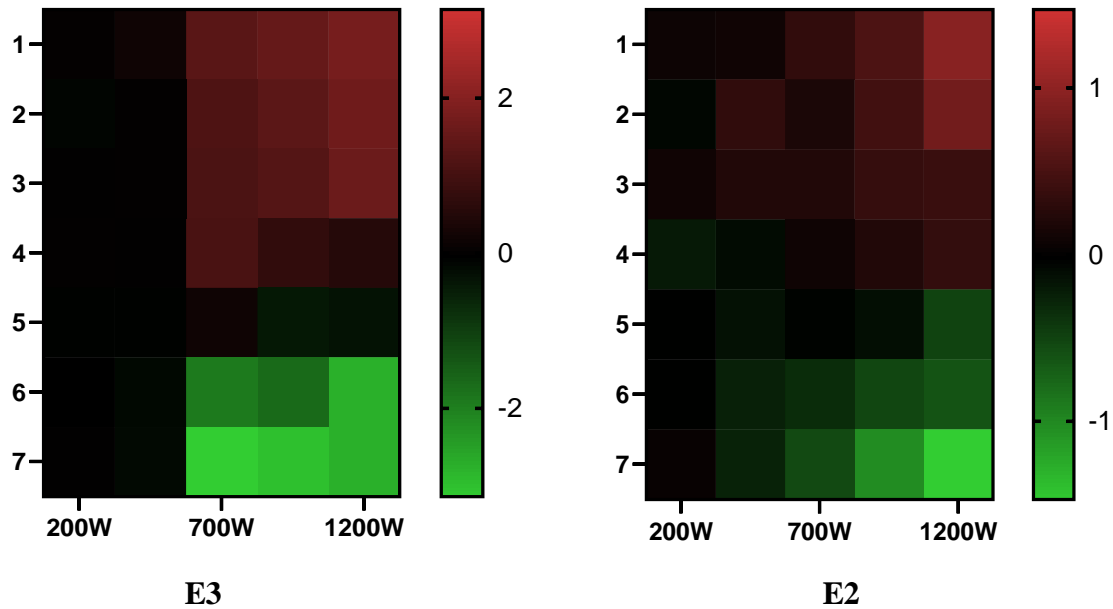


Figure n°22 : des cartes thermique de souche E3 et E4.

En continuité avec notre analyse, les résultats des cartes thermiques (figure n°22) en se concentrant spécifiquement sur les souches E2 et E3, montre qu'à une intensité de 200 W, la présence de la couleur noire indique qu'il n'y a pas d'effet significatif, car la température est basse et le traitement n'est pas efficace. En revanche, aux intensités comprises entre 700 W et 1200 W, les couleurs rouge et verte indiquent un effet significatif. Ces couleurs signalent que la température atteinte est élevée et que le traitement est efficace. La couleur verte, en particulier, représente une zone de sécurité où les conditions sont très efficaces, particulièrement à 1200 W.

Tableau n°2 : la valeur de D et Z et la comparaison entre R-square weibull et linéaire et entre RMSE et SYX, δ weibull

| souches | la puissance | D | Z | R-Square weibull | R-Square linéaire | RMSE weibull | Syx linéaire | δ weibull |
|-----------|--------------|--------|-------|------------------|-------------------|--------------|--------------|------------------|
| E1 | 200w | 392.46 | 37.59 | | 0.188 | | 0.114 | |
| | 400w | 241.48 | | 0.967 | 0.368 | 0.030 | 0.117 | 120.43±19.20 |
| | 700w | 29.81 | | 0.986 | 0.667 | 0.060 | 0.511 | 56.83±1.63 |
| | 1000w | 20.15 | | 0.977 | 0.811 | 0.146 | 0.517 | 33.95±4.30 |
| | 1200w | 12.58 | | 0.955 | 0.951 | 0.442 | 0.387 | 9.84±4.83 |
| E2 | 200w | 1589 | 38.33 | | 0.019 | | 0.106 | |
| | 400w | 108.6 | | 0.774 | 0.740 | 0.134 | 0.129 | 91.19±28.54 |
| | 700w | 71.34 | | 0.975 | 0.902 | 0.060 | 0.109 | 65.20±2.62 |
| | 1000w | 39.62 | | 0.998 | 0.899 | 0.028 | 0.199 | 49.61±0.64 |
| | 1200w | 25.37 | | 0.968 | 0.934 | 0.192 | 0.246 | 35.45±4.81 |
| E3 | 200w | 41401 | 15.52 | | 0.0001 | | 0.051 | |
| | 400w | 189.9 | | 0.945 | 0.896 | 0.034 | 0.042 | 435.27±245.99 |
| | 700w | 13.62 | | 0.973 | 0.783 | 0.359 | 0.912 | 35.673±3.82 |
| | 1000w | 13.23 | | 0.995 | 0.889 | 0.136 | 0.633 | 30.26±1.69 |
| | 1200w | 11.57 | | 0.941 | 0.880 | 0.588 | 0.752 | 23.62±7.08 |
| E4 | 200w | 1489 | 24.82 | | 0.011 | | 0.120 | |
| | 400w | 276.4 | | 0.896 | 0.133 | 0.026 | 0.199 | 524.13±905 |
| | 700w | 16.41 | | 0.980 | 0.756 | 0.187 | 0.746 | 36.66±3.35 |
| | 1000w | 14.46 | | 0.959 | 0.906 | 0.341 | 0.479 | 18.58±5.92 |
| | 1200w | 11.9 | | 0.973 | 0.919 | 0.359 | 0.538 | 15.45±4.52 |

Ce tableau récapitulatif présente les valeurs de destruction thermique pour toutes les souches de Bacillus (E1, E2, E3, E4) sous différentes intensités de micro-ondes (200 W, 400 W, 700 W, 1000 W, 1200 W), ainsi que les coefficients de détermination R^2 des modèles de Weibull et linéaire, le RMSE du modèle de Weibull, le SYX du modèle linéaire, et le delta du modèle de Weibull. Nous avons comparé ces valeurs pour déterminer le meilleur modèle de représentation entre le modèle de Weibull et le modèle linéaire logarithmique. Les résultats de cette comparaison montrent que le modèle de Weibull offre la meilleure représentation.

En effet, le coefficient de détermination R^2 pour toutes les souches sous toutes les intensités (400 W, 700 W, 1000 W, 1200 W) dans le modèle de Weibull approche 1, indiquant une excellente adéquation du modèle aux données. En revanche, dans le modèle linéaire, le R^2 est inférieur à 1 pour ces mêmes conditions, ce qui indique un moins bon ajustement du modèle linéaire comparé au Weibull. Un R^2 proche de 1 dans un modèle indique une meilleure représentation des données observées.

Également pour la comparaison des valeurs RMSE du modèle de Weibull et des valeurs SYX du modèle linéaire. Le RMSE pour toutes les souches sous toutes les intensités (400 W, 700 W, 1000 W, 1200 W) dans le modèle de Weibull est inférieur aux valeurs SYX du modèle linéaire pour toutes les souches de Bacillus. Ce faible taux d'erreur dans la représentation du modèle de Weibull renforce sa supériorité dans la modélisation des données observées.

En ce qui concerne la valeur D pour toutes les souches (E1, E2, E3, E4), nous observons que plus l'intensité de micro-ondes est élevée, plus la température augmente, ce qui conduit à une diminution de la valeur D.

La valeur Z représente la température nécessaire pour réduire la population de la souche Bacillus d'un logarithme. Après calcul, nous obtenons les valeurs suivantes : E1 = 37.59, E2 = 38.33, E3 = 15.52, E4 = 24.82. La souche E2 présente la valeur Z la plus élevée, ce qui indique une plus grande résistance à la température par rapport aux autres souches (E1, E3, E4). Cela signifie que la température doit être plus élevée pour atteindre une réduction d'une unité logarithmique des valeurs n pour la souche E2.

Pour illustrer la diminution des populations des souches Bacillus en fonction du temps de traitement, nous calculons les réductions prévues pour chaque souche sous les intensités spécifiées. Par exemple, à une intensité de 1000 W pendant 60 secondes, nous prévoyons une réduction de 2.94 log ufc pour la souche E1, 1.51 log ufc pour la souche E2, 4.53 log ufc pour la souche E3, et 4.14 log ufc pour la souche E4, en utilisant les valeurs de D et Z calculées.

1.2. Effet de la température et du pH sur l'inactivation par microondes

D'après les figures n° (23,24,25,26) et après avoir utilisé le test de Tukey pour comparer les différences multiples entre le pH et la température, ainsi que le pH avec différentes intensités de micro-ondes, dans toutes les souches E1, E2, E3, E4, plusieurs observations significatives sont faites. Il n'y a pas de différence significative entre le pH à 1000 W et la température à 1200 W, ni entre la température à 1000 W et le pH à 1000 W, ni entre le pH à 700 W et le pH à 1000 W, car les moyens statistiques ne diffèrent pas de manière significative. En revanche, il y a une différence significative entre la température à 700 W et la température à 1200 W, entre la température à 700 W et le pH à 700 W, ainsi qu'entre le pH à 1000 W et la température à 1000 W, car les moyens statistiques diffèrent significativement.

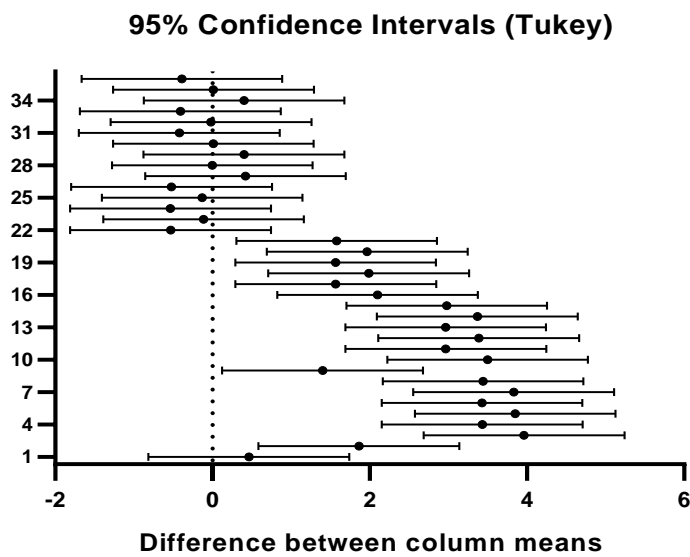
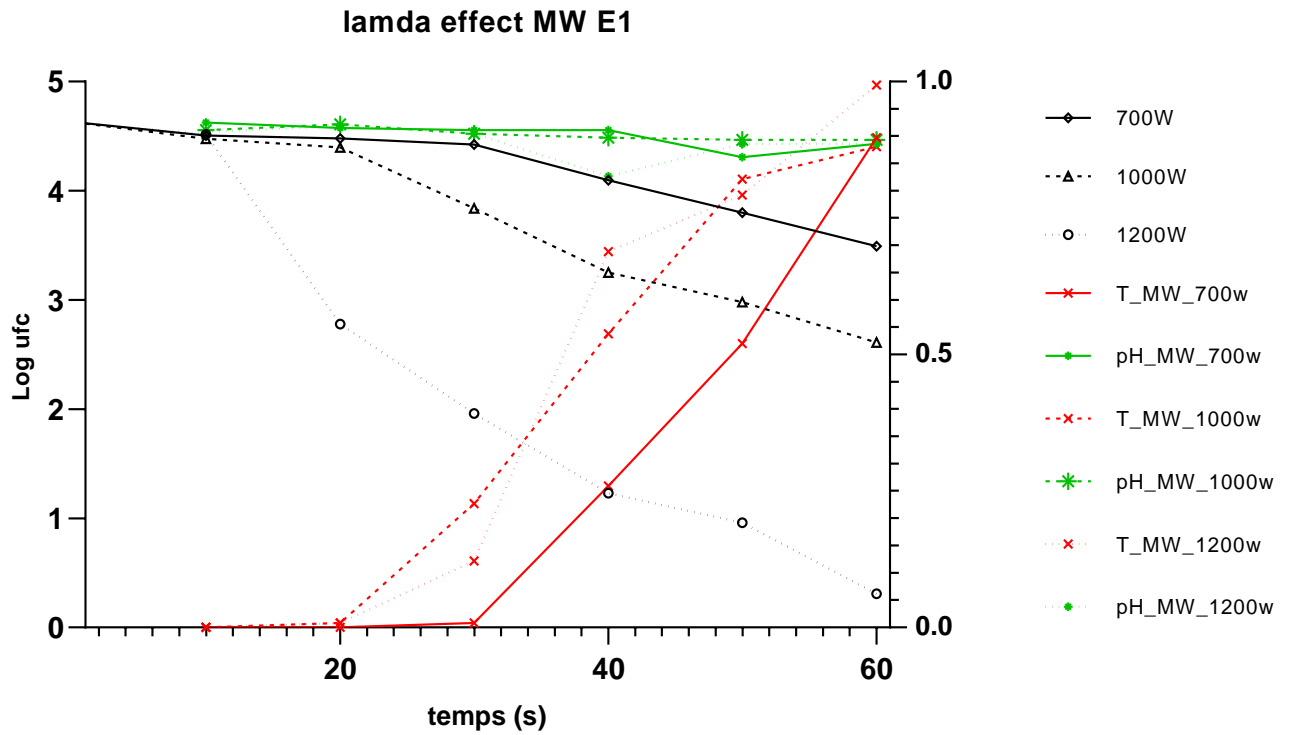


Figure n°23 : Effet de la température et PH sur l'inactivation de la souche E1 avec test tukey de comparaison multiple entre les deux effets en fonction du temps

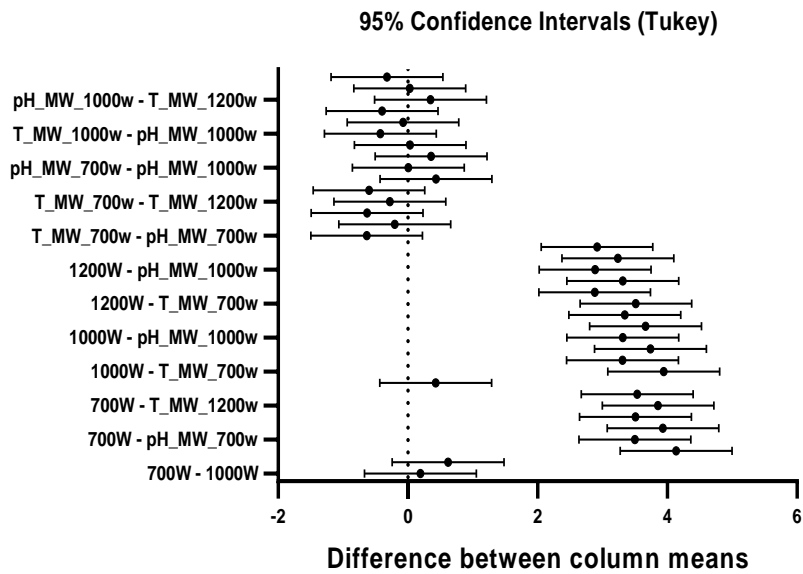
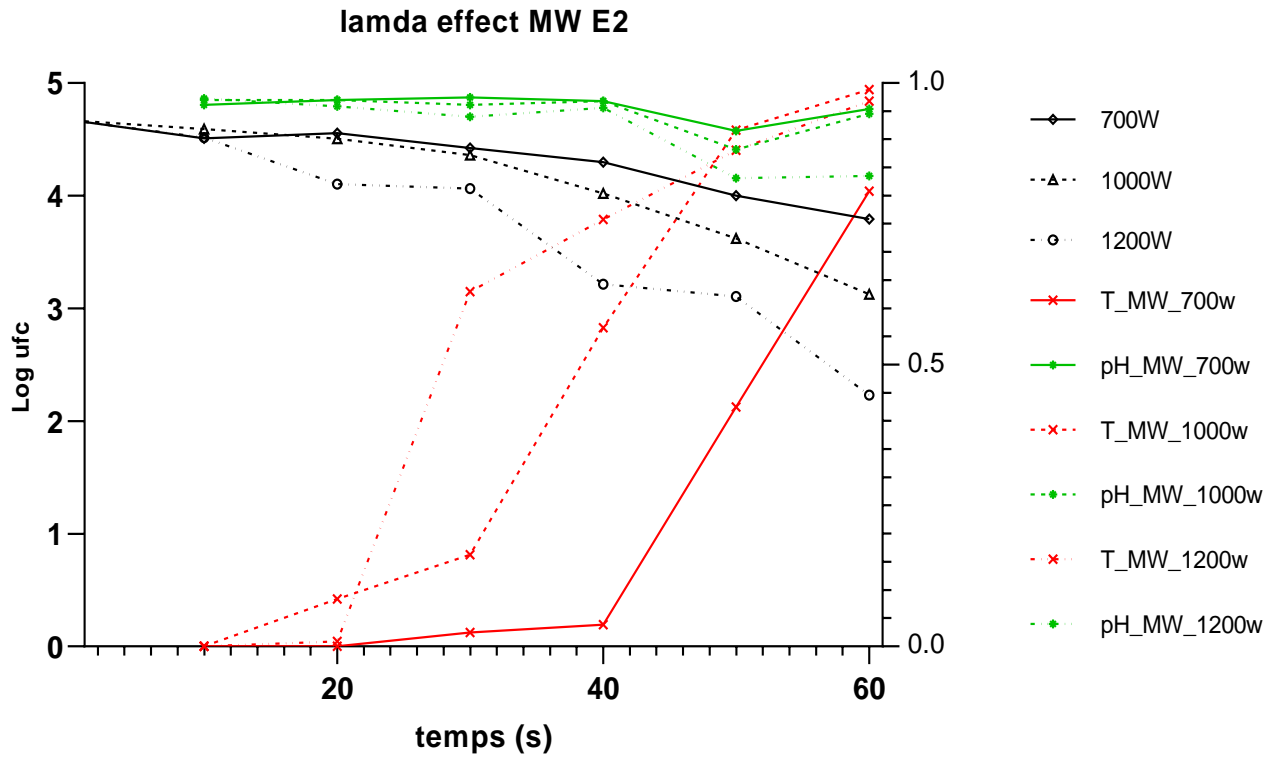


Figure n°24 : Effet de la température et PH sur l'inactivation de la souche E2 avec test tukey de comparaison multiple entre les deux effets en fonction du temps.

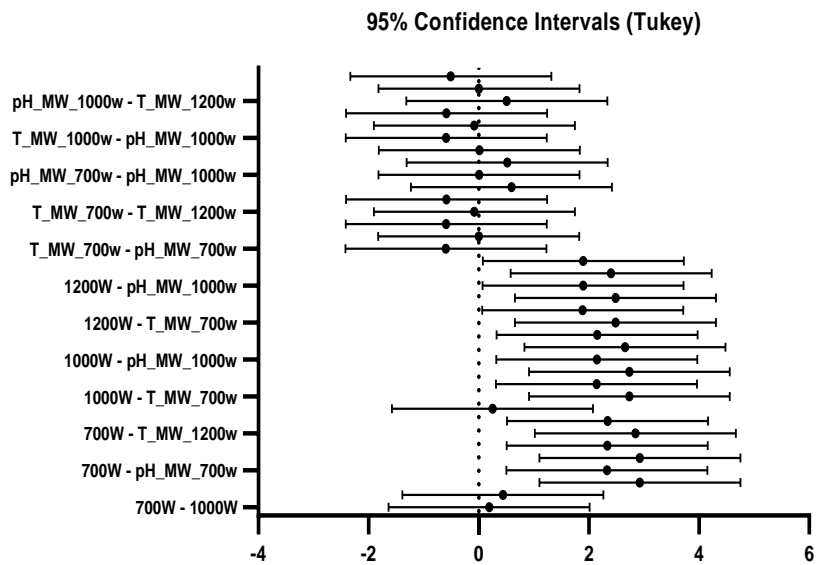
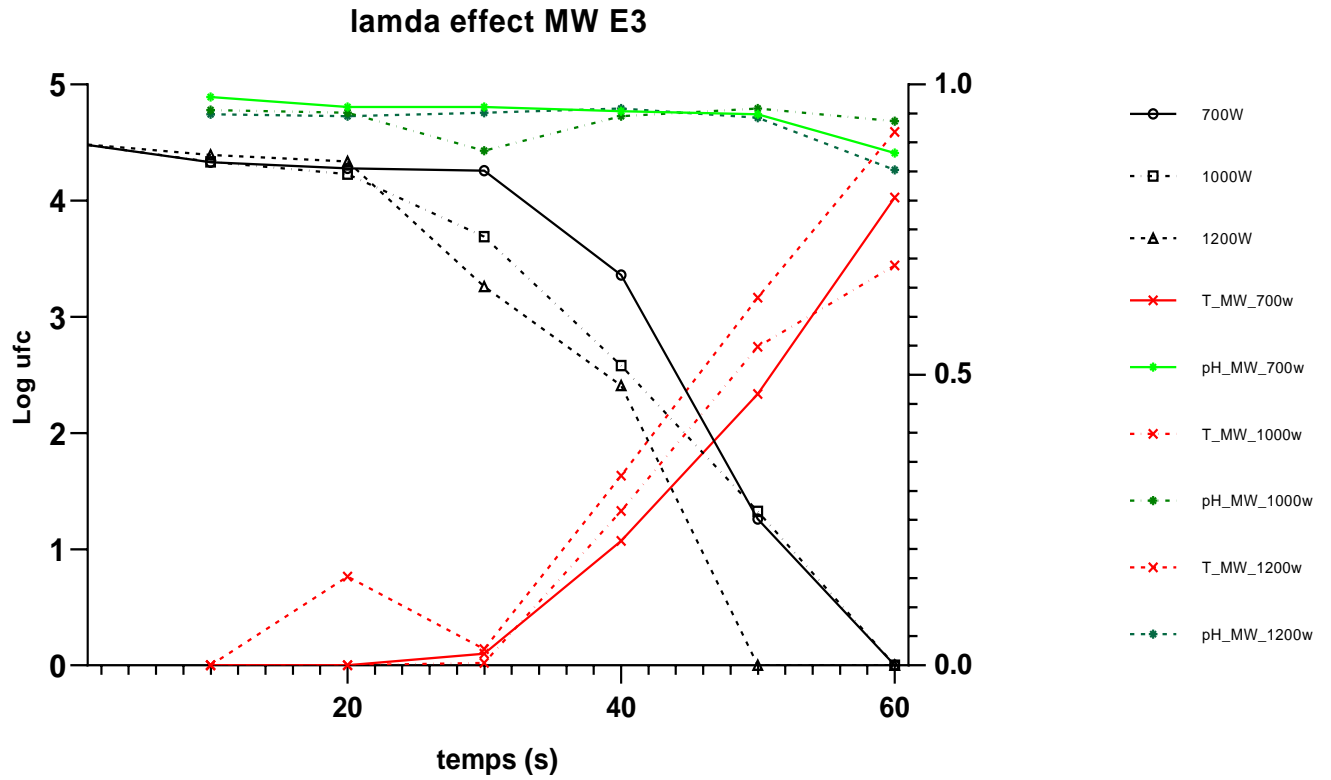


Figure n°25 : Effet de la température et PH sur l'inactivation de la souche E13 avec test tukey de comparaison multiple entre les deux effets en fonction du temps.

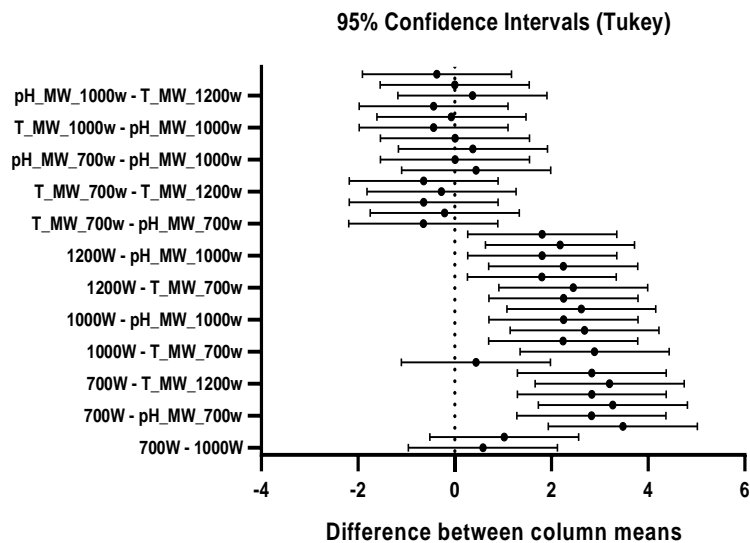
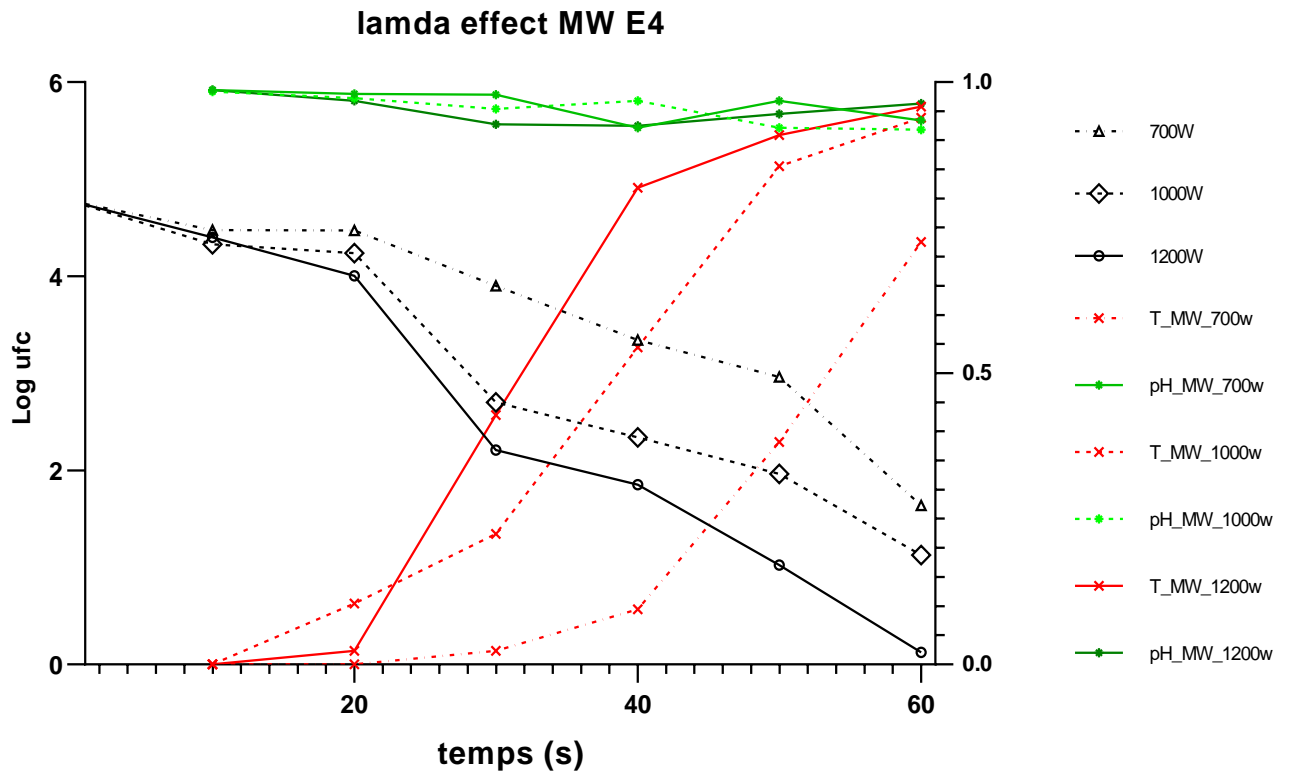


Figure n°26 : Effet de la température et PH sur l'inactivation de la souche E4 avec test tukey de comparaison multiple entre les deux effets en fonction du temps.

La durée du traitement par micro-ondes joue un rôle crucial : une durée de 30 à 60 secondes montre un effet significatif sur les souches *Bacillus* en raison de l'augmentation de la température. En comparaison, une durée de 10 à 30 secondes produit des effets moins prononcés.

L'effet du pH est étroitement lié à la température : son augmentation entraîne la dégradation des composants du lait, tels que les protéines en acides aminés, ce qui élève la valeur du pH. Cela peut influencer l'activité des micro-organismes, y compris les Bacillus, en modifiant leur environnement et leur capacité à survivre.

La valeur de lambda (λ), qui mesure l'effet de la température, est un indicateur de son efficacité dans l'inactivation des micro-organismes. Plus λ est proche de 1, plus la température est efficace pour l'inactivation des Bacillus. De même, la valeur de λ pour l'effet du pH indique son efficacité dans l'inactivation : plus λ est proche de 1, plus le pH est efficace pour influencer l'inactivation des micro-organismes.

Sur le plan microbiologique, l'analyse des effets de la température et du pH sur l'inactivation des Bacillus révèle des conclusions importantes. L'impact de la température se distingue nettement de celui du pH, montrant que des températures élevées sont cruciales pour efficacement inactiver les micro-organismes comme les Bacillus. La température élevée agit en altérant les structures cellulaires des micro-organismes, affectant leur viabilité et leur capacité à proliférer.

En contraste, bien que le pH joue également un rôle dans l'environnement microbien, son effet sur l'inactivation des Bacillus est moins prononcé que celui de la température. Les variations de pH peuvent influencer la stabilité des protéines et d'autres composants nutritifs du lait, mais leur impact direct sur la viabilité des micro-organismes est moindre comparé à la chaleur thermique.

Ces résultats soulignent la nécessité critique de contrôler précisément les paramètres de température lors de l'utilisation des micro-ondes pour chauffer le lait. Bien que les micro-ondes soient souvent utilisées par les parents pour chauffer le lait maternel ou infantile, il est important de noter que l'efficacité de cette méthode dépend de la température atteinte pendant le processus. Les températures optimales doivent être maintenues pour garantir une inactivation efficace des micro-organismes pathogènes sans compromettre la qualité nutritionnelle du lait.

En conclusion, l'utilisation des micro-ondes doit être considérée uniquement comme un moyen de réchauffement, mais non plus comme une méthode potentiellement efficace pour traiter thermiquement le lait et assurer sa sécurité microbiologique dans les intervalles de temps généralement utilisés (entre 10 et 30s).

1.3. Traitement par l'eau bouillante (HM):

Après traitement par l'eau bouillante, appliqué sur du lait infantile inoculé avec quatre souches de *Bacillus* sous forme sporulée, nous avons effectué une modélisation des résultats de dénombrement. Nous avons utilisé le modèle logarithmique ainsi que le modèle de Weibull pour mieux comprendre la destruction des spores de *Bacillus* par ce traitement. De plus, nous avons employé le test de Tukey pour analyser statistiquement les différences entre les résultats obtenus.

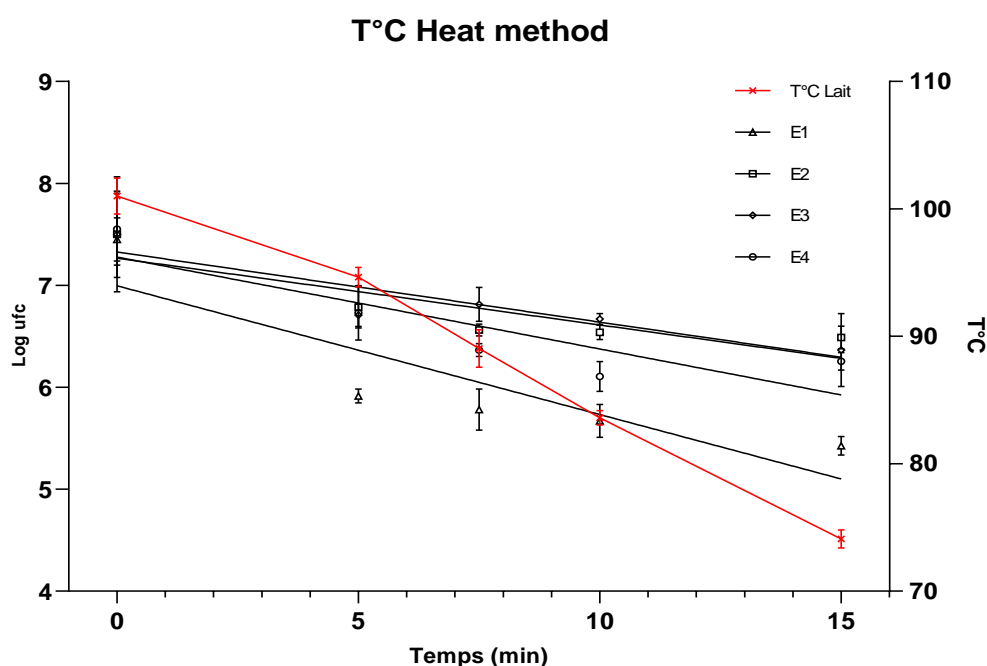


Figure n°27 : Courbe de l'effet de la température du lait sur l'inactivation des quatre souches de *Bacillus* testées en fonction du temps.

La courbe de la température du lait et du logarithme du nombre de colonies ($\log N$) en fonction du temps, selon la deuxième méthode, a révélé des tendances intéressantes. Lorsque la température du lait diminue de 100°C à 75°C en 15 minutes, on observe une réduction significative du nombre de colonies pour toutes les souches étudiées. Les résultats de notre étude concordent avec les données de la littérature qui montrent que des températures élevées combinées à une réduction rapide de la température peuvent entraîner une inactivation substantielle des spores.

À t_0 , les valeurs de $\log N$ pour les souches inoculées étaient les suivantes : E1 : 7,4 log UFC, E2 : 7,50 log UFC, E3 : 7,50 log UFC, et E4 : 7,55 log UFC. Ces valeurs initiales indiquent une charge bactérienne élevée, typique des spores de *Bacillus* en phase de dormance. La diminution observée des valeurs $\log N$ après traitement thermique est cohérente avec le modèle de destruction thermique des spores, où la survie des spores diminue exponentiellement avec l'augmentation de la température et le temps d'exposition. Des études antérieures ont montré que le modèle de Weibull est particulièrement adapté pour décrire la résistance thermique des spores de *Bacillus*, offrant une meilleure compréhension des mécanismes de destruction comparé aux modèles linéaires simples.

Ces résultats contribuent à la compréhension globale de l'inactivation des spores de *Bacillus* par traitement thermique et fournissent des bases solides pour l'amélioration des procédés de stérilisation du lait infantile. Il est également intéressant de noter que cette méthode de traitement par l'eau bouillante a été utilisée depuis longtemps par les mères dans la préparation du lait infantile. Avant l'apparition des fours à micro-ondes, c'était probablement la seule méthode disponible pour chauffer et stériliser le lait.

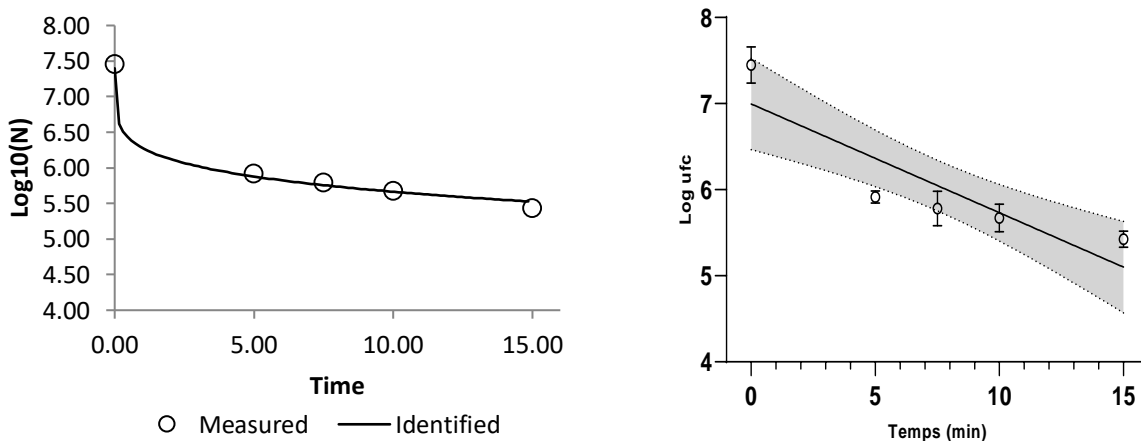


Figure n°28 : Les courbes du modèle logarithmique et du modèle Weibull en fonction de temps dans traitement par méthode HM appliqué sur la souche E1.

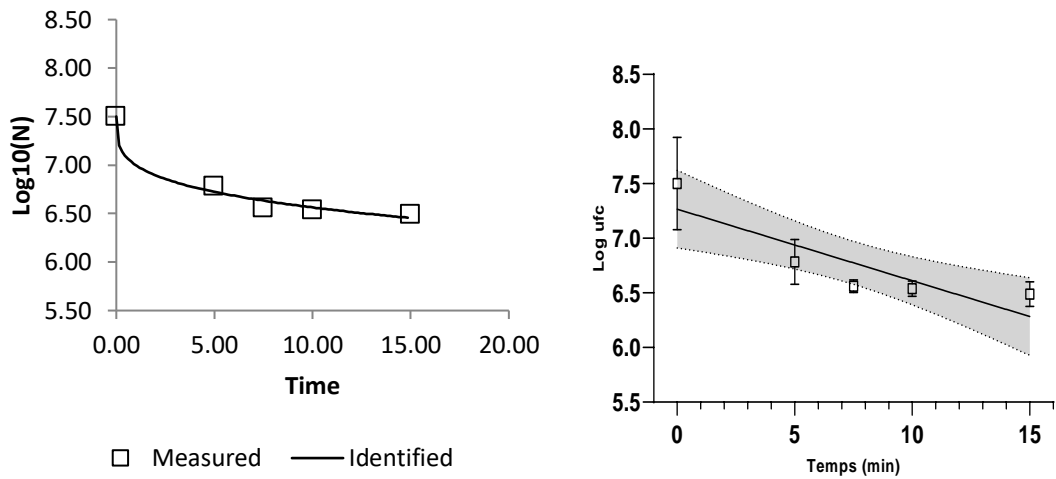


Figure n°29 : Les courbes du modèle logarithmique et du modèle Weibull en fonction de temps dans traitement par méthode HM appliqué sur la souche E2.

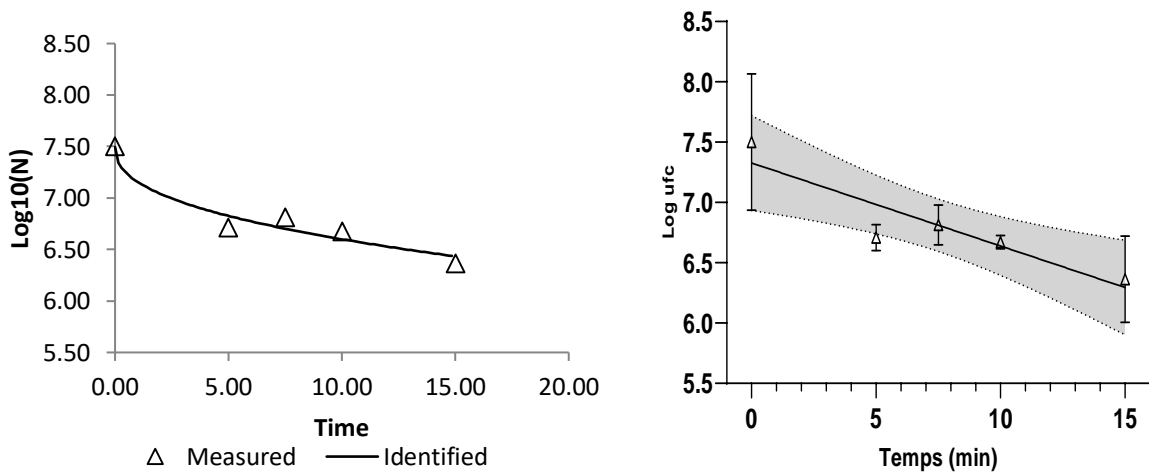


Figure n°30 : Les courbes du modèle logarithmique et du modèle Weibull en fonction de temps dans traitement par méthode HM appliqué sur la souche E3.

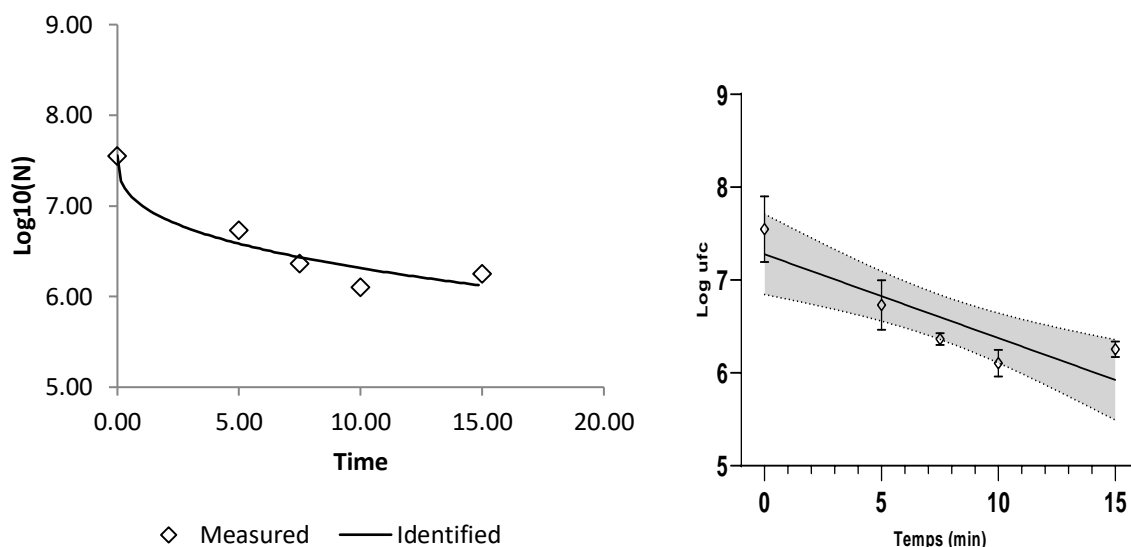


Figure n°31 : Les courbes du modèle logarithmique et du modèle Weibull en fonction de temps dans traitement par méthode HM appliqué sur la souche E4.

Les résultats des modèles de Weibull et logarithmique que nous avons utilisés dans la deuxième méthode HM montrent une diminution progressive de N_0 pour toutes les souches de *Bacillus* au fil du temps. Les valeurs initiales de N_0 étaient les suivantes : E1 : 7,40 log UFC/g, E2 : 7,50 log UFC/g, E2 : 7,50 log UFC/g, et E4 : 7,55 log UFC/g. La valeur résiduelle de N après traitement thermique représente la dose de bactéries ingérées par l'enfant.

Une des manières les plus simples de prévenir la réplication de *Bacillus* est de contrôler les températures lors de la préparation des aliments. Différentes méthodes de cuisson permettent la destruction des cellules végétatives et des spores, telles que la cuisson à la vapeur, le rôtissage, la friture ou le grillage. Cependant, le traitement à des températures en dessous de 100°C permet la survie des spores (Tirloni et al., 2022).

Historiquement, les mères faisaient bouillir l'eau et le lait pour assurer la destruction des agents pathogènes, une pratique essentielle dans des environnements où les risques microbiologiques étaient élevés. Cette méthode, bien que simple, est basée sur des principes scientifiques solides de thermodynamique et de microbiologie, où l'application de chaleur est utilisée pour inactiver les micro-organismes indésirables.

Les études sur la sécurité alimentaire et la microbiologie ont souvent confirmé l'efficacité de l'ébullition pour éliminer les spores et les bactéries, ce qui explique pourquoi cette méthode a

perduré dans le temps. L'absence de technologies modernes de chauffage, comme les micro-ondes, a rendu l'ébullition non seulement une pratique courante mais aussi une nécessité pour la préparation sûre du lait infantile.

Tableau n°3 : la comparaison entre Rsquare weibull et linière et entre RMSE et SYX, δ weibull

| les souches | RMSE weibull | sxy linière | R square weibull | R square linière | δ weibull | D linière |
|-------------|--------------|-------------|------------------|------------------|-------------------|-----------|
| E1 | 0.085 | 0.403 | 0.994 | 0.753 | 0.56 \pm 0.71 | 07.95 |
| E2 | 0.072 | 0.270 | 0.270 | 0.644 | 12.63 \pm 14.14 | 15.26 |
| E3 | 0.134 | 0.292 | 0.949 | 0.624 | 13 \pm 05.1 | 14.53 |
| E4 | 0.208 | 0.329 | 0.935 | 0.701 | 5.42 \pm 3.96 | 11.08 |

Ce tableau présente les valeurs D pour toutes les souches de Bacillus (E1, E2, E3, E4), les valeurs de R carré (R^2) du modèle de Weibull et du modèle linéaire, les valeurs de l'erreur quadratique moyenne (RMSE) du modèle de Weibull, ainsi que les valeurs de l'erreur standard de l'estimation (syx) du modèle linéaire, et enfin, les valeurs de Delta pour le modèle de Weibull. Nous avons effectué une analyse comparative entre ces valeurs pour déterminer quelle modélisation représente le mieux les données.

Pour évaluer la meilleure représentation entre ces deux modèles, nous avons examiné les résultats des coefficients de détermination (R^2). Le modèle de Weibull a montré une meilleure représentation avec des valeurs de R^2 proches de 1 pour toutes les souches, sauf pour la souche E2 où le coefficient de détermination a montré une corrélation plus faible. Cela suggère que le modèle de Weibull explique bien la variance des données pour les souches E1, E3, et E4, mais moins efficacement pour la souche E2. En revanche, le R^2 pour les mêmes souches dans le modèle linéaire était inférieur à 1, indiquant une moins bonne adéquation du modèle linéaire aux données. Plus la valeur de R^2 est proche de 1, meilleure est la représentation du modèle, car cela indique une plus grande proportion de la variance des données expliquée par le modèle.

Nous avons également interprété la comparaison entre les valeurs de RMSE du modèle de Weibull et les valeurs de syx du modèle linéaire. Toutes les valeurs de RMSE pour les souches du modèle de Weibull étaient inférieures à toutes les valeurs de syx du modèle linéaire pour les mêmes souches de Bacillus. Le RMSE et syx sont des mesures de la précision prédictive des modèles, représentant l'écart-type des résidus (différences entre les

valeurs observées et prédites). Des valeurs plus faibles de RMSE et s_{yx} indiquent une meilleure adéquation du modèle aux données, avec des erreurs de prédiction plus faibles. Cela indique que le modèle de Weibull présente une meilleure précision prédictive et un ajustement supérieur aux données expérimentales par rapport au modèle linéaire.

Ainsi, les résultats montrent que le modèle de Weibull offre une meilleure adéquation pour décrire la destruction des spores de *Bacillus* dans le lait infantile, en raison de ses faibles taux d'erreur (RMSE) et de ses valeurs élevées de R^2 , à l'exception de la souche E2. Cette conclusion est cruciale pour optimiser les méthodes de traitement thermique du lait infantile, garantissant une meilleure sécurité microbiologique tout en préservant la qualité nutritionnelle du lait.

Pour calculer la réduction en log UFC après 15 minutes de traitement à 100°C, nous utilisons la valeur D et δ pour chaque souche. Les réductions en log UFC montrent que, après 15 minutes de traitement à 100°C, les spores de *Bacillus* sont réduites de : 1.886 log UFC pour la souche E1, 0.983 log UFC pour la souche E2, 1.032 log UFC pour la souche E3 et 1.354 log UFC pour la souche E4.

Les taux de réduction montrent qu'après 15 minutes de traitement à 100°C, la souche E1 a le taux de réduction le plus élevé, suivi des souches E4, E3, et E2. La souche E2 montre la plus grande résistance au traitement thermique, avec une réduction totale de seulement 9.6 fois, indiquant que des traitements supplémentaires ou des conditions de traitement plus strictes pourraient être nécessaires pour atteindre une réduction suffisante de cette souche spécifique.

1.4. Effet de la température et du pH sur l'inactivation par l'eau bouillante

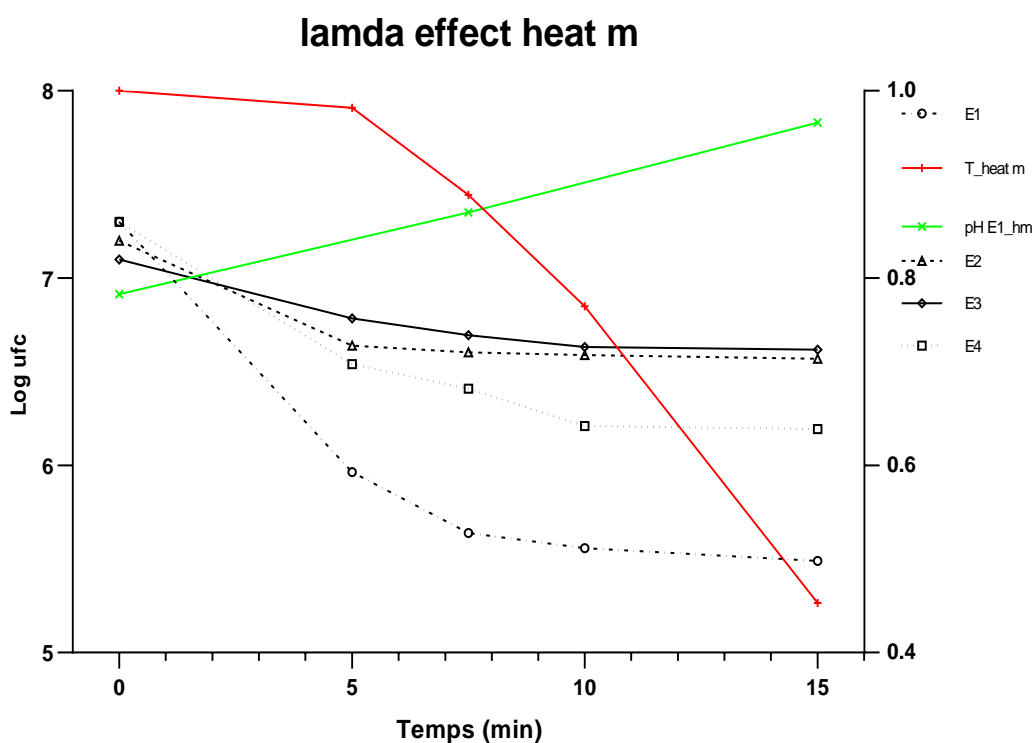


Figure n°32 : Courbe de l'effet de la température et du pH sur l'inactivation des quatre souches de *Bacillus* par la méthode de préparation par l'eau bouillante.

Dans cette étude, nous avons tenté de simuler les conditions réelles rencontrées par les mères dans les pratiques de préparation du lait infantile en utilisant la méthode de reconstitution par l'eau bouillante. Ce graphique illustre la modélisation de l'effet combiné de la température et du pH en fonction du temps sur l'inactivation de *Bacillus*.

La température du lait augmente initialement avant de diminuer progressivement au fil du temps, entraînant une réduction logarithmique (log UFC) des concentrations de *Bacillus*, indiquant leur inactivation. Les souches E4 et E1 montrent une diminution plus rapide, suggérant que la température est plus efficace pour inactiver ces souches comparativement aux souches E2 et E3.

L'augmentation de la température du lait provoque également une élévation du pH, bien que l'effet de la température sur l'inactivation de *Bacillus* soit plus prononcé que celui du pH. L'efficacité des traitements thermiques est caractérisée par un couple temps/température optimal, qui varie en fonction du type de produit et des microorganismes cibles.

Les deux principaux traitements thermiques sont la pasteurisation et la stérilisation. La pasteurisation, qui se déroule à des températures comprises entre 65°C et 100°C, permet l'élimination des formes végétatives des microorganismes. En revanche, la stérilisation, effectuée à des températures entre 100°C et 120°C, permet d'éliminer à la fois les formes végétatives et sporulées des microorganismes (Jeantet et al., 2006; Boumendjel, 2011).

l'analyse montre que la température joue un rôle crucial dans l'inactivation des spores de *Bacillus*, avec une efficacité variable selon les souches. Les souches E4 et E1 sont plus sensibles aux traitements thermiques, tandis que les souches E2 et E3 montrent une résistance accrue. Ces résultats soulignent l'importance de sélectionner des conditions de traitement thermique appropriées pour garantir la sécurité microbiologique des produits laitiers, en tenant compte des caractéristiques spécifiques des souches présentes.

1.5. Comparaison des Méthodes de Préparation du Lait Infantile (MW et HM)

En comparant l'efficacité des méthodes de préparation du lait infantile par micro-ondes et par ébullition, des différences notables sont observées. La méthode de reconstitution par l'eau bouillante a montré une efficacité remarquable contre les formes végétatives testées de toutes les souches de *Bacillus*. Aucune croissance n'a été observée sur les boîtes de Pétri, ce qui indique une élimination complète des formes végétatives par cette méthode. Cette observation est corroborée par les valeurs élevées de réduction en log UFC obtenues après traitement thermique.

D'autre part, l'utilisation des micro-ondes pour la préparation du lait infantile peut présenter des défis en termes de distribution uniforme de la chaleur. Les micro-ondes peuvent ne pas chauffer uniformément, créant des zones froides où des spores et des formes végétatives peuvent survivre. Cette inhomogénéité peut réduire l'efficacité globale de la stérilisation, mettant en péril la sécurité microbiologique du lait.

Cependant, pour les formes sporulantes, les deux méthodes se révèlent limitées pour un traitement adéquat. En extrapolant ces résultats vers la réalité, l'étude de Mezian et al. (2022) a trouvé une concentration moyenne de la flore sporulée de 3.81 log UFC/ml dans le lait infantile. Nos résultats indiquent qu'au moins 2 log UFC/ml de spores pourraient rester dans le lait après traitement par ébullition, ce qui confirme nos doutes initiaux sur le rôle potentiel des spores de *Bacillus* comme contaminants significatifs de la microbiote intestinale des

bébés. Ces spores résiduelles peuvent provoquer des déséquilibres dans cette flore, posant ainsi des risques pour la santé intestinale des nourrissons.

En conclusion de cette partie, bien que les micro-ondes offrent une commodité moderne, la méthode traditionnelle de reconstitution par l'eau bouillante prouve son efficacité supérieure en termes de réduction des formes végétatives de *Bacillus*. Néanmoins, des limitations subsistent pour les formes sporulantes avec les deux méthodes de traitement thermique. Il est donc crucial de développer et d'adopter des nouvelles recommandations plus efficaces pour garantir la sécurité microbiologique du lait infantile et prévenir les risques de contamination par *Bacillus*.

2. Étude du potentiel des Souches de *Bacillus* à Former le Biofilm

2.1. Méthode de Quantification sur des Microplaques (96 Puits)

Dans cette étude, nous voulons simuler les milieux réels de croissance. Pour cela, nous avons utilisé le lait comme milieu de culture et le BHI (Bouillon de Cœur-Cerveau) pour les formes végétatives, ainsi que le lait, le BHI et l'eau physiologique pour les formes sporulantes.

Le violet de cristal (CV) est un colorant qui se fixe sur les polysaccharides du peptidoglycane et colore sans distinction toutes les biomasses, incluant les cellules vivantes ou mortes ainsi que la matrice composée de substances polymériques extracellulaires du biofilm bactérien. Ce colorant rend ce test utile pour estimer la réponse globale en mode biofilm d'un isolat. Grâce à cette méthode, une souche peut être classée comme non formatrice, faiblement formatrice, moyennement formatrice ou fortement formatrice de biofilm (Metzler, 2016).

La bactérie adhère initialement à une surface de polystyrène (plaque à 96 puits), se multiplie et produit un biofilm bactérien. Le violet de cristal colore les structures polysaccharidiques des bactéries incluses dans le biofilm ainsi que les bactéries sous forme planctonique. Un lavage à l'eau distillée permet d'éliminer l'excès de colorant ainsi que les bactéries planctoniques. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de biofilm produite. Une mesure de la densité optique (DO) permet d'obtenir une évaluation quantitative de la capacité d'une bactérie à produire un biofilm (Vieu, 2014).

$$DO_{lue} \leq DO_{nc} -$$

$$DO_{nc} < DO_{lue} \leq 2XDO_{nc} \pm$$

$$2XDO_{nc} < DO_{lue} \leq 4XDO_{nc} +$$

$$DO_{lue} > 4XDO_{nc} ++$$

Notes : - = Absence ; ± = faible ; + = Modérée ; ++ = Forte ; DO_{nc} : la moyenne des DO des Contrôles négatifs. (Stepanovic et al., 2000)

| | lait | | | | BHIB | | | |
|----------------------|------|----|----|----|------|----|----|----|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E1 | E2 | E3 | E4 |
| Formation de biofilm | + | + | ± | ± | - | ++ | - | - |

Le Tableau n°4 : présente les résultats de la densité optique (DO) des quatre souches de Bacillus en forme végétative. Ces résultats permettent d'évaluer la capacité de chaque souche à former un biofilm dans différents milieux de culture.

Parmi les souches testées, la souche E2 a montré la plus grande capacité à former un biofilm, surtout dans le milieu BHI. Les valeurs élevées de DO pour cette souche indiquent qu'elle est fortement formatrice de biofilm, ce qui suggère une activité métabolique intense et une production significative de substances polymériques extracellulaires.

La souche E1 suit de près, avec des résultats indiquant également une forte formation de biofilm, bien que légèrement inférieure à celle de la souche E2. Les performances de formation de biofilm de la souche E1 dans le milieu BHI montrent qu'elle a une aptitude notable à adhérer et à se multiplier sur les surfaces, formant des structures biofilms robustes.

Les souches E3 et E4 ont montré des capacités de formation de biofilm relativement plus faibles comparées à E1 et E2, bien qu'elles soient tout de même capables de former des biofilms. Ces résultats suggèrent que les souches E3 et E4 peuvent avoir des mécanismes de régulation de la formation de biofilm différents ou moins efficaces dans les conditions de culture testées.

En résumé, les résultats indiquent que le milieu BHI est particulièrement favorable à la formation de biofilm pour les souches E1 et E2, avec E2 étant la plus performante. Cette observation est cruciale pour comprendre les conditions environnementales qui favorisent la formation de biofilm par ces bactéries, ce qui a des implications pour le contrôle des contaminations bactériennes et la gestion des infections associées aux biofilms.

Tableau n°5 : résultats de la capacité à former le biofilm relatif aux DO des souches de forme sporulantes

Notes : - = Absence ; ± = faible ; + = Modérée ; ++ = Forte ; DO_{nc} : la moyenne des DO des Contrôles négatifs. (Stepanovic et al., 2000)

| | lait | | | | BHIB | | | | L'eau physiologie | | | |
|----------------------|------|----|----|----|------|----|----|----|-------------------|----|----|----|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E1 | E2 | E3 | E4 | E1 | E2 | E3 | E4 |
| Formation de biofilm | ± | ± | ± | - | ++ | + | + | ± | + | ± | + | ± |

Les résultats du tableau n°5 révèlent les capacités distinctes des quatre souches sporulantes à former des biofilms. La souche E1 s'est distinguée en montrant la plus grande performance, se classant comme fortement formatrice de biofilm, particulièrement dans le milieu BHIB. Elle est suivie par les souches E2 et E3, qui ont également démontré une capacité significative à former des biofilms dans ce même milieu. En revanche, dans le milieu à base de lait, aucune des souches sporulantes n'a manifesté la capacité de former un biofilm, ce résultat reste pour nous incompréhensible.

La prédominance de la souche E1 dans la formation de biofilm dans le milieu BHIB peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment sa capacité spécifique à adhérer et à sécréter des polysaccharides extracellulaires, éléments clés dans la matrice du biofilm. Les observations divergentes dans le milieu à base de lait suggèrent des interactions complexes entre les nutriments disponibles, les propriétés spécifiques des souches bactériennes et les conditions environnementales.

Selon la littérature, les différences dans la formation de biofilm peuvent être influencées par la composition des milieux de culture, les propriétés génétiques des souches bactériennes et les conditions de croissance. Par exemple, certains milieux enrichis comme le BHIB favorisent la croissance et la maturation du biofilm en fournissant des nutriments adaptés et des conditions favorables à la colonisation bactérienne.

En conclusion, bien que la souche E1 montre une forte capacité à former un biofilm dans le milieu BHIB, l'absence de formation de biofilm dans le milieu à base de lait soulève des questions importantes sur les interactions spécifiques entre les composants du milieu et les mécanismes de formation de biofilm chez les souches sporulantes étudiées. Ces résultats mettent en lumière l'importance de considérer les facteurs environnementaux et nutritionnels dans l'étude des biofilms bactériens.

2.2. Détection par la Méthode de Rouge Congo Agar

D'après la figure n°33 toutes les souches ont montré une capacité notable à produire des biofilms, notamment la souche E2, qui s'est distinguée par la formation de colonies noires présentant un aspect cristallin et une consistance sèche sur Gélose Rouge Congo. Ce phénomène est attribué à la production d'exopolysaccharides qui réagissent avec le rouge Congo (Mahamat et al., 2013). Cette approche visuelle offre une première indication de la capacité des souches à former des biofilms, Ceci confirme et est en accord avec ce que nous avons trouvé dans la partie de quantification par la méthode des microplaques.

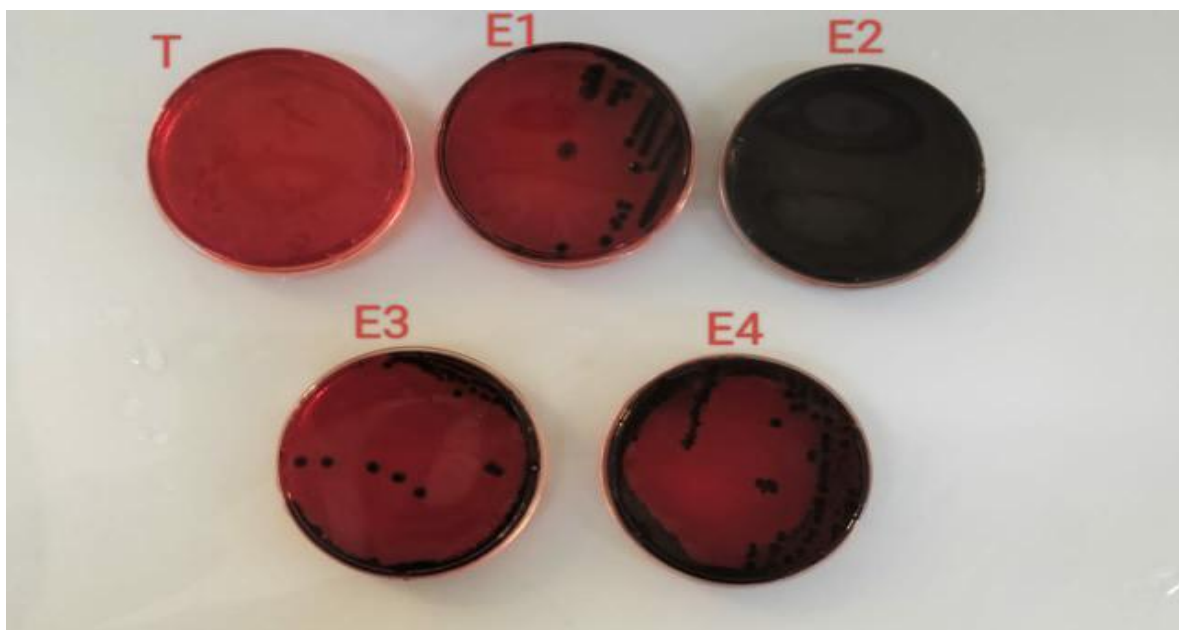


Figure n°33 : Résultat de production de biofilm des souches de *Bacillus* par RCA.

La caractérisation phénotypique de la production de biofilm par la méthode du slime a été réalisée en cultivant les isolats sur un milieu solide contenant du colorant Rouge Congo. La méthode RCA (Rouge Congo Agar) permet une analyse directe et visuelle des colonies, facilitant l'identification des souches productrices de slime (colonies noires sur la gélose rouge) et des souches non productrices (colonies rouges). Cependant, cette méthode ne permet pas une évaluation quantitative du biofilm, car elle repose uniquement sur un changement de couleur du rouge Congo qui interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant le slime (Freeman et al., 1989).

2.3. Étude de la Formation de Biofilm sur Surfaces en PTFE et Silicone

Dans cette partie de l'étude, nous avons voulu simuler les pratiques de nettoyage et de désinfection des biberons effectuées par les mères afin de tester leur efficacité vis-à-vis des souches de *Bacillus*. Pour ce faire, nous avons testé les quatre souches sous leurs formes végétatives et sporulantes. Le désinfectant le plus couramment utilisé à domicile est l'hypochlorite de sodium, qui a été testé avec un temps de contact de 5 minutes.

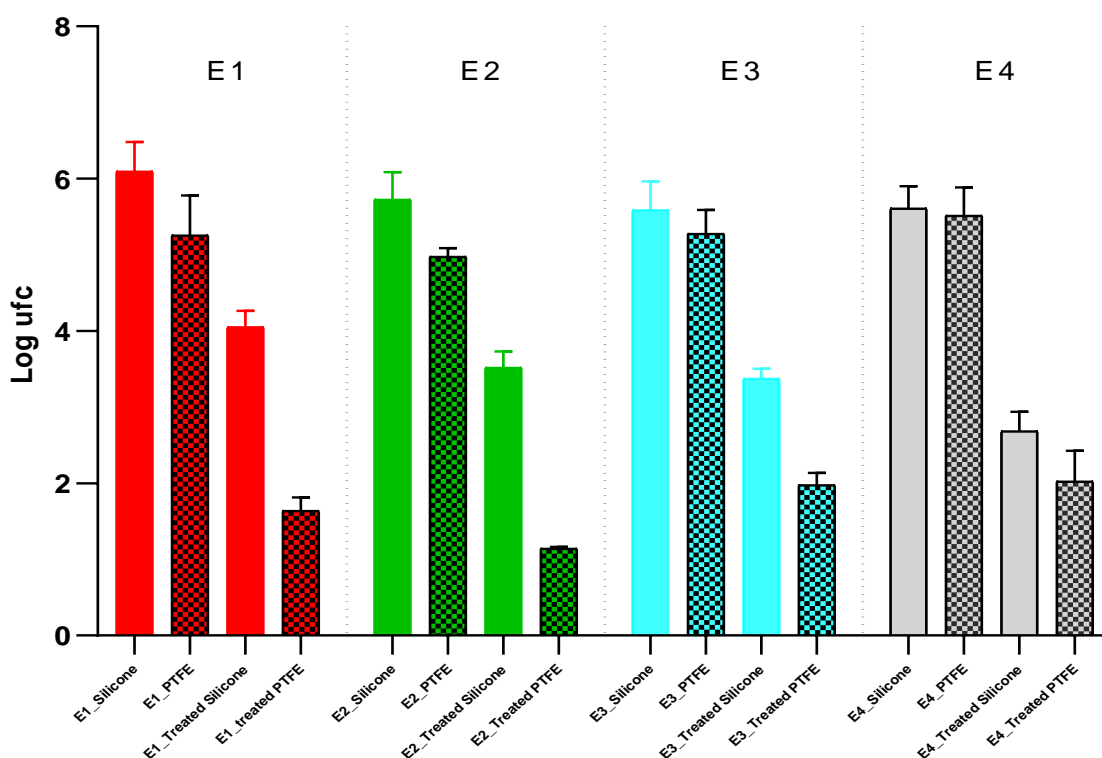


Figure n°34: Graphe de log n ufc/g sur les surfaces traité et non traité (silicone et PTFE) dans les quatre souches.

D'après la figure n°34 les résultats du dénombrement des biofilms ont révélé que les quatre souches de *Bacillus* sont capables de former des biofilms sur les surfaces en silicone et en PTFE, en particulier les souches E1 et E2. Les *Bacillus* démontrent une capacité significative à adhérer et à former des biofilms sur les matériaux utilisés dans la fabrication des biberons, tels que le silicone et le PTFE. Les données indiquent que toutes les souches de *Bacillus* ont montré une adhésion plus élevée sur les surfaces en silicone par rapport aux surfaces en PTFE. Notamment, la souche E1 a présenté une adhésion particulièrement élevée sur le

silicone par rapport aux autres souches, tandis que l'adhésion sur le PTFE était plus marquée pour la souche E4.

Des études antérieures ont solidifié ces résultats en démontrant que les matériaux en silicone tendent à favoriser une adhésion bactérienne plus prononcée et une formation de biofilm plus robuste par rapport aux surfaces en PTFE. Cette observation est largement attribuée aux propriétés physico-chimiques distinctes de chaque matériau. Le silicone présente une surface souvent plus hydrophile qui offre davantage de sites d'adhésion pour les cellules bactériennes. De plus, les polymères de silicone peuvent adsorber des composants organiques provenant du milieu environnant, ce qui favorise encore plus l'adhésion et la croissance bactérienne. En revanche, le PTFE (polytétrafluoroéthylène), connu pour sa surface lisse et non réactive, offre moins de sites favorables à l'adhésion des cellules bactériennes. Sa faible énergie de surface et sa chimie stable limitent les interactions moléculaires avec les biomolécules et les micro-organismes, réduisant ainsi la capacité des bactéries à former des biofilms structurés et durables (Costerton et al., 1999; Bridier et al., 2011).

Ces observations mettent en lumière l'importance des propriétés physico-chimiques des surfaces dans la régulation de l'adhésion bactérienne et de la formation de biofilm. Comprendre ces mécanismes est crucial pour développer des stratégies efficaces de prévention et de contrôle des biofilms, qui peuvent poser des défis significatifs pour la sécurité et la qualité des produits.

En ce qui concerne le traitement des coupons par hypochlorite de sodium, les résultats ont révélé une efficacité limitée pour éliminer complètement le biofilm adhérent sur les surfaces, en particulier sur le silicone. Des études antérieures ont démontré que les biofilms bactériens sur des surfaces comme le silicone peuvent être extrêmement résistants aux agents désinfectants courants, tels que l'hypochlorite de sodium, en raison de leur capacité à former une matrice extracellulaire protectrice et à induire des mécanismes de résistance aux stress environnementaux (Bridier et al., 2011; Simões et al., 2010).

Plus spécifiquement, l'élimination du biofilm sur le PTFE a été significativement plus efficace, surtout contre la souche E2, ce qui souligne l'importance de choisir des matériaux appropriés dans la conception des équipements pour réduire le risque de contamination croisée. Le PTFE présente des propriétés de surface qui peuvent rendre plus difficile l'adhésion et la formation de biofilm par rapport au silicone, comme en témoignent des études

sur les propriétés hydrophobes et la capacité à réduire l'adhésion bactérienne (Li et al., 2017; Chavant et al., 2004).

Ces résultats mettent en lumière les défis persistants liés à la gestion des biofilms bactériens dans les environnements industriels et cliniques. Les résidus de biofilm persistants malgré les méthodes de nettoyage standard peuvent servir de réservoirs de contamination potentiels, posant ainsi des risques pour la sécurité alimentaire et sanitaire. Cela souligne la nécessité critique de développer et d'appliquer des protocoles de nettoyage et de désinfection plus rigoureux et adaptés aux différents types de surfaces, afin de garantir des pratiques de sécurité optimales.

2.4. Méthode d'AFM (Microscopie à Force Atomique)

Les résultats de la mesure de la rugosité de la surface pour le PTFE et le silicone montrent que les valeurs avant traitement sont supérieures à celles après traitement dans les deux matériaux, suggérant que les surfaces non traitées présentent plus d'irrégularités propices à l'adhésion bactérienne. Cette observation est conforme à l'idée que la rugosité de surface élevée favorise l'adhésion des bactéries.

Avant le traitement, la rugosité de surface était comparable entre le PTFE et le silicone pour toutes les souches testées. Cependant, après le traitement par l'hypochlorite de sodium, les surfaces traitées montrent une réduction de la rugosité, bien que le traitement n'ait pas été suffisant pour éliminer complètement les bactéries adhérant à la surface.

La rugosité de surface est une caractéristique cruciale car elle influence l'adhésion des micro-organismes. Des études antérieures ont souligné que la rugosité peut créer des niches où les bactéries peuvent s'ancrer plus fermement, rendant le nettoyage et la désinfection plus difficiles (Kovačević et al., 2016).

L'utilisation de l'Atomic Force Microscopy (AFM) pour mesurer la rugosité des surfaces en silicone et en PTFE offre une méthode précise et sensible. L'AFM permet de visualiser et de quantifier les variations de rugosité à l'échelle nanométrique, offrant ainsi des informations détaillées sur la topographie des surfaces avant et après traitement. Cette approche est particulièrement utile pour évaluer l'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection dans divers environnements, y compris l'industrie alimentaire et les soins de santé.

D'après les tableaux n (6,7), les données de rugosité moyenne (Ra) et de rugosité quadratique moyenne (RMS Sq) fournissent des indications précieuses sur l'effet du traitement par l'hypochlorite de sodium sur la surface en silicone et en PTFE, avant et après le traitement, pour les souches E1 et E2 de Bacillus.

Pour la souche E1 avant traitement, le Ra était de 119.522 nm et le RMS Sq de 178.404 nm, montrant une surface assez rugueuse. Après traitement, ces valeurs ont considérablement diminué à 41.2300 nm pour Ra et 47.9961 nm pour RMS Sq. Cette réduction significative indique une amélioration notable de la régularité de la surface après désinfection, réduisant potentiellement les sites favorables à l'adhésion bactérienne.

Pour le silicone avant traitement, les valeurs de Ra étaient de 23.967 nm et de 25.092 nm pour RMS Sq, indiquant une surface relativement lisse. Après traitement, ces valeurs ont légèrement diminué à 12.1706 nm pour Ra et 15.5573 nm pour RMS Sq, suggérant une amélioration mineure de la régularité de la surface.

Concernant la souche E2, avant traitement, les valeurs élevées de rugosité (172.637 nm pour Ra et 201.159 nm pour RMS Sq) montrent une surface très rugueuse. Après traitement, ces valeurs ont significativement chuté à 40.2922 nm pour Ra et 52.8391 nm pour RMS Sq, soulignant une amélioration substantielle de la surface.

Sur le silicone pour la souche E2, les valeurs initiales de rugosité (18.0083 nm pour Ra et 24.4151 nm pour RMS Sq) ont également diminué après traitement (11.9325 nm pour Ra et 17.4492 nm pour RMS Sq), bien que dans une moindre mesure par rapport à PTFE.

En conclusion, les résultats montrent que le traitement par l'hypochlorite de sodium a eu un effet positif sur la réduction de la rugosité des surfaces en silicone et en PTFE, ce qui pourrait réduire les sites propices à l'adhésion bactérienne. Cependant, même après traitement, des niveaux de rugosité résiduels persistent, ce qui souligne la nécessité d'améliorer les protocoles de nettoyage et de désinfection pour minimiser davantage le risque de contamination bactérienne et/ou prévenir la contamination croisée et assurer des normes sanitaires élevées.

Tableau n°6 : Synthèse des résultats de l'AFM donnant les Ra avec les image 3D de silicone et du PTFE avant et après traitement de souche E1

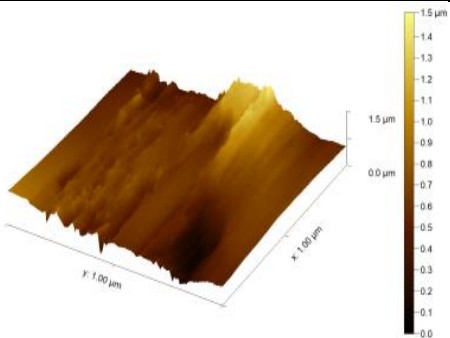
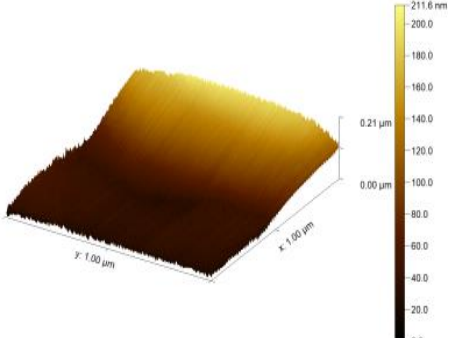
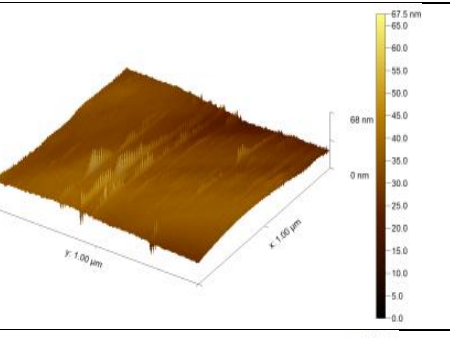
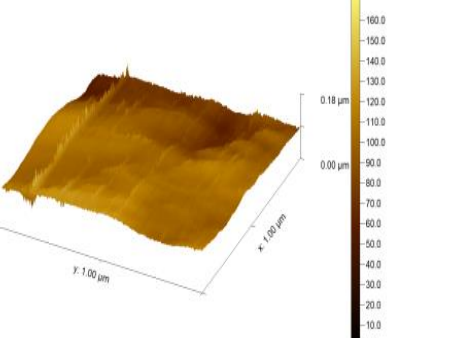
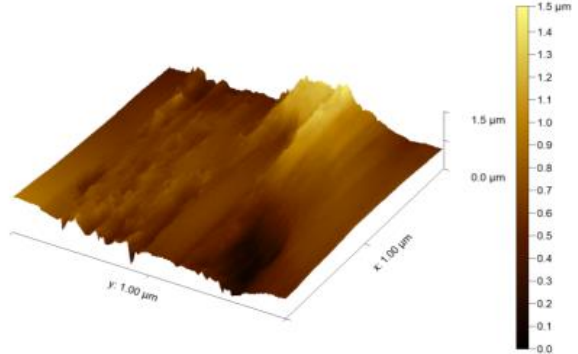
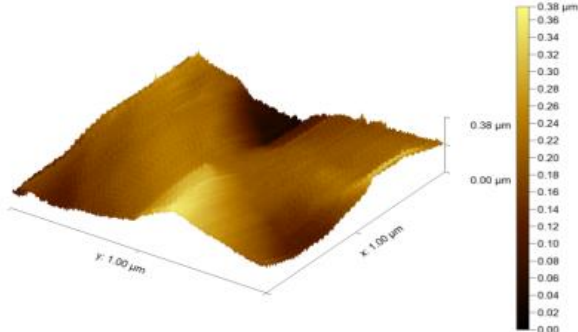
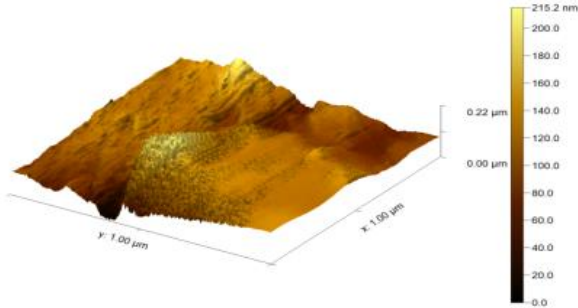
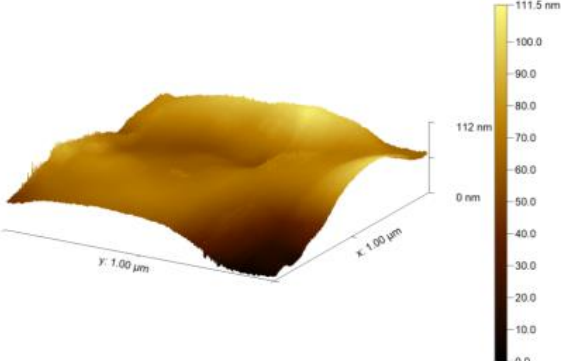
| Surfaces E1 | Mean roughness (Ra) (nm) | RMS roughness (Sq) (nm) | Image |
|----------------------------------|----------------------------|-------------------------|--|
| PTFE Avant traitement | 119.522 | 178.404 |  |
| PTFE traité | 41.2300 | 47.9961 |  |
| Silicone Avant traitement | 23.967 | 25.092 |  |
| Silicone traité | 12.1706 | 15.5573 |  |

Tableau n°7 : Synthèse des résultats de l'AFM donnant les Ra avec les image 3D de silicone et du PTFE avant et après traitement de souche E2

| surface E2 | Mean roughness (Ra) (nm) | RMS roughness (Sq) nm | Image |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------|--|
| PTFE Avant traitement | 172.637 | 201.159 |  |
| PTFE traité | 40.2922 | 52.8391 |  |
| Silicone Avant traitement | 18.0083 | 24.4151 |  |
| Silicone traité | 11.9325 | 17.4492 |  |

Conclusion

Cette étude avait pour objectif principal de développer un modèle prédictif en simulant les pratiques courantes des mamans, pour nous fournir des recommandations basées sur des données scientifiques de température et de pH pour évaluer la survie du *Bacillus* dans le lait infantile et pour arriver à améliorer la sécurité alimentaire des nourrissons.

Cependant, il est important de noter que les deux méthodes de traitement thermique n'étaient pas totalement efficaces sous certaines conditions. Les traitements par micro-ondes et par eau bouillante ont été comparés pour évaluer leur efficacité respective sur la survie du *Bacillus* dans le lait infantile. Le traitement par eau bouillante s'est montré efficace pour éliminer toutes les cellules végétatives du *Bacillus*, contrairement au traitement par micro-ondes à 60 secondes, qui n'était efficace qu'à des intensités élevées et se révélait inefficace à des intensités plus faibles telles que 200W et 400W.

L'analyse des valeurs de pH et de température post-traitement a révélé que l'effet de la température était plus déterminant que celui du pH dans l'inactivation du *Bacillus*.

Nous avons également évalué la capacité des souches de *Bacillus* à former des biofilms, utilisant des méthodes telles que la microplaque 96 puits, la gélose Rouge Congo et des coupons de matériaux (silicone et PTFE) couramment utilisés dans la fabrication des biberons. Nos résultats ont montré que toutes les souches de *Bacillus* avaient la capacité de former des biofilms, avec la souche E2 se distinguant particulièrement par une forte capacité formatrice de biofilm. De plus, nous avons observé une forte adhérence des souches sur les surfaces en silicone et en PTFE, facilitant ainsi la formation de biofilms.

Pour évaluer l'efficacité des méthodes de nettoyage et de désinfection couramment utilisées par les mamans, nous avons mesuré la rugosité des surfaces en silicone et en PTFE avant et après traitement à l'hypochlorite de sodium. Les résultats obtenus ont montré que ces procédures n'éliminaient pas complètement le biofilm des surfaces. L'analyse par AFM a permis d'estimer la rugosité de chaque surface, soulignant l'importance de cette caractéristique dans l'adhérence des bactéries et la formation de biofilm.

Cette recherche a permis de déterminer l'efficacité des méthodes domestiques (eau bouillante, micro-ondes) pour réduire la charge bactérienne dans le lait infantile et de définir les conditions optimales pour minimiser les risques microbiologiques associés. En simulant

les pratiques courantes des mamans, nous avons pu formuler des recommandations basées sur des données scientifiques pour améliorer la sécurité alimentaire des nourrissons.

Cette étude ouvre également la voie à une meilleure compréhension des dynamiques de survie et de croissance des bactéries *Bacillus* face aux différents traitements, et offre ainsi une base solide pour le développement de modèles prédictifs du comportement bactérien dans des conditions domestiques typiques.

Pour l'avenir, il serait bénéfique d'approfondir cette étude par :

- L'optimisation des modèles prédictifs: Affiner les modèles en intégrant des paramètres supplémentaires comme la composition du lait et les variations de température et de pH.
- L'analyse de la formation de biofilm: Continuer les recherches sur la formation de biofilms par *Bacillus* sur différents matériaux de biberons et tester l'efficacité d'autres désinfectants pour éliminer les biofilms.
- L'évaluation de l'exposition et des risques: Estimer la dose de *Bacillus* ingérée par les nourrissons en menant une évaluation détaillée des risques et utiliser ces données pour développer des recommandations précises.
- L'amélioration des pratiques de désinfection: Développer des recommandations basées sur les résultats pour améliorer les pratiques de préparation et de nettoyage des biberons.
- Le suivi et évaluation à long terme: Tester d'autres souches bactériennes impliquées dans ce type de matrice alimentaire et suivre leurs impacts sur la santé des nourrissons et le changement de leurs microbiotes intestinales.

Liste des références :

- Ahern, Grace J., A. A. Hennessy, C. Anthony Ryan, R. Paul Ross, and Catherine Stanton, 'Advances in Infant Formula Science', *Annual Review of Food Science and Technology*, 10. Volume 10, 2019 (2019), pp. 75–102, doi:10.1146/annurev-food-081318-104308
- Buss da Silva, N., Ellouze, M., Rouzeau-Szynalski, K., et al. (2022). Predicting *Bacillus cereus* growth and cereulide production in dairy mix. *International Journal of Food Microbiology*, 364: 109519–109519
- CAC, 2008. Code of hygienic practice for powdered infant formula for infants and young children. In: Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome, Italy, 2008.
- Castelijns GA, Parabirsing JA, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T. Surface behaviour of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* and *S. Infantis*. *Vet Microbiol.* 2013 Jan 25;161(3-4):305-14. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.047. Epub 2012 Aug 6. PMID: 22906529.
- Chap, J., P. Jackson, R. Siqueira, N. Gaspar, C. Quintas, J. Park, and others, 'International Survey of *Cronobacter Sakazakii* and Other *Cronobacter* Spp. in Follow up Formulas and Infant Foods', *International Journal of Food Microbiology*, *Cronobacter* Special Issue, 136.2 (2009), pp. 185–88, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.005
- Chabeaud P, De Groot A, Bitter W, Tommassen J, Heulin T, Achouack W 2001. Phase variable expression of an operon encoding extracellular alkaline protease, a serine protease homolog, and lipase in *Pseudomonas brassicacearum*. *J Bacteriol* **183**: 2117–20.
- Cho, T.J., Hwang, J.Y., Kim, H.W., Kim, Y.K., Kwon, J.I., Kim, Y.J., Lee, K.W., Kim, S.A., Rhee, M.S., 2019. Underestimated risks of infantile infectious disease from the caregiver's typical handling practices of infant formula. *Sci. Rep.* 9, 9799.
- Christensen G.D, Simpson W.A, Younger J.A, Baddour L.M, Barrett F.F, Melton D.M and Beachey E.H. (1985). Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* **22**: 996–1006.
- Donlan, Rodney M., 'Biofilms: Microbial Life on Surfaces', *Emerging Infectious Diseases*, 8.9 (2002), pp. 881–90, doi:10.3201/eid0809.020063
- Ej, Bottone, 'Bacillus Cereus, a Volatile Human Pathogen', *Clinical Microbiology Reviews*, 23.2 (2010), doi:10.1128/CMR.00073-09
- Em, Crielly, Logan Na, and Anderton A, 'Studies on the Bacillus Flora of Milk and Milk Products', *The Journal of Applied Bacteriology*, 77.3 (1994), doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb03072.x
- Formation of Emetic Toxin Producing *Bacillus Cereus* Strains', *Food Control*, 96 (2019), pp. 527–34, doi:10.1016/j.foodcont.2018.10.008

Hassiotou F, Alsaweed M, Savigni D, Lai CT, Hartmann P, Geddes D **2015**. Profiling of human milk miRNA. *FASEB J* 29:582.8

Hwang, Ji-Yeon, and Jong-Hyun Park, 'Characteristics of Enterotoxin Distribution, Hemolysis, Lecithinase, and Starch Hydrolysis of *Bacillus Cereus* Isolated from Infant Formulas and Ready-to-Eat Foods', *Journal of Dairy Science*, 98.3 (2015), pp. 1652–60, doi:10.3168/jds.2014-9042

Jéssica B. Portelaa 2019)Predictive model for inactivation of salmonella in infant formula duringmicrowave heating processing

Kessler HG. 1981. Cleaning—sanitizing—sterilizing. In: *Food engineering and dairy technology*. Freising , Germany : Publishinh House Verlag A. Kessler. p 530–76.

Kessler, H. G. (2002). *Food and Bio Process Engineering: Dairy Tech-nology*. Verlag A. Kessler, Munich, Germany.

Kindle, G., Busse, A., Kampa, D., Meyer-Koenig, U., & Daschner, F. (1996). Killing activityof microwaves in milk. *Journal of Hospital Infection*, 33, 273–278.

Lm, Wijnands, Dufrenne Jb, Rombouts Fm, in 't Veld Ph, and van Leusden Fm, 'Prevalence of Potentially Pathogenic *Bacillus Cereus* in Food Commodities in The Netherlands', *Journal of Food Protection*, 69.11 (2006), doi:10.4315/0362-028x-69.11.2587

Luu-Thi, H., Grauwet, T., Vervoort, L., et al. (2014). Kinetic study of *Bacillus cereus* spore inactivation by high pressure high tempera-ture treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26: 12–17

Lipkie TE, Banavara D, Shah B, Morrow AL, McMahan RJ et al. **2014**. Caco-2 accumulation of lutein is greater from human milk than from infant formula despite similar bioaccessibility. *Mol. Nutr. Food Res.* 58:2014–22

Park YW **2008**. Goat milk—chemistry and nutrition. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals* YW Park, GFW Haenlein, WL Wendorff 34–58 Hoboken, NJ: Blackwell

Park, Eun-ji, Mohammad Shakhawat Hussain, Shuai Wei, Minyeong Kwon, and Deog-Hwan Oh, 'Genotypic and Phenotypic Characteristics of Biofilm

Pena, ~ W.E., de Andrade, N.J., Nilda, F.F., Soares, N.F., Alvarenga, V.O., SalatirJunior, S. R., Granato, D., Zuniga, A.D., Sant'Ana, A.S., 2014. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *Int. Dairy J.* 34, 153–158.

Ran-Ressler RR, Khailova L, Arganbright KM, Adkins-Rieck CK, Jouni ZE et al. **2011**. Branched chain fatty acids reduce the incidence of necrotizing enterocolitis and alter gastrointestinal microbial ecology in a neonatal rat model. *PLOS ONE* 6:e29032

- Ryan AS, Zhou W **2006**. Lower breastfeeding rates persist among the Special Supplemental Nutrition Program for Women, Infants, and Children participants, 1978–2003. *Pediatrics* 117:1136–46
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000 Apr;40(2):175-9. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6. PMID: 10699673.
- Sadek, Zeinab I., Mohamed A. Abdel-Rahman, Mohamed S. Azab, Osama M. Darwesh, and Mahmoud S. Hassan, ‘Microbiological Evaluation of Infant Foods Quality and Molecular Detection of *Bacillus Cereus* Toxins Relating Genes’, *Toxicology Reports*, 5 (2018), pp. 871–77, doi:10.1016/j.toxrep.2018.08.013
- Sonenshein, Abraham L, ‘Control of Sporulation Initiation in *Bacillus Subtilis*’, *Current Opinion in Microbiology*, 3.6 (2000), pp. 561–66, doi:10.1016/S1369-5274(00)00141-7
- Smith RM, Parisi JT, Vidal L, Baldwin JN. Nature of the genetic determinant controlling encapsulation in *Staphylococcus aureus* Smith. *Infect Immun*. 1977 Jul;17(1):231-4. doi: 10.1128/iai.17.1.231-234.1977. PMID: 885615; PMCID: PMC421105.
- Sadiq, F.A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., He, G., 2016. A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 200–208.
- Stepanovic S., Dragana V., Veronika H., Giovanni D. B., Sodanka D., Ivana I. and Filip R.(2007)**. quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci *apmis* **115**: 891–9.
- Smithers LG, Collins CT, Simmonds LA, Gibson RA, McPhee A, Makrides M **2010**. Feeding preterm infants milk with a higher dose of docosahexaenoic acid than that used in current practice does not influence language or behavior in early childhood: a follow-up study of a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 91:628–34
- Sanchez-Vizuite P, Orgaz B, Aymerich S, Le Coq D, Briandet R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front Microbiol*. 2015 Jul 14;6:705. doi: 10.3389/fmicb.2015.00705. PMID: 26236291; PMCID: PMC4500986.
- Marino L, Goddard E, Whitelaw A, Workman L **2007**. Prevalence of bacterial contamination of powdered infant feeds in a hospital environment. *S. Afr. Med. J.* 97:534–37
- Martin CR, Ling PR, Blackburn GL. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*. 2016 May 11;8(5):279. doi: 10.3390/nu8050279. PMID: 27187450; PMCID: PMC4882692.
- Manual, F. (2005). Food Safety Risk Analysis PART I An Overview and Framework Manual. p. 78.

- McFadden A, Mason F, Baker J, Begin F, Dykes F et al. **2016**. Spotlight on infant formula: coordinated global action needed. *Lancet* 387:413–15
- Vidic, Jasmina, Carole Chaix, Marisa Manzano, and Marc Heyndrickx, ‘Food Sensing: Detection of *Bacillus Cereus* Spores in Dairy Products’, *Biosensors*, 10.3 (2020), p. 15, doi:10.3390/bios10030015
- Van den Broeck J, Willie D, Younger N **2009**. The World Health Organization child growth standards: expected implications for clinical and epidemiological research. *Eur. J. Pediatr.* 168:247–51
- Tirloni E, Stella S, Celandroni F, Mazzantini D, Bernardi C, Ghelardi E. *Bacillus cereus* in Dairy Products and Production Plants. *Foods*. 2022 Aug 25;11(17):2572. doi: 10.3390/foods11172572. PMID: 36076758; PMCID: PMC9455733.
- Tremblay YD, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. *Can J Vet Res.* 2014 Apr;78(2):110-6. French. PMID: 24688172; PMCID: PMC3962273.
- Tirloni E, Stella S, Celandroni F, Mazzantini D, Bernardi C, Ghelardi E. *Bacillus cereus* in Dairy Products and Production Plants. *Foods*. 2022 Aug 25;11(17):2572. doi: 10.3390/foods11172572. PMID: 36076758; PMCID: PMC9455733.
- Vidic J, Chaix C, Manzano M, Heyndrickx M. Food Sensing: Detection of *Bacillus cereus* Spores in Dairy Products. *Biosensors (Basel)*. 2020 Feb 25;10(3):15. doi: 10.3390/bios10030015. PMID: 32106440; PMCID: PMC7146628.
- Watterson, M. J., D. J. Kent, K. J. Boor, M. Wiedmann, and N. H. Martin, ‘Evaluation of Dairy Powder Products Implicates Thermophilic Sporeformers as the Primary Organisms of Interest’, *Journal of Dairy Science*, 97.4 (2014), pp. 2487–97, doi:10.3168/jds.2013-7363
- Wijman, J. G. E., de Leeuw, P. P. L. A., Moezelaar, R., et al. (2007). Air–liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environment Microbiology*, 73(5): 1481–1488
- Watson D, O’Connell M, Motherway M, Schoterman M, Neerven R, Nauta A, Sinderen D **2013**. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 114:1132–46
- Zhao, Shengjuan, Junliang Chen, Peng Fei, Hongxia Feng, Yao Wang, Md. Aslam Ali, and others, ‘Prevalence, Molecular Characterization, and Antibiotic Susceptibility of *Bacillus Cereus* Isolated from Dairy Products in China’, *Journal of Dairy Science*, 103.5 (2020), pp. 3994–4001, doi:10.3168/jds.2019-17541
- Zhang K, Tang L, Wang H, Qiu L-Q, Binns CW, Lee AH **2015**. Why do mothers of young infants choose to formula feed in China? Perceptions of mothers and hospital staff. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12:4520–32

<https://www.popote-bebe.fr/lemag/les-coulisses-de-la-fabrication-dun-lait-infantile/>

<https://www.nuliie.com/can-i-warm-baby-bottle-in-a-microwave/>

<https://www.mpedia.fr/art-nettoyage-et-sterilisation/#summary-anchor-1>

<https://www.popote-bebe.fr/lemag/les-coulisses-de-la-fabrication-dun-lait-infantile/>

<https://www.physiolac.com/conseil-expert/choix-lait-bebe/>

<https://www.popote-bebe.fr/lemag/les-coulisses-de-la-fabrication-dun-lait-infantile/>

<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/08927014.2011.626899>