

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل

M/M.P.10/16

Université Mohammed Seddik benyahia -Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de
la Vie
Département de Microbiologie Appliquée
et des Sciences Alimentaires

كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم : الميكروبيولوجيا التطبيقية
و علوم التغذية



Mémoire de fin d'études

en vue de l'obtention du diplôme: **Master Académique en Biologie**

Option : Microorganismes et pathogénicité

Thème

**Détection de la formation de biofilms par des souches de
*Staphylococcus aureus***

Membre de jury :

Présidente : M^{me}.Roula S.

Examinatrice : Dr. Ouled Haddar H.

Encadreur : Dr .Ait Meddour A

Co-encadreur : Mr.Rahmoune Y

Présenté par :

- Lakhel Hanane
- Chellat Khayra



Année universitaire : 2015-2016

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

REMERCIEMENT

Tout d'abord nous remercions Allah pour nous avoir donné la force, la patience, la volonté d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude à notre encadreur le Dr Ait Meddour Amel dont les conseils et la supervision nous ont fourni l'occasion et l'environnement propice pour effectuer cette étude. Son œil critique nous a été très précieux pour structurer ce travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de notre mémoire, nous la remercions vraiment.

Un grand Merci également à Mr Rahmoune Yazid, notre co-encadreur

Nos vifs remerciements vont à M^{me} .Roula S et Dr. Ouled Haddar H
Et à l'ensemble du personnel du laboratoire de microbiologie.

Un grand merci à nos parents qui nous ont soutenu durant toutes ses années d'étude et qui nous ont encouragé sans cesse.

Merci à tout le monde

Hanane et Khayra

LISTE DES TABLEAUX

N° du tableau	Titre	page
Tableau I	Description des prélèvements effectués à la ferme	21
Tableau II	Liste des antibiotiques testés	24
Tableau III	Résultats de l'identification des souches de <i>S. aureus</i>	29
Tableau IV	Résistance et sensibilité à quelques antibiotiques des souches de <i>S. aureus</i>	31
Tableau V	Résultats de la standardisation	32
Tableau VI	Résultats de la mesure de la DO	35
Tableau VII	Classification de l'adhésion bactérienne (formation de biofilm)	36
Tableau VIII	Comparaison entre les trois méthodes selon la température	37

LISTE DES FIGURES

N° de figures	Titre	Page
Fig. 1	Image en forme de tours d'un biofilm bactérien	2
Fig. 2	Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation de biofilms	4
Fig.3	Micrographie électronique d'un biofilm de <i>S. aureus</i> sur une surface en industrie laitière	11
Fig. 4	A : <i>S. aureus</i> vue en microscopie optique après coloration de Gram, B : <i>S. aureus</i> vue en microscopie électronique	13
Fig. 5	Illustration des différentes surfaces de prélèvement, (A) citerne de stockage réfrigérée et (B) schéma des composants d'une machine à traire	21
Fig. 6	production de slime par les souches de <i>S. aureus</i>	33
Fig. 7	Formation de biofilms par la méthode des tubes (MT)	34
Fig. 8	Photographie de l'adhésion bactérienne dans des microplaques de polystyrène de 96 puits après coloration au cristal violet, (A) : pas d'adhésion, (B) : forte adhésion, (C) : adhésion modérée et (D) : faible adhésion	36
Fig. 9	Formation de biofilms par les souches de <i>S. aureus</i> dans des microplaques en polystyrène de 96 puits estimée par la méthode « TCP »	36

Liste des abréviations

A: Absorbance

AGR: Accessory gene regulator

AHL: Acyl-homosérine lactone

AI: Auto-inducteur

AML: Amoxicilline

AMP: Ampicilline

BAP : Biofilm associated protein

BHI : Brain heart infusion

BN : Bouillon nutritif

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme
de la société française de microbiologie

Recommandations

CIP : Ciprofloxacine

CV : Cristal violet

DO: Densité optique

EPS: Exocellular polymeric substances

GN : Gélose nutritive

MT : Méthode des tubes

P.: Pseudomonas

P: Pénicilline

PBS: Phosphate buffered saline

QS : « quorum sensing »

RCA : Rouge congo agar

S : Staphylococcus

S : Streptomycine

SAR: Staphylococcal accessory regulator

Spp : Species plural

ssp : subspecies

T : Tétracycline

TIAS : Toxi-infection alimentaire

Staphylococcique

TCP : Tissue Culture Plate

TS: Tryptone -Sel

TSB-YE: Trypticase -Soy Broth-Yeast-

UFC : Unité formant colonie

VA : Vancomycine

SOMMAIRE

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

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. BIOFILMS

1. Historiques et définition	3
2. Structure et composition.....	3
3. « <i>Quorum sensing</i> ».....	4
4. Adhésion aux surfaces inertes: première étape de la formation de biofilms	5
5. Facteurs susceptibles de modifier l'adhésion microbienne	7
5.1. Facteurs liés aux microorganismes.....	7
5.2. Facteurs liés aux supports solides.....	7
5.3. Facteurs liés aux fluides environnants et à la présence de matières interférentes	8
6. Localisation et impacts des biofilms.....	8
6.1. En milieu naturel	8
6.2. En milieu médical	8
6.3. En milieu industriel	9

II. BIOFILMS INDESIRABLES

1. Biofilms « négatifs»	11
2. Exemple de bactéries formant des biofilms « négatifs »	12
3. <i>S.aureus</i>	12
3.1. Taxonomie	12

3.2 . Caractères généraux	13
3.3. Habitat.....	14
3.4. Pouvoir pathogène	14
3.4.1. Facteurs de virulence.....	14
3.4.2. Principales pathologies	14
3.4.3. Toxi-infections alimentaires.....	15
3.5. Résistance aux antibiotiques.....	15
4. Adhésion et formation de biofilms	16
5. Régulation moléculaire en biofilm	16

PARTIE PRATIQUE

I. MATERIEL ET METHODE

1. Démarche expérimentale	18
2.1. Matériels utilisés	18
2.1. Milieux de cultures et produits chimiques.....	18
2.2. Appareils.....	19

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES DE *Staphylococcus aureus*

I.INTRODUCTION.....	20
1. Sites de prélèvements.....	20
2. Techniques de prélèvements	20
2.1. A partir de lait cru de vaches	20
2.2. A partir de la machine à traire et de la citerne de stockage réfrigérée.....	20
3. Isolement et purification.....	21
3.1. A partir de lait cru de vaches	21
3.2. A partir de la machine à traire et de la citerne de stockage réfrigérée.....	22
4. Test d'identification	22
4.1. Tests de la catalase	22
4.2. Test de la coagulase.....	22
4.3. Test de la DNase.....	23
5. Antibiogramme	23

PARTIE 2
CRIBLAGE DES SOUCHES DE *S. aureus*
DETECTION DE LA FORMATION DE BIOFILMS

1. Préparation de l' <i>inoculum</i> standard	24
2. Méthode indirecte : production de «slime» sur milieu solide «rouge congo agar» (RCA).....	24
3. Méthodes directes.....	25
3.1 Méthode des tubes (MT).....	25
3.2 Méthode d'adhésion sur microplaque de polystyrène «TCP».....	25

II. RESULTATS ET DISCUSSION

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES DE *Staphylococcus aureus*

1. Isolement des souches de <i>S. aureus</i>	28
2. Identification des souches de <i>S. aureus</i>	28
3. Antibiogramme des souches de <i>S. aureus</i>	31

CRIBLAGE DES SOUCHES DE *S. Aureus*

DETECTION DE LA FORMATION DE BIOFILMS

1. Préparation de l' <i>inoculum</i> standard	32
2. Méthode indirecte : production de «slime» sur milieu solide (RCA)	33
3. Méthodes directes	34
3.1. Méthode des tubes (MT).....	34
3.2. Méthode d'adhésion sur microplaque de polystyrène «TCP» :	35

Conclusion	39
-------------------------	----

Références Bibliographiques

Annexes

Introduction

La bio-contamination des surfaces est de plus en plus souvent identifiée comme une source de problèmes industriels sévères dans des domaines très divers. En effet, ce phénomène est à l'origine d'une diminution des rendements et d'une augmentation des coûts de production dans les industries agroalimentaires notamment en raison de la corrosion des matériaux d'équipement (biocorrosion), de l'encrassement des échangeurs de chaleur ou encore du colmatage des membranes de filtration (Simões *et al.*, 2010 ; Pasvolsky *et al.*, 2014).

Les laiteries, les filières fromagères fermières sont souvent confrontées à l'adhésion des bactéries indésirables sur les surfaces des équipements (cuves, canalisations et pompes), parmi ces bactéries *Staphylococcus aureus*. Les Staphylocoques sont capables de survivre dans des conditions particulièrement difficiles (basses températures, pH acides, milieu salin...) et de développer des mécanismes d'adaptation aux agressions extérieures rencontrées. Ils peuvent alors être retrouvés sur les sites de production alimentaire ou sur les matériaux de conditionnement. Les conséquences économiques de tels phénomènes bioadhésifs sont particulièrement importantes et sont dues notamment aux pertes inhérentes à la dégradation prématurée des produits finis ainsi qu'à l'impact sanitaire associé aux toxi-infections alimentaires (Pasvolsky *et al.*, 2014). Pour ces raisons, l'éradication et/ou l'inhibition de la formation de biofilms indésirables (*S. aureus*) couplée à la maîtrise de l'hygiène des surfaces solides en contact avec les milieux biologiques est indispensable.

L'objectif fondamental de ce travail est de détecter si les souches de *S. aureus* isolées de lait cru de vaches sont capables de former des biofilms. Et de détecter également si les souches de *S. aureus* isolées des surfaces inertes sont capables de ré-adhérer et de former de nouveaux biofilms.

Pour ce faire, des souches de *S. aureus* seront isolées de lait cru de vaches et de la surface de matériel de traite et de stockage de lait. Ces dernières seront identifiées phénotypiquement, Par la suite, l'étude sera focalisée sur leur capacité d'adhésion et la formation de biofilms.

Ce manuscrit comporte deux parties :

La partie 1 consistera en une étude bibliographique portant sur une présentation des biofilms et leur diversité, où on parlera des biofilms indésirables de *S. aureus* en industrie agroalimentaire en particulier l'industrie laitière et fromagère.

La partie 2 consistera en une description des protocoles expérimentaux utilisés (matériel et méthodes) ainsi que les résultats obtenus. L'ensemble des résultats sera ensuite discuté pour aboutir à une conclusion générale et ouvrir sur de nouvelles perspectives.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre 1

1. Historiques et définition

Le biofilm représente la forme vivante de base de la plupart des microorganismes dans l'environnement, Ces derniers sont généralement définis comme des agrégats de cellules adhérents à une surface, on parle alors de communautés microbiennes sessiles. Ils sont observés dans les milieux aqueux ou exposés à l'humidité, ils peuvent se développer sur n'importe quel type de surface naturelle ou artificielle, qu'elle soit minérale (roche, interfaces air-liquide...), organique (peau, tube digestif, racines et feuilles des plantes), industrielle (canalisations, coques des navires) ou médicale (prothèses, cathéters, sondes urinaires....) (Lock, 1993 ; Costerton *et al.*, 1994 ; Dawgul *et al.*, 2014). Les microorganismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires) au sein d'un biofilm sont englobés dans une matrice généralement constituée de polymères extracellulaires (EPS) sécrétés par ces mêmes microorganismes (Branda *et al.*, 2005 ; Shakibaie *et al.*, 2014). Les EPS renferment en majorité des polysaccharides macromoléculaires et en moindre mesure des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Sutherland, 2001 ; Shakibaie *et al.*, 2014).

Bien qu'Antoni Van Leeuwenhoek ait été le premier à examiner des biofilms bactériens sur la surface de ses propres dents au XVII^{ème} siècle (1632-1723) (Donlan et Costerton, 2002), la première étude scientifique consacrée aux biofilms date de 1943 (Zobell, 1943). La prédominance du mode de vie sous forme de biofilm ne fut cependant affirmée qu'en 1978 par Costerton et son équipe proposèrent les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes (Costerton *et al.*, 1978). Depuis, un nombre croissant d'études ont été consacrées aux biofilms, aussi bien dans les domaines industriels, environnementaux que dans le domaine médical (de Chalvet de Rochemonteix, 2009).

2. Structure et composition

Les progrès en microscopie non destructive (notamment le développement de la microscopie confocale à balayage laser) ont apporté une image plus précise de l'architecture du biofilm (Costerton *et al.*, 1995 ; Allesen-Holm *et al.*, 2006). Ainsi, les bactéries peuvent former un tapis unique à la surface du support ou peuvent s'organiser en des structures tridimensionnelles plus complexes. L'image la plus courante (Fig. 1) se présente sous la forme de microcolonies s'organisant en structures piégées dans une matrice et pouvant prendre la forme de champignons ou de tours (Donlan et Costerton, 2002). Suivant les conditions environnementales, le ou les microorganismes présents et le type de support, la forme et l'épaisseur du biofilm varient considérablement (Stoodley *et al.*, 1997).

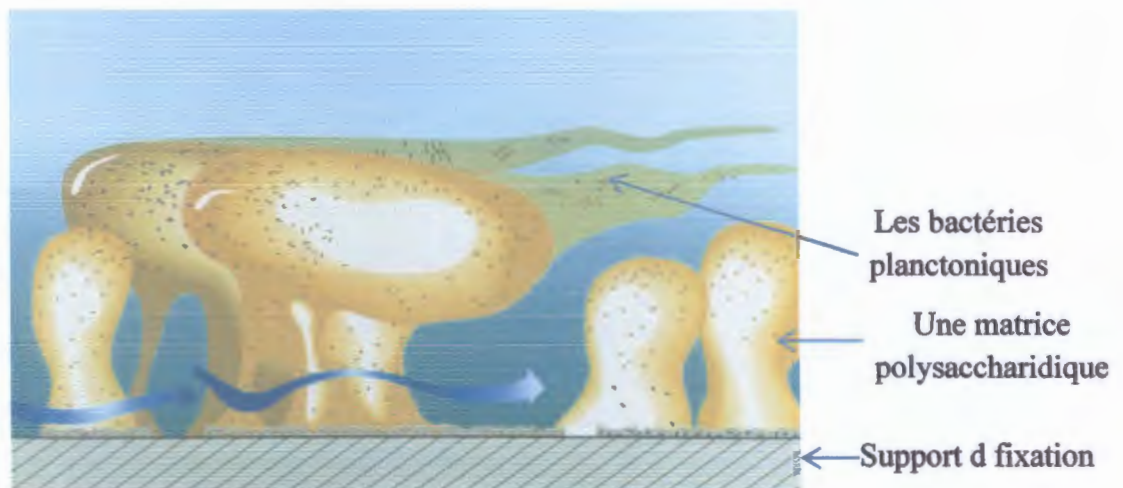


Fig.1. Image en forme de tours d'un biofilm bactérien (Donlan et Costerton, 2002).

Au sein des structures les plus complexes et les plus denses, la diffusion est faible et l'accessibilité aux nutriments et à l'oxygène est par conséquent limitée. L'existence de canaux à eau permet la distribution de ces molécules au sein d'un biofilm même si certaines régions demeurent inaccessibles, notamment les couches bactériennes les plus profondes (Stewart, 2003). Différents gradients vont ainsi être créés à l'intérieur des biofilms (gradient de pH, d'oxygène et de nutriments), confirmant l'hétérogénéité de ces structures. Dans les écosystèmes naturels, les biofilms bactériens sont pour la plupart composés de communautés microbiennes variées et très bien organisées (Stoodley *et al.*, 2002); on parle alors de biofilms plurimicrobiens ou de biofilms mixtes.

3. « *Quorum sensing* »

Le phénomène de comportement communautaire ou « *Quorum sensing* » (QS) a été décrit pour la première fois chez des bactéries marines bioluminescentes appelées *Vibrio fischeri* (Nealson, 1977). Ce mécanisme a été retrouvé aussi chez d'autres bactéries à Gram négatif telle que *Pseudomonas aeruginosa* (Whitehead *et al.*, 2001) mais également à Gram positif (Heilmann et Gotz, 2010).

La formation du biofilm est régulée par une communication de cellule à cellule fondée sur une détection de la densité cellulaire. L'amplitude du signal est fonction de la taille de la population et en fonction d'un certain seuil, le signal active un régulateur transformationnel inducteur de gènes spécifiques (mécanisme d'auto-induction).

Le mécanisme de QS commence par une signalisation par une molécule connue sous le nom d'auto-inducteur (AI) et un activateur ou régulateur de réponse (R-protéine). Dans le cas d'une faible densité de bactéries (la distance entre ces deux dernières est grande) l'auto-inducteur est produit à un niveau faible. En cas de forte densité de bactéries (la distance entre les deux dernières est alors petite)

le niveau de l'auto-inducteur augmente jusqu'à un seuil de concentration pour lequel l'auto-inducteur est capable d'activer la production des gènes cibles. Cela induit la réponse correspondante aux signaux comme par exemple la production d'EPS (Rajesh et Ravishankar Rai, 2014). Les processus commandés par QS incluent la bioluminescence, sporulation, production antibiotique et formation de biofilms (Christopfer *et al.*, 2005).

Il existe plusieurs molécules de signalisation intercellulaire chez les bactéries (Miller *et al.*, 2004):

- **Acyl homosérine lactones (AHL) ou Auto-inducteur 1 (AI-1):** Mis en évidence uniquement chez les bactéries à Gram-négatif.
- **Peptides auto-inducteurs :** Mis en évidence chez de nombreuses espèces de bactéries à Gram positif.
- **Auto-inducteur 2 (AI-2) :** Mis en évidence chez certaines bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cette molécule a été identifiée chez de nombreuses bactéries pathogènes telles que *Salmonella enterica* (Miller *et al.*, 2004) et *Escherichia coli* entérohémorragique (Vendeville *et al.*, 2005) et de souches de bactéries lactiques potentiellement probiotiques telle que *Lactobacillus rhamnosus* GG (Lebeer *et al.*, 2007).

Le QS est utilisé par les staphylocoques pour la régulation de la synthèse des facteurs de virulences, des exotoxines et la formation de biofilms (Podbielski et Kreikemeyer, 2004).

Le QS joue plusieurs rôles comme par exemple, la régulation de la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm et en prenant en compte les conditions environnementales, déterminer l'épaisseur du biofilm, réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaire. Les synergies observées au sein des biofilms constitués de différentes espèces de microorganismes sont permises grâce aux molécules intervenant dans le QS.

4. Adhésion aux surfaces inertes: première étape de la formation de biofilms

La formation d'un biofilm sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (Parot Sandrine, 2007).

Le processus de formation d'un biofilm se déroule en plusieurs étapes successives telles qu'illustrées sur la figure 2.

Pour aboutir à l'étape d'adhésion, la bactérie doit dans un premier temps approcher le support conditionné (présence de film conditionnant) par un certain nombre de facteurs tels que le mouvement brownien, la sédimentation et le transfert de masse par convection (De Almeida Cournet, 2010,

5. Facteurs susceptibles de modifier l'adhésion microbienne

5.1. Facteurs liés aux microorganismes

L'hydrophobicité joue un rôle prépondérant lors de l'adhésion. Cette propriété est liée à la composition de l'enveloppe cellulaire (Palmer *et al.*, 2007). Une hydrophobicité importante est souvent corrélée à une forte adhésion, notamment aux surfaces hydrophobes comme les plastiques par l'intermédiaire de forces d'attraction hydrophobes (Donlan, 2002). Par exemple, les *fimbriae* contiennent une forte proportion d'acides aminés hydrophobes ce qui conduit à l'établissement d'interactions hydrophobes avec un support solide (Donlan, 2002). Les acides teichoïques, composants spécifiques des bactéries à Gram positif, semblent également exercer un effet sur l'adhésion de ces bactéries. En effet, Gross *et al.* (2001) ont démontré qu'un mutant de *Staphylococcus aureus* dont les acides teichoïques ne comportent pas de D-alanine était incapable d'adhérer au polystyrène en raison de l'accroissement de la charge négative de surface par rapport à la souche sauvage.

Des protéines de surface (de nature hydrophobe), fréquemment appelées « adhésines », sont fortement impliquées dans l'adhésion aux supports (Flint *et al.*, 1997) par l'intermédiaire d'interactions spécifiques ou de la mise en place d'interactions hydrophobes. Ainsi, Cucarella *et al.* (2001) ont identifié chez *S. aureus* une protéine de paroi appelée BAP (« Biofilm Associated Protein ») et ont démontré que les bactéries produisant cette dernière adhèrent fortement à des surfaces en plastique (polystyrène) contrairement aux mutants qui en sont déficients. (Latasa *et al.*, 2006).

D'autres polymères présents à la surface des bactéries, notamment les polysaccharides sont également impliqués dans l'adhésion initiale (Atabek et Camesano, 2007). Les polymères excrétés par les bactéries (EPS) induisent quant à eux un renforcement de l'adhésion au support, la rendant irréversible (Kuchma *et al.*, 2005).

5.2. Facteurs liés aux supports solides

Pour étudier l'adhésion bactérienne sur les matériaux, il est important de prendre en compte le type de matériau, l'hydrophobicité, la rugosité de surface, les procédures de nettoyage (Boulangé-Petermann, 1996) et la présence ou non d'un film conditionnant (Fletcher et Loeb, 1979). Les matériaux, selon leur nature, présentent à leur surface des imperfections qui correspondent à des anfractuosités qui sont des endroits privilégiés pour la colonisation microbienne. Les microorganismes en se logeant dans ces imperfections peuvent alors être protégés des agressions extérieures (nettoyant-désinfectant, ultrasons) (Boulangé-Petermann, 1996). Des recherches ont démontré que l'effet de la rugosité des surfaces sur l'adhésion microbienne semble varier selon le type de surface et le type de

microorganisme. Cependant, l'effet de la rugosité sur l'adhésion microbienne n'est pas clair. Pour certains auteurs, la présence de fissures et de « micro-crevasses » augmente l'aire de contact et peut favoriser l'adhésion en protégeant les microorganismes, notamment les bactéries, des phénomènes de cisaillement hydrodynamique et des agents chimiques de désinfection (Arnold et Bailey, 2000).

5.3. Facteurs liés aux fluides environnants et à la présence de matières interférentes

Dans l'environnement naturel, des matières interférentes telles que des protéines, polysaccharides, minéraux ou des résidus de produits de nettoyage vont pouvoir s'adsorber aux interfaces solide-liquide (film conditionnant) et ainsi influencer le comportement bio-adhésif des bactéries en modifiant les propriétés physicochimiques de surface des supports solides (rugosité, hydrophobicité et charge) (van Oss, 1996 ; Beloin *et al.*, 2008). Ce film organique masque en partie ou totalement les propriétés de surface du support et augmente l'adhésion (Bradshaw *et al.*, 1997), ou au contraire la diminue (Pratt-Terpstra *et al.*, 1987). Les interactions responsables de la bio-adhésion ne se feront alors plus entre les bactéries et le support solide mais entre les bactéries et les molécules adsorbées.

6. Localisation et impacts des biofilms

Il est maintenant reconnu que le biofilm représente le mode de croissance bactérien prépondérant (Giaouris *et al.*, 2014). Dans un environnement aqueux, toutes les surfaces sont susceptibles d'être colonisées qu'elles soient biotiques (tissus vivant) ou abiotiques (surfaces inertes).

6.1. En milieu naturel

L'habitat naturel des bactéries est très varié. Elles ont colonisé aussi bien les environnements favorables à la vie que les environnements les plus inhospitaliers. Ainsi les biofilms ont été observés dans les eaux usées, les cours d'eau et les sources d'eaux chaudes (Ward *et al.*, 1998). Les végétaux représentent un habitat favorable à la formation de colonies bactériennes et des biofilms ont été détectés sur les racines au niveau de la rhizosphère (Davey et O'Toole, 2000). Dans la nature, les biofilms ont des impacts bénéfiques multiples, puisqu'ils sont responsables dans le sol du recyclage des nutriments, ils jouent un rôle important dans la production d'oxygène, dans la fixation du carbone et de l'azote mais également dans les processus de biominéralisation ou de bioremédiation. Par exemple, l'eau accumulée dans les nappes souterraines subit une épuration naturelle par l'action de biofilms lors de son passage dans le sous-sol (Banwart *et al.*, 2007).

6.2. En milieu médical

Les biofilms peuvent entraîner de sévères problèmes dans le domaine médical lorsqu'ils sont formés de bactéries pathogènes. Ces derniers se développent dans des systèmes digestifs, urinaire et respiratoire et causent de nombreuses infections chroniques, telles que l'ostéomyélite chronique, cystite chronique, la prostatite chronique et la pneumonie chronique dans les patients présentant la

fibrose kystique (**Alnasouri, 2010**). En revanche la flore commensale humaine peut être considérée comme un biofilm qui protège son hôte contre les attaques des bactéries pathogènes (**Roux et Ghigo, 2006**).

6.3. En milieu industriel

La présence de biofilms a par ailleurs un impact considérable dans l'industrie agroalimentaire (**Carpentier et Cerf, 1993**), touchant tous les secteurs : laiteries, fromageries, industries de transformation de la viande, brasseries, sucreries, etc... Tout équipement non stérilisé abrite des bactéries qui peuvent faire démarrer un processus de colonisation notamment dans les zones peu accessibles au nettoyage et à la désinfection. Un biofilm peut se mettre en place en quelques heures et permettre ainsi aux bactéries qui s'y trouvent de devenir résistantes aux agents extérieurs engendrant d'éventuelles contaminations. L'ensemble des secteurs industriels est également confronté à la biodétérioration des matériaux sur lesquels s'installent les biofilms. Ce phénomène touche notamment les métaux (on parle alors de corrosion microbienne ou biocorrosion) (**Beech et Sunner, 2004**), les polymères ou les ciments (**Fernandes, 2006**). Il entraîne des pertes économiques importantes et des problèmes écologiques de par les traitements anti-biofilms appliqués.

Chapitre II

1. Biofilms « négatifs »

Les biofilms indésirables appelés également biofilms « négatifs », formés par des bactéries pathogènes et d'altération sont très répandus dans l'industrie agroalimentaire au niveau de laquelle ils représentent un réel problème (Carpentier et Cerf, 1993), touchant tous les secteurs : laiteries, fromageries, industries de transformation de la viande, brasseries, sucreries....

En industrie laitière la formation de biofilms (Fig. 3) peut avoir lieu dans des différents sites de la chaîne de transformation du lait (Parkar *et al.*, 2004). Les équipements laitiers, principalement les tanks de stockage du lait et le système de canalisation ainsi que les pasteurisateurs et les évaporateurs sont reconnus pour être une source de contamination du lait par des bactéries nuisibles (Marchand *et al.*, 2012). Le développement de biofilms sur les équipements laitiers est très rapide (8-12 h), avec un nombre souvent supérieurs à 10^6 bactérie/cm² (Bremer *et al.*, 2009). Le risque de transfert de ces bactéries au lait qui circule dans les lactoducs est important, ce qui implique la contamination des produits laitiers et être à l'origine de l'altération de la qualité de ces produits du fait de la dégradation de certains éléments protéiques, lipidiques ou glucidiques, ou encore du fait de la production de substances indésirables. Ces altérations se traduisent par des défauts de goût, d'odeur, d'aspect et de texture. Et la diminution de leur sécurité et durée de vie provoque par la suite des pertes économiques très importantes (Bremer *et al.*, 2006).



Fig.4. Micrographie électronique d'un biofilm de *S. aureus* sur une surface en industrie laitière (<http://www.coe.montana.edu/biofilmbook>).

En raison de leur résistance au traitement thermique et aux agents antimicrobiens, les biofilms de l'environnement laitier sont difficiles à éliminer même avec des procédures de nettoyage et de désinfection (Srey *et al.*, 2013). En outre il a été montré que la ré-adhésion des bactéries à la surface des équipements du système de canalisation du lait est observée même durant le nettoyage (Le Gentil

et al., 2010). Ces biofilms sont dominés par les EPS et les résidus de lait, tels que les protéines, le phosphate et le calcium, ce qui rend leur détachement difficile (*Simões et al.*, 2010).

Il a été rapporté également que les sources principales de la contamination du lait sont habituellement les équipements utilisés dans les fermes d'exploitation laitière (machine à traire, tank, cuve...) et notamment le transport (La surface interne du camion-citerne) (*Simões et al.*, 2010) . Il a été démontré par des études réalisées sur des fermes bovines que les machines à traire hébergent des bactéries identiques à celles trouvées dans le lait. Cette transmission est liée à la formation de biofilms sur certaines parties de la machine à traire ce qui constitue alors un réservoir permanent aux bactéries qui peuvent se détacher et ensemençer le lait (*Simões et al.*, 2010)

2. Exemple de bactéries formant des biofilms « négatifs »

La formation des biofilms par des bactéries pathogènes telles que *Bacillus cereus*, *P. aeruginosa*, *Shigella spp*, *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*.....dans les environnements de transformation des aliments est devenue un sujet de préoccupation. La capacité de ces bactéries à adhérer et à coloniser les surfaces inertes tels que le polystyrène, le polypropylène, le caoutchouc, l'acier inoxydable et le verre est maintenant bien établie (*Dogan et Boor*, 2003 ; *Mariani et al.*, 2011 ; *Farrokh et al.*, 2013).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la bactérie *S. aureus* connu par sa pathogénicité et sa capacité à adhérer sur surfaces inerte dans des fermes, laiteries et fromageries.

3. *S. aureus*

3.1. Taxonomie

Les staphylocoques ont été découverts par Pasteur et Koch en 1877 à partir du pus de furoncle et d'ostéomyélite. En 1881, Ogston faisait la première étude détaillée des staphylocoques et regroupait ces bactéries dans le genre *Staphylococcus*. En 1884, Rosenbach était capable d'isoler ces bactéries et de produire une culture pure. Il décrivait *S. aureus* à cause de l'apparence jaune-orangée des colonies et montrait que *S. aureus* était responsable de furoncles et d'infections des plaies. Sur la base d'analyses des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S, le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des *Firmicutes*, à la Classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales* et à la famille des *Staphylococcaceae* (*Garrity et al.*, 2005).

Le genre *Staphylococcus* dispose de plus d'une trentaine d'espèces divisées en deux groupes selon leur aptitude à produire une coagulase. Six espèces de ce genre sont à coagulase positive *S.*

intermedius, *S. lutrae*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. aureus* ssp. *aureus* et *S. aureus* ssp. *anerobius* (Lamprell, 2003 ; Al alam, 2008).

3.2. Caractères généraux

S. aureus est une bactérie pathogène d'origine alimentaire provoquant des intoxications alimentaires dûes à l'ingestion d'aliments contaminés (Bathia et Zahoor, 2007), Il est considéré comme l'un des principaux agents responsables de toxi-infections alimentaires, liées à la sécrétion d'entérotoxines (Jorgensen *et al.*, 2005). Les espèces de *S. aureus* sont des coques à Gram positifs (Fig. 4) de 0,5 à 1,5 µm de diamètre, associées en paires, en chaînettes, en amas irréguliers ou en grappes de raisins. Plusieurs souches de *S. aureus* produisent des colonies pigmentées en jaune doré plus ou moins intense (Sutra *et al.*, 1998).

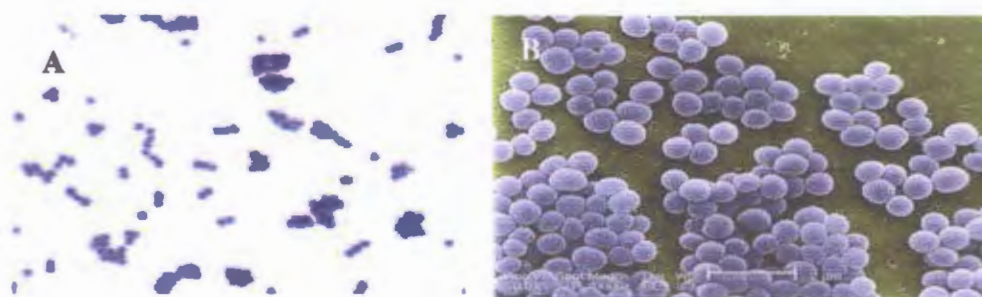


Fig.4. A : *S. aureus* vue en microscopie optique après coloration de Gram, B : *S. aureus* vue en microscopie électronique (*in* Al alam, 2008).

Les souches de *S. aureus* sont de type respiratoire anaérobie facultatif à oxydase négative et à catalase positive. Leur croissance est plus rapide et plus abondante en conditions aérobies qu'en conditions anaérobies (Sutra *et al.*, 1998). Leur température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C en fonction des souches (température minimale: entre 5 et 10°C ; température maximale : environ 45°C). La majorité des souches de *S. aureus* sont hémolytiques et produisent une ADNase ainsi qu'une coagulase qui coagule le plasma de lapin (Lamprell, 2003). Elles sont capables de se multiplier à des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 avec un pH optimal de croissance de 7 à 7,5. Elles sont halotolérantes et peuvent se multiplier en présence de concentrations élevées de chlorure de sodium (en général jusqu'à 10 %).

3.3 Habitat

Les souches de *S. aureus* sont très répandues dans la nature (air, eau et sol), ceux sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'Homme et de l'animal. Cependant, le principal réservoir de cette bactérie reste l'Homme; 15 à 40 % des adultes ont un portage nasal persistant de *S. aureus* à une densité de 10^3 à 10^4 cellules/cm², le reste de la population a un portage

intermittent. A partir des sites de portage, *S. aureus* colonise les territoires cutanés en particulier, les zones humides et les mains (Heczko *et al.*, 1981 ; Peacock *et al.*, 2001).

3.4. Pouvoir pathogène

3.4.1. Facteurs de virulence

La virulence des souches de *S. aureus* impliquées dans des infections humaines ou animales est liée à la production d'une grande variété de composés. Ces composés sont soit associés à la paroi de la bactérie (protéine A, récepteurs pour des glycoprotéines de l'hôte, polysides capsulaires), soit excrétés dans l'environnement de la bactérie (toxines, coagulase, enzymes) (Sutra *et al.*, 1998).

3.4.2. Principales pathologies

▪ Chez les animaux (mammifères)

Les principales pathologies dues à *S. aureus* en élevages sont les infections mammaires ou mammites chez les femelles en lactation (vache, brebis, chèvre). Chez la vache, les infections mammaires dues à *S. aureus* sont le plus souvent sub-cliniques et peuvent passer inaperçues, alors que chez la chèvre et la brebis, elles évoluent très souvent vers une forme gangreneuse. *S. aureus* est responsable de 20 à 40% des infections mammaires sub-cliniques chez la vache. La présence de *S. aureus* dans le lait, produit destiné à la consommation, représente un risque pour la santé humaine (Sutra *et al.*, 1998 ; Deverriere, 2007).

▪ Chez l'Homme

C'est l'agent pathogène le plus fréquemment rencontré dans les infections nosocomiales et suppuratives superficielles cutané-muqueuses telles que les folliculites, les furoncles, les impétigos, les sinusites et les otites. Il est responsable de septicémies à l'origine de localisations viscérales pleuro-pulmonaires (abcès bulleux), cardiaques (endocardites aiguës), ostéo-articulaires (ostéomyélites) ou urinaires (phlegmon périnéphrétique), de toxémies qui regroupent le syndrome de la peau ébouillantée (maladie de Ritter du nouveau-né), le syndrome du choc toxique et les intoxications alimentaires (Vincenot *et al.*, 2008).

3.4.3. Toxi-infections alimentaires

Une toxi-infection alimentaire staphylococcique (TIAS), est plutôt une intoxication due à l'ingestion d'une ou de plusieurs entérotoxines produites dans un aliment contaminé par un

staphylocoque (Kérouanton *et al.*, 2007). La dose infectieuse d'entérotoxine staphylococcique est d'environ 1ng/g d'aliment, ce taux est atteint lorsque la population de *S. aureus* excède les 10^5 cellules/g. Cependant, les entérotoxines seraient détectables même à un niveau de *S. aureus* faible (10^3 cellules/g) (Lamprell, 2003). La concentration d'entérotoxine A requise pour provoquer une TIAS chez l'être humain est de 200 ng/kg. SEB est également très toxique, une dose de 0,4µg/kg est susceptible de provoquer un choc toxique chez l'Homme (Bhunja, 2008). Les syndromes typiques associés aux TIAS apparaissent généralement 2 à 6 heures après ingestion et se traduisent par des vomissements avec ou sans diarrhées, crampes abdominales, généralement pas de fièvre quelque fois une légère hyperthermie ou bien au contraire une hypothermie. Des complications peuvent survenir en fonction de la dose de l'entérotoxine ou bien de la sensibilité de l'individu et de son état de santé : déshydratation, irritations musculaires, hypotension et état de choc. Cependant la mortalité est très rare et n'atteint que les individus sensibles aux méfaits de la déshydratation (Zang et Stewart, 2001 ; Jay et Loessner, 2005).

Au Brésil, en 1999 ont eu lieu deux épidémies d'intoxication alimentaire touchant au total 378 personnes qui avaient consommé dans un cas du fromage au lait cru, dans l'autre du lait cru. L'analyse du fromage et du lait cru a montré qu'ils contenaient *S. aureus* dans des quantités allant de $2,4.10^3$ à 2.10^8 UFC/g et qu'il y avait eu production d'entérotoxines A, B et C. Les entérotoxines spécifiques détectées supposaient que la source de contamination venait des manipulateurs de ces produits (Simeao do carmo, 2002).

3.5. Résistance aux antibiotiques

S. aureus a développé des résistances quasiment à tous les antibiotiques. Les mécanismes impliqués comprennent la synthèse d'enzymes inactivatrices, la modification de la cible des antibiotiques et des systèmes d'efflux qui diminuent la concentration de l'antibiotique dans la bactérie (Corne, 2004). La résistance des staphylocoques à coagulase négative est comparable à celle observée chez *S. aureus*. Leurs fréquences de résistances peuvent même parfois être plus élevées notamment chez *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*, fréquemment responsables d'infections nosocomiales (Jidar, 2007).

4. Adhésion et formation de biofilms

L'adhésion initiale de *S. aureus* nécessite des interactions physicochimiques non covalentes de type interactions hydrophobes, les forces de Van-Der-Waals et de possible interactions électrostatiques (Otto, 2004). Parmi les molécules impliquées dans l'adhésion aux surfaces inertes on retrouve :

- l'autolisine Atl E (Planchon, 2006).
- l'acide téchoiques (Otto, 2004).

- Les protéines de surface SSP-1 (280 kDa) et SSP-2 (250 kDa)
- La protéine Biofilm Associated Protein (BAP) contribue à la formation de biofilm de *S. aureus* (Cucarella et al, 2001).

5. Régulation moléculaire en biofilm

La différenciation des cellules planctoniques en biofilm et la production d'exopolysaccharides sont dépendantes de l'activation de réseaux régulateurs complexes en réponse aux signaux du «*quorum-sensing*» et/ou aux facteurs de stress environnementaux. Chez les staphylocoques, les systèmes régulateurs sont gouvernés principalement par:

- L'opéron « accessory gene regulator » (*agr*),
- L'opéron « staphylococcal accessory regulator » (*sar*).

Ces systèmes sont dit « accessoires » car ils ne sont pas essentiels à la croissance mais ils sont activés à certaines phases de la croissance cellulaire ou lors de certaines conditions environnementales. Des régulateurs additionnels permettent aux microorganismes de répondre aux signaux environnementaux, ce sont des systèmes à deux composantes qui sont au nombre de 17 chez *S. aureus* (Toledo-Arana et al., 2005).

Matériels et Méthodes

Parti 1 : Matériel

1. Démarche expérimentale

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Jijel, dans la période du mois d'avril-Juin 2016.

Le but de ce travail s'articule autour des points suivants :

- Isolement des souches de *S. aureus* à partir de lait cru de vaches et de matériel de traite et de stockage réfrigéré utilisés dans des fermes d'exploitation laitière,
- Identifications phénotypiques et biochimiques des souches de *S. aureus* isolées,
- Détection de la capacité des souches isolées à former des biofilms par :
 - **Méthode indirecte** : production d'un «slime» sur milieu solide « rouge congo agar » ou « RCA» telle que décrit par **Freeman et al. (1989)** et **Mariana et al. (2009)**.
 - **Méthodes directes** :
 - ✓ Méthodes des tubes (MT), qui est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par **Christensen et al. (1982)**.
 - ✓ Méthode d'adhésion sur microplaque de polystyrène «Tissue Culture Plate», «TCP», décrite par **O'Toole et al. (1999)**. Cette technique permet une évaluation semi-quantitative de la formation du biofilm.

2. Matériels utilisés

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales on s'est servi du matériel suivant :

2.1. Milieux de cultures et produits chimiques

-Géloses et bouillons de cultures

- Gélose Chapman, (Institut Pasteur)
- Gélose Nutritive (GN), (Institut Pasteur)
- Gélose Rouge Congo Agar « RCA»,(prepare au laboratories)
- Gélose Mueller Hinton, (Institut Pasteur)
- Gélose ADNase, (Institut Pasteur)

- Bouillon Nutritif (BN), (Institut Pasteur)
- Bouillon Giollitti et Cantoni, (Institut Pasteur)
- Bouillon BHIB (coeur cervelle), (Institut Pasteur)
- Bouillon Trypticase Soja enrichi avec 0,6 % d'extrait de levure (TSB-YE). (Institut Pasteur)

-Tampons

- Eau physiologique stérile,
- PBS (Phosphate buffered saline)
- Solution TS

-Produits chimiques et réactifs

- **Colorants** : violet de gentiane, fuchine, lugol, alcool et le cristal violet à 0.1%.
- **Produits chimiques** : éthanol à 95% et le H₂O₂.

2.2. Appareils

- Autoclave (PBIBRAND),
- Bain marie (GERHARDT),
- Balance (KARN440-35A),
- Compteur de colonies,
- Etuves 25, 30 et 37C° (MEMMERT).
- Microplaques de 96 puits en polystyrène (Nunc®, polystyrène, France),
- Microscope optique (OLYMPUS),
- Micropipettes (MICROLIT),
- Spectrophotomètre (JENWAY),
- Plaque chauffante (VELP scientifica).

Partie1 : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES DE *Staphylococcus aureus* :

1. Sites de prélèvements

Des souches de *S. aureus* sont isolées au cours de cette étude à partir de lait cru de vaches (saines) dans une ferme de la Wilaya de Jijel et à partir de biofilms bactériens naturels formés sur le matériel de traite (machine à traire), et de stockage réfrigéré (citerne) dans deux fermes d'exploitation laitière (Bejaia et Bordj Bou Arreridj).

1. Techniques de prélèvements

1.1. A partir de lait cru de vaches

Deux échantillons de lait cru de vaches sont aseptiquement collectés. Ces derniers sont immédiatement transportés dans une glacière au laboratoire.

2.2. A partir de la machine à traire et de la citerne de stockage réfrigérée

Trois techniques de prélèvements à partir des surfaces internes de matériel de traite et de stockage sont utilisées tel que décrit ci-dessous et dans le tableau I :

□ **Circulation d'un liquide** : on fait circuler dans la machine à traire (Fig. 5) 150 ml d'une solution de TS (Tryptone 0,1% [m/v], NaCl 0,9% [m/v]) stérile. La machine est constituée de matériaux divers : caoutchouc, acier inoxydable et plastique. Cette technique permet de récupérer une partie de la flore qui se décroche du biofilm au cours de la circulation du TS sous pression (**Laithier et al., 2005**).

□ **Rinçage** : un rinçage du bocal de réception de lait (en acier inoxydable) est effectué en utilisant 300 ml de TS stérile et sous agitation vigoureuse. Un volume de 150 ml du liquide de rinçage est ensuite récupéré dans des flacons stériles de 250 ml.

□ **Prélèvement par écouvillonnage** : à l'aide d'écouvillons stériles, des prélèvements sont effectués en divers points de la machine à traire (manchon) et de la citerne de stockage du lait. Les écouvillons sont par la suite immergés dans des flacons de 250 ml contenant 150 ml de TS stérile.

Tableau I. Description des prélèvements effectués à la ferme

Site de prélèvement	Nombre d'échantillons prélevés
Machine à traire	Manchon : 2 échantillons prélevés par écouvillonnage
	Tuyau long à lait : 2 échantillons prélevés par circulation d'une solution de TS
	Bocal de réception du lait : 2 échantillons prélevés par rinçage
Citerne de stockage réfrigérée	1 échantillon prélevé par écouvillonnage
Total	7 échantillons

NB : les sept échantillons prélevés sont immédiatement transportés dans une glacière au laboratoire.

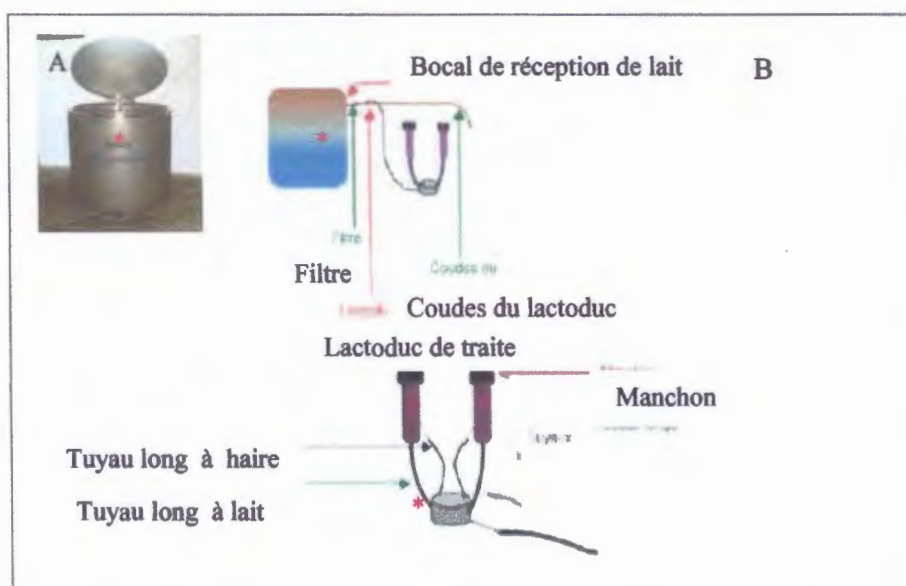


Fig. 5. Illustration des différentes surfaces de prélèvement, (A) citerne de stockage réfrigérée et (B) schéma des composants d'une machine à traire. Les sites de prélèvement sont indiqués par un astérisque (*) (Cahier fermier, 2005).

3. Isolement et purification

3.1. A partir de lait cru de vaches

1 ml d'échantillon de lait estensemencé dans des tubes contenant 9 ml de milieu Giolitti et Cantoni additionné de tellurite de potassium, puis les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 h. Après noircissement du bouillon, un ensemencement par stries sur la gélose Chapman est réalisé. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h.

Après incubation, les colonies sont sélectionnées sur la base de leur caractères cultureux (couleur jaune doré, bords réguliers, bombées, luisantes et un diamètre de 1 à 3 mm) (Sutra *et al.*, 1998). 3 colonies caractéristiques sont prélevées de chaque boîte et purifiées. La purification est effectuée par 4 repiquages successifs sur géloses Chapman avec vérification de la pureté des souches après chaque repiquage en effectuant une coloration de Gram et un test de la catalase.

3.2. A partir de la machine à traire et de la citerne de stockage réfrigérée

0,1 ml de chaque échantillon estensemencé en surface sur la gélose Chapman. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, les colonies sont sélectionnées sur la base de leurs caractères cultureux (couleur, forme et aspect). La purification est réalisée comme indiquée dans le paragraphe précédent.

4. Test d'identification

L'identification des souches de *S. aureus* est réalisée par l'utilisation de 4 tests principaux : étude microscopique, test de la catalase, test de la coagulase et test de la DNase.

4.1. Etude microscopique

L'observation microscopique permet une étude de la forme, de l'arrangement et de la couleur des cellules bactériennes par la technique de coloration de Gram.

4.2. Tests de la catalase

La catalase permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par la souche, sa recherche consiste à mettre en contact une colonie en présence d'eau oxygénée. La présence d'une catalase se traduit en quelques secondes par la formation de bulles gazeuses (Joffin *et al.*, 2016).

4.3. Test de la coagulase

A partir des colonies caractéristiques sur gélose Chapman un ensemencement d'un bouillon BHI (coeur cerveau) est réalisé puis incubation à 37°C pendant 24 h. 0,5 ml de plasma humain sont répartis dans des tubes à hémolyse stériles, puis 0,5 ml de chaque bouillon BHI présentant un trouble sont stérilement ajoutés. Les tubes sont mélangés au vortex puis incubés à 37°C. L'observation se fait toutes les heures pendant 8 heures puis au bout de 24 h. Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum (Guiraud et Rosec, 2004).

4.4. Test de l'ADNase

A partir des colonies caractéristiques sur gélose Chapman, une gélose à ADN est ensemencée par strie centrale, puis les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h. La révélation de l'activité se fait en vaporisant à la surface de la gélose une solution d'acide chlorhydrique (HCl 1N). L'apparition d'une zone claire autour de la strie indique la présence d'une ADNase (Guiraud et Rosec, 2004).

5. Antibiogramme

Après ensemencement et incubation pendant 24 h à 37°C sur gélose nutritive, 2 colonies identiques de chaque culture de *S. aureus* (S1, S2, S3, S4, S5 et S6) sont utilisées pour préparer des suspensions bactériennes dans 5 ml d'eau physiologique (concentration de 10^8 UFC/ml à l'échelle de Mc Farland). Après homogénéisation de la suspension bactérienne au vortex, une dilution à 10^{-1} est effectuée, pour avoir 10^7 UFC/ml.

Selon CA-SFM, (2010) :

- Un écouvillon stérile est trempé dans chaque suspension bactérienne à 10^7 UFC/ml
- L'écouvillon est essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Sur une boîte de Pétri présentant 4 mm d'épaisseur de gélose Mueller Hinton, l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface de la gélose de haut en bas et en stries serrées
- L'opération est répétée trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Les disques d'antibiotiques (tableau II) sont déposés sur la gélose Mueller Hinton incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Après incubation, on mesure à l'aide d'un pied à coulisse les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques.

Tableau II. Liste des antibiotiques testés

Antibiotique	Famille	Charge du disque (µg)
Ampicilline (AMP)	β-lactamines	10
Pénicilline G (P)		10 UI
Oxacilline (OX)		5
Amoxicillin(AML)	β-lactamines	25
Ciprofloxacine(CIP)	Quinolones	5
Vancomycine(VA)	Glycopeptids	30
Tetracycline(TE)	Tetracyclins	30
Streptomycine(S)	Aminosids	50

UI. Unité Internationale

Partie2 : CRIBLAGE DES SOUCHES DE *S. aureus* DETECTION DE LA FORMATION DE BIOFILMS

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détection de la capacité de formation de biofilms: méthode des tubes (MT), production d'un «slime» sur milieu solide « rouge congo agar » ou « RCA» et l'adhésion sur microplaques de polystyrène «Tissue Culture Plates» ou «TCP» (Oliveira et Cunha, 2010).

1. Préparation de l'inoculum standard

Après ensemencement sur gélose Chapman et incubation pendant 24 h à 37°C, une colonie identique de chaque culture est repiquée dans 9 ml de bouillon nutritif. Au bout de 18 h d'incubation, une série de dilutions décimales allant jusqu'à 10⁻⁹ est effectuée et les dilutions 10⁻⁶-10⁻⁹ sont ensemencées sur gélose nutritive à raison de trois boites par dilution, puis incubées pendant 24 h à 37°C. Au terme de la période d'incubation, les colonies sont dénombrées en utilisant un compteur de colonies.

1. Méthode indirecte : production de «slime» sur milieu solide «rouge congo agar» (RCA)

La capacité des bactéries à produire un «slime», un polysaccharide formant une couche diffuse facilement détachable de la paroi bactérienne est testée sur milieu solide au rouge congo modifié (52 g de la gélose BHI, 25 g de glucose, 25 g de saccharose, 0,8 g de rouge congo et 1000 ml d'eau distillée) (Freeman *et al.*, 1989 ; Mariana *et al.*, 2009). Le rouge congo a été préparé séparément en solution et autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. Cette solution est ajoutée ensuite aux autres constituants du milieu (en surfusion à 55°C).

Le milieu de culture est ensemencé par stries avec des cultures de *S. aureus* (10^6 UFC/ml). La lecture des résultats est effectuée après 48 h d'incubation respectivement à 37°C en examinant l'aspect des colonies. Les bactéries possédant une forte production de "slime" donnent des colonies noires avec un anneau clair au centre, par contre les bactéries possédant une faible production donnent des colonies marrons parfois avec un brunissement occasionnel au centre (Mathur *et al.*, 2006).

3. Méthodes directes

3.1. Méthode des tubes (MT)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par Christensen *et al.* (1982). 5 ml de suspensions bactériennes de souches de *S. aureus* (10^6 UFC/ml) préparées dans du bouillon Trypticase-Soja enrichi avec 0,6% d'extrait de levure (TSB-YE) sont mis dans des tubes en polystyrène (tubes à hémolyse) et incubés à 37°C pendant 24 h. Du bouillon TSB-YE stérile est inclus en tant que témoin négatif. Au bout de la période d'incubation, les tubes sont lavés trois fois avec du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,3) puis laissés à sécher dans une position renversée. Après séchage des tubes, une coloration avec une solution de cristal violet (0,1%, m/v ; Sigma-Aldrich, France) est effectuée (5 ml). Le colorant non lié est éliminé par 3 rinçages successifs avec de l'eau distillée. Les tubes sont laissés à sécher. La formation d'un biofilm est considérée positive si le colorant reste fixé aux parois internes des tubes et elle est classée en trois catégories :

- forte (couleur violet foncé),
- modérée (couleur violet clair),
- faible (couleur violet très clair).

La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation d'un biofilm (Mathur *et al.*, 2006). Toute couleur identique au témoin négatif (TSB-YE stérile) est indicatrice d'une absence d'adhésion.

3.2. Méthode d'adhésion sur microplaque de polystyrène «Tissue Culture Plates», «TCP»

La formation de biofilms en microplaques de polystyrène est mise au point selon le protocole d'O'Toole *et al.* (1999) avec quelques modifications. Cette technique permet une évaluation semi-quantitative de la formation du biofilm.

A partir de cultures de 18 h, des suspensions bactériennes de *S. aureus* (10^6 UFC/ml) sont préparées dans 5 ml de TSB-YE. 100 µl de chaque suspension sont utilisés pour inoculer les puits d'une microplaque à fond plat de 96 puits (Nunc®, polystyrène, France); les différents dépôts sont effectués par colonne à l'aide d'une micropipette, les microplaques sont incubées à différentes températures (25, 30 et 37°C) pendant 48 h. Par la suite, les cellules non adhérentes sont éliminées par rinçage trois fois avec de l'eau distillée stérile. Les biofilms sont colorés par l'ajout de 150 µl d'une

I. TECHNIQUES ET METHODES EXPERIMENTALES

solution de cristal violet à 0,1% (m/v), les microplaques sont laissées pendant 30 min à température ambiante et le colorant non lié est éliminé par 3 rinçages successifs avec de l'eau distillée stérile puis les microplaques sont séchées pendant 10 min à 45°C. Le cristal violet est solubilisé par addition de 200 µl d'éthanol à 95% sous agitation pendant 30 min. Un volume de 1,5 ml est transféré dans des cuves et l'absorbance à 570 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Du bouillon TSB-YE stérile est inclus en tant que témoin négatif.

Résultats et discussion

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES DE *Staphylococcus aureus*

I. Introduction :

Le lait constitue un milieu favorable à la croissance de plusieurs espèces de microorganismes dont certains sont pathogènes et peuvent être à l'origine de plusieurs maladies et intoxications humaines ; L'objectif de ce travail consiste à déterminer la détection de la formation de biofilms par *S.aureus* dans le lait cru dans la région de Jijel et aussi dans le matériel de collecte, traite, stockage sur la qualité de lait produite dans la région de Bejaia et Bourj Bouaririj.

1. Isolement des souches de *S. aureus*






Au cours de cette étude qui s'est déroulée durant la période allant d'Avril à Juin 2016, nous avons fait des prélèvements à partir des échantillons de lait cru de vaches, de la surface interne de matériel de traite (machine à traire) et de stockage (citerne réfrigérée) de lait. Les souches de staphylocoques isolées à partir des échantillons de lait cru de vaches ayant donné une coloration noire du milieu de Giolitti Cantoni ont été purifiées sur gélose Chapman et les souches fermentant le mannitol et formant des colonies jaune-doré ont été retenues pour des tests d'identification. Les souches isolées à partir de la surface interne des équipements laitiers ont été également purifiées sur gélose Chapman et celles ayant donné des colonies jaune-doré ont été retenues pour des tests d'identification.



2. Identification des souches de *S. aureus*

En se référant aux données de **Guiraud et Rosec (2004)**. Les résultats de l'identification des souches isolées obtenus ont été rapportés dans le tableau III.

Tableau III. Résultats de l'identification des souches de *S. aureus*

Test effectué	Caractères recherchés	Résultats	Illustration
Culture sur milieu Chapman	Fermentation du Mannitol	Colonies jaunes dorées entourées d'une auréole jaune (mannitol +)	
Coloration de Gram	Aspect des cellules et type de paroi	Cocci à Gram positif disposés en amas	
Test de la catalase	Présence d'une Catalase	Apparition d'une Effervescence	
Test de l'ADNase	Présence d'une ADNase	Après pulvérisation de HCl 1N sur la gélose à ADN, les stries apparaissent entourées de zones claires	
Test de coagulase	Présence d'une Coagulase	Coagulation du plasma	

Les tests d'identification ont permis l'obtention de 6 souches de *S. aureus* [3 souches isolées de lait cru de vaches (S1, S2 et S3), 2 souches isolées de la machine à traire (S4 et S5) et 1 souche isolée de la citerne de stockage réfrigérée (S6)].

Dans ce contexte, il a été rapporté dans une étude réalisée à Alger, qui a porté sur 69 vaches laitières appartenant à 22 élevages distincts que les analyses bactériologiques des échantillons de lait cru ont montré la présence de coques à Gram positif, notamment des staphylocoques à

coagulase positive (7%), des staphylocoques à coagulase négative (1%) et des streptocoques (7%) (Boulbina *et al.*, 2009).






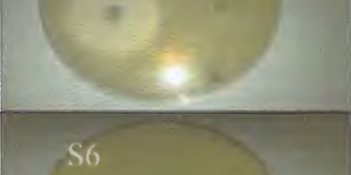
Les études publiées sur la diversité des biofilms sur les équipements laitiers dans des fermes d'exploitations laitières sont peu nombreuses. Selon Lefrileux et Le Mens (2004), Laithier *et al.* (2005) et Michel (2005), la flore microbienne présente sur la surface des équipements laitiers dans les ateliers fermiers est constituée généralement d'une flore pathogène et d'altération à Gram positif (exemple : staphylocoques à coagulase positive). Scheldeman *et al.* (2005) ont rapporté qu'une partie importante des biofilms formés à l'intérieur des citernes (acier inoxydable) à lait réfrigérés (5-10°C) dans les fermes laitières est constituée d'une flore pathogène et mésophile telle que *S. aureus*. Aneur *et al.* (2011) ont rapporté que des biofilms indésirables dont ceux formés par *S. aureus* sont présents sur le matériel en contact avec le lait (machine à traire, citerne de stockage réfrigérée, bidon en acier inoxydable et bidon en aluminium) dans une ferme laitière à Freha (Wilaya de Tizi Ouzou, Algérie).

D'autre part, une étude réalisée en Franche-Comté (France) sur 16 fermes bovines a permis de mettre en évidence la présence de souches identiques dans les laits crus et dans les manchons de la machine à traire ayant servi à la traite (Bouton *et al.*, 2007). Cette transmission est liée à une formation de biofilms sur certaines parties de la machine à traire. Ceux-ci constituent alors un réservoir permanent de microorganismes qui peuvent se détacher et contaminer le lait. Par conséquent, Laithier *et al.* (2005) se sont intéressés à la diversité des microorganismes rencontrés à différents niveaux de la machine à traire. Ils ont remarqué que la composition microbienne des biofilms varie selon leur localisation au niveau des manchons, du bocal de réception du lait, du lactoduc ou de la vanne de la citerne de stockage et selon la nature de leurs matériaux (caoutchouc, verre...). Les zones peu accessibles au nettoyage comme par exemple la vanne de la citerne de stockage de lait renferment des biofilms dont les niveaux en flores pathogènes et d'altération sont élevés (*S. aureus*, *E. coli.*). En revanche, les bords de réception de lait (en verre) sont peu chargés en ces flores (Laithier *et al.*, 2005).

3. Antibiogramme des souches de *S. aureus* :

Le profil de résistance des souches de *S. aureus* a été déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton. Les résultats des antibiogrammes des souches identifiées sont représentés dans le tableau IV.

Tableau IV. Résistance et sensibilité à quelques antibiotiques des souches de *S. aureus*

Antibiotiques / Souches	AML	AMP	CIP	P	VA	TE	S
 S1	R	/	S	R	S	R	/
 S2	S	/	S	R	S	S	/
 S3	S	/	S	S	S	/	/
 S4	R	R	S	R	R	R	S
 S5	R	R	S	R	R	R	R
 S6	R	R	S	R	R	S	S

S: sensible, R: résistant et / : pas de test réalisé.

Selon l'étude qui réalisée par **Bonnet et al. (2009)** qui montre que le souche de référence est sensibles au ces antibiotiques testés, à partir cette étude en interprétant ces résultats de l'antibiogramme.

La souche S1 est résistante à l'AML, à la P et à la TE, et sensible à la CIP et à la VA. La souche S2 est résistante à la P et sensible aux antibiotiques suivants : AML, CIP ,VA et TE. La souche S3 est sensible aux antibiotiques suivant : AML, P, VA et CIP. La souche S4 est résistante à l'AML, à l'AMP, à la P, à la VA et à la TE et sensible à la CIP et à la S. La souche S5 est résistante aux antibiotiques suivants : AML, AMP,S, P, VA et TE et elle a présenté une sensibilité à la CIP . La souche S6 a présenté une résistance à l'AML, à l'AMP, à la P et à la VA et une sensibilité à la CIP, à la TE et à la S. La figure 6 présente quelques diamètres de zones d'inhibition enregistrées par les souches de *S. aureus*.

Selon *Auajjar et al., (2006)* qui montre après ces études que les *Staphylococcus aureus* sont naturellement sensibles au différents antibiotiques on concluons que les six souches de *S. aureus* isolées ont montré une résistance importante aux antibiotiques testés. toutes les souches testées ont développé une résistance acquise à la pénicilline à l'exception de la souche S3. De plus, il été noté qu'une résistance acquise également a été développée par les souches S1, S4, S5 et S6 vis-à-vis de l'amoxicilline. Cette résistance acquise a été développée aussi vis-à-vis de l'ampicilline et la vancomycine par les souches S4, S5 et S6. De même pour les souches de S1, S4 et S5 vis-à-vis de la tétracycline.

CRIBLAGE DES SOUCHES DE *S. aureus*

DETECTION DE LA FORMATION DE BIOFILMS

1. Préparation de l'inoculum standard

Afin de pouvoir comparer entre les souches de *S. aureus* identifiées pour la production de biofilms, il fallait choisir un *inoculum* fixe. Pour cela, une standardisation des *inocula* s'avère indispensable. Les résultats de la standardisation de ces souches sont présentés dans le tableau V.

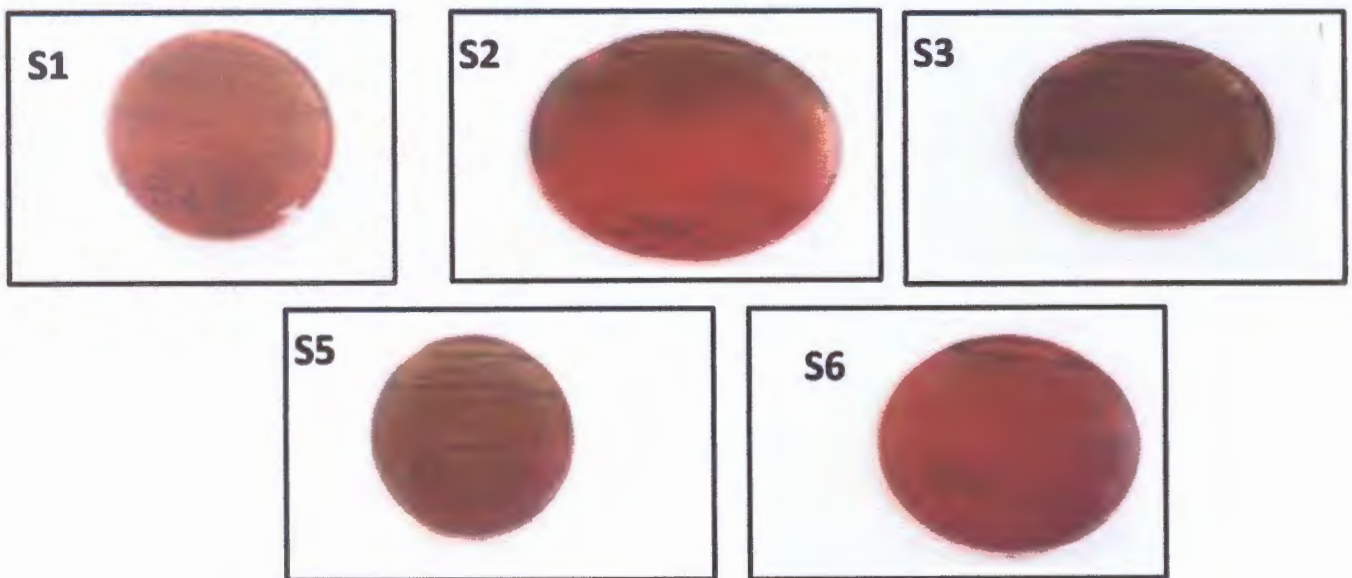
Tableau V. Résultats de la standardisation

Souches	Nombre en UFC/ml
S1	3,1X10 ⁹
S2	2,1X10 ⁹
S3	3,3X10 ⁹
S4	3,1 X10 ⁹
S5	1,9 X10 ⁹
S6	3,2 X10 ⁹

2. Méthode indirecte : production de «slime» sur milieu solide «rouge congo agar» (RCA)

L'étude de la formation d'un « slime » par les souches de *S. aureus* a été réalisée en utilisant de la gélose rouge congo agar. Le colorant rouge congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime et donnent des colonies noires sur milieu CRA contrairement aux colonies non productrices. Selon **Mathur et al. (2006)** la couleur marron des colonies indique une production faible de « slime ». Les résultats de cette étude sont présentés sur la figure 6.

- Les souches S1, S2, S3, S5 et S6 présentent une forte production de slime (colonies noires).



- La souche S4 présente une faible production de slime (colonies marrons)



Fig.6. production de slime par les souches de *S. aureus*

De nombreuses bactéries à Gram positif ou négatif possèdent une couche d'exopolysaccharides plus ou moins épaisse et visqueuse recouvrant la face extérieure de la paroi, couche dont la composante de base est le poly- β , 6-*N*-acetyl-D-glucosamine (PGA) (**Robert et al., 2007**). Ces polysaccharides sont soit attachés à la paroi par des liaisons covalentes ou par des interactions fortes

en tant que polysaccharides capsulaires (PSC) soit forment une couche diffuse facilement détachable de la surface et se trouvent par la suite dans le milieu extracellulaire en tant que polysaccharides de « slime » (PSS) (Yang *et al.*, 2010).

La production de PSS par les bactéries pathogènes a été également rapportée par plusieurs auteurs. Exemple : *S. aureus* et *S. epidermidis* (Christensen *et al.*, 1985 ; Gara et Humphreys, 2001 ; Nayak *et al.*, 2011). Selon ces auteurs, les PSS produits représentent un facteur de virulence impliqué dans la colonisation des surfaces biotiques et abiotiques en formant des biofilms.

3. Méthodes directes

3.1. Méthode des tubes (MT)

La détection de la formation d'un biofilm par cette méthode est considérée comme positive quand un film visible recouvre la paroi et le bas du tube (Christensen *et al.*, 1982). Sur la base de l'intensité de coloration au cristal violet et en comparaison au témoin négatif, les résultats de ce test ont montré que les souches de *S. aureus* ont présenté une production positive traduite par l'apparition d'une couleur pourpre recouvrant la paroi interne des tubes.

La souche S1 a présenté une forte production de biofilms, les souches S2, S4, S5 et S6 ont présenté une production modérée par contre la souche S3 a présenté une production faible. Les résultats de ce test sont présentés sur la figure 8.



Fig 7 .Formation de biofilms par la méthode des tubes (MT)

Plusieurs auteurs ont rapporté que la discrimination entre les souches productrices de biofilms par la MT est difficile et ceci serait dû à la différence d'appréciation des résultats par les observateurs aboutissant à des classifications différentes des biofilms (fort/modéré, modéré/faible et

faible/pas de biofilms). Plusieurs auteurs confirment également que la « TCP » est supérieure à la MT en terme de fiabilité (Passerini de Rossi *et al.*, 2007).

1.2. Méthode d'adhésion sur microplaque de polystyrène «Tissue Culture Plates», «TCP»

La méthode « TCP » est une technique très utilisée pour l'étude de la formation de biofilms. C'est une technique colorimétrique basée sur le principe que le cristal violet se lie de manière proportionnelle à la biomasse du biofilm (Niu et Gilbert, 2004). La coloration permet de visualiser les cellules bactériennes qui s'attachent à la surface et se colorent en pourpre avec le cristal violet (les surfaces abiotiques ne se colorent pas ou très légèrement) (Pratt et Kolter, 1998). La méthode « TCP » permet également une évaluation semi-quantitative de la formation de biofilms.

Dans cette étude, la détection de la formation de biofilms par les souches de *S. aureus* a été réalisée par cette technique en utilisant des microplaques en polystyrène de 96 puits à fond plat sous des conditions bien définies, à savoir : un *inoculum* de 10^6 UFC/ml, un milieu de croissance TSB-YE et une incubation de 48 h à 25, 30 et à 37°C. Du TSB-YE a été inclus en tant que témoin négatif.

Les valeurs de l'absorbance à 570 nm (A_{570}) après incubation à différentes températures et coloration au cristal violet sont considérées comme un indice de l'adhésion bactérienne à la surface interne des microplaques et la capacité des bactéries à former des biofilms qui influencé par l'effet de la température (Tableau VI).

Tableau VI. Résultats de la DO :

Souches A à T=	S1	S2	S3	S4	S5	S6	T(-)
25°C	+1	+1	0.109	0.195	0.217	0.14	0.07
30°C	+1	+1	0.108	0.154	0.181	0.14	0.07
37°C	+1	+1	0.064	0.14	0.131	0.064	0.07

Les résultats sont présentés sur la figure 9. Les souches de *S. aureus* sont classées dans quatre catégories: non-adhérentes (pas de production de biofilms), faiblement adhérentes (faible production de biofilms), moyennement adhérentes (production moyenne ou modérée de biofilms) et fortement adhérentes (production forte de biofilms) suivant la méthode adoptée par Mathur *et al.* (2006) tel qu'indiqué dans le tableau VII.

Tableau VII. Classification de l'adhésion bactérienne (formation de biofilm) (Selon Mathur *et al.*, 2006).

Valeur de l' A_{570}	Adhésion	Formation de biofilms
$A \leq 0,07$ témoin négatif	Non	Non
$0,12 \geq A > 0,07$	Faible	Faible
$0,24 \geq A > 0,12$	Modérée	Modérée
$A > 0,24$	Forte	Forte



Fig. 8. Photographie de l'adhésion bactérienne dans des microplaques de polystyrène de 96 puits après coloration au cristal violet, (A) : pas d'adhésion, (B) : forte adhésion, (C) : adhésion modérée et (D) : faible adhésion

Les souches de *S. aureus* ayant montré une adhésion sur tubes (MT), ont présenté également une capacité d'adhésion ($A > A_{\text{témoin}} = 0,07$) sur microplaques.

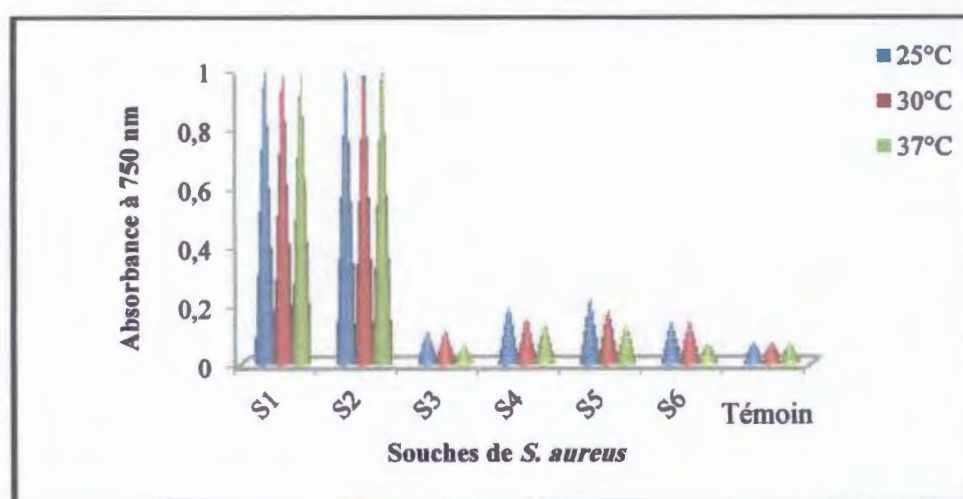


Fig. 9. Formation de biofilms par les souches de *S. aureus* dans des microplaques en polystyrène de 96 puits estimée par la méthode « TCP »

La classification de l'adhésion des souches de *S. aureus* selon Mathur *et al.*, (2006) est présentée dans le tableau VII.

Tableaux VIII. Classification de l'adhésion des souches de *S. aureus*

Souche / Adhésion	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Adhésion à 25°C	Forte	Forte	faible	modérée	modérée	modérée
Adhésion à 30°C	Forte	Forte	faible	modérée	modérée	modérée
Adhésion à 37°C	Forte	Forte	faible	modérée	modérée	faible

A partir des résultats obtenus on remarque que les souches S1 et S2 adhèrent fortement à 25, 30 et à 37°C, les souches S4 et S5 adhèrent modérément à ces trois températures contrairement à la souche S3 qui a présenté une faible adhésion. La souche S6 a présenté une adhésion modérée à 25 et 30°C et une adhésion faible à 37°C.

Pompermayer *et al.* (2000) ont montré que l'adhésion de *S. aureus* ATCC 25922 au polypropylène était plus importante à 30°C qu'à 12°C. De plus, Gallardo-Moreno *et al.* (2004) ont constaté l'importance qu'il y a à réaliser les expériences d'adhésion à une température proche de la température optimale de croissance car ce paramètre peut influencer les caractéristiques physicochimiques (charge et hydrophobicité) de la surface des cellules. Cependant, certaines bactéries peuvent former des biofilms à des températures inférieures à leurs températures optimales de croissance, dans nos études on a remarquant que quand la température est augmentée la formation des biofilms est diminuée.

elle peut influencer la charge et d'hydrophobicité

de la cellule des bactéries

cellulaire

On a bien-caractérisé les 6 d'isolats obtenues à partir de la méthode standard de TCP a été employé pour évaluer des méthodes de TCP, de TM, et de CRA. Les méthodes de TCP et RCA étaient les plus sensibles, en termes de distinguer entre les producteurs de biofilm et les non-producteurs. Dans TM, des producteurs forts de biofilm pourraient être facilement détectés, mais on dit qu'il y a une bonne corrélation entre la TCP et MT, Au terme de ces trois tests, les souches de *S. aureus* isolées à partir de lait cru de vaches et de matériels de traite et de stockage de lait ont été capables de former des biofilms.

Conclusion

Conclusion:

Les biofilms sont des associations de microorganismes, adhérant entre eux Et colonisent des surfaces très variées connus pour leurs effets néfastes dans les domaines agroalimentaires spécifiquement les contaminations de produits laitiers et fromagères, en particulier les *Staphylococcus aureus*, qui sont capables de former les biofilms sur la surface de matériel à traitement, de collecte et de stockage réfrigéré utilisés dans des fermes d'exploitation laitière.

C'est dans ce cadre que s'est inscrit le travail présenté dans ce manuscrit portant sur l'étude de la capacité de *S.aureus* de la formation des biofilms et sa détection par trois méthodes et l'effet de la température sur l'adhésion et la formation des biofilms.

Dans une première approche, nous avons isolé six souches de *S. aureus* à partir de lait cru de vaches et de matériel de traitement et de stockage réfrigéré utilisés dans des fermes d'exploitation laitière et identifié phénotypiquement et biochimiquement des souches de *S. aureus* isolées

Dans la deuxième partie, a été axée sur l'étude de la capacité et détection de biofilms formés par ces souches isolées par trois méthodes principales, méthode indirecte décrit la production d'un «slime» sur milieu solide «rouge congo agar» ou «RCA» et méthodes directes qui décrit la Méthode des tubes (MT), qui est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm. et la détermination que il y a une corrélation entre les trois méthodes.

D'après les résultats obtenus nous concluons que nos souches sont multi résistantes à des antibiotiques testés et peuvent former des biofilms qui ont montré par une bonne adhésion dans les trois méthodes à la température optimale à 25°C, bien qu'il y a une bonne corrélation entre MT et RCA.

Les perspectives qui s'inscrivent logiquement dans la suite de cette étude sont nombreuses :

- Développement des moyens de la lutte contre les biofilms négatifs plus efficaces tel que l'utilisation des biofilms positifs.
- Développement des procédures de nettoyage et désinfection plus efficaces pour éviter l'installation de ces microorganismes sur matériel de traitement, collecte et du stockage.

Références bibliographiques

A

- Al alam, D. 2008.** Impact de l'interaction entre les cellules épithéliales et bronchiques et *Staphylococcus aureus* sur le chimiotactisme des lymphocytes T dans la mucoviscidose. Thèse de Doctorat en Immunologie. Université de Reims (France), 164p.
- Allesen-Holm M, Barken K B, Yang L, Klausen M, Webb J S, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2006.** A characterization of DNA release in *P. aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology* **59**: 1114-28.
- Ameur A, Rahal K, Bouyoucef A. 2011.** Evaluation du nettoyage des tanks de réfrigération dans les fermes laitières de la région de Freha (Algérie). *Nature et Technologie* **6** : 80-84.
- Arnold J W, Bailey GW. 2000.** Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poultry Science* **79**: 1839-1845.
- A Roux, J M Ghigo.2006 .Les biofilms bactériens,** Bull. Acad. Vét. France, pp : 266
- Atabek A, Camesano T A. 2007.** Atomic force microscopy study of the effect of lipopolysaccharides and extracellular polymers on adhesion of *P. aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **189**: 8503-8509.
- Auajjar N, Benaïssa A , Nour Eddine E, Alain B..6002**multirésistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *p. Fluorescens* Et *staphylococcus aureus* et survie Sur divers tissus hospitaliers **145** : 61-76.

B

- Bonnet R, Cavallo JD, Chardon H, chidiac H, Courvalin P, dabernat H, Drugeon H, dubreuil L, guery B, Jarlier v, jehl F, Lambert T, Leclercq R, nicolas-chanoine MH, Plesiat P, Quentin C, Rouveix B, soussy CJ, Varon E, Weber P.2010.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie Recommandations 2010,35 P.
- Bathia A, Zahoor S. 2007.** *S. aureus* enterotoxins: a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **1**: 188-197
- Beech I B, Sunner J. 2004.** Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology* **15**: 81-186.
- Beloin C, Houry A, Froment M, Ghigo G M, Henry N. 2008.** A short time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics and adhesin-dependent behaviours. *Plos Biology* **167**: 15449-1558.

- Bhunia, A. K.**, 2008. *Staphylococcus aureus* in Foodborne Microbial Pathogens . Ed. Springer (New York), 276p .
- Boulangé-Petermann L, Rault J, Bellon-Fontaine M N.** 1997. Adhesion of *Str. thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling* **11**: 201-216
- Boulbina, I., Driss, W., Tazka, H., Bouziane, A.M.**, 2009. Diagnostic bactériologique des mammites des vaches laitières dans quelques communes de la wilaya d'Alger (Baraki, Eucalyptus et Ouled Chebel) in Les maladies infectieuses des bovins. Ecole nationale supérieure vétérinaire d'El Harrach – Alger. 40p.
- Bouton Y, Guyot P, Vacheyrou M, Normand A C, Piarroux R, Beuvier E.** 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Exemples des LHF. 15ème colloque du club des bactéries lactiques. Rennes. France.
http://www.typtech.fr/wa_files/MicrofloreDulaitcru-RMT-juillet2011BD.pdf
- Bradshaw D J, Marsh PD, Watson G K, Allison C.** 1997. Effect of conditioning films on oral microbial biofilm development . *Biofouling* **11**: 217-226.
- Branda S S, Vik S, Friedman L, Kolter R.** 2005. Biofilms: the matrix revised. *Trends in Microbiology* **13**: 20-26.
- 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 . *International Journal of Food Microbiology* **106**: 254-262.
- Bremer P J, Seale B, Flint S, Palmer J.** 2009. Biofilms in dairy processing. In Fratamico PM, Annous BA et Gunther NW (ed.). Biofilms in the food and beverage industries. Oxford, Cambridge, New Delhi:Wood head. pp. 396–431

C

- Cahier fermier**, 2005. Spécial résultats du programme biofilms. *Bulletin de l'Institut de l'élevage* **14**: 1-8.

- Carpentier B, Cerf O. 1993.** Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry *Journal of Applied Bacteriology* **75** : 499-511.
- Christensen G D, Simpson W A, Bisno A L, Beachey E H. 1982.** Adherence of slime producing strains of *S. epidermidis* to smooth surfaces . *Infection and Immunity* **37**: 318–26
- Corne, P., 2004.** *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, Phénotypique et épidémiologique. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques et Chimiques de la Santé. Université de Montpellier (France), 116p
- Costerton J W, Geesey G G, Cheng G K. 1978.** How bacteria stick. *Scientific American* **238**: 86-95.
- Costerton J W, Lewandowski Z, De Beer D, Caldwell D, Korber D, James G. 1994.** Minireview: biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* **176**: 2137-2142.
- Costerton J W, Lewandowski Z , Caldwell D E, Korber DR, Lappin-Scott H M. 1995.** Microbial biofilms. *Annual Review in Microbiology* **49**: 711-745.
- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades J R. 2001.** BAP, a *S. aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology* **183**: 2888–2896.

D

- Davey M E, O'Toole C A. 2000.** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 847-867.
- Dogan B, Boor K J. 2003.** Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 130–138.
- Donlan R M, Costerton J W. 2002.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review* **15**: 167-193

F

- Farrokh C, Jordan k , Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Thevenot D , Condron R, De Reu K, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M , Hummerjohann J, Lindsay D , Mischczycha S, Moussiegt S, Verstraete K, Olivier C. 2013.** Review of Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology* **162**: 190-212.
- Fernandes P. 2006.** Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials .*Applied Microbiololgy and Biotechnology* **73**: 291-296.
- Fletcher M, Loeb G I. 1979.** Influence of the substratum characteristics on the attachment of a marine *Pseudomonad* to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 67-72.
- Flint S H, Bremer P J, Brooks J D. 1997.** Biofilms in dairy manufacturing plant – description, current concerns and methods of control. *Biofouling* **11**: 81–97.
- Freeman DJ., Falkner FR., Keane CT. (1989).** New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* .**42**:872-874.

G

- Gallardo-Moreno A M, Gonzalez Martin M L, Pérez-Giraldo C, Garduno E, Bruque J M, Gomez-Garcia A C. 2002.** Thermodynamic Analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *C. parapsilosis* to polystyrene . *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2610-2613
- Gara J P, Humphreys H. 2001.** *S. epidermidis* biofilms: importance and implications . *Journal of Medical Microbiology* **50**:582–7.
- Garrity G M, Holt J G. 2001.** Taxonomic outline of the Archaea and Bacteria. In. Boone DR et Castenholz RW (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* , 2eme edition, vol 1 (The Archeae and the deeply branching and phototrophic Bacteria). Springer-verlag (New York) , pp. 155-166.
- Giaouris E, Heir E, Hébraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, Møretre T, Habimana O, Mickaël Desvaux M, Renier S, Nychas G J. 2014.** Attachment and biofilm formation by

foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science* **97**: 298–309.

Guiraud, J.P., Rosec, J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR . Ed. Dunod (France), 298p

Gross M, Cramton S E , Gotz F, Peschel A. 2001. Key role of teichoic acid net charge in *S. aureus* colonization of artificial surfaces . *Infection and Immunity* **69**: 3423–3421.

H

Heczko, P.B., Hoffler, U., Kasprovicz, A., Pulverer, G., 1981. Studies of the flora of the nasal vestibule in relation to nasal carriage of *Staphylococcus aureus* . *Journal of Medical Microbiology* **14**, 233-241.

Hielmann C, Gotz F. 2010. Cell-Cell communication and biofilms formation in Gram-positive bacteria . *In Kramer R et Jung K (ed.). Bacterial signaling.* Wiley-VCH Verlag (Weinheim), pp.7-22.

J

Jay, J.M., Loessner, M.J., 2005. Staphylococcal gastroenteritis *in* Modern food microbiology. Ed. VII. Springer (New York), 790p.

Jidar K. (2007).Prévalence du Staphylocoque doré résistant à la méthicilline chez les patients hospitalisé en dermatologie. Thèse de doctorat : université Paris Descart faculté de médecine Paris Descart. 55p.

Jorgensen H J, Mathisen T, Lovseth A, Omoe K, Qvale KS, Loncarevic S. 2005. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiology Letters* **252**:267-272

K

Kérouanton, A., Hennekinne J.A., Letertre C., Petit L. Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M.L., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology* **115**, 369–375.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Kuchma S L, Connolly J P, O'Toole GA. 2005. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *P. aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **187**:1441-1454.

L

Lamprell, H., 2003. Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments. Université de Bourgogne (France), 79p.

Lebeer S, De Keersmaecker S J, Verhoeven T L A, Fadda A A, Marchal K, Vanderleyden J. 2007. Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lb. rhamnosus* GG reveals a central metabolic role Important for growth and biofilm formation. *Journal of Bacteriology* **189**: 860–871.

Laithier C, Chatelin Y M, David V, Talon R, Labadie J, Barral J, Tormo H, Lefrileux Y, Morge S. 2005. Améliorer la maîtrise de la qualité des fromages fermiers par une meilleure caractérisation des biofilms et de leur rôle. Compte rendu final 150531011. INRA de Theix, (France). pp 1-185. http://www.idele.fr/?eID=cmis_download&oID=workspace://SpacesStore/.pdf

Latasa C, Solano C, Penades J R, Lasa I. 2006. Biofilm-associated proteins. *Comptes Rendus de Biologie* **329**: 849-57.

Lefrileux Y, Mens P. 2004. Evaluation du pouvoir contaminant d'une machine à traire : comparaison de 4 méthodes. Institut de l'élevage 26740 Montboucher. http://www.google.dz/=http%3A%2F%2Fidele.fr%2F%3FeID%3Dcmis_download%26oID%3Dworkspace%3A%2F

Lock M A. 1993. Attached microbial communities in rivers. In Ford TE. (ed.). Aquatic Microbiology. Blackwell Scientific Publications (Cambridge), pp. 113-138.

M

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 Reviewers in Food Science and Food Safety* **11**: 133–147.

Mariani C, Oulahal N, Chamba J F, Dubois-Brissonnet F Briandet R. 2011. Inhibition of *L. monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control* **22**: 1357-1362.

Mariana N S, Salman S A, Neela V, Zamberi S. 2009. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *S. aureus*. *African Journal of Microbiology Resaerch* **3**:330-338.

Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D J, Fatma T, Rattan A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* **24**: 25-9.

Miller S T, Xavier K B, Campagna S R . 2004 . *Sl. typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Molecular Cell* **15**: 677–687.

N

Nayak N, Satpathy G, Nag H L, Venkatesh P, Ramakrishnan S, Nag T C , Prasad S. 2011. Slime production is essential for the adherence for *S. epidermidis* in implant-related infections. *Journal of Hospital Infection* **77**: 153-156.

Nealson K H. 1977. Auto- induction of bacterial luciferase occurrence mechanism and significance . *Archives in Microbiology* **112**:73–79.

Niu C E, Gilbert S. 2004.Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:6951–6956.

O

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Oliveira A, Cunha M D. 2010. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci . *BMC Research Notes* **3**: 260.

O'Toole G, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *P. aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* **30**: 295-304.

O'Toole G, Pratt A L A, Watnick P I, Newman D K, Weaver V B, Kolter R. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in Enzymology* **310**:91-109.

Otto M. (2004) . Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiology*. **6** : 269-275.

P

Palmer J S, Flint S H, Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment , the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**: 577–588.

Parkar S G, Flint S H, Brooks J D . 2004 . Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic *bacilli* on stainless steel . *Journal of Applied Microbiology* **96**: 110-116.

Pasvolsky R, Zakin V, Ostrova I, Shemesh M. 2014. Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. *International Journal of Food Microbiology* **181**: 19-27

Passerini DE Rossi B, Calenda M, Vay C, Franco M .2007. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from device-associated nosocomial infections. *Revista Argentina de Microbiología* **39**: 204-212.

Peacock, S.J., de Silva, I., Lowy, F.D., 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus* ? *Trends in Microbiology* **9**, 605-10.

Planchon S. (2006). Aptitude de *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus xylosus* à former des biofilms. Etude d'une souche "biofilm-positif" par une approche protéomique. Thèse de doctorat : Université Blaise Pascal, école doctorales sciences de la vie et de la santé .237P

Podbielski A, Kreikemeyer B. 2004. Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *International Journal Infectious Disease* **8**: 81-95.

Pompermayer D M C, Gaylarde C C. 2000. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *S. aureus* and *E. coli* to polypropylene . *Food Microbiology* **17**: 361-365.

Pratten J., Foster S. J ., Chan P.F., Wilson M., Nair S.P. (2001). *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes Infectiology* . **3**, 633-637.

Pratt-Terpstra I H, Weerkamp A H, Busscher H J. 1987 . Adhesion of oral Streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumine-coated surfaces . *Journal of General Microbiology* **133**: 3199-3206.

R

Rajesh P S, Ravishankar Rai V. 2014. Quorum quenching activity in cell-free lysate of endophytic bacteria isolated from *Pterocarpussantalinus* Linn and its effect on quorum sensing regulated biofilm in *P. aeruginosa* PAO1. *Microbiology Research* **169**: 561–569.

Robert J, Palmer J, Stoodley P. 2007. Biofilms 2007: Broadened Horizons and New Emphases. *Journal of Bacteriology* **189**:7948–7960.

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

S

Sauer K, Cullen M C, Rickard A H, Zeef LAH, Davies D G, Gilbert P. 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *P. aeruginosa* PAO1 biofilm . *Journal of Bacteriology* **186**: 7312-7326.

Scheldeman P, Pili A, Harman L, De vos P, Heyndrickx M. 2005. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy and farms. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1480-1494.

Shakibaie M, Forootanfar H, Golkari Y, Mohammadi-Khorsand T, Shakibaie M R. 2014. Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

isolates of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb>.

Simeao do carmo, L., Souza dias, R., Roberto linardi, V., 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology* 19, 9-14.

Simões M, Simoes L C, Vieira M J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* 43: 573-583.

Srey S, Kabir Jahid I, Sang-Do Ha I. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31: 572-585.

Sutherland I W . 2001 . The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment . *Trends in Microbiology* 9: 222-227.

Sutra, L., Federighi, M., Jouve, J.L., 1998. Manuel de bactériologie alimentaire. Ed. Polytechnica (Paris), 308p.

Stewart P S, 2003. Diffusion in biofilms . *Journal of Bacteriology* 185: 1485-1491.

Stoodley P, de Beer D, Lappin-Scott H M. 1997. Influence of electric fields and pH on biofilm structure as related to the bioelectric effect. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 1876-1879.

Stoodley P, Sauer k, Davies D G, Costerton J W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* 56:187-209.

T

Toledo-Arana A., Merino N., Vergara-Irigaray M., Debarbouille M., Penades J.R., Lasa I. (2005). *Staphylococcus aureus* Develops an Alternative, *ica*-Independent Biofilm in the Absence of the *arlRS* Two-Component System. *Journal of Bacteriology* . 187: 5318-5329.

Y

Yang Z, Li S, Zhang Z, Zeng X, Li D, Zhao Y, Zhang J. 2010. Capsular and slime-polysaccharide production by *Lb. rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **110**: 53–57.

V

van Oss C J. 1996. Forces interfaciales en milieux aqueux. Edition Masson (Paris) , 230p.

Vendeville A, Winzer K, Heurlier K, Tang C M, Hardie K R. 2005. Making „sense“ of metabolism: autoinducer-2, *LuxS* and pathogenic bacteria . *Nature Reviews in Microbiology* **3**:383–396.

W

Whitehead K A , Verran J. 2009 . The effect of substratum properties on the survival of attached microorganisms on inert surfaces. *Springer Series on Biofilms* **4**: 13-33.

Z

Zhang X, Huang X, Mai Y, Lin N, Fan A, Tang B. 2012. Bactericidal behavior of Cu-containing stainless steel surfaces. *Applied Surfaces Science* **258**: 10058-10063 .

Zobell C E. 1943. The effect of solid surface upon bacterial activity . *Journal of Bacteriology* **46**:39-56.

Annexes



Annexe I : Composition des milieux de culture (pour 1 litre d'eau distillée)

(Suivant les fournisseurs)

Gélose « rouge congo agar » ou « RCA»:

Gélose BHI.....	52g
Glucose.....	25g
Saccharose	25g
Rouge congo.....	0.8g

Autoclaver 15 min à 121°C

Gélose Chapman

Extrait de viande.....	1g
Chlorure de sodium	75g
Peptone.....	10g
Agar	15g
D Mannitol	10g
Rouge de phénol.....	0,025g

pH=7,4

Autoclaver 15 min à 120°C

Gélose nutritive

Extrait de viande	1g
Peptone.....	15g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g

pH=7,2

Autoclaver 15 min à 120°C

Gélose.....15g

Autoclaver 15 min à 120°

Bouillon nutritif

Extrait de viande1g

Peptone.....15g

Chlorure de sodium5g

pH=7,2

Autoclaver 15 min à 120°C

Bouillon TSB

Hydrolysate enzymatique de caséine.....17g

Peptone de soja.....3g

D-Glucose.....2.5g

Chlorure de sodium.....5g

Hydrogénophosphate dipotassique.....2.5g

pH=7,3

Autoclaver 15 min à 120°C

Annexe II : composition des colorants, tampons et réactifs ((pour 1 litre d'eau distillée)

Cristal violet (0,1%) 1g

Autoclaver 15 min à 120°C

Solution de TS

Tryptone.....0, 1 g

NaCl0,9g

pH =7

Autoclaver 15 min à 120°C

Eau physiologique

Eau distillée.....1l

Chlorure de sodium.....9g

pH =7

Gélose BHI

Infusion coeur-cerveille-peptone	27,5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique.....	2,5g
D (+) Glucose.....	2g
Agar	15g

pH=7,4

Autoclaver 15 min à 120°C

Bouillon Giolitti Cantoni

Tryptone	10g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	5g
Chlorure de lithium	5g
Mannitol	20g
Chlorure de sodium	5g
Glycine	1, 2g
Pyruvate de sodium	3g

pH=6,9

Autoclaver 15 min à 120°C

Gélose Mueller Hinton

Extrait de viande.....	2g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon.....	1,5g
Agar	10g

pH=7,4

Autoclaver 15 min à 120°C

Gélose ADNase

Tryptone Bacto.....	20g
Chlorure de sodium.....	5g
Acide désoxyribonucléique.....	2g

Autoclaver 15 min à 120°C

PBS (Phosphate buffered saline)

NaCl.....	140 mM
KCl.....	3 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Eau distillée	1 L

Annexe III : coloration de gram

La réalisation de la coloration de gram passe par les étapes suivantes :

- Préparation du frottis : étalement de l'aliquote bactérien sur une lame puis fixation par la chaleur,
- Première coloration avec le violet de gentiane durant environ 1 minute,
- Laver à l'eau,
- Rajouter lugol durant environ 30 secondes,
- Laver à l'eau,
- Décolorer par la solution éthanol 90° C,
- Laver à l'eau,
- Coloration à la fuchine environ 1 à 2 minutes,
- Rajouter quelque goutte de l'huile à immersion
- Observer après séchage (objectif X 100).

Réalisé par :

M^{elle} Chellat Khayra

M^{elle} Lakhale Hanan

Jury :

Président : Dr. Ouled Haddar H.

Examineur : M^{me} Roula

Encadreur : Dr Ait Meddour A

Co-encadreur : Mr Rahmoune Y

Thème :

Détection de la formation de biofilms par des souches de *S. aureus*

Résumé

Six souches ont été récupérées à partir de biofilms bactériens naturels adhérents sur du matériel de traite et de stockage de lait ainsi qu'à partir de lait cru de vaches. Ces dernières ont été identifiées comme étant *S. aureus*. Afin de tester leur potentiel de formation de biofilms, trois tests ont été réalisés (RCA, MT et TCP).

Sur la base de leur capacité d'adhésion et de formation de biofilms les résultats ont montré que les six souches de *S. aureus* ont été capables de former des biofilms, ces derniers ont été influencés par les températures d'incubation (25, 30 et 37°C).

Mots clés : biofilms, adhésion, *S. aureus*, lait cru, matériels de traite.

Abstract

Six strains were recovered from natural bacterial biofilms adhered on milking equipment and milk storage as well as from raw milk of cows. These were identified as *S. aureus*. To test their biofilm formation potential three tests were carried out (RCA, MT and TCP).

On the basis of their capacity for adhesion and biofilm formation, results showed that the six strains of *S. aureus* were able to form biofilms and they were influenced by the incubation temperatures (25, 30 and 37 ° C)

Keywords: biofilms, adhesion, *S. aureus*, raw milk and milking material.

الملخص:

تم عزل ست سلالات من بيوفيلم البكتيريا الطبيعي الملتصق على معدات الحلب وتخزين الحليب وكذلك من الحليب الخام من الأبقار وقد تم تحديد هذه السلالات وهي *S. aureus* و لاختبار قدرة السلالات على تشكيل البيوفيلم تم اختبارها بثلاث اختبارات (RCA, MT, TCP). على أساس قدرتها على الالتصاق وتشكيل بيوفيلم أظهرت النتائج أن السلالات الستة من *S. aureus* كانت قادرة على تشكيل البيوفيلم و تتأثر بدرجات حرارة (25° C, 30° C, 37° C)

الكلمات المفتاحية:

البيوفيلم, التصاق, *S. aureus*, حليب البقرة ومعدات الحلب.