

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة الجيلالي بونعامة بخميس مليانة  
Université Djilali BOUNAAMA KHEMIS MILIANA  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la terre  
Département des sciences Biologiques



Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Microbiologie  
Spécialité : Microbiologie Appliquée  
Thème :

## **Evaluation de la capacité des souches de *Pseudomonas spp* à former des biofilms**

Réalisé par :

M<sup>elle</sup>. AMMEK Mounya

M<sup>elle</sup>. BELLOUT Fadhila

Encadré par :

M<sup>me</sup>.DIDOUH Nassima

Soutenue publiquement le :21 /07/2019, devant le jury composé de :

M <sup>me</sup> .OUAZIB M.	<b>Président</b>	<b>MCB</b>	UDB Khemis Miliana
M <sup>me</sup> .ZAOUADI N.	<b>Examinatrice</b>	<b>MAA</b>	UDB Khemis Miliana
Mr.AMROUCH Z.	<b>Examineur</b>	<b>MCB</b>	UDB Khemis Miliana
M <sup>me</sup> .DIDOUH N.	<b>Promotrice</b>	<b>MCB</b>	UDB Khemis Miliana

**Année Universitaire :2018-2019**

# Remerciement

*Avant tout nous remercions {Allah} le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté, La patience, pour faire ce travail.*

*Nous tenons à remercier infiniment notre promotrice Mme. DIDOUH Nasima qui a bien accepté d'encadrer ce sujet.*

*Nous remercions également très sincèrement Mme. OUAZIB d'avoir accepté de présider le jury de ce travail.*

*Nous remercions Mme Zaouadi, Mr Amrouch d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Nous remercions les ingénieurs des laboratoires de l'université de khemis Miliana en particulier : Aicha, Afef, Nadjiba, pour nous avoir soutenues et encouragés tout le Long de notre travail.*

*En fin nous remercions toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicace*

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude l'amour,

Le respect, la reconnaissance...

Ainsi, c'est tout simplement que

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.

A ma mère HASSIBA qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que  
j'atteigne ce niveau

.Ni sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de  
mère soucieuse de L'avenir de ces enfants.

A mon cher papa MOHAMMED qui a su se montrer patient, compréhensif et  
encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand  
réconfort.

Veillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel.

Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...

A Mes sœurs ASMA et IKRAM et mon frère MOSSAAB que dieu vous  
garde et vous protège que votre chemin soit plein succès.

A toute ma famille

A mes chéries FADHILA et ASIA ET GHANIYA ET AMIRA ET MOUNA  
ET SARA pour leur aide et leur soutien que dieu vous protège et vous  
préserve

Les personnes qui m'ont aidée à réaliser ce travail

*Mounya*

## *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail : A Dieu, tout puissant, qui m'a donné la force,  
lasanté et le courage de réaliser ce précieux travail

A mes très chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour et leur prière  
tout au long de mes études .J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma  
reconnaissance et tout mon amour.

A mes frères Mohamed, Nouredin, Abde Alaziz, et Mourad, pour l'amour ,  
l'attention et l'aide qu'ils m'ont apportés.

A mes très chères sœurs Samia et Fatima Zahra ainsi que ses époux, qui ont  
toujours été présents dans les moments les plus difficiles. A mes chères  
copines: Amira, Ghaniya, Nawal, Assia, Rihab, Mounya, Marwa et Meriem.  
A tous mes camarades de promotion de master 2 Microbiologie Appliquée A  
ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour.

*Fadhila*

## Résumé

Dans leur environnement naturel, la majorité des micro-organismes adhèrent aux surfaces biotiques ou abiotiques. Cette dualité micro-organisme-surface est conditionnée par les propriétés du substrat, les propriétés de la surface bactérienne, et les conditions de l'environnement. L'adhésion microbienne conduit à la formation de biofilms qui sont fréquemment nuisibles en milieu industriel. *Pseudomonas spp* capable de former des biofilms dans les divers systèmes industriels, posant par la suite une contamination des produits transformés.

Dans ce travail, 10 souches de *Pseudomonas spp* ont été collectées d'équipements d'usine laitière. Ces souches font l'objet de l'étude de leurs productions des enzymes extracellulaires et leurs capacités à former le biofilm par différentes techniques.

Nos résultats de l'activité hydrolytique extracellulaire révèlent que 90% des souches étaient protéase et lipase positive et 10 % des souches étaient lecithinase positives. Les résultats de technique RCA (Rouge Congo Agar) ont révélée que les 10 souches ne produisent pas le slime. La capacité des bactéries à former un biofilm a été évaluée par la technique TCP. Cette technique a révélée que toutes les souches ne sont pas capables de former un biofilm. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer qu'il y a une association entre la non production de slime et la non capacité de former de biofilm par ces souches.

Mots clés : *Pseudomonas spp*, biofilm, slime, activité enzymatique : lecithinase, protéolytique, et lipolytique .

## Abstract

In their natural environment, the majority of microorganisms adhere to biotic or abiotic surfaces. This microorganism-surface duality is conditioned by the properties of the substrate, the properties of the bacterial surface, and the conditions of the environment. Microbial adhesion leads to the formation of biofilms that are frequently harmful in industrial environments. *Pseudomonas spp* able to produce biofilms in various industrial systems, subsequently posing a contamination of the transformed products.

As part of this work, 10 strains of *Pseudomonas spp* were collected from dairy plant equipment. These strains are the subject of the study of their production of extracellular enzymes and their capacity to form the biofilm by different techniques.

Our results of extracellular hydrolytic activity reveal that 90% of the strains were protease and lipase positive and 10% of the strains were lecithinase positive. RCA (Congo Red Agar) results revealed that the 10 strains do not produce slime. The ability of bacteria to form a biofilm was assessed by the TCP technique. This technique revealed that not all strains are able to form a biofilm. The results obtained allowed us to show that there is an association between the non production of slime and the non capacity to form biofilm by these strains.

Key words: *Pseudomonas ssp*, biofilm, slime, enzymatic activity: lecithinase, protéolytique, and lipolytique .

## ملخص

في بيئتها الطبيعية، تلتزم غالبية الكائنات الحية الدقيقة بالأسطح الأحيائية أو اللاأحيائية. هذه الازدواجية السطحية الكائنات الحية الدقيقة مشروطة بخصائص الركيزة، وخصائص السطح البكتيرية، وظروف البيئة. يؤدي الالتصاق الميكروبي إلى تكوين الأغشية الحيوية التي غالباً ما تكون ضارة في البيئات الصناعية *Pseudomonas spp*. قدرة على تشكيل الأغشية الحيوية في النظم الصناعية المختلفة، مما يشكل تلوئاً للمنتجات المحولة.

كجزء من هذا العمل، تم جمع 10 سلالات من *Pseudomonas spp* من معدات مصنع الألبان. هذه السلالات هي موضوع دراسة إنتاجها للإنزيمات خارج الخلية و قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي بتقنيات مختلفة.

تكشف نتائج النشاط المائي خارج الخلية عن أن 90% من السلالات كانت بروتياز و أنزيم الليباز إيجابية وأن 10% من السلالات كانت إيجابية ليسيتيناز. (كشف نتائج RCA الكونغو الأحمر ألاجوري) أن 10 سلالات لاتنتج الوحل. تم تقييم قدرة البكتيريا على تشكيل بيوفيلم بواسطة تقنية TCP. كشفت هذه التقنية أنه ليس كل السلالات قادرة على تكوين بيوفيلم. سمحت لنا النتائج التي تم الحصول عليها لإثبات وجود علاقة بين عدم إنتاج الوحل وعدم القدرة على تكوين الأغشية الحيوية بواسطة هذه السلالات.

**الكلمات المفتاحية** *Pseudomonas ssp*: الأغشية الحيوية، الوحل، النشاط الأنزيمي ليسيتيناز ، بروتياز ، والليباز.

## Liste des abréviations

-	Négatif
%	Pourcentage.
+	Positif
<b>BHIB</b>	Bouillon Cœur cerveau
<b>C°</b>	Température en degré Celsius.
<b>CIP</b>	cleaning-in-place
<b>CV</b>	Cristal violet
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>EPS</b>	Exo polysaccharides
<b>P</b>	Pseudomonas
<b>PIA</b>	Polysaccharide Intercellulaire Adhésion
<b>PNAG</b>	Polysaccharide poly-N-acetylglucosamine
<b>RCA</b>	Red Congo Agar
<b>TCP</b>	Plaque de Culture de Tissus
<b>TSB</b>	Tryptycase soja bouillon
<b>UFC</b>	Unité(s) formant colonie(s)

## Liste des figures

Figure 1: Schématisation de biofilm .....	2
Figure 2: Schéma présentant les étapes du développement du biofilm.....	6
Figure 3: Composition du biofilm.....	7
Figure 4: Résultats de la mise en évidence activités hydrolytiques extracellulaires. L'activité protéolytique.....	18
Figure 5: Phénotype de production de slime par les souches sur milieu RCA .....	22
Figure 6 : la formation de biofilm par les souches de <i>Pseudomonas spp</i> après 24 heures et 48 heures d'incubation.....	24

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition d'un biofilm bactérien. ....	7
Tableau 2 : Résultats expérimentaux d'activités hydrolytiques extracellulaires de <i>Pseudomonas</i> ...	17

# Table de matière

**Remerciements**

**Dédicaces**

**résumé**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

<b>introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>Partie I : Synthèse bibliographique .....</b>	<b>2</b>
I.1. Historique : .....	2
I.2. Définition : .....	3
I.3. Le biofilm de <i>Pseudomonas spp</i> en industrie laitière .....	3
I.3.1 les étapes de formation du biofilm .....	4
I.3.1.1 Attachement réversible des bactéries » .....	4
I.3.1.2. Adhésion irréversible .....	5
I.3.1.3. Formation des micro-colonies et production d'EPS .....	5
I.3.1.4. Maturation du biofilm .....	5
I.3.1.5. Détachement et dispersion du biofilm.....	6
I.4. Composition du biofilm .....	7
I.4.1 Les microorganismes.....	7
I.4.2 La matrice(EPS) .....	8
I.5.Facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....	8
I.5.1 Caractéristiques de la surface .....	8
I.5.1.1 Rugosité de la surface : .....	8
I.5.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface : .....	9
I.5.1.3. Présence de films protéiques sur la surface : .....	9
I.5.2. Caractéristiques du milieu : .....	9
I.5.3. Propriétés des cellules : .....	10
I.6.Biofilm dans l'industrie laitière.....	11

I.7. Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières :	11
I.8. Elimination de biofilm	12
<b>Partie II : Matériel et méthodes</b>	<b>14</b>
II.1. Lieu d'étude	14
II.2. Origine des souches	14
II.3. Revivification des souches	14
II.4. Vérification de la pureté des souches	14
II.5. Caractérisation des souches	14
II.5.1. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires :	14
II.5.1.1. Détermination de l'activité lecithinase :	14
II.5.1.2. Détermination de l'activité protéolytique :	15
II.5.1.3. Détermination de l'activité lipolytique : Hydrolyse du Tween 80	15
II.5.2. Evaluation de la formation de biofilm par <i>Pseudomonas spp</i>	15
II.5.2.1. Méthode du Rouge Congo Agar (RCA)	15
II.5.2.2. Formation de biofilm sur microplaque :	15
<b>Partie III : Résultats et discussion</b>	<b>17</b>
III.1. Caractérisation des souches	17
III.1. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires :	17
III.2. Evaluation de la formation de biofilm par la méthode RCA :	21
III.3 Formation de biofilm par microplaque :	23
<b>Conclusion</b>	<b>27</b>
<b>Références Bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

# INTRODUCTION GENERALE

Dans l'industrie alimentaire les bactéries pourraient être en mesure de fixer et à former des biofilms sur la surface de la transformation des aliments (**Langoni et al.,2008 ; Aung et al.,2011**) et qui sont particulièrement connus par leurs effets négatifs sur la santé. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus, on peut citer les contaminations de produits alimentaires, la bio détérioration des matériaux (en particulier la bio corrosion, etc). (**Klinger et al.,2005**).

La détérioration de lait résultant de la contamination des produits laitiers avec des micro-organismes psychrotrophes entraîne des pertes significatives pour l'industrie alimentaire et une préoccupation particulière de l'industrie laitière (**Dogan et Boor, 2003**). Le lait est généralement stocké à basse température pendant 2 à 5 jours avant le traitement thermique (**DeJonghe et al., 2011 ; Baur et al., 2015** ).Au cours du stockage, la microflore psychrotrophes peut réduire la qualité du lait cru (**Lafarge et al., 2004 ; Xin et al., 2017**)*Pseudomonas* a été identifié comme psychrotrophes prédominant associée au lait, ce qui en fait l'un des plus importants groupes bactériens dans l'industrie laitière (**Wiedmann et al.,2000; Marchand et al., 2009**). Ce mémoire entre dans ce contexte. Il a pour objectif de caractériser les souches de *Pseudomonas spp* par la recherche des enzymes extracellulaires et aussi de déterminer la capacité des bactéries à former des biofilms.

Le travail comporte trois grandes parties :

1. Une mise au point bibliographique traitant du biofilm, ses étapes de formation, les problèmes causés par le biofilm en industrie agroalimentaire ainsi que d'élimination de biofilm.
2. Une partie expérimentale comprenant : La mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires : Les activités lecithinase, protéolytique et lipolytique, la détection de la capacité de ces souches de *Pseudomonas spp* isolées à partir des canalisations d'une usine laitière, à former de biofilm par 2 méthodes expérimentaux : RCA et TCP.
3. Une troisième partie rend compte des résultats expérimentaux obtenus. Enfin, nous présenterons les principales conclusions de ce travail.

Partie I  
Synthèse bibliographique

## Partie I : Synthèse bibliographique

### I.1. Historique :

La découverte des biofilms microbiens est attribuée à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek, le premier qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés microbiennes adhérentes à la surface des dents (**Roux et Chigo, 2006**).

En 1978, **Costerton et ses collaborateurs** ont proposé les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes. Ils ont proposé pour la première fois la théorie de «biofilms», qui a expliqué les mécanismes par lesquels les microorganismes adhèrent aux surfaces vivantes et inertes et les avantages accumulés par cette niche écologique (**Branger et al., 2007 ; Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Kara Terki, 2014**).

Plus récemment, les études sur les biofilms étaient développées dans divers domaines industriels, environnementaux et médicaux. Beaucoup de travaux dans les deux dernières décennies ont compté sur les outils tels que : la microscopie électronique à balayage (MEB) ou les techniques de cultures microbiologiques standards pour la caractérisation des biofilms (**Donlan, 2002**).

La figure ci-dessous montre les différentes étapes de formation de biofilm proposé par Zobell en 1943.

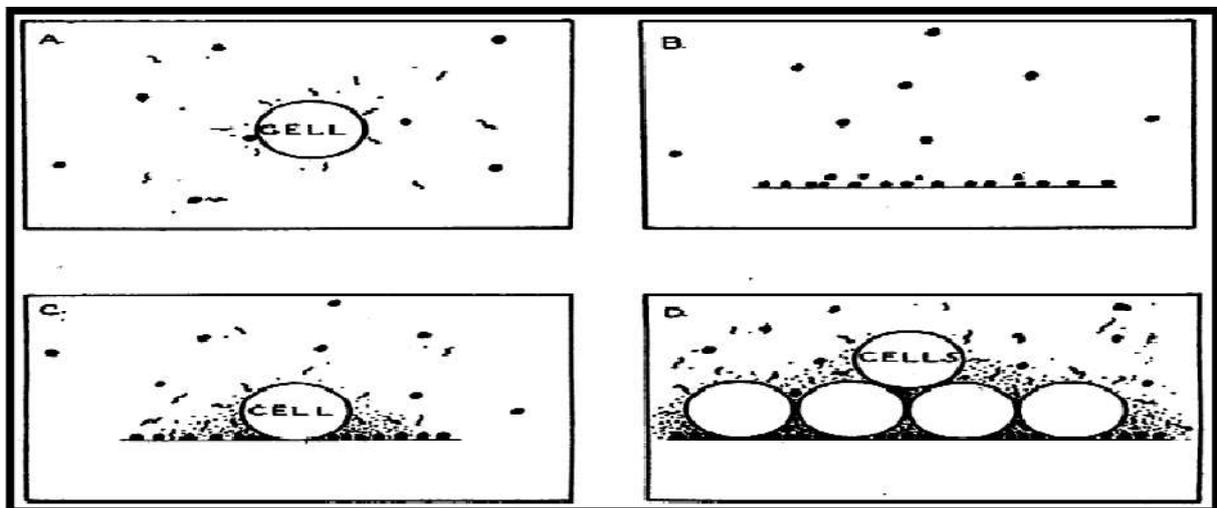


Figure 1: Schématisation de biofilm par Zobell, 1943

## I.2. Définition :

Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules de bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique (**Hall-Stoodley et al., 2004** ; **Muhsin et al., 2015**). Les bactéries peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique, qu'à une surface abiotique (**Muhsin et al., 2015**). Ainsi, le biofilm est défini comme étant une association de microorganismes, dans laquelle les cellules se collent l'une à l'autre sur une surface recouverte par une matrice de substances extracellulaires polymériques produites par les bactéries elle mêmes (**Costerton et al., 1999** ; **Hall-Stoodley et al., 2004** ; **Muhsin et al., 2015**).

## I.3. Caractéristiques des *Pseudomonas*

Les caractéristiques des *Pseudomonades* sont décrites dans l'ouvrage « Bergey's » (**Garrity, 2005**). Ce groupe renferme des bacilles à Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de longueur, non sporulés. Ces bactéries sont très généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires.

Dans leur grande majorité, elles produisent des sidérophores : pyocyanine, pyorubine, chlororaphine, oxyphénazine. Certaines de ces molécules sont considérées comme caractéristiques d'espèce telle la pyocyanine, pigment vert-bleu de *P. aeruginosa*, Ces bactéries sont aérobies, à métabolisme strictement respiratoire. Globalement, toutes sont capables de se multiplier à 28°C et pour des valeurs de pH supérieures à 4,5. Néanmoins, certaines sont considérées psychrophiles et d'autres thermophiles. Leur caractéristique majeure reste toutefois la diversité et la pluralité des substrats carbonés qu'elles sont capables d'utiliser et leur richesse en enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, estérases, etc.). Cette description restrictive des caractéristiques prédominantes de ces micro-organismes masque l'extrême diversité phénotypique qui règne au sein du seul genre *Pseudomonas*. En effet, si plus de 150 espèces ont maintenant été différenciées grâce à l'apport des techniques de la phylogénétique moléculaire, nombreux sont les auteurs qui décrivent l'extraordinaire pouvoir adaptatif de ces germes faisant de chaque isolat un micro-organisme original. Le remarquable potentiel génétique et physiologique adaptatif de ces bactéries se traduit par des propriétés de résistance à de nombreux antibiotiques, à certains agents chimiques et physiques (biocides, sels de bore, de chrome et métaux lourds, rayonnements ultraviolets, etc.), aux bactériophages et à certaines bactériocines. D'après (**Spierse et al., 2000**) cette capacité d'adaptation est responsable de la distribution universelle de ces espèces dans les environnements .

## I.3. Le biofilm de *Pseudomonas spp* en industrie laitière

De nombreux microorganismes rencontrés dans l'environnement laitiers peuvent développer des biofilms à n'importe quel stade de la chaîne de production. Les analyses microbiologiques des surfaces des équipements ont montré que les bactéries adhérentes sur ces dernières proviennent de la

ferme (**Huck et al.,2008; Gad, 2018**). Les *Pseudomonas* ont l'aptitude de former de biofilms dans les équipements de fabrication de produit laitier.

Les *Pseudomonas* ont cette capacité de produire des polymères extracellulaires qui permettent leur adhésion aux matériaux des canalisations de lait de la machine à traire (**Wang et Jarayao ,2001**). De manière générale dans l'industrie agroalimentaire les bactéries sont 100 à 1000 fois plus résistantes aux méthodes de désinfection usuelles quand elles sont sous forme de biofilm et non sous forme planctonique (**Jahid et Ha ,2012**).

L'efficacité des traitements des surfaces dépend de différents facteurs que sont : la fréquence de traitement, le type de produit utilisé pour le nettoyage et la désinfection, le temps de contact, la température d'application, le pH, la charge bactérienne et l'âge du biofilm (**Jahid et Ha ,2012**).

Les résultats de l'étude réalisée par **Laithier et al. (2004)** montrent que les biofilms sont présents à tous les niveaux dans les ateliers fromagers fermiers : machine à traire, tank à lait, bac de caillage et les moules.

*P. aeruginosa*, comme d'autres bactéries à Gram négatif, produit des agrégats structurés ou biofilms maintenue par une matrice (**khalilzadeh, 2009**). Cette dernière est composée majoritairement d'un mélange comprenant en proportions des alginates (exopolysaccharide), ainsi que des protéines et des rhamnolipides (**Pecastings, 2010 ; Ben Haj Khalifa et al.,2011 ; Barakat, 2012**).

Dès que la bactérie a réussi à s'implanter, elle devra y survivre et ce malgré la présence des défenses de l'hôte innées et acquises, et d'événements répétés d'antibiothérapie pour réussir la formation de biofilms (**Ben Haj Khalifa et al.,2011**).

La formation d'un biofilm mature chez *P. aeruginosa* a lieu 5 à 7 jours et s'effectue en 5 étapes (**Soussereau, 2012**).

### **I.3.1 les étapes de formation du biofilm**

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale (**Annous et al.,2009**), telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement (**Vu et al., 2009**).

Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques et/ ou sur les équipements de l'industrie agroalimentaire (**Talaro, 2008**).

#### **I.3.1.1 Attachement réversible des bactéries »**

Dans un premier temps, les cellules bactériennes sous forme planctonique vont venir s'associer à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire de transport passif (ex : sédimentation) ou alors de transport actif en faisant notamment intervenir des structures

particulières de la surface de la bactérie tels que : flagelles chez *Pseudomonas aeruginosa*, et PNAG ou PIA qui présentent la molécule d'adhésion la plus importante chez les staphylocoques (Goetz *et al.*, 2016).

Il s'en suivra une adhésion réversible correspondant à un attachement faible des cellules bactériennes à la surface déclenchée, lorsque les microorganismes arrivent sur le support à une certaine distance, et faisant intervenir des forces non covalentes ou des interactions faibles de type forces de Van der Waals et liaisons électrostatiques (Bos *et al.*, 1999 ; Akbas, 2015 ; Goetz *et al.*, 2016).

#### **I.3.1.2. Adhésion irréversible**

Dans un deuxième temps, grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries qui leur permettent de renforcer leur fixation au support, l'adhésion devient irréversible (Branger *et al.*, 2007). Dans ce cas, interviennent des interactions fortes et de courte distance qui apparaissent lorsque la distance devient inférieure à 3 nm, et comprennent les interactions hydrophobes, acides-base de Lewis, la formation de dipôle, les liaisons covalentes et les interactions d'hydrogène (Malek, 2013 ; Akba, 2015).

#### **I.3.1.3. Formation des micro-colonies et production d'EPS**

Durant cette étape, lorsque les bactéries sont irréversiblement attachées à la surface sera définitif, elles vont s'agréger entre elles et se diviser en utilisant les nutriments présents dans le film de conditionnement et l'environnement liquide. Ce cimène à la formation des microcolonies qui s'élargissent et s'unissent pour former une couche cellulaire couvrant la surface (Otto, 2013 ; Mogha *et al.*, 2014 ; Goetz *et al.*, 2016). Il y aura alors une phase durant laquelle la densité bactérienne atteint un certain seuil, qui permettra au quorum sensing de participer à la maturation du biofilm (Otto, 2013). Une fois l'intensité de ses signaux abouti un niveau précise, les mécanismes génétiques contrôlant la production d'EPS sont activés (Costerton *et al.*, 1999). Ces EPS jouent un rôle immense dans la protection des biofilms contre les agressions extérieures, qu'elles soient mécaniques, physiques, chimiques ou cellulaires ainsi que dans l'ancrage de cellules à la surface (Lebeaux *et al.*, 2014 ; Mogha *et al.*, 2014).

#### **I.3.1.4. Maturation du biofilm**

Par la suite la croissance exponentielle de biofilm se traduisant par une augmentation favorable de son épaisseur jusqu'à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel (Costerton *et al.*, 1995). Le biofilm mature se caractérise par la formation des canaux aqueux, qui vont entraîner la séparation des microorganismes d'une part, et permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments dans les parties enfouies du biofilm d'autre part, ainsi que l'évacuation des déchets (figure

03). Le biofilm se développe, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique, en présence des conditions optimales (Filloux et Vallet, 2003).

### I.3.1.5. Détachement et dispersion du biofilm

Une fois la taille maximale du biofilm atteinte, les bactéries jointes afin de survivre et coloniser de nouveaux créneaux doivent pouvoir se détacher et se disperser du biofilm (Mogha *et al.*, 2014). Le détachement de cellules de surface peut être régulé par le quorum sensing, et qu'a également ceci aura une influence sur les différentes étapes de la formation du biofilm (Tremblay *et al.*, 2014 ; Akbas, 2015). Principalement, les cellules filles sont détachées en premier du biofilm, suite à divers facteurs tels que : perturbation mécanique (ex : forces de cisaillement), les dynamiques des fluides, une dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire (ex : DNase) (Mogha *et al.*, 2014 ; Goetz *et al.*, 2016). Le détachement de biofilm a été divisé en trois processus : érosion, abrasion et sloughing :

1. L'érosion : est le résultat des forces de cisaillement en milieu liquide.
2. L'abrasion (la collision de particules) : Se réfère au détachement continu de cellules simples ou bien des petits groupes cellulaires et affecte la surface totale du biofilm.
3. Sloughing : Correspond à la perte instantanée des grandes parties du biofilm, affectant non seulement le biofilm entier mais aussi la surface de biofilm (Mogha *et al.*, 2014).

La figure ci-dessous montre les différentes étapes de formation de biofilm.

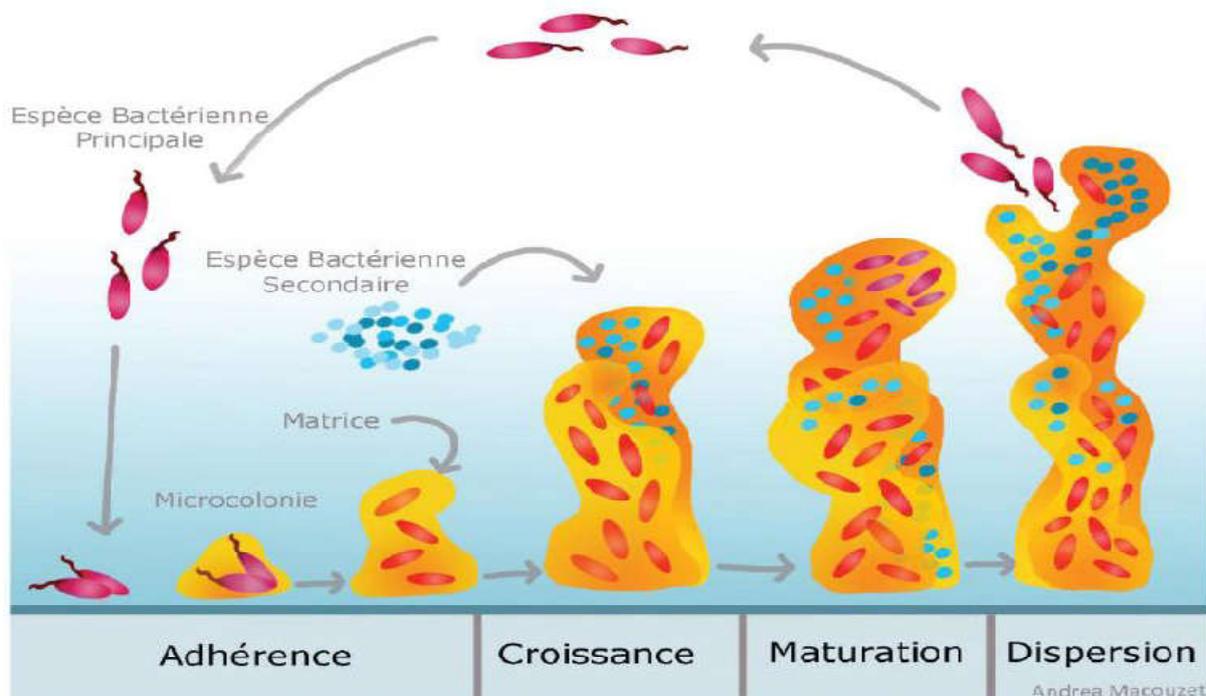


Figure 2: Schéma présentant les étapes du développement du biofilm

(Yannick *et al.*, 2014).

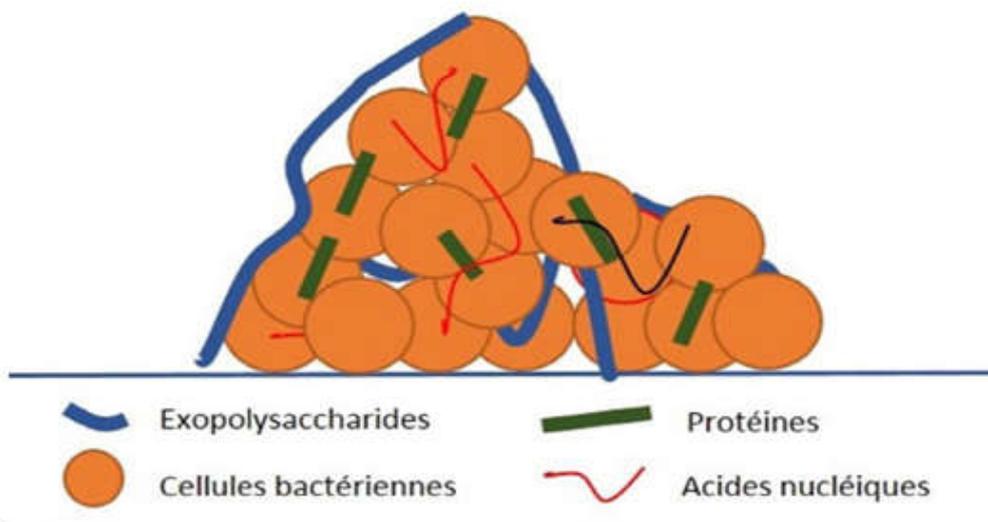
#### I.4. Composition du biofilm

Le développement de l'architecture des biofilms est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les bactéries du biofilm, incluant des protéines, des enzymes, des polysaccharides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des lipides, des glycolipides et des cations (voir Tableau1) (Flemming et Wingender, 2010). En plus de ces composants, l'eau est le composant majeur, avec plus de 97%, responsable du flux des nutriments à l'intérieur de la matrice du biofilm (Sutherland, 2001). La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (Yannick *et al.*, 2014).

**Tableau 1 : Composition d'un biofilm bactérien (Muhsin *et al.*, 2015).**

Composés	Pourcentage dans la matrice
Cellules microbiennes	2-5%
Protéines	1-2%
Polysaccharides	<1-2
ADN/ARN	<1-2%
Eau	Supérieur à 97%

La figure ci-dessous montre les différents composants du biofilm.



**Figure 3:Composition du biofilm (Lister *et al.*, 2014)**

##### I.4.1 Les microorganismes

Un biofilm est composé de communautés complexes des bactéries au sein desquelles on peut trouver des multiples espèces attachées à différents matériels (Akbas, 2015).

Dans des conditions naturelles, les biofilms mono espèce sont relativement rare dans le milieu industriel en raison pression de la sélection exercer par les conditions de processus technologique (Sutherland, 2001 ; Malek *et al.*,2013). En effet, la plupart des biofilms sont souvent composés de différents types de microorganismes : bactéries, algues, protozoaires, mycètes, dans lequel chaque groupe exécutant des fonctions métaboliques spécialisées (Branger *et al.*,2007 ; Alnnasouri, 2010).

#### **I.4.2 La matrice(EPS)**

La formation de la matrice est un processus dynamique qui dépend de la disponibilité nutritive, la synthèse et la sécrétion de matière extracellulaire (Flemming *et al.*,2016). Cette matrice peut être constituée non seulement de polysaccharides, mais elle comprend aussi des protéines, des acides nucléiques, des agents tensioactifs, des lipides, des glycolipides et des cations. Cette composition est variée selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (Tremblay *et al.*,2014). Elle fournit aux microorganismes des avantages structurels et fonctionnels, tels que :

1. L'hydratation.
2. La capture de ressources.
3. La capacité digestive.
4. La protection et la résistance aux agents antimicrobiens.
5. Les interactions réciproques intercellulaires qui peuvent améliorer la capacité du métabolisme de cellules dans le biofilm (Flemming *et al.*,2016).

#### **I.5.Facteurs favorisant la formation d'un biofilm**

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (Donlan, 2002).

##### **I.5.1 Caractéristiques de la surface**

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (DeChalvetet De Rochemonteix, 2009).

###### **I.5.1.1 Rugosité de la surface :**

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante (Characklis, 1990). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car

les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (Donlan, 2002).

Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques (Donlan et Costerton, 2002)

#### **I.5.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface :**

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (Bendinger, 2003).

#### **I.5.1.3. Présence de films protéiques sur la surface :**

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière.

En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (Nobbs, 2009).

#### **I.5.2. Caractéristiques du milieu :**

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs (O'Toole *et al.*, 2000; Donlan, 2002 ; Martinez, 2007 ; Goller, 2008):

**a. La température :** est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (Dumas, 2007).

**b. Le pH :** du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (Hamadi *et al.*, 2004) ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (Boutaleb, 2007).

**c. Concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques.**

**d. Sources de carbone disponibles :** elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez, 2007).

**e. Concentrations en nutriments :** dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (Spormann, 2008).

**f. Concentrations en certains cations :** l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium  $\text{Na}^+$ , Calcium  $\text{Ca}^{2+}$ , ion ferrique  $\text{Fe}^{3+}$ ) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (Fletcher, 1988).

**g. Hydrodynamique du fluide :** selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (Donlan, 2002).

### I.5.3. Propriétés des cellules :

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes (Donlan, 2002).

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides. Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (Donlan, 2002).

La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas ou température basse). L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression

de gènes codant pour des caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate, fer et croissance ralentie (**Goller, 2008**).

### **I.6. Biofilm dans l'industrie laitière**

La capacité de certains micro-organismes à former des biofilms continue d'entraîner un problème majeur pour différentes industries. Cependant toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs des produits laitiers sont remis en cause par les problèmes des biofilms en libérant des bactéries qui compromettent la sécurité et la qualité du produit fini (**Parkar et al., 2004 ; Srey et al., 2013**). En effet, les principales sources de contamination des produits laitiers sont souvent dues au manque de désinfection d'équipement et/ou au mauvais nettoyage (**Srey et al., 2013**).

Dans les conditions favorables, un biofilm dans un environnement de traitement de lait se développe initialement par le biais de l'accumulation de la matière organique sur une surface en métal, qui est alors colonisée par les bactéries (**Marchand et al., 2012**), bien que le lait est considéré comme un meilleur milieu pour la croissance des micro-organismes en raison de son pH (presque neutre) et sa large variété en éléments nutritifs disponibles, ainsi que la présence des stimulants de croissance (**Mogha et al., 2014**). Le biofilm laitier se développe très rapidement (8-12 h), avec des nombres bactériens souvent supérieurs à  $10^6$  bactérie/cm<sup>2</sup> (**Malek, 2013**).

### **I.7. Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières :**

La formation de biofilm pose des problèmes dans beaucoup de branches de l'industrie alimentaire (**Poulsen, 1999**). En industrie laitière, les biofilms se forment habituellement sur les surfaces qui sont en contact avec des fluides, et peuvent être une source de contamination bactérienne responsable de la réduction de la durée de conservation des produits et de la transmission de maladies (**Carpentier et Cerf, 1993 ; Zottola et Sasahara, 1994 ; Dunne, 2002 ; Agarwal et al., 2006**). Ils peuvent en effet servir de niche à des espèces pathogènes comme *Listeria monocytogenes* (**Wong, 1998**) et causent alors de sévères problèmes de santé publique (**Cerf, 2002**). La formation des biofilms sur les équipements d'industrie laitière peut mener à des problèmes d'hygiène et à des pertes économiques (**Bremer et al., 2006 ; Zhao et Liu, 2006 ; Gram et al., 2007**).

Les biofilms sont plus résistants aux agents antimicrobiens comparés aux cellules planctoniques ce qui fait de leur élimination à partir des équipements de traitement des denrées alimentaires un défi important (**Simões et al., 2006 ; Simões et Vieira, 2009**). Des études ont montré que les micro-organismes organisés en biofilm sur une surface sont plus résistants aux antibiotiques et aux désinfectants, que les cellules planctoniques, cette résistance dépend de leur

activité métabolique et augmente avec l'âge du biofilm (**Mattila- Sandholm et Wirtanen, 1992 ; Zottola et Sasahara ,1994 Lechevallier et al., 1998 ; Costerton et al ., 1995**), l'état de la matrice d'exopolymères, la surface et les conditions de croissance (**Muatapha etLiewen,1989 ;Frank et Koffi,1990**). Généralement, les microorganismes vivant dans les biofilms sont beaucoup plus résistants aux désinfectants que des micro-organismes dans une culture planctonique. La résistance accrue est provoquée par plusieurs facteurs. Le glycocalyx limite la diffusion et peut causer la désactivation des désinfectants. La densité de la suspension bactérienne à l'intérieur du biofilm et l'état physiologique de cellules affectant la production des enzymes dégradantes sont également impliqués (**Vidal et al.,1997 ; Wirthlin et al., 2005**).

Les micro-organismes dans les biofilms peuvent catalyser des réactions chimiques et biologiques (sulfate-réductases ou les bactéries productrices d'acide) causant ainsi la corrosion des canalisations et des tanks de stockage. Ils peuvent également réduire l'efficacité de transfert de chaleur si les biofilms deviennent suffisamment épais (**Costerton et Lappin-Scott, 1989 ; Vieira et al.,1993 ; Mittelman, 1998**). Dans les biofilms, la concurrence pour les nutriments a comme conséquence une insuffisance nutritive, a également un rôle important dans la plus grande résistance des biofilms aux traitements antimicrobiens (**Berg et al.,1982 ; Jones et Pickup, 1989**). Certaines études ont montré que les bactéries portées par les aliments étaient plus résistantes aux divers désinfectants. Cette résistance est encore plus grande dans des biofilms âgées (plus de 24 h) que dans des biofilms jeunes (**Anwar et al.,1990 ; Frank et Koffi, 1990 ; Lee et Frank, 1991 ; Wirtanen et Mattila-Sandholm, 1992**).

Compte tenu des différents facteurs décrits précédemment, les micro-organismes adhérents et/ou en biofilms sont très difficiles à éliminer et sont donc une source récurrente de contamination des aliments dans le secteur agro-alimentaire et les biofilms formé sur les canalisations ou d'autres surfaces dans l'environnement de traitement des denrées alimentaires sont identifiées comme source potentielle pour l'intoxication alimentaire (**Allion, 2004**). La résistance des biofilms aux traitements conventionnels augmente la nécessité de développer de nouvelles stratégies de prévention (**Singh et al.,2002 ; Simoes et al., 2009**).

### **I.8. Elimination de biofilm**

Dans l'industrie agroalimentaire l'attachement microbien aux surfaces des équipements est rapide, par conséquent, il impossible de nettoyer et de désinfecter assez souvent pour éviter l'attachement. Néanmoins une fréquence suffisante de désinfection devrait permettre d'éviter la maturation du biofilm et l'accumulation des résidus de produit. (**Houdet et Michels,2010**).

L'objectif principal d'un processus de nettoyage est l'élimination des résidus de produits, qui est un premier point critique dans l'élimination, et le contrôle de biofilms. En effet, l'élimination

incomplète des résidus alimentaires favorise la ré-adhésion des bactéries et la formation du film conditionnement point de départ d'un nouveau biofilm. En outre, les désinfectants sont moins efficaces lorsque des particules alimentaires ou de souillure sont présentes sur les surfaces (**Sinde et Carballo, 2000**). De mêmes les méthodes de nettoyage standard utilisées dans de nombreuses industries agroalimentaires, tel que le nettoyage standard utilisées dans de nombreuses industries agroalimentaires, tel que le nettoyage acido-alcalin du CIP n'est pas suffisant pour éliminer la matrice organique de biofilm. Les paramètres des processus cinétique efficaces, comprennent des formulations appropriées, concentrations, temps, température et doivent être optimisés pour cibler l'élimination d'un biofilm (**Parker et al ,2004**). Celle-ci est également considérablement facilitée par l'application de force mécanique (comme le brossage et le frottement) de la surface pendant le nettoyage (**Houdt et Michiels., 2010 ; Malek, 2013**).

# Partie II

## Matériel et méthodes

## Partie II : Matériel et méthodes

### II.1. Lieu d'étude

Cette étude est réalisée au niveau de deux laboratoires pédagogiques ; Laboratoire de Microbiologie et laboratoire de biochimie au niveau de l'université de Djilali Bounaama Khemis-Miliana. la durée du stage pendant deux mois.

### II.2. Origine des souches

L'étude a été réalisée sur 10 souches appartenant au genre *Pseudomonas spp* isolées lors de travaux antérieurs. Ces souches ont été isolées à partir des canalisations pré et post pasteurisation du lait cru de l'usine laitière Arib. Les prélèvements ont été effectués aux niveaux des canalisations (circuits fermées) après l'application du système CIP.

### II.3. Revivification des souches

Les souches ont été conservées dans des tubes eppendorf, contenant du bouillon Luria Bertani additionné du glycérol a 10%, sont revivifiées dans des tubes à essais contenant 7ml du bouillon nutritif, et incubées pendant 24h à 30°C.

### II.4. Vérification de la pureté des souches

La purification des souches a été réalisée par des passages alternés sur le bouillon nutritif et la gélose nutritive. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24h. Généralement trois passages alternés sont effectués.

### II.5. Caractérisation des souches

#### II.5.1. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires :

Les activités lecithinase, protéolytique et lipolytique ont été recherchées.

##### II.5.1.1. Détermination de l'activité lecithinase :

Ce test a été réalisé en cultivant la souche sur une gélose nutritive contenant 10 % de solution de jaune d'œuf (voir annexe 1). L'incubation se fait pendant 5 jours à une température de 30°C.

La présence de cette activité est détectée par la présence de colonies entourée par des zones opaques.

### II.5.1.2. Détermination de l'activité protéolytique :

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé (**Vanderzant *et al.*, 1992**) (voir annexe 1). Après 72 heures d'incubation à 30°C, on ajoute une solution d'HCL (1N), la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de la strie indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture.

### II.5.1.3. Détermination de l'activité lipolytique : Hydrolyse du Tween 80

Ce teste a été réalisé par l'ensemencement de la souche en strie sur gélose nutritive contenant de Tween 80 (voir annexe 1) pendant 3 jours à une température de 30°C.

En cas de réaction positive, il se forme un halo opaque autour de la strie hydrolysant le Tween 80, dû à la précipitation des acides gras.

## II.5.2. Evaluation de la formation de biofilm par *Pseudomonas spp*

### II.5.2.1. Méthode du Rouge Congo Agar (RCA)

La caractérisation phénotypique de la production de slime a été réalisée par culture des isolats de *Pseudomonas spp* sur le milieu RCA. Cette technique proposée par **Freeman *et al.* (1989)** requiert l'utilisation d'un milieu solide préparé d'un bouillon cœur cerveau (BHIB) additionné de 5% de saccharose et de Rouge Congo.

Le colorant Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime et donnant des colonies noires sur milieu RCA, contrairement aux colonies non productrices qui restent rouge.

### II.5.2.2. Formation de biofilm sur microplaque( TCP) :

La capacité de formation de biofilm par *Pseudomonas spp* a été mesurée dans des microplaques en polystyrène à 96 puits. Chaque souche a été testée dans 5 réplicas après l'inoculation d'une culture standardisée dans du TSB additionnée de 0.2% de glucose. Les puits de contrôle négatifs contiennent TSB additionnée de 0.2% de glucose non inoculé. Des échantillons (200µL) ont été distribués dans des puits et les microplaques ont été incubées à 30 C° pendant 24 et 48 h.

Les cellules planctoniques ont été éliminées de chaque puits par l'enlèvement de la culture bactérienne et des rinçages avec de l'eau distillée stérile (trois fois). On évacue l'excès de l'humidité en tapotant les microplaques sur des serviettes et on sèche les plaques pendant 15minutes.

La formation de biofilm a été quantifiée par dosage au cristal violet, comme indiqué par (**Sabaeifard *et al.*, 2014**).

L'absorbance à 590 nm a été mesurée et les souches ont été regroupées dans :

$DO_{590} < 0.1$ , non producteurs (NP).

$DO_{590} [0.1-1.0]$  faibles producteurs (WP) .

$DO_{590} [1.1-3.0]$  producteurs modérés (MP) et  $DO_{590} \geq 3.0$ , producteurs puissants (SP).

# Partie III

## Résultats et discussion

## Partie III : Résultats et discussion

### III.1. Caractérisation des souches

#### III.1. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires :

Les activités hydrolytiques extracellulaires de 10 souches *Pseudomonas spp* ont été évaluées.

Les résultats de l'activité hydrolytique extracellulaire sont donnés par le tableau 02.

**Tableau 2 : Résultats expérimentaux d'activités hydrolytiques extracellulaires de *Pseudomonas***

Souche	Numéro de prélèvement	Saison de prélèvement	Site de prélèvement	L'activité protéolytique	L'activité lipolytique	Activité lécéthinase
<i>Pseudomonas spp3</i>	1	Saison froide	Avant pasteurisation	+	+	-
<i>Pseudomonas spp4</i>	1	Saison froide	Avant pasteurisation	+	+	-
<i>Pseudomonas spp5</i>	1	Saison froide	Avant pasteurisation	+	+	-
<i>Pseudomonas spp7</i>	1	Saison froide	Avant pasteurisation	+	+	-
<i>Pseudomonas spp1</i>	3	Saison froide	Avant pasteurisation	+	+	-
<i>Pseudomonas spp3</i>	3	Saison froide	Avant pasteurisation	+	+	-
<i>Pseudomonas spp5</i>	3	Saison froide	Avant pasteurisation	+	+	-
<i>Pseudomonas spp6</i>	3	Saison froide	Avant pasteurisation	+	+	-
<i>Pseudomonas spp7</i>	3	Saison froide	Avant pasteurisation	+	+	-
<i>Pseudomonas spp14</i>	1	Saison chaude	Avant pasteurisation	-	-	+

Les activités hydrolytiques extracellulaires ont révélé que celles-ci sont présentes chez les souches testées. Ces activités sont variables et reflètent les potentialités propres à chaque souche. Nos résultats révèlent que 90% de *Pseudomonas spp*, étaient positives pour la protéase, 90% étaient lipase positive et 10% étaient positives pour la lécithinase (voir figure 4).



**Figure 4: Résultats de la mise en évidence activités hydrolytiques extracellulaires. L'activité protéolytique**

Les bactéries psychrotrophes du lait cru sont essentiellement des bactéries à Gram négatif, se multipliant à une température inférieure à 7°C et dont le genre le plus représentatif est *Pseudomonas* (Law, 1979). Les *Pseudomonas* y représentent 51% des bactéries psychrotrophes (Reinheimer *et al.*, 1990).

Les *Pseudomonas* sont des bactéries non seulement mésophiles mais aussi psychrotrophes, ce qui explique leur développement à des températures de 30°C (température optimale de croissance) (Rajmohan *et al.*, 2002) et allant jusqu'à 4°C. Par ailleurs, un pH compris entre 4 et 5 ralentit leur développement, tout comme une activité de l'eau inférieure à 0,98 ; en effet, les *Pseudomonas* sont très exigeants en eau libre (Bornert, 2000).

La dégradation des composants du lait par diverses activités enzymatiques associées à la contamination de produits laitiers par *Pseudomonas spp* peut réduire la durée de conservation du lait transformé.

Les enzymes impliquées sont des enzymes protéolytiques et lipolytiques dites thermorésistantes qui dégradent les fromages (Arslan *et al.*, 2011, Costa *et al.*, 2001). Les premières dégradent la caséine du lait, ce qui altère la coagulation et engendre l'amertume si présents en grandes quantités. Le second type d'enzymes transforme les triglycérides en acides gras libres, à l'origine des autres défauts de goût (Arslan *et al.*, 2011) .

Comme les bactéries psychrotrophes entrent généralement dans la contamination des produits laitiers transformés dans les processus de traitement du lait-post-pasteurisation dans une usine (Moseley, 1980 et Ralyea et Boor, 1998), ces microbes peuvent ne représenter qu'une petite fraction de la flore initiale du lait transformé. La détérioration bactérienne se produit lorsque les conditions de croissance pendant le stockage réfrigéré permettent aux microbes psychrotrophes de se multiplier et de devenir la microflore dominante (Cousins et Bramley, 1981).

En plus de la capacité de *Pseudomonas spp* de se développer en grand nombre pendant le stockage réfrigéré, beaucoup de ces souches produisent également des lipases extracellulaires thermostables, et des lecithinase qui peuvent encore contribuer à la détérioration du lait (Champagne *et al.*, 1994 ;cousin, 1982 ;Shah, 1994 ; Sorhaug et stepaniak, 1997). Beaucoup de ces enzymes restent actives, même après des étapes de de traitement thermique qui peuvent détruire les organismes qui produisent ces enzymes (Garcia *et al.*, 1989 ; Mayerhofet *al.*, 1973 ; Sorhaug et Stepaniak, 1997). La dégradation des composants du lait par diverses activités enzymatiques peut réduire la durée de conservation du lait transformé. Par ex exemple, la digestion de la caséine par les protéases peut conduire à un gout amer et à la coagulation et à la gélification du lait. Les lipases hydrolysent la tributyrine et les matières grasses du lait pour donner des acides gras libres, qui donnent au lait un goût rance amer, et savonneuses. La lecithinase dégrade les membranes des globules gras du lait et augmente la sensibilité des matières grasses du lait à l'action des lipases (Cousin,1998 ;Cox,1993 ;Shah, 1994). Les produits hydrolytiques des matières grasses et des protéines du lait diminuent la qualité organoleptique des produits à base de laitiers liquide.

Dogan et Boor (2002), ont examinés338 *Pseudomonas*, 51% ont été identifiées comme *P. fluorescens*. Ces résultats sont conformes aux observations antérieures indiquant que *P. fluorescens* est l'organisme prédominant dans le lait réfrigéré. La présence de ce microbe dans les échantillons de lait transformés reflète probablement la présence de *P. fluorescens* dans l'environnement de transformation des produits laitiers, ainsi que son temps de génération à des températures de réfrigération (Cousin, 1982. CravenetMacauley, 1992. IngrahametStokes, 1959). ribotypie de 42*Pseudomonas* isolats ont révélé différents profils de ribotype. Ce grand nombre de différents ribotypes indique la diversité considérable écologique de *Pseudomonas spp* dans l'environnement de transformation des produits laitiers. Ces résultats montrent que ribotypage fournit une méthode fiable pour différencier les souches de *Pseudomonas* ayant un potentiel de détérioration des produits laitiers.

Des recherches antérieures ont montré que les bactéries psychrotrophes Gram-négatives telles que *Pseudomonas* ne survivent pas à la pasteurisation commerciale (Cousin.1982). Par

conséquent, la présence de bactéries à Gram-négatives dans le lait pasteurisé fraîchement indique généralement la contamination des post-pasteurisations (**Cousin, 1982**).

**Dogan et Boor (2002)**, ont montré que les souches de *P.fluorescens* ont été positives pour toutes les activités enzymatiques alors que la plupart des souches de *P. putida* (87,5%) ont été négatifs pour l'ensemble des activités enzymatiques.

Ces résultats correspondent à ceux de **Wiedmann et al. (1999.)** En ce que la majorité des souches de *P. fluorescens* ont la protéase extracellulaire, lipase, et l'activité Lécithines toutes les souches de *P. putida* sont généralement négatives pour toutes les activités enzymatiques. Nous concluons que *P. fluorescens* est un organisme d'altération importante des produits laitiers transformés.

Le potentiel de détérioration de *Pseudomonas spp* est du sa capacité à se multiplier à des températures de réfrigération et aussi en raison de leur capacité à produire des protéases thermostables et des lipases (**Sørhaug et Stepaniak, 1997**). Une étude a montré que les isolats de *Pseudomonas spp* ne montrent pas d'activités protéolytiques et lipolytiques à 4 ° C, alors à 20 ° C, les isolats de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* a montré ces activités. Cette constatation est d'accord avec les conclusions de **Dogan et Boor (2003)**.

**Mohammed et al (2015)**, ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* a été jugé prédominant du genre *Pseudomonas spp* suivi par *Pseudomonas fluorescens*. Le dénombrement total était de  $(3,50 \pm 0,085) \times 10^4$  ufc / ml. Sur 10 isolats de *Pseudomonas spp*. Qui ont été examinés pour les activités protéolytiques et lipolytiques; deux isolats présentaient une activité protéolytique, alors que trois avaient une activité lipolytique et cinq isolats présentaient les deux.

Les métalloprotéases sont les principales protéases produites par *Pseudomonas* (**Ertan et al., 2015**) et ont une importants dans le processus de détérioration des aliments, en particulier dans le lait, parce que la disponibilité du calcium, il est difficile de dénaturer les protéases, conférant une plus grande résistance thermique (**Ertan et al., 2015, Stoeckel et al., 2016**). Dans le lait UHT, l'hydrolyse de la caséine par métalloprotéases provoque un effet gélifiant (**Matéos et al., 2015, Stuknytė et al., 2016**). De plus, ils représentent 60% du commerce mondial des enzymes (**Kuddus et Ramteke, 2012**), en insistant sur l'importance de la connaissance des genres et espèces de micro-organismes qui produisent ces protéases en raison de leur potentiel biotechnologique. L'activité lipolytique des micro-organismes du genre *Pseudomonas*, en particulier de l'espèce *P. fluorescens* est également important pour les processus industriels et chimiques (**Hakiminia et al., 2013**).

Cependant, ces lipases agissent négativement sur la qualité du lait et ses dérivés, et on sait peu sur l'activité lipolytique d'autres *Pseudomonas spp*.

### III.2. Evaluation de la formation de biofilm par la méthode RCA :

Le rouge Congo agar est basée sur les caractéristiques phénotypiques, tels que la morphologie des colonies et la couleur des colonies. Sur ce milieu, les souches qui produisent des colonies noires sont considérées comme formatrices de biofilm, ou productrices de slime. A l'inverse, les souches qui produisent des colonies rouge lisse, sont considérés comme non formatrices de biofilm ou non productrices de slime (**Cucarella et al., 2001**).

Cette technique qualitative consiste à l'ensemencement des souches testées pour leurs capacité à produire un biofilm sur milieu Rouge Congo (**Freeman et al., 1989**) ; (**Chaieb et al., 2005**). C'est une méthode indirecte qui permet de distinguer entre les souches productrices de slime de celles qui n'en produisent pas, en se basant sur la composition de la couleur de leurs colonies.

L'évaluation de couleur des colonies, selon **Satorres et alcarazen (2007)** ; Les colonies des souches non productrices sont de couleur rose rouges tandis que celle qui ont la capacité à produire un slime sont de couleur noires à surface ou presque noire (**Nasr et al, 2012**). Les colonies des souches de phénotype variable donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge à centre rouge et à contour noir (**Touati et al, 2007**).

Plusieurs auteurs ont rapporté la capacité des bactéries à former des biofilms sur les matériaux couramment utilisés dans le secteur alimentaire y compris le secteur laitier, tel que l'acier inoxydable, le verre et le caoutchouc (**Hamadi et al., 2014**) , la gélose au Rouge Congo (RCA) sont parmi les systèmes les plus couramment utilisés pour l'étude de la capacité de l'organisme à produire des biofilms. Les résultats obtenus nous ont permis de constater que les 10 souches de *Pseudomonas spp* ne produisent pas le slime et montre un phénotype négatif dans le milieu (voir figure 5).



**Figure 5: Phénotype de production de slime par les souches sur milieu RCA**

Le slime est définie comme la substance polymérique extracellulaire, également connu sous le nom d'exo-polysaccharides (EPS). Sur le milieu RCA, les souches exprimant le PIA (polysaccharide intercellularadhesin) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatif (**Chaieb *et al.*, 2005**). Le Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime et donnant des colonies noires, contrairement aux colonies non productrices qui restent rouge (**Rewatkar et Wadher, 2013 ; Kara Terki, 2014**).

La véritable nature de slime et les causes de sa formation sont complexes, et de nombreux facteurs interagissent pour créer les conditions nécessaires à la formation de slime. Des facteurs tels que le pH, la température et les niveaux de nutriments organiques jouent un rôle important dans le développement de slime (**Chaudhary *et al.*, 1998**).

Le slime est composé de macromolécules, glycoprotéines, polysaccharides et de peptidoglycanes, la structure chimique exacte n'est pas bien définie. Dans des études antérieures, il a été également montré que le contenu en hydrates de slime joue un rôle important dans l'adhérence bactérienne (**Sakarya *et al.*, 2004**).

En plus, les microorganismes qui produisent ces exo-polysaccharides sont plus résistants à la dessiccation, à la prédation et aux produits chimiques (**Ophir *et al.*, 1994**). Cependant, ces molécules sont également importantes dans la formation de biofilms sur les surfaces puis qu'elles sont impliquées dans les premières étapes de la formation de biofilms.

Plusieurs auteurs signalent que la méthode de rouge Congo agar semble être moins efficace pour détecter la formation de biofilm in vitro (**Hassan et al., 2011 ; Rûzicha et al., 2004 ; Taj et al., 2012**).

**saha et al (2018)**, ont constaté que seulement 39 (29.1%) des 134 souches de *Pseudomonasaeruginosa* isolées des échantillons cliniques ont été productrice de slime par la méthode rouge congo.

**Asim et al (2010)**, ont trouvé que parmi les 80 isolats de *Pseudomonasaeruginosa* isolé à partir de divers échantillons cliniques seulement 75 % produire de slime.

**Oncel et al (2010)**, ont indiqué que sur les 10 isolats de *P.aeruginosa* uniquement 60% produire de slime et 40% non produire de slime.

**Arslan et al (2011)**, ont constaté que sur 32 *Pseudomonasssp* isolées à partir de 140 échantillons de fromage blanc faites maison aucune ne produit le slime.

La méthode TCP semble être plus efficace que la méthode de Rouge Congo dont **Hassan et al. (2011)** estime que la méthode TCP est une méthode de criblage la plus fiable, sensible et reproductible pour la détection de la formation du biofilm.

### III.3 Formation de biofilm par microplaque :

Le protocole d'essai TCP décrit par **Christensen et al.,(1985)** est le plus largement utilisé et a été considéré comme la norme d'essai pour la détection de la formation de biofilm.

La formation de biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits, est analysée par une simple observation à l'œil nu des puits après une coloration au cristal violet. Cette coloration est considérée comme l'une des techniques indirectes d'estimation de la production de biofilm sur des différents types de substrats (**Djordjevic et al.,2002**). La coloration développée reflète directement la masse du biofilm, et sa solubilisation permet de la quantifier (**Musk et al.,2005**).

Après 24 heures et 48 heures d'incubation à une température de 30 °C, la formation des biofilms a été exprimée en DO mesurées à 590 nm. Les résultats obtenus (Figure3) ont permis de mettre en évidence la capacité de formation de biofilms de toutes les souches de *Pseudomonas* isolées sur une surface hydrophobe (polystyrène) après culture.

D'après les résultats de **Bellifa et al. (2013) ; KaraTerki et al, (2013)**, la technique TCP reste la meilleure technique pour le dépistage de la formation du biofilm in vitro.

Elle permet une détermination quantitative pour comparer et examiner l'adhésion de différentes souches (**Racha et al.,2012**) .

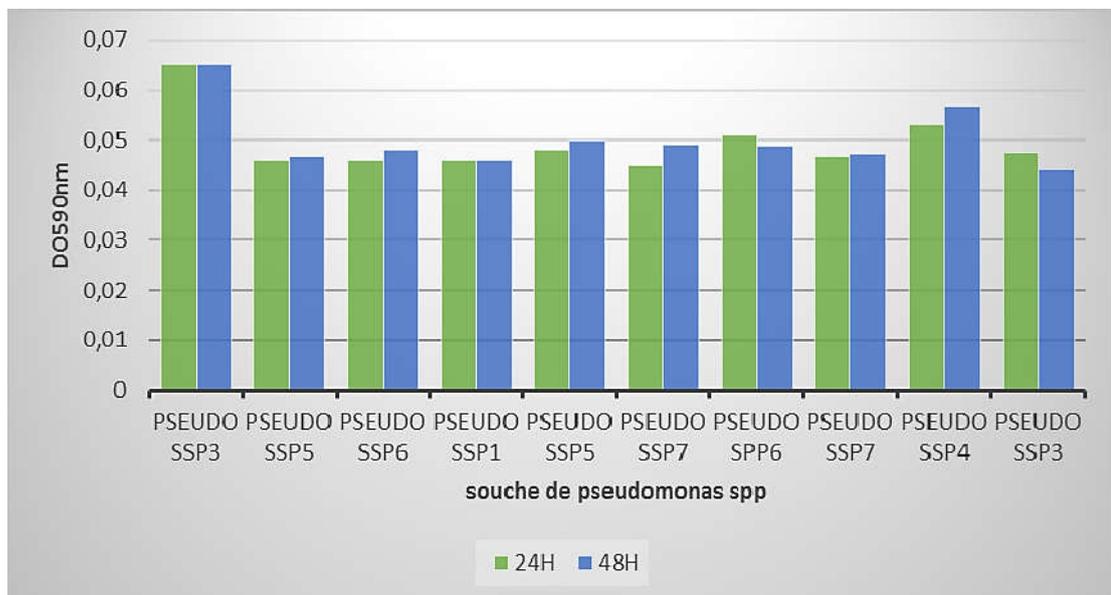
Les 10 souches ont été testées pour leur capacité de produire du biofilm in vitro. Ceci par la méthode quantitative de coloration au cristal violet sur microplaque 96 puits en polystyrène. Les valeurs moyennes de densités optiques (DO) obtenues par un lecteur d'absorbance pour microplaques, ont été converties en histogramme (voir figure 6). La valeur moyenne des puits de contrôle (sans biofilm) est égale à 0,05. D'après l'analyse de l'histogramme et par comparaison des différentes valeurs de DO pour chacune des souches étudiées, il s'est avéré que les 9 souches sont présentant une  $DO > 0.05$  après 24 heures d'incubation elle peut être considérée comme non producteur de biofilm par apport (**Sabaeifard et al.,2014**). L'absorbance à 590 nm a été mesurée et les souches ont été regroupées dans :

$DO_{590} < 0.1$ , non producteurs (NP) .

$DO_{590} [0.1-1.0]$  faibles producteurs (WP) .

$DO_{590} [1.1-3.0]$  producteurs modérés (MP) et  $DO_{590} \geq 3.0$ , producteurs puissants (SP).

De même que pour la formation de biofilm, aucune amélioration dans la croissance de souches n'a été obtenue après changement le temps d'incubation après 48h. Donc elle peut être considérée comme non productrice de biofilm.



**Figure 6 : la formation de biofilm par les souches de *Pseudomonas spp* après 24 heures et 48 heures d'incubation.**

La méthode TCP est la méthode fiable pour quantifier un biofilm in vitro que la méthode de RCA(**Hou et al., 2012**). Dans ce contexte plusieurs travaux ont aboutira ce même résultats citant :**FillouxetValleten2003** qui ont essayé d'étudier le biofilm de *Pseudomonasaeruginosa* in vitro .

*P. aeruginosa*, une bactérie aérobie stricte, forme des biofilms à l'interface air-liquide (**Filoux et Vallet, 2003**), ce qui correspondait ici à la position des anneaux violets. Les travaux de **Musk et al. (2005)** ont montré que cette bactérie est capable de former des biofilms avec une densité cellulaire importante localisée à l'interface air – liquide.

La détection du biofilm par les méthodes TCP semble plus fiable.

Nos résultats sont en concordance avec ceux de **d'Oli et al. (2012)**, où ils montrent que la technique TCP est la plus fiable pour la détection de la formation de biofilm chez des souches cliniques.

La capacité d'adhérer à des surfaces solides et la formation consécutive d'une communauté de biofilm bactérien organisé sont des étapes importantes dans la mise en place de *Pseudomonas* spp. Dans les usines de fabrications laitières il est bien connu que le passage de l'état planctonique à un mode de biofilm est un processus complexe, qui se produit en réponse à des changements de conditions environnementales (**O'Toole et al., 2000**).

**Rossi et al. (2016)** ont montré que la majorité des souches de *P. fluorescens* isolées à partir de produits laitiers et les usines de fabrication de produits laitiers sont capables de former un biofilm dans des puits de plaques de microtitration, avec des variations liées à la biodiversité des souches. Comme la première étape de la formation de biofilms est l'adhésion des bactéries sur les surfaces, l'hypothèse que les souches ont montré une bonne capacité à créer des interactions hydrophobes avec des surfaces de polystyrène. Cependant, **Lemos et al. (2014)** ont suggéré que les propriétés physiques et chimiques de surface ne sont pas le principal facteur de régulation du processus d'adhésion initiale pour *P. fluorescens*.

**Coban et al. (2009)** a testé la capacité des isolats de *P. aeruginosa* à former le biofilm chez des patients atteints de fibrose kystique, la production de biofilm a été détectée par la méthode TCP dans 33,3% des échantillons testés.

L'étude de **d'Oncel et al. (2010)** a révélé que 60% des isolats de *P. aeruginosa* de rhinosinusite chronique produisent des biofilms bactériens par la méthode de TCP.

Dans la nature *P. aeruginosa* existe rarement sous forme planctonique, libre, mais plutôt sous la forme de biofilm (**Méar, 2014**). En 2014, **Saxena** et ses collaborateurs ont montré que sur 80 souches de *Pseudomonas*, isolées à partir de crachat, seulement 16 souches ont été des bonnes formatrices de biofilm par contre 47 ont donné une formation faible.

Toutes les bactéries en générale et *P. aeruginosa* en particulier résident de manière prédominante sous la forme d'un biofilm (Nagant, 2013). Cette bactérie est l'une des bactéries les plus étudiées dans le contexte des biofilms (Musk *et al.*, 2005).

Rossi *et al* (2016) ont observé que la formation de biofilms par les souches de *P. fluorescens* a été promu à 10 ° C: les souches généralement ne produisent pas le biofilm à 30 ° C ont été plutôt faibles producteurs ou particulièrement modérée à 10 ° C. Il est admis que la formation de biofilms est renforcée par la mobilité des cellules, en particulier quand elle est médiatisée par flagelles, et dans certaines conditions environnemental les flagelles sont nécessaires pour la formation de biofilms dans *P. fluorescens* (Robleto *et al.*, 2003). Ainsi, l'hypothèse que la capacité de formation de biofilm pourrait être due à des appendices de surface bactérienne qui peut être en fonction de la température comme dans le cas de *L. monocytogenes*. A cet égard, l'intégration de plusieurs signaux différents à partir de l'environnement pourrait jouer un rôle dans la formation de biofilm, ainsi que d'autres événements tels que phénotypique et génotypique lors de la production de biofilm et la libération des EPS (Simões *et al.*, 2010). la formation de biofilm est un phénomène complexe sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels: la surface, le milieu et les microorganismes (Branger *et al.*, 2007). Il est admis que les micro-organismes se fixent plus facilement sur des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le téflon ou d'autres matières plastiques que sur des matériaux comme le verre ou les métaux (Liesseyamba, 2012).

D'autre part, la diminution rapide de la capacité de formation de biofilm que nous avons observé à 30 ° C après 48 h d'incubation pourrait être attribuée à la perte de exopolymères du biofilm et en particulier de exopolysaccharides, ce qui laisse supposer qu'un processus actif de détachement se produisait, probablement médiée par la dégradation enzymatique (Allison *et al.*, 1998). Ces observation ne sont pas en accord avec celles rapporté par Nagant (2013), qui indiquent que lors de la détection de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* en fonction du temps, que la formation de biofilm varie entre souches et que les valeurs d'absorbances CV de toutes les souches étudiées augmentent après une longue incubation en particulier 48 heures.

De ce fait et à fin de détecter et de quantifier les biofilms formés *in vitro*, la méthode de RCA semble être moins efficace (Beliffa, 2014) par contre la méthode de coloration au CV peut être la plus adaptés et la plus fiable (Hou *et al.*, 2012).

Des études montre que la méthode de coloration au CV a permis de mettre évidence une formation de biofilm variable chez l'ensemble de souches étudiées en comparaison avec la méthode de RCA qui a permis de détecter la formation de biofilms. Ces résultats sont semblables à ceux

rapportés par plusieurs travaux traitant les biofilms de *P. aeruginosa* tels que l'étude de **FillouxetVallet (2003)**.

# CONCLUSION

La formation de biofilm est l'un des problèmes majeurs en milieu industriel. Plus précisément dans l'industrie laitière, la capacité des bactéries à s'attacher aux surfaces de contact d'équipement laitière fournit un réservoir de contamination pour les agents pathogènes avec des conséquences sur la santé humaine.

À l'heure actuelle, les biofilms de *Pseudomonas spp* sont considérés comme la principale cause de la détérioration microbienne du lait et produits laitiers, et la principale raison de pertes économiques importantes dans l'industrie laitière. On outre, La capacité d'une souche à former du biofilm est reconnue comme étant un important facteur de virulence chez de nombreuses espèces bactériennes.

Dans cette étude, la capacité des souches de *Pseudomonas spp* a produire des enzymes extracellulaire et la capacité de formation du biofilm à été évalué par les méthodes suivantes : Rouges Congo Agar (RCA), méthode TCP.

Nos résultats révèlent que 90% de *Pseudomonas spp*, étaient positives pour la protéase, 90% étaient lipase positive et 10% étaient positive pour la lecithinase. La méthode classique la plus souvent utilisée pour détecter la production de slime phénotypiquement est RCA qui réalisée sur un milieu solide le rouge Congo agar. Nos résultats révèlent toutes les souches sont non productrices de slime. N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm, qui a été influencé par l'adhésion des micro-organismes sur une surface telle en polyéthylène. Dans notre travail, La formation de biofilm de ces souches sur microplaque à été évaluée. D'après les résultats obtenus toutes les souches n'ont pas pu former un biofilm.

Les résultats obtenus nous ont permis de montrer une association entre le slime, l'hydrophobicité et la capacité d'adhérer et former le biofilm sur l'acier inoxydable.

Pour être accompli, ce travail mérite d'être poursuivi par une identification des souches par les techniques de biologie moléculaires.

Afin de minimiser l'impact sur l'environnement, il serait intéressant d'explorer des techniques alternatives permettant de inhiber l'adhésion bactériens sur la surface qui ont en contact avec les aliments serait également une voie à prospecter.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## Références Bibliographiques

### A

- **Agarwal S., Sharma K., Swanson B. G., Yuksel G. U., Clark S. 2006.** Nonstarter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **89**:1452-1466.
- **Akbas M. Y. 2015.** Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. PP 383-394.
- **Allison G. W., Lubchenco J., Carr M. H. 1998.** Marine reserves are necessary but not sufficient for marine conservation. *Ecol. Appl.* **8** :S79-S92.
- **Alnnasouri M. 2010.** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France *Appl. Environ. Microbiol.* **52** :1242-1246.
- **Annous B.A., Fratamico P.M., Smith J.L. 2009.** Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *J. Food Sci.* **74**(1): R1–R14.

Anwar H., Dasgupta M., Costerton J. W. 1990. **Testing the susceptibility of bacteria in biof**

- **Arslan S., Eyi A., Özdemir F. 2011.** Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas spp.* isolated from cheeses, *J. Dairy Sci.* **94** :5851–5856
- **Asim I., Shaikh M., Musaddiq. 2010.** Detection and analysis of biofilm production and extracellular polymeric substance in *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical specimens. *Biosci. Biotech. Res. Comm* ; **3**:74-78
- **Azeredo J., Critical I. 2017.** Review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* **43** : 313–351.

### B

- **Barakat R. 2012.** Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine, pigment redox-actif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle de France.
- **Baur C., Krewinkel M., Kranz B., Von Neubeck M., Wenning M., Scherer S., et al. 2015.** Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* **49** : 23–29.
- **Bellifa S., Hassaine H., M'hamedi I., Kara Terki I., Lachachi M., Didi W. 2013.** Formation of biofilm in microfermentor by *Klebsiella pneumoniae* isolated from

medical devices at the university hospital of Tlemcen. 4th International Woekschop on Biotechnology. Tlemcen Algeria.

- **Ben Haj Khalifa A., Moissenet D., Vu Thien H., Khedher M. 2011.** Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. Ann Biol Clin; 69(4) : 393-403.
- **Bendinger B., Rijnaarts H .H., Altendorf K., Zehnder A. J. 2003.** Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. Applied and environmental microbiology. 59(11): 3973-3977.
- **Berg J.D., Matin A., Roberts P. V. 1982.** Effect of the antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. Appl. Environ. Microbiol. **44**: 814–818.
- **Bornert G.2000.** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. Revue de médecine vétérinaire. **11** : 1003-1010.
- **Bos R., Mei H. C., Busscher H. J. 1999.** Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions–itsmechanisms and methods for study. FEMS microbiology reviews, 23(2) :179-230.
- **Boutaleb N .2007.** Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Universités de Bretagne-Sud, France. 174 pages.
- **Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007).** Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon. P.131-164.
- **Bremer P. J., Fillery S., McQuillan A. J. (2006).** Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. Int. J. Food Microbiol. **106**: 254–262.

## C

- **Carpentier B., Cerf O. 1993.** A review: Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. J. Appl. Bacteriol. **75**: 499–511.
- **Cerf O.2002.** Risques bactériens liés aux produits laitiers. Revue Française des Laboratoires. 2002:67-69.
- **Chaieb K., Mandouani K., Bakhrouf A. 2005.** Detection of icaA and icaD loci by Polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needlesin à dialysis unit, Journal of Hospital Infection. **61** : 225-230.
- **Chalvet de Rochemonteix A. 2009.** Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort Paris.

- **Champagne C.P., Laing R.R., Roy D., Mafu A.A. and Griffiths M.W. (1994).** Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. **34** : 1–30.
- **Characklis W.G, Marshall K.C. 1990.** Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- **Chaudhary R.C., Reddy A.P.K., Balasubramanian V., Roy J.K. 1998.** Partnership internationally: An overview of India's experiences in rice research. P. 483-509. In: Rainfed Rice for Sustainable Food Security. CRRI, Cuttack, India.
- **Choi JW., Kim SC., Hong SH., Lee HJ. 2017.** Secreted Small RNAs via Outer Membrane Vesicles in Periodontal Pathogens. *J Dent Res*. **96**: 458–466.
- **Christensen GD., Simpson WA., Bisno AL., Beachy EH. (1985).** Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity* **37**: 318-326.
- **Coban A., Ciftci A., Onuk E., Erturan Z., Tanriverdi C.Y., Durupinar B. 2009.** Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *Mikrobiyol. Bul.* **43** : 563-573.
- **Costa M., Gomez M-F., Molina I-H. et Romero A. 2001.** Cinética de crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* en leche cruda e temperaturas de refrigeración. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. **51** : 371-375.
- **Costerton J. W., Lappin-Scott H. M. 1989.** Behavior of bacteria in biofilms. *Am. Soc. Microbiol. News*. **55**: 650–654.
- **Costerton J.W., Stewart P.S., et Greenberg E.P. 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**: 1318–1322.
- **Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott, H. M. 1995.** Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, **49**(1), 711-745.
- **Cousin M. A. 1982.** Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J. Food Prot.* **45**:172–207.
- **Cousins C. H., et Bramley A. J. 1981.** The microbiology of raw milk. *Dairy microbiology*. Vol. 1. Dans *The microbiology of milk*. Editeur: R. K. Robinson. Applied Science Publishers, London. pp. 119-165..
- **Cox J. M. 1993.** The significance of psychrotrophic pseudomonads in dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.* **48**:108–113.

- **Craven H. M., B. J. Macauley. 1992.** Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. Identification of types. *Aust. J. Dairy Technol.* **47**:38–45.
- **Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., Penadés J.R. 2001.** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **9**:2888–2896.

## D

- **De Chalvet De Rochemonteix A. 2009.** Thèse de Doctorat .Les biofilms et la peau. La faculté de médecine de Créteil.
- **De Jonghe V., Coorevits A., Van Hoorde K., Messens W., Van Landschoot A., De Vos P., et al. 2011.** Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **77** : 460–470.
- **Didouh N. 2015.** Caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection. Université Abou –BekrBelkaid –Tlemcen.
- **Djordjevic D., Wiedmann M. And Mclands borough L.A. 2002.** Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and environment al microbiology.* **68**: 2950– 2958.
- **Dogan B., Boor K J. 2003.** Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas spp.* isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl. Environ. Sci.* **69** : 130–138.
- **Donlan R.M, Costerton JW. 2000.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews.***15**: 167- 193.
- **Donlan R.M. 2002.** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*; **8**, **9**: 881– 890.
- **Dumas C. 2007.** Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.
- **Dunne W. M. 2000.** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately .*Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 155–166.

## E

- **Ertan H., Cassel C., Verma A., Poljak A., Charlton T., Aldrich-Wright J., Omar S.M., Siddiqui A.S., Cavicchioli R. 2015.** A new broad specificity alkaline and allopeptase from a *Pseudomonas sp.* Isolated from refrigerated milk: role of calcium in improving enzyme productivity. *J. Mol. Catalysis B, Enzymatic***113**:1-8.

## F

- **Filloux A., Vallet I. 2003.** Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Med. Sci. (Paris)*. Jan;19(1):77-83.
- **Flemming H.C., et Wingender J. 2010.** The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, **8**: 623-633.
- **Flemming H. C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S. A., Kjelleberg, S. 2016.** Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575..
- **Fletcher M. 1988.** Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*. **170**: 2027-2030.
- **Florez C., Raab JE., Cooke AC., Schertzer JW. 2017.** Membrane Distribution of the Pseudomonas Quinolone Signal Modulates Outer Membrane Vesicle Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*.8: e01034–17.
- **Frank J. F., Koffi R. A. 1990.** Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* **53**: 550-554.
- **Freeman D.J., Falkiner FR., Keane CT. 1989.** New method of detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. **42**: 87-84.

## G

- **Gad S. (2018).** Assessment of biofilm advantages and disadvantages. *Journal of Scientific And Engineering Research*, 5(4): 231-237.
- **Garcia M. L., B. Sanz, P. Garcia-Collia, and J. A. Ordonez. 1989.** Activity and thermostability of the extracellular lipases and proteinases from pseudomonads isolated from raw milk. *Milchwissenschaft* **44**:547–549.
- **Garrity G.M. 2005** .The Proteobacteria - Part B: The Gammaproteobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Springer: New York).
- **Goetz C., Dufour S., Archambault M., Malouin F., Jacques, M.2016.** Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lorsd'infections intra-mammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique. PP : 215-229.
- **Goller C.C, Romeo T. 2008.** Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **322**: 37- 66

- **Gram L., Bagge-Ravn D., Ng Y. Y., Gyomai P., Vogel B. F. 2007.** Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. Food Control. **18**: 1165–1171.

## H

- **Hakiminia F., Ranjbar B., Khalifeh K. & Khajeh K. (2013).** Kinetic and thermodynamic properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase upon addition of proline. Int. J. Biologic. Macromol. **55**:123-126. <<http://dx.doi.org/10.1016/j>.
- **Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. 2004.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature reviews Microbiology, 2(2): 95–108.
- **Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M., Kouider N. 2004.** Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Annals of Microbiology. **54**: 213-225.
- **Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M. 2011.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis. **15** (4):305-11.
- **Hou W., Sun X., Wang Z. et al., 2012.** Investigative Ophthalmology Visual Science, the Association for Research in Vision and Ophthalmology. (53) : 9. 5624.5631.
- **Houdt R., Michiels C.W. 2010.** Biofilm formation and the food industry. A focus on the bacterial outer surface .J. App Microbiol Volume 109, Issue 4.
- **Huck J. R., Sonnen M., Boor K. J. 2008.** Tracing heat-resistant, cold-thriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product. Journal of Dairy Science, **91**: 1218–1228.

## I

- **Ingraham J. L., J. L. Stokes. 1959.** Psychrotrophic bacteria. Bacteriol. Rev. **23**:97–108.

## J

- **Jahid I.K., Ha S.D., 2012.** A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety. Food Sci Biotechnol 21( 2): 299– 316.

## K

- **Kara Terki I., Hassaine H., Oufriid S., Bellifa S., Mhamedi I., Lachachi M., Timinouni M. 2013.** Detection of *icaA* genes and biofilm formation in *Staphylococcus* spp isolated from

urinary catheters at the university hospital of Tlemcen .*African journal of Microbiology*. 7(47) : 5350-5375.

- **Kara Terki, I. 2014.** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- **Khalilzadeh P. 2009.** Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat d'Université de Paul Sabatier - Toulouse III. Toulouse.
- **Klinger C., filloux A ., lazduski A . 2005 .** Les biofilms, forteresses bactériennes. La recherche **389** : 42-46.
- **Koeppen K., Hampton TH., Jarek M., Scharfe M., Gerber SA., Mielcarz DW., et al.2016.** A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. PLoS Pathog ;**12**: 1–22.
- **Kuddus M., Ramteke P.W. 2012.** Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. Critic. Rev. Microbiol. 38(4):330-338. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2012.678477>

## L

- **Lafarge V., Ogier J.C., Girard V., Maladen V., Leveau J.Y., Gruss A., et al. 2004.** Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. Appl. Environ. Microbiol. **70** : 5644–5650.
- **Law B. A. 1979.** Review of the progress of Dairy Science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. Journal of Dairy Research, **46** : 573-588.
- **Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Lucet, J. C. 2014.** Physiopathologie et prévention des infections liées aux dispositifs médicaux implantés. La Revue du praticien, 64(5), 620-625.
- **Lee S. H., Frank J. F. 1991.** Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes*. Hypochlorite and heat. J. Food Prot. **54**: 4–6.
- **Lemos M., Borges A., Teodósio J., Araújo P., Mergulhão F., Melo L., Simões M. 2014.** The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. Int Biodeter Biodegr **86**:42-51.
- **Liesse Iyamba J-M. 2012.** Etude de l'interaction des souches cliniques de Staphylococcus aureus avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.

- **Lister J.L., Horswill A.R. 2014.** Staphylococcus aureus biofilms : recent developments in biofilm dispersal. Front. Cell. Infect. Microbiol. ,2014,4,178

## M

- **Malek F., Boudjemaa B. M., Aouar-Métri A., Kihal M. 2013.** Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. Dairy Science & Technology, 93(1), 73-82.
- **Marchand S., Heylen K., Messens W., Coudijzer K., De Vos P., Dewettinck K., et al. 2009a.** Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lungdensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. 11 : 467–482.
- **Marchand S., De Block J., De Jonghe V., Coorevits A., Heyndrickx M., Herman, L. 2012.** Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11(2), 133-147.
- **Marchand S., Vandriesche G., Coorevits A., Coudijzer K., De Jonghe V., Dewettinck K., et al. 2009b.** Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. Int. J. Food Microbiol. 133 : 68–77.
- **Martinez LR, Casadevall A. 2007.** *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. Applied and Environmental Microbiology. 4592- 4601.
- **Matéos A., Guyard-Nicodème M., Baglinière F., Jardin J., Gaucheron F., Dary A., Humbert G., Gaillard J.L. 2015.** Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. Int. Dairy J.49:78-88.
- **Mattila-Sandholm T., Wirtanen G. 1992.** Biofilm formation in the industry: A Review. Food Rev. Inter. 8: 573-603.
- **Mayerhof H. J., R. T. Marshall, C. H. White, M. Lu. 1973.** Characterization of a heat stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P26. Appl. Microbiol. 25:44–48.
- **Méar J.B. 2014.** Étude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Thèse de doctorat. Université Lille nord de France, France.

- **Mogha K. V., Shah N. P., Prajapati J. B., Chaudhari A. R. 2014.** Biofilm a threat to dairy industry. *Indian Journal of Dairy Science*, 67(6).
- **Mohammed E. O., Rames ., et Hamama D.2015.** comportement protéolytiques et lipolytique *Pseudomonas spp.* isolé du lait pasteurisé. *Int. J. Food Sci. Microbiol.* Vol. 2 (4), pp. 069-071.
- **Moseley, W. K. 1980.** Pinpointing post-pasteurization contamination. *J. Food Prot.* 43:414.
- **Muatapha A., Liewen M. B. 1989.** Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers. *J. Food Prot.* 52: 306-311.
- **Muhsin J., Ufaq T., Tahir H. et Saadia A. 2015.** Bacterial Biofilm: its composition, formation and role in human infections. *Journal of microbiology and biotechnology*, 4: 1-14.
- **Musk D.J., Banko D.A., and Hergenrother P.J. 2005.** Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry et Biology*; 12: 789-799.

## N

- **Nagant C. 2013.** Contribution à la recherche de nouveaux agents antibactériens actifs sur les biofilms de *P. aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.
- **Nasr S.A., AbuShady H. M., Hussein H.S. 2012.** Biofilm formation and presence of ica AD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 1110-8630.
- **Nobbs, A. H., Lamount, R. J. and Jenkinson, H. 2009.** Streptococcus adherence and colonization, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, .vol 73 No. 3, pp. 407-505

## O

- **O'toole G., Kaplan HB., Kolter R. 2000.** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49-79.
- **Oli A. K., Raju S., Nagaveni S., kelmani chandrakanth R. 2012.** Biofilm formation by multidrug resistant *Enterococcus faecalis* (MDEF) originated from clinical samples. *Journal of Microbiology and biotechnology reserch.* 2(2).
- **Ophir T., Gutnick D.L. 1999.** A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (2): 740-745.

- **Otto M. (2013).** Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 64, 175-188.

## P

- **Parkar S. G., Flint S. H., and Brooks J. D. 2004.** Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 110-116.
- **Pecastaings S. 2010.** Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.
- **Poulsen L. V. 1999.** Microbial Biofilm in Food Processing. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **32**: 321-326.

## R

- **Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S. 2012.** Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medical Human and Genetic* .**13**: 269–274.
- **Rajmohan S., Dodd C., Waites W.M. 2002.** Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of applied microbiology*, n° 93, 205-213.
- **Ralyea, R. D., M. Wiedmann, and K. J. Boor. 1998.** Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. *J. Food Prot.* **61**:1336–1340.
- **Reinheimer, J. A., Demkow, M. R., and Condioti, M. C. 1990.** Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures. *Aust. J. Dairy Technol.*, **45** : 5-9.
- **Rewatkar A. R., Wadher B. J. 2013.** *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilm formation Methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. Volume 8, Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40.
- **Robleto EA., López-Hernández I., Silby MW., Levy SB. 2003.** Genetic analysis of the AdnA regulon in *Pseudomonas fluorescens*: non essential role of flagella in adhesion to sand and biofilm formation. *J Bacteriol* **185**:453-60.
- **Rossi C., Lopez C.C. 2016.** Annalisa Serio, Elisa Goffredo , Beniamino Terzo Cenci Goga , Antonello Paparella. *Italian Journal of Food Safety* .5 :5793.
- **Roux A. Et Chigo J-M. 2006.** Les biofilms bactériens. *Communication, Bull. Acad. Vêt*, 261-268.

- **Ruzicka F., Hola V., Votava M. 2004.** Biofilm detection and clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol (Praha)*;49(5):596-600.

## S

- **Sabaeifard P., Abdi-Ali A., Soudi MR., Dinarvand R.2014.** . Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method. *J Microbiol Meth* **105**:134-40.
- **SahaS, Devi KM, Damrolien S, Devi KS, Krossnunpuui, Sharma KT.2018.** Biofilm production and its correlation with antibiotic resistance pattern among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in north-east India. *Int J Adv Med ;* **5**:964-968.
- **Sakarya S., Oncu, B. Ozturk et al.2004.** Nouraminidase produces dose-dependent decrease of slime production and adherence of slime-forming, coagulase-negative staphylococci *Arch Med Res*, **35** : 275-278
- **Satorres S., Alcaráz A., 2007.** Prevalence of icaAand icaDgenes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff, *Cent Eur J Public Health*, **15** (2): 87–90
- **Saussereau E. 2013.**Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d’une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité. Thèse de doctorat d’Université Pierre et Marie Curie. Paris VI.
- **Saxena S., Banerjee G., Garg R., Singh M. 2014.** Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. **8**(5): 09-11.
- **Shah N. P. 1994.** Psychrotrophs in milk. *Milchwissenschaft* **49**:432–437.
- **SimõesM., Bennett R. N., Rosa E. A. S. 2009.** Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*. **26**: 746–757.
- **Simões M., Sillankorva S., Pereira M. O., Azeredo J., Vieira M. J. 2007.** The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonasfluorescens* biofilms. *Biofouling*. **24**: 249–258.
- **Simões M., Simões L. C., Machado I., Pereira M. O., Vieira M. J. 2006.** Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*. **84**: 338–345.

- **Simões M., Simões L.C., Vieira M.J. 2009.** Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research*, **43**: 229–237.
- **Simões M., Simões L.C., Vieira M.J. 2010.** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* **43**:573–583.
- **Sinde E., Carballo J. 2000.** Attachment of *salmonella spp* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* **17**:439–447
- **Singh P. K., Parsek M. R., Greenberg E. P., Welsh M. J. 2002.** A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* **417**:552-555.
- **Singh P.K., Schaefer A.L., Parsek M.R., Moninger T.O., Welsh M.J., Greenberg, E.P. 2000.** Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**: 762–764
- **Sorhaug T., Stepaniak L. 1997.** Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends Food Sci. Technol.* **8**:35–40.
- **Spiers A.J., Buckling A., Rainey P.B. 2000.** The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146** :2345-2350.
- **Spormann AM. 2008.** Physiology of microbes in biofilms stability of *Burkholderiacenocepacia* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* 5208- 5218
- **Srey S., Jahid I. K., Ha S. D. 2013.** Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control.* 31(2), 572-585.
- **Stoeckel M., Lidolt M., Stressler T., Fischer L., Wenning M. & Hinrichs J. 2016.** Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products. *Int. Dairy J.* 61:250
- **Stuknytė M., Decimo M., Colzani M., Silveti T., Brasca T., Cattaneo S., Aldini G De Noni I. 2016.** Extracellular thermostable proteolytic activity of the milk spoilage bacterium *Pseudomonas fluorescens* PS19 on bovine caseins. *J. Dairy Sci.* 99(6):4188-4195.
- **Sutherland I.W. 2001.** The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*, **9**: 222-227.

## T

- **Taj Y. Essa F. Aziz F. Shahana Kazmi U. 2012.** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dev. Ctries*; 5(6):403-409.
- **Talaro., Kathleen., Park. 2008.** *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, McGraw-Hill, New York.

- **Touati A., Achour W., Abbassi . 2007.** Détection des gènes ica et de la production de slime parmi des souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques, Pathologie Biologie. **55** : 277–282 .
- **Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014).** Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. Canadian Journal of Veterinary Research. **78(2)**, 110-116.

## V

- **Vanderzant C., Splittstoesser D.F (ed.). 1992.** Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, D.C.
- **Vidal D. R., Ragot C., Thibault F. 1997.** Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. Annales Pharmaceutiques Françaises. **55**: 49–54.
- **Vieira M. J., Melo L., Pinheiro M. M. 1993.** Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. Biofouling. **7**: 67–80.
- **Vu B., Chen M., Crawford R. J., Ivanova E. P. 2009.** Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation, Molecules, **14** : 2535-2554.

## W

- **Wiedmann M., Weilmeier D., Dineen S. S., Ralyea R., Boor K. J. 2000.** Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas spp.* isolated from milk. Appl. Environ. Microbiol. **66** : 2085–2095.
- **Wirtanen G., Mattila-Sandholm T. 1992.** Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. Part II. Lebensm.-Wiss. Technol. **25**: 50–54.
- **Wirthlin M. R., Chen P. K., Hoover C. I. 2005.** A laboratory model biofilm fermenter: design and initial trial on a single species biofilm. J. Periodontology. **9**: 1443–1449.
- **Wong A. C. L. 1998.** Biofilms in food processing environments. J. Dairy Sci. **81**: 2765-2770.

## X

- **Xin L., Meng Z. X., Zhang L. W., Cui Y. H., Han X., Yi H. X. 2017.** The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows milk from North China. Int. Dairy J. **66** :34–41.

## Y

- **Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. 2014.** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **78**: 110- 116.

## Z

- **Zhao Q., Liu Y. 2006.** Modification of stainless steel surfaces by electroless Ni-P and small amount of PTFE to minimize bacterial adhesion. *J. Food. Eng.* **72**: 266–272.
- **Zobell C. E. 1943.** The Effect of Solid Surfaces up on Bacterial Activity. *J. Bacteriol.*, **46**: 39-56.
- **Zottola A. E., Sasahara K. C. 1994.** Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 125-148.

# ANNEXES

---

## Annexes

### Annexe 1:

#### **Bouillon cœur-cerveille (BHIB) :**

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de coeur de boeuf.....	5.0 g
Peptone.....	10.0g
Glucose.....	2.0 g
Chlorure de sodium.....	2.0 g
Phosphatase di sodique.....	5 g

pH= 7.4

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min.

#### **Luria Bertani liquide (LB)**

Tryptone.....	10 g
Extrait de levure.....	05 g
Nacl.....	05 g
Eau distillée.....	1000 ml

#### **Bouillon TSB**

Tryptone.....	17g
Peptone papainique de Soja.....	3g
Glucose.....	2.5g
Sels biliaires.....	1.5g
Chlorure se sodium.....	5g
Phosphate dipostassique.....	4g
Novobiocine.....	0,020g
Eau distillée.....	1000ml

#### **Bouillon nutritif**

Peptone.....	10g
Extrait de leueur.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée.....	1000ml

**Le gélosé Tween 80**

Peptone .....	10 g
Chlorure de sodium .....	5g
Chlorure de calcium .....	0.1g
Agar .....	25g

**Gélose à lait écrémé**

Gélose .....	15g
Lait écrémé .....	01L

**Gélose ordinaire au jaune d'œuf**

Peptone .....	10g
Extrait de viande .....	05g
NaCl .....	05g
Agar .....	15g

10% jaune d'œuf stérile

**Milieu Rouge Congo Agar (RCA)**

BHIB .....	37 g
Saccharose .....	50 g
Agar .....	10 g
Rouge Congo .....	0.8 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH= 7,4

Stérilisation à l'autoclave : 121°C pendant 15 minutes

**Gélose nutritive :**

Peptone .....	15g
Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure .....	02g
Nacl .....	05g
Agar .....	20g
Eau distillée .....	1000ml

**Cristal violet :**

Cristal violet .....	2g
Eau distillée .....	100