

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE de TLEMCEEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de biologie

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et
à l'environnement (LAMAABE)*

MEMOIRE

Présenté par

ZEBAIR Mohammed Feth ennour

RAHAOUI Mohammed Fouad

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Science Biologique, Option : Microbiologie fondamentale

Thème

Effet de la température sur la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*.

Soutenu le 25/06/2023, devant le jury composé de :

Président	Mr. BARKA Mohammed Salih	Pr	U.Tlemcen
Examineur	Mr. BENYOUB Nour Eddine	MCB	U. Tlemcen
Promotrice	M ^{me} CHERIF ANNTAR Asmaa	MCB	U. Tlemcen

Année universitaire 2022/2023

Remerciement

Avant tout, la louange au Dieu le plus puissant pour ce qu'il nous a donné, comme santé, volonté et surtout patience pour pouvoir achever ce modeste travail.

Ensuite, notre profond remerciement s'adresse à notre encadrante

*Mme **CHERIF ANNTAR Asmaa***

Pour avoir accepté d'encadrer notre travail, pour ses conseils, son encouragement et son soutien

Nos remerciements s'adressent aussi aux membres de jury, qui nous font l'honneur d'examiner notre travail :

*il y a le président et l'examineur Mr **BARKA Mohemmed Salih** et **BENYOUB Nour Eddine***

Un grand merci pour nos chers professeurs qui nous ont fait découvrir le monde de la biologie et qui nous ont donné les bases de la recherche pendant notre parcours universitaire.

En fin, nous remercions toute personne qui a contribué, de près ou loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*Je remercie tout d'abord « Allah » le tout puissant pour la volonté, la
santé et la*

patience

Je dédie ce mémoire,

A mes chers parents

*Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et
leur prière tout au long de mes études*

.A mon cher frère et mes chères sœurs

*Abdelghani, Bouchra, Fatima, et les petites loulou Hadjer et alae. pour
leur appui et leur encouragement et leur soutien moral*

*A ma chère grand-mère BELGHOMARI djemaa décédée l'année
dernière 23/05/2022 j'aimerais bien que tu sois là avec nous en ce
moment. je viens te dire au revoir. Tu es parti avant nous, bien trop
tôt, et tu nous rappelles qu'ici-bas, notre vie est peu de chose. Que dieu
te bénisse.*

A mon binôme

ZEBAIR Mohammed feth ennour et à sa famille.

A mes collègues

*Pour leurs disponibilités, amitiés, et soutiens apporté depuis le jour de
notre connaissance.*

Fouad Rahaoui

Dédicace

Je remercie tout d'abord « Allah » le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience

Je dédie ce mémoire

A mon grand-père décédé, MESTARI Abdelouahab, merci pour votre soutien et vos conseils, j'aimerais que vous me voyiez atteindre ce point et que vous partagiez ma joie. Que dieu te bénisse.

A mes chers parents

Pour leurs sacrifices, leur soutien, leur amour et leur contribution pour atteindre le point où je suis aujourd'hui

A mes chers frères

Fouad et Abdelouaheb

Pour leur encouragement et leur soutien

A mes chers amis

Ismail et ismail

Pour leur soutien, attention et les bons moments

A mes collègues et toutes mes connaissances

A mon binôme et ami

Rahaoui Mohamed Fouad

ZEBAIR Mohammed Feth-ennour

ملخص

الشريط الحيوي هو مجتمع متنوع من الكائنات الدقيقة الحية التي تمتلك القدرة على التثبيت على مختلف الأسطح، سواء كانت حية أو غير حية، مثل اللآلئة والمعدات المستخدمة في صناعة الألبان. هناك العديد من العوامل التي تساهم في تكوين الشريط الحيوي، بما في ذلك درجة الحرارة التي تلعب دورًا حاسمًا. من بين الكائنات الدقيقة الموجودة، تلعب بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* دورًا هامًا في تدهور جودة المنتجات. تهدف هذه الدراسة إلى دراسة تأثير درجة الحرارة على تكوين الشريط الحيوي من خلال سلالات معزولة من *Klebsiella pneumoniae* المأخوذة من خطوط إنتاج الحليب الخام، تحديدًا في الأقسام السابقة واللاحقة للتعقيم، بعد تطبيق بروتوكول التنظيف في المكان. قمنا بتقييم قدرة تكوين الشريط الحيوي باستخدام تقنية أطباق الميكروتيتر بـ 96 وحدة على ثلاث سلالات (lamaabe4-75، lamaabe4-63 و lamaabe4-90) في ثلاث درجات حرارة مختلفة (20 درجة مئوية، 37 درجة مئوية و 55 درجة مئوية) لمدة أربع فترات زمنية (2 ساعة، 4 ساعات، 6 ساعات و 24 ساعة). بعد قياس الكثافة البصرية (DO) لكل سلالة، لاحظنا أن سلالة lamaabe4-90 عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة تظهر أعلى نشاط في تكوين الشريط الحيوي بقيمة DO تبلغ 1.58 نانومتر.

الكلمات الرئيسية: كليسيلا نيومونيا، الشريط الحيوي، درجة الحرارة، مصنع الألبان.

Abstract

The biofilm is a heterogeneous community of microorganisms that have the ability to attach to different surfaces, whether living or inert, such as materials and equipment used in the dairy industry. Several factors contribute to the formation of this biofilm, with temperature playing a crucial role. Among the microorganisms present, the bacterium *Klebsiella pneumoniae*, an opportunistic pathogen, plays a significant role in the degradation of the organoleptic and sanitary quality of finished products. This study aims to examine the effect of temperature on biofilm formation by isolates of *Klebsiella pneumoniae* obtained from raw milk production lines, specifically the pre- and post-pasteurization sections, after the implementation of the cleaning-in-place protocol. We evaluated the biofilm formation capacity using the 96-well microtiter plate technique with three strains (lamaabe4-75, lamaabe4-63, and lamaabe4-90) at three different temperatures (20°C, 37°C, and 55°C) for four durations (2 hours, 4 hours, 6 hours, and 24 hours). After measuring the optical density (OD) of each strain, we found that the lamaabe4-90 strain at 37°C for 24 hours exhibited the highest biofilm-forming activity, with an OD of 1.58 nm.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, temperature, dairy industry.

Résumé

Le biofilm est une communauté hétérogène de micro-organismes ayant la capacité de se fixer sur différentes surfaces, qu'elles soient vivantes ou inertes, telles que les matériaux et les équipements utilisés dans l'industrie laitière. Plusieurs facteurs contribuent à la formation de ce biofilm, dont la température qui joue un rôle crucial. Parmi les micro-organismes présents, la bactérie *Klebsiella pneumoniae*, un pathogène opportuniste, joue un rôle prépondérant dans la dégradation de la qualité organoleptique et sanitaire des produits finis. Cette étude vise à examiner l'effet de la température sur la formation du biofilm par des souches isolées de *Klebsiella pneumoniae* provenant des lignes de production de lait cru, plus précisément des sections pré- et post-pasteurisation, après l'application du protocole de nettoyage en place. Nous avons évalué la capacité de formation du biofilm en utilisant la technique des microplaques de titration à 96 puits sur trois souches (lamaabe4-75, lamaabe4-63 et lamaabe4-90) à trois températures différentes (20°C, 37°C et 55°C) pendant quatre durées (2h, 4h, 6h et 24h). Après avoir mesuré la densité optique (DO) de chaque souche, nous avons constaté que la souche lamaabe4-90 à 37°C pendant 24 heures présentait la meilleure activité de formation de biofilm, avec une DO de 1,58 nm.

Mots clé : *klebseilla pneumonie*, biofilm, température, industrie laitière.

Table des matières

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction générale.....	1
Première Partie : Synthèse bibliographique.....	3
Chapitre I :L'espèce <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
1.Classification.....	3
2.Bactériologie de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
2.1Caractères généraux.....	3
2.1.1 Caractères morphologiques :.....	3
2.1.2 Caractères culturaux :.....	4
2.1.3 Caractères biochimiques :.....	5
3.Habitat.....	5
4.Pouvoir pathogène de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
Chapitre II Généralités sur les Biofilms	
1.Historique.....	7
2.Définition du biofilm.....	7
3.Structure et composition du biofilm.....	8
4.Etapes de formation du biofilm.....	9
4.1Formation de film de conditionnement :.....	10
4.2Adhésion initiale réversible :.....	10
4.3Adhésion irréversible :.....	11
4.4Croissance et maturation :.....	11
4.5Dispersion :.....	11
5.Le biofilm en industries laitières.....	11
5.1Les micro-organismes contaminants du lait dans l'industrie laitière.....	12
5.1.1 Flore indigène (originelle) :.....	12
5.1.2 Flore de contamination.....	12
□ Flore pathogène.....	13

□ Flore d'altération.....	13
---------------------------	----

CHAPITRE III : Les facteurs influençant la formation des biofilms

1.Caractéristique de la surface :	14
1.1Rugosité de la surface :	14
1.2Propriétés physico-chimiques de la surface :	14
1.3Présence de film protéique sur la surface :	14
2.Caractéristiques du milieu.....	15
3.Caractéristiques des microorganismes.....	15

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

1.Origine des souches.....	17
2.Revivification des souches.....	17
3.Observation microscopique.....	17
4.Conservation des souches.....	17
4.1Conservation à court terme.....	18
4.2Conservation à long terme.....	18
5.Effet de la température sur la formation de biofilm par <i>K.pneumoniae</i>	18
5.1Préparation de la suspension bactérienne.....	18
5.2Formation de biofilm par <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
5.2.1 Protocol.....	18
5.2.2 Quantification des biofilms formés.....	19

Troisième partie : Résultats et discussion

1.Vérification de la pureté des souches étudiées :	20
2.Effet de la température sur la formation de biofilm par <i>Klebsiella pneumoniae</i> :.....	21
2.1Effet de la température sur la formation de biofilm par la souche <i>K.pneumoniae</i> lamaabe4-75.....	21
2.2Effet de la température sur la formation de biofilm par la souche <i>K.pneumoniae</i> lamaabe4-63 :	23
2.3Effet de la température sur la formation de biofilm par la souche <i>K.pneumoniae</i> lamaabe4-90 :	25
Discussion	29
Conclusion	32
Référence Bibliographique	33

Tables des Figures

Figure 1: Aspect des colonies de <i>K. pneumoniae</i> sur milieu gélosé Mac Conkey.....	4
Figure 2: Composition du biofilm.....	8
Figure 3: Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien.....	9
Figure 4: Observation en microscopie électronique à balayage de biofilms.....	9
Figure 5: Représentation schématique de la formation de biofilm.....	10
Figure 6 : ensemencement des souches <i>K.pneumoniae</i> sur gélose MacConkey	20
Figure 7: observation microscopique de souche <i>K.pneumoniae</i> Grossissement100	20
Figure 8 : quantification du bifilm formée par la souche 1 "lamaabe4-75"	22
Figure 9: quantification du bifilm formée par la souche 2 "lamaabe4-63".	24
Figure 10: quantification du bifilm formée par la souche 3 "lamaabe4-90".	26
Figure 11 : Cinétique de formation du biofilm par les 3 souches par rapport au température 20°C en fonction du temps	27
Figure 12: Cinétique de formation du biofilm par les 3 souches par rapport au température 37°C en fonction du temps	27
Figure 13: Cinétique de formation du biofilm par les 3 souches par rapport au température 55°C en fonction du temps	28

Liste des abréviations

- **H₂S** : Hydrogène sulfuré
- **ONPG** : Orthonitrophénylβ-D- galactopyranoside
- **VP** : Vogues-Proskauer
- **LPS** : lipopolysaccharides
- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **ADNe** : acide désoxyribonucléique extracellulaire
- **PKA** : protéine kinase A
- **BHIB** : Bouillon cœur-cerveille Rpm : rotation per minute
- **PBS** : tampon phosphate salin
- **DO** : densité optique
- **%** : pourcentage
- **°c** : degré celsius
- **Nm** : nanomètre
- **Ufc** : unité formant colonie
- **mL** : millilitre
- **μL** : microlitre
- ***K.pneumoniae*** : *Klebsiella pneumoniae*.

Introduction générale

Introduction générale

L'industrie laitière est considérée comme l'une des principales industries alimentaires dans le monde qui commercialise une large gamme de différents produits laitiers dont le lait.

Le lait est un aliment naturellement riche en nutriments essentiels tels que les protéines, les lipides et les glucides, ce qui en fait une source idéale pour la croissance des micro-organismes, y compris les bactéries. Cependant, la présence de bactéries contaminants dans le lait peut entraîner diverses maladies d'origine alimentaire, ce qui représente un risque pour la santé publique. Parmi les bactéries pathogènes potentiellement présentes dans le lait, *Klebsiella pneumoniae* est une espèce particulièrement préoccupante en raison de son implication dans les infections nosocomiales et communautaires.

Klebsiella pneumoniae est une bactérie à Gram négatif faisant partie de la famille des Enterobacteriaceae. On la retrouve dans divers environnements tels que les sols, l'eau et les matières fécales d'animaux et d'humains. De plus, cette bactérie a la capacité de coloniser les voies respiratoires et le système digestif des mammifères, y compris l'être humain. La présence de *Klebsiella pneumoniae* dans le lait peut résulter d'une contamination lors des étapes de traite, de stockage ou de transport.

La formation de biofilms par des bactéries pathogènes telles que *Klebsiella pneumoniae* représente un défi majeur pour l'industrie laitière. Ces biofilms peuvent contaminer le lait, augmentant ainsi les risques pour la santé des consommateurs et entraînant d'importantes pertes économiques pour les producteurs laitiers (Marchand *et al.*, 2012). Il est donc essentiel de comprendre les facteurs qui influencent la formation de biofilms par *Klebsiella pneumoniae* dans l'industrie laitière, afin de mettre au point des stratégies de prévention et de contrôle efficaces.

La température est un paramètre environnemental crucial qui peut avoir un impact sur la formation de biofilms. Les fluctuations de température peuvent affecter la dynamique de croissance bactérienne, la production de molécules de signalisation et la composition de la matrice extracellulaire. Cependant, l'effet spécifique de la température sur la formation de biofilms par l'espèce *Klebsiella pneumoniae* dans le lait demeure relativement peu étudié.

L'objectif de ce mémoire est donc d'étudier l'effet de différentes températures sur la formation de biofilms par *Klebsiella pneumoniae* couramment rencontrées dans l'industrie laitière. Pour ce faire, nous examinerons les connaissances actuelles sur la formation de

biofilms par d'autres bactéries dans le lait et mettrons en évidence les facteurs influençant ce processus. Nous réaliserons également des expériences en laboratoire pour évaluer la capacité de *Klebsiella pneumoniae* à former des biofilms à différentes températures dans des pendant différent temps d'incubation.

Cette étude permettra d'approfondir notre compréhension de l'impact de la température sur la formation de biofilms par *Klebsiella pneumoniae* dans le domaine laitière. Les informations ainsi obtenues seront cruciales pour le développement de stratégies de prévention et de contrôle spécifiques visant à réduire la formation de biofilms dans l'industrie laitière. En améliorant notre compréhension de ce processus, nous pourrions renforcer la protection de la qualité et de la sécurité des produits laitiers, ainsi que la santé des consommateurs.

La structure de présent manuscrit sera comme la suite :

La première partie comportera une synthèse bibliographique composant du trois chapitres traitant des généralités sur l'espèce *K.pneumoniae*, des généralités sur les biofilms et les facteurs influençant la formation du de ces biofilms.

La seconde partie sera consacrée à la méthodologie appliquée pour atteindre notre objectif.

Les résultats obtenus et leur discussion seront présentés en troisième partie.

Pour finir, une conclusion avec des perspectives clôturera ce travail.

Première Partie : Synthèse bibliographique

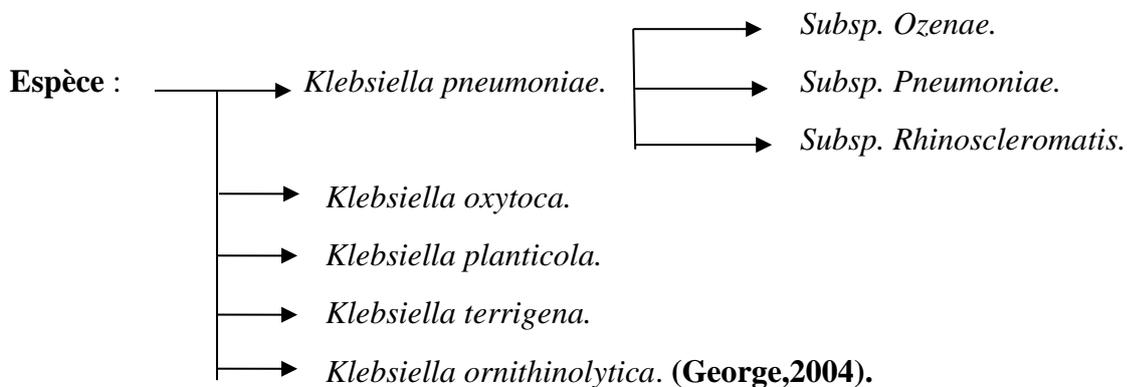
Chapitre I :
L'espèce *Klebsiella pneumoniae*

En 1887, **Trevisan** a choisi de nommer le genre *Klebsiella* en hommage à **Klebs Edwin**, un microbiologiste allemand du 19^{ème} siècle. L'espèce principale de ce genre est *Klebsiella pneumoniae*, également connue sous le nom de pneumobacille de Friedlander. Cette bactérie a été initialement décrite par Friedlander, qui l'a détecté dans les poumons d'un patient décédé de pneumonie (**Belbel, 2013**).

1. Classification

Selon la classification de la 2^{ème} édition de Bergy's manuel *Klebsiella pneumoniae* appartient au:

Règne	: Bacteria
Embranchement	: Proteobactéria
Classe	: Gamma Proteobactéria
Ordre	: Enterobacterales
Famille	: Enterobacteriaceae
Genre	: Klebsiella



2. Bactériologie de *Klebsiella pneumoniae*

2.1 Caractères généraux

2.1.1 Caractères morphologiques :

Ces organismes sont des bacilles à Gram négatif qui se présentent généralement sous forme de diplobacilles et sont toujours immobiles. Leur taille est similaire à celle d'*Escherichia coli*, avec un diamètre allant de 0,3 à 1,0 µm et une longueur de 0,6 à 6,0 µm. Il est courant qu'ils soient encapsulés, bien que seulement environ 5% des souches ne le soient pas. Non sporulés. Cette espèce appartient à la famille des entérobactéries (**El Khoury, 2019**) ; (**Benmesmoudie,**

2015) ; (Richard et Grimont, 1992).

2.1.2 Caractères cultureux :

K. pneumoniae, tout comme les autres entérobactéries, se développe sur des milieux ordinaires. Son métabolisme est aérobie-anaérobie facultatif. Les colonies se forment en environ 18 heures à 37°C et ont une apparence ronde et bombée, souvent avec un aspect muqueux variable. Sur les milieux contenant du lactose, les colonies de *K. pneumoniae* sont positives au test du lactose (Clave,2013).

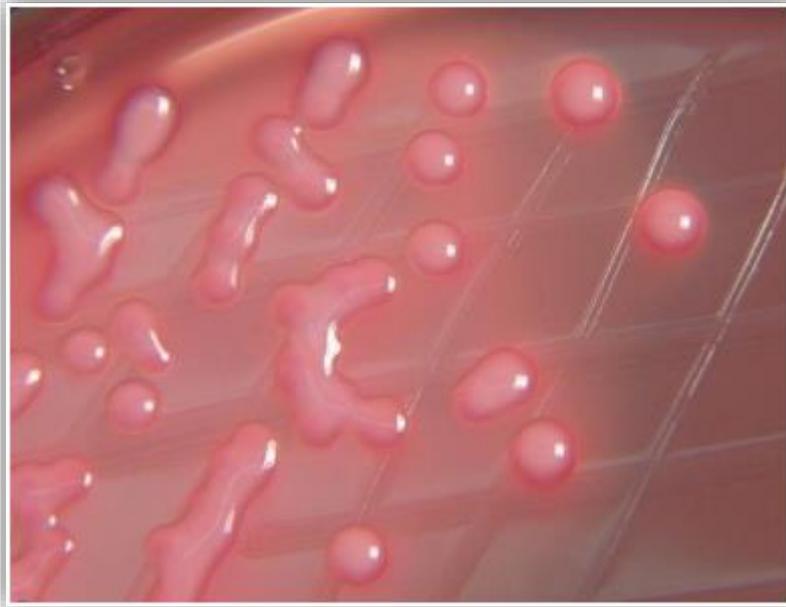


Figure 1: Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur milieu gélosé Mac Conkey (Gueye, 2007).

La culture en milieu liquide tel que le bouillon nutritif ou l'eau peptonée se développe rapidement à des températures comprise entre 30°C et 37°C, avec une possible formation d'un dépôt muqueux et d'une collerette visqueuse en surface. Contrairement aux autres espèces de *Klebsiella*, plus de 90% des souches de *K.pneumoniae* peuvent croître à 44°C dans un bouillon lactosé bilié vert brillant et plus de 80% produisent du gaz lorsqu'elles fermentent le lactose (Le Minor et Véron, 1989).

2.1.3 Caractères biochimiques :

Klebsiella pneumoniae peut être définie comme une Entérobactérie immobile, Hydrogène sulfuré (H₂S) -, RM -, KCN+, OrthonitrophénylB-D- galactopyranoside (ONPG) +, β-xylosidase +, Vogues-Proskauer (VP) +, ODC -, désaminase oxydative -, LDC +, indole -, lipase, DNase et gélatinase -, uréase +, fermentant de nombreux substrats glucidiques ce qui se traduit par une production de gaz, utilisant le citrate de Simmons et le malonate L'ensemble de ces caractères est présentes dans le **tableau 1**.

Tableau 1: Principaux caractères biochimiques de *K. pneumoniae* (Joly, 2002).

Indole	Glucose	Gaz	ONPG	VP	Mobilité	TDA	RM	ODC	H ₂ S	Citrate	ADH	LDC
-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+

3. Habitat

K. pneumoniae est présente au niveau du tube digestif de l'homme (chez 30 % des individus) et des animaux à sang chaud. Sa présence dans l'eau peut signifier une contamination fécale. Elle peut être rencontrée dans l'environnement (sol, végétaux). Au cours des infections nosocomiales, le tube digestif des patients hospitalisés et les mains du personnel sont les deux sources principales de contamination (Clave,2013).

4. Pouvoir pathogène de *Klebsiella pneumoniae*

Les espèces du genre *Klebsiella* sont également des pathogènes opportunistes importants, en particulier chez les personnes immunodéprimées. Les facteurs de pathogénicité des espèces du genre *Klebsiella* comprennent des adhésines, des sidérophores, des polysaccharides capsulaires, des lipopolysaccharides de surface cellulaire (LPS) et des toxines, qui jouent chacun un rôle particulier dans la pathogénèse associée à ces espèces. Selon le type d'infection et le mode d'infectivité, les bactéries du genre *Klebsiella* peuvent, en vue de les attaquer, adhérer aux cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures, aux cellules du tractus gastro-intestinal, aux cellules endothéliales ou aux cellules uroépithéliales, avant de coloniser les muqueuses. Les affections sous-jacentes sont souvent l'alcoolisme, le diabète sucré, l'atteinte chronique du foie (cirrhose), l'insuffisance rénale chronique, le cancer, les greffes, les brûlures et l'utilisation de cathéters (Janda et Abbott, 2006).

Klebsiella pneumoniae occupe une place prépondérante parmi les entérobactéries pathogènes opportunistes, étant fortement impliquée dans les infections nosocomiales. Elle est responsable d'une variété d'infections, notamment des infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires, hépatiques intra-abdominales, des bactériémies, des septicémies et des infections des sites opératoires (Sekhri,2011).

Chapitre II

Généralités sur les Biofilms

1. Historique

C'est au XVII^e siècle qu'**Antonie van Leeuwenhoek** découvrit les biofilms en observant la présence de micro-organismes « animalcules » dans des prélèvements effectués à la surface des dents. En 1933, lors d'études de la croissance des algues, **Henrici** observa des communautés microbiennes fixées sur des lames en verre. Il émit alors l'hypothèse que la plupart des bactéries étaient capables de s'organiser sous forme de communautés sessiles fixées à une surface (**Henrici, 1933**). **Heukelekian** et **Heller** (1940) mirent en évidence « l'effet bouteille », c'est-à-dire la capacité des bactéries fixées à un substrat solide d'exhiber des propriétés de croissance et des activités métaboliques plus importantes que celles des mêmes bactéries en suspension (**Heukelekian & Heller, 1940**). **Claude E. Zobell** (1904-1989), considéré comme le père de la microbiologie marine, démontra en 1943 que la quantité de bactéries fixées à un substrat était largement supérieure à la quantité de bactéries libres dans la phase liquide adjacente (**Zobell, 1943**). Enfin, c'est seulement aux alentours des années 1970 que l'étude des biofilms connût un véritable essor grâce aux techniques de microscopie électronique à transmission et à balayage et l'utilisation de colorants spécifiques des polysaccharides tel que rouge de ruthénium. Ainsi Jones *et al.*, confirmèrent l'existence d'agrégats mono et polymicrobiens, mais aussi l'entité d'une matrice polyosidique (**Jones *et al.*, 1969**). En 1973, **Characklis** démontra que ces matrices d'exopolymères conféraient aux biofilms une certaine ténacité et résistance vis-à-vis des désinfectants (**Characklis, 1973**). Enfin, c'est en 1978 que fut menée la première étude des communautés microbiennes des cours d'eau ; **Costerton** et son équipe proposèrent pour la première fois le terme de « biofilms », considéré comme un mode de vie naturel utilisé par une grande majorité de micro-organismes (**Costerton *et al.*, 1978**).

2. Définition du biofilm

Les biofilms sont définis comme des communautés microbiennes structurées, englobées dans une matrice polymérique produite par les bactéries elles-mêmes, et adhérentes à une surface inerte ou biotique telles que les métaux, les sols, les plantes ou encore les muqueuses (**Costerton *et al.*, 1999**). De nombreuses activités humaines sont ainsi concernées par les biofilms, que ce soit le secteur industriel, environnemental, agro-alimentaire ou celui de la santé. Les bactéries ayant la capacité de former un biofilm présentent des caractéristiques conjointes. Elles sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (**Figure 2**) (**Goetz *et al.*, 2016**).

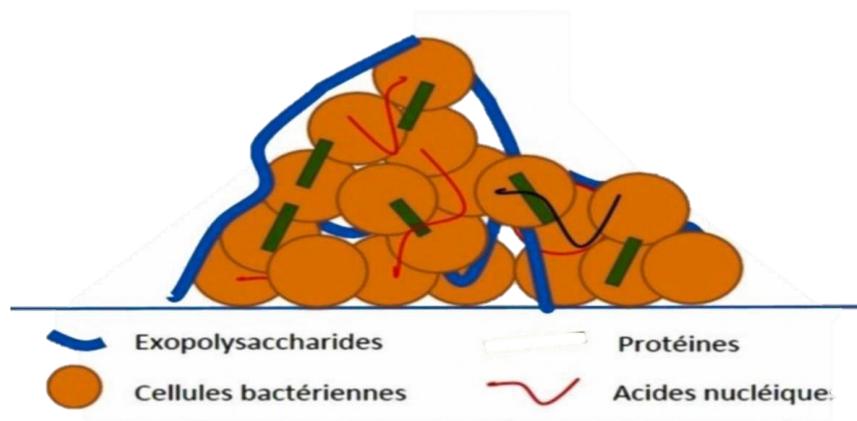


Figure 2: Composition du biofilm (Bentiba, 2017).

3. Structure et composition du biofilm

Le terme "biofilm" décrit un ensemble de matériel vivant (bio) formant un mince revêtement (film). Les micro-organismes présents dans le biofilm ne représentent que 10 % de sa masse sèche, tandis que la matrice qui les entoure constitue 90 % du biofilm. La structure d'un biofilm est complexe, avec des arrangements tridimensionnels hétérogènes. Des agrégats de micro-organismes sont entrelacés avec des canaux hydriques, facilitant ainsi la diffusion des nutriments et de l'oxygène à tous les niveaux du biofilm, ainsi que l'élimination des déchets (Donlan, 2002) (Figure 3). La matrice du biofilm présente une teneur en eau élevée, pouvant atteindre jusqu'à 97 %. Sa composition varie en fonction de l'espèce bactérienne et des conditions de culture (Tremblay *et al.*, 2014). Les composants polymériques extracellulaires qui la composent, jouant le rôle de matériaux de construction, comprennent des polysaccharides, des protéines et de l'ADN extracellulaire (ADNe). (Figure 2) Ces substances contribuent à la cohésion et à la fixation du biofilm aux surfaces (Wei & Ma, 2013).

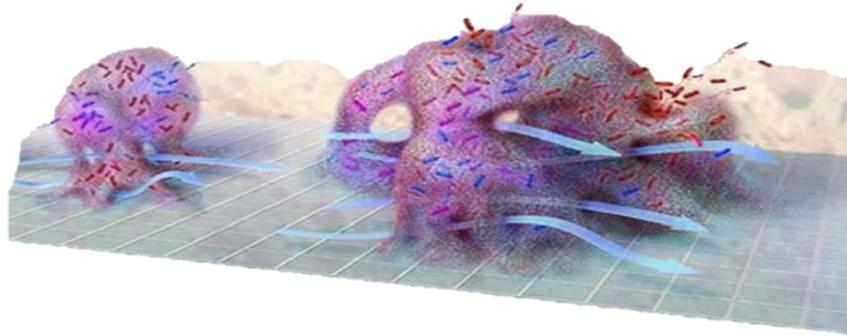


Figure 3: Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien. Les flèches bleues indiquent le sens de la circulation du fluide à l'intérieur des canaux hydriques (Site web 1).

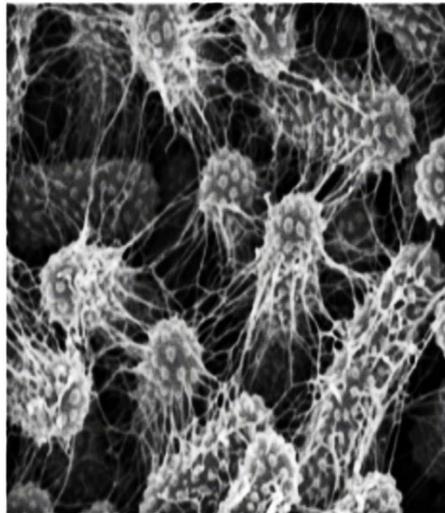


Figure 4: Observation en microscopie électronique à balayage de biofilms. A Biofilm de 48h à *Klebsiella pneumoniae* formé sur lamelle de Thermanox, en microfermenteur (Balestrino et al.,2008).

4. Etapes de formation du biofilm

La formation de biofilm est un processus complexe qui se fait très rapidement, en quelques heures, en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène et de nutriments. Les biofilms sont généralement formés selon un processus de plusieurs étapes, la figure ci-dessous schématise ces étapes :

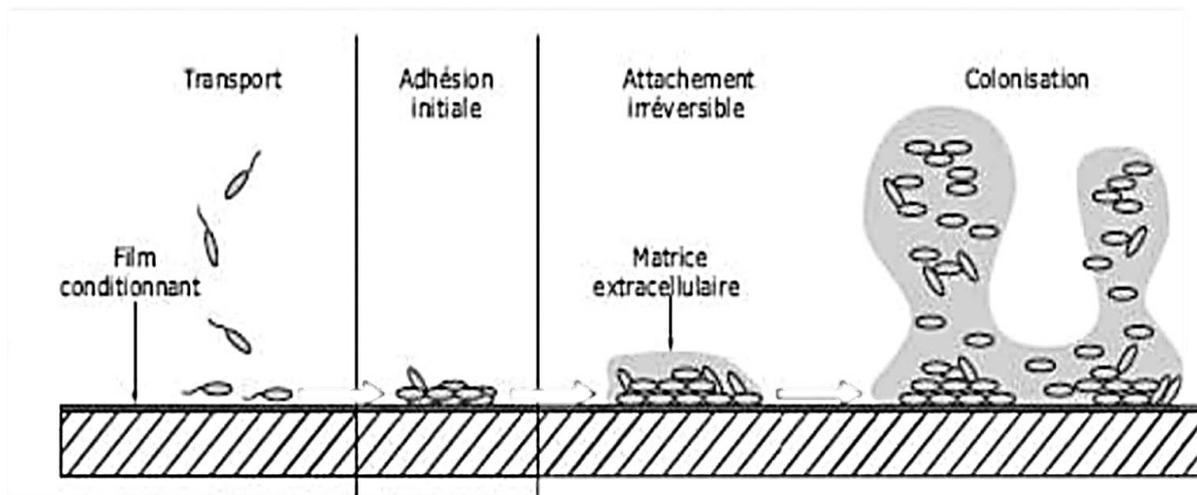


Figure 5: Représentation schématique de la formation de biofilm (Chamberland, 2018).

4.1 Formation de film de conditionnement :

La première étape consiste à former un film de conditionnement composé de protéines ou de fragments protéiques, de glucides, de lipides et de matières minérales (comme des sels) provenant de l'environnement environnant. La nature de ce film de conditionnement peut varier considérablement en fonction du type d'environnement auquel la surface du substrat est exposée. Ce film modifie les propriétés physico-chimiques de la surface, telles que la tension de surface, la polarité et le caractère hydrophile ou hydrophobe, ce qui peut favoriser ou inhiber l'adhésion bactérienne; (Brauge, 2015 ; Lorite *et al.*, 2011 ; Branger, 2007). De plus, L'adsorption et l'accumulation de molécules organiques sur le support créent une disponibilité en nutriments qui favorise le chimiotactisme et l'installation des microorganismes à la surface (Brauge, 2015).

4.2 Adhésion initiale réversible :

Au cours de cette étape, les bactéries planctoniques s'approchent de la surface grâce à des forces de flux, la gravité ou leur mobilité intrinsèque. Lorsqu'elles se rapprochent des surfaces, elles se fixent de manière transitoire de manière réversible. Cette étape permet aux bactéries de s'adapter à l'environnement et peut éventuellement conduire à une fixation permanente ou à un retour à l'état planctonique (Caiazza et O'Toole, 2004) ; (sauer *et al.*, 2002).

4.3 Adhésion irréversible :

L'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries, renforçant ainsi leur fixation au support. Des interactions fortes, telles que des liaisons hydrophobes, se forment entre la bactérie et la surface. La synthèse des exopolymères, débutant dès les premières étapes d'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm, et la matrice peut occuper jusqu'à 75-95 % du volume d'un biofilm mature (**Kuchma et al., 2005 ; Spiers et al., 2003**).

4.4 Croissance et maturation :

Une fois que les cellules bactériennes se sont solidement attachées à la surface, elles vont commencer à s'agglutiner, se multiplier et former des micro-colonies. Cela marque le début de l'étape de colonisation, au cours de laquelle les bactéries adhérentes se multiplient par division cellulaire et sont continuellement rejointes par de nouvelles bactéries provenant de la phase liquide. Cette étape d'accumulation peut varier en intensité et en rapidité (**Tremblay et al., 2014**). La mise en place de l'architecture complexe du biofilm implique la formation de canaux aqueux et de pores entre les micro-colonies, qui permettent la circulation d'oxygène et de nutriments essentiels à la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets. Cela favorise un environnement propice à la survie et au développement des micro-organismes (**Tanke et al, 2006**).

4.5 Dispersion :

La dispersion d'un biofilm se produit lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, telles que la diminution des nutriments, des acides aminés, l'exposition à des forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, la limitation en oxygène et les carences métaboliques (**Sauer et al, 2004**). La dispersion joue également un rôle crucial dans la dissémination bactérienne et la colonisation de nouvelles surfaces. Ce processus de détachement est influencé par la mobilité des bactéries et la taille des micro-colonies (**Hermsan et al, 2010**).

5. Le biofilm en industries laitières

Le problème des biofilms pose de sérieux défis économiques et sanitaires à presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris le secteur des produits laitiers. En effet, les biofilms sont une source de contamination des aliments transformés par des micro-organismes indésirables, et ils sont largement responsables de la détérioration de la qualité organoleptique et sanitaire des produits finis, ainsi que de la réduction de leur durée de conservation (**Malek,**

2019).

Dans l'industrie laitière, on peut identifier deux types de biofilms. Tout d'abord, il y a les biofilms environnementaux, qui se forment lentement sur toutes les surfaces humides telles que les planchers, les murs et les plafonds. En revanche, les biofilms de procédé se forment sur les surfaces internes des équipements. Ils sont généralement moins diversifiés et se développent de manière plus rapide (**Chamberland, 2018**).

5.1 Les micro-organismes contaminants du lait dans l'industrie laitière

Les microorganismes responsables d'altérations néfastes de la qualité des produits trouvent dans le lait de vache un environnement propice à leur développement. La mise en place de normes de gestion rigoureuses contribue à améliorer la qualité du lait. Bien que cela nécessite des ressources financières supplémentaires pour garantir la sécurité du lait destiné aux consommateurs, ces mesures constituent une barrière contre la prolifération des microorganismes (**Maiworé et al., 2018**).

Selon **Mami** (2013), La microflore présente dans le lait peut être classée en deux catégories : la microflore indigène, qui est naturellement présente, et la microflore de contamination. Cette dernière peut être subdivisée en deux sous-catégories : la microflore responsable de l'altération du lait et la microflore pathogène.

5.1.1 Flore indigène (originelle) :

La présence de la flore naturelle dans le lait joue un rôle crucial dans ses caractéristiques organoleptiques (**Foutou et al., 2011**). Le lait possède sa propre flore protectrice, comprenant des ferments lactiques tels que *Micrococcus sp*, *Lactococcus*, *Streptobacillus* et *Lactobacillus*. Ces micro-organismes ont en commun la capacité de fermenter le lactose en acide lactique (**Brisabois et al., 1997**).

5.1.2 Flore de contamination

La garantie de l'hygiène tout au long de la production, de la conservation et de la transformation du lait revêt une importance cruciale pour la santé publique (**Sissao et al., 2015**). Il est nécessaire d'assurer un approvisionnement régulier pour maintenir la qualité hygiénique du lait, qui peut souvent être instable et susciter des **doutes** (**Bachtarzi et al.,**

2015).

La flore de contamination comprend tous les microorganismes qui contaminent le lait, de sa collecte à sa consommation. Elle se divise en une flore d'altération, responsable de défauts

sensoriels et de réduction de la durée de conservation des produits, ainsi qu'en une flore pathogène présentant un danger pour la santé (**Vignola, 2002**). Cette flore peut se composer d'une flore d'altération et d'une flore pathogène (**Vignola, 2002**).

➤ **Flore pathogène**

La présence de micro-organismes pathogènes dans le lait et les produits laitiers représente un risque pour la santé des consommateurs, car ces micro-organismes peuvent produire et libérer des toxines potentiellement dangereuses (**Vignola, 2002**). La contamination par des agents pathogènes peut être de nature endogène, résultant d'une infection chez l'animal lors de la traite, ou exogène, survenant suite à un contact direct avec des surfaces infectées ou à des facteurs environnementaux (Brisabois et al., 1997). Parmi les principales bactéries de cette flore pathogène on cite : *Salmonella* ; *Bacillus* ; *Staphylococcus*...

➤ **Flore d'altération**

Elle entraîne la dégradation des composants du lait cru tels que les lipides et les protéines, ce qui peut engendrer des défauts sensoriels au niveau du goût, de l'arôme, de l'apparence et de la texture, tout en réduisant la durée de conservation du produit (Beuvier et Feutry, 2005). Les principaux groupes d'altération sont : *Klebsiella*, *Pseudomonas*, entérobactéries, *Clostridium* spp (Valérie et al., 2002).

CHAPITRE III

Les facteurs influençant la formation des biofilms

La formation d'un biofilm est un processus complexe qui est influencé par divers facteurs, tels que les propriétés du substrat sur lequel les bactéries s'attachent, les caractéristiques du milieu environnant et les propriétés de surface des cellules impliquées (**Donlan, 2002**).

1. Caractéristique de la surface :

Ces caractéristiques incluent la rugosité de la surface ; propriétés physico-chimiques de la surface et la présence de film protéique.

1.1 Rugosité de la surface :

L'effet de la rugosité de surface sur l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm a fait l'objet de nombreuses études. Une surface rugueuse offre une plus grande surface disponible pour l'attachement bactérien et sert de support pour favoriser l'adhérence (**Yoda et al., 2014**). Par ailleurs, les surfaces rugueuses peuvent offrir une protection supplémentaire aux bactéries contre les forces de cisaillement (**Bollen et al., 1996**). En conséquence, il est largement accepté que l'augmentation de la rugosité de surface conduit à une adhérence bactérienne et à une formation de biofilm accrues, ce qui rend les bactéries plus résistantes au détachement (**Yao et al., 2020 ; Yu et al., 2016 ; Xing et al., 2015**).

1.2 Propriétés physico-chimiques de la surface :

Les propriétés physico-chimiques de la surface jouent un rôle crucial dans le taux et l'étendue de l'attachement des micro-organismes. Les surfaces hydrophobes et non polarisées, telles que le téflon ou d'autres matières plastiques, favorisent une fixation plus facile des micro-organismes par rapport aux surfaces hydrophiles comme le verre ou les métaux. Les cellules sont capables de surmonter les forces de répulsion exercées par le substrat grâce à des interactions hydrophobes (**Bendinger et al., 2003**).

1.3 Présence de film protéique sur la surface :

La présence d'un polymère sur un matériau altère les propriétés physico-chimiques de sa surface, ce qui a une incidence directe sur l'attachement des bactéries à ce matériau.

Par exemple, la présence préalable d'un film protéique tel que le sang, les larmes, l'urine ou la salive sur un biomatériau influence l'attachement des bactéries à sa surface et favorise la formation du biofilm (**Mittelman, 1996**).

2. Caractéristiques du milieu

Parmi les facteurs du milieu qui ont une large influence sur la formation des biofilms on peut citer les facteurs suivants :

- **La température** : En 1998, **Smoot** et **Pierson** ont démontré une corrélation entre la diminution de la température de croissance et l'augmentation de l'hydrophobicité. Il a également été constaté que l'hydrophobicité influe sur l'activité métabolique et enzymatique des bactéries (**Dumas, 2007**). La température de croissance peut influencer de manière significative la mobilité électro-phorétique des cellules et la production de flagelles, ce qui à son tour peut avoir un impact sur l'adhésion (**Bellifa Samia, 2014**).
- **Le pH** du milieu environnant peut altérer la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides en modifiant les équilibres d'ionisation des groupements fonctionnels exposés, conformément à leurs valeurs de pKa (**Bellifa samia, 2014**). Cela peut entraîner une diminution ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives qui peuvent être défavorables à l'adhésion des microorganismes (**Boutaleb, 2007**).
- **Concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques.**
- **Les sources de carbone disponible** : elles ont une influence sur la formation et la maturation d'un biofilm (**Martinez, 2007**).
- **Les concentrations en nutriments** : La formation d'un biofilm dans un environnement statique requiert une concentration élevée de nutriments, contrairement à un environnement hydrodynamique où cette concentration élevée n'est pas nécessaire (**Spormann, 2008**).
- **Hydrodynamique du fluide** : La localisation du matériau dans un fluide joue un rôle crucial dans son exposition aux turbulences. Les zones de fixation, situées à l'écart des flux laminaires et présentant une turbulence minimale, sont les endroits privilégiés où les micro-organismes peuvent se fixer plus facilement sur une surface, étant moins soumis aux forces du fluide (**Donlan, 2002**).

3. Caractéristiques des microorganismes

L'hydrophobicité de la surface cellulaire, la présence de fimbriae et de flagelles, ainsi que la production d'exopolysaccharides jouent un rôle dans l'attachement des bactéries à une surface. La plupart des bactéries ont une charge négative et des zones hydrophobes à leur surface. Cette hydrophobicité influence l'attachement des bactéries à une surface, où les liaisons hydrophobes

deviennent plus importantes lorsque les surfaces sont moins polarisées (**Liesse, 2012**).

En règle générale, les bactéries qui possèdent des caractéristiques hydrophobes – celles ayant des caractéristiques hydrophiles ont tendance à privilégier les surfaces hydrophiles (**Mitik-Dineva et al., 2009**). Des recherches ont révélé que l'adhérence des bactéries est davantage influencée par les matériaux dotés de surfaces hydrophobes que par l'hydrophobicité de la surface bactérienne elle-même (**Katsikogianni et Missirlis, 2004**).

La formation d'une liaison stable avec la surface est facilitée par la présence de structures adhésives telles que des filaments adhésifs (fimbriae, pili) ou d'autres composants non filamenteux tels que les EPS et les capsules (**Perrin, 2009**). La capacité des microorganismes à coloniser les surfaces peut varier considérablement, même au sein d'une même espèce microbienne (**Kukavica-Ibrulj, 2007**).

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

1. Origine des souches

Dans le présent travail, 3 souches (lamaabe4-75 ; lamaabe4-63 et lamaabe4-90) sont sélectionnées pour faire l'objet de cette étude. Ces souches appartenant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées et caractérisées dans une étude précédente (**Cherif-Antar et al., 2016**). Elles ont été isolées à partir des chaînes de production de lait cru plus précisément des lignes pré et post-pasteurisation et après l'application du protocole de nettoyage en place. L'identification moléculaire des souches a été réalisée par la technique Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR), Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) et le séquençage de l'ADNr 16s. La capacité des souches à former le biofilm *in vitro* a également été évaluée par différentes techniques. Elles ont montré une bonne aptitude à produire des biofilms par différentes techniques sur différentes surfaces solides.

La présente étude a été menée au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) et le laboratoire de microbiologie à l'Institut des Sciences et Techniques Appliquées (ISTA), Université de Tlemcen.

2. Revivification des souches

Les souches sélectionnées pour faire l'objet de ce travail étaient conservées à -80°C. Pour les revivifier, une petite fraction de la culture de glycérol à -80°C de chaque souche est transférée dans 5 ml de bouillon cœur-cerveau (BHIB) (**Fluka, fabriqué en Inde**) puis incubée à 37°C pendant 18 à 24h. Après l'incubation, les suspensions bactériennes sont homogénéisées au vortex puisensemencées sur la gélose Mac Conkey (**Fluka, fabriqué en Inde**). Les boîtes sont incubées à 37°C pour une durée de 24h.

3. Observation microscopique

Afin de vérifier la pureté des souches, une observation microscopique est réalisée. Des frottis bactériens sont préparés pour chaque souche de *Klebsiella pneumoniae* puis colorés au bleu de méthylène.

4. Conservation des souches

Deux techniques de conservation sont appliquées pour nos souches à savoir :

4.1 Conservation à court terme

Cette technique consiste à ensemencer une colonie de la souche de *K.pneumoniae* après revivification sur la gélose inclinée ensuite incubée à 37°C pendant 24h. Après l'incubation, les tubes sont placés au réfrigérateur à 4°C, pour une durée de 20 jours.

4.2 Conservation à long terme

Ce type de conservation se fait à -80°C. Pour cela, 3 ml du milieu BHIB (**Fluka, fabriqué en Inde**) est ensemencé et incubé à 37°C pendant 24 h. Un volume de 1 ml de chaque suspension est centrifugé à 13200 rpm pendant 2 min. Le surnageant est éliminé et le culot est additionné de 500 µl de bouillon BHI stérile et de 500 µl de glycérol stérile à une concentration finale de glycérol à 50% (marque : Merck ; pays producteur : Allemagne) en tant qu'agent cryo-protecteur.

5. Effet de la température sur la formation de biofilm par *K.pneumoniae*

5.1 Préparation de la suspension bactérienne

Une colonie de chaque souche à étudier issue de la culture bactérienne revivifiée est transférée dans un bouillon BHI et incubée à 37°C pendant une nuit puis ajustée à une concentration finale de $\approx 10^8$ ufc/ml.

5.2 Formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

5.2.1 Protocole

Un total de 3 souches de *K.pneumoniae* est sélectionné pour étudier l'effet de la température sur leur capacité de formation de biofilm. Pour cela, 3 températures souvent rencontrées dans l'industrie laitière sont choisies à savoir 20, 37 et 55°C.

La formation de biofilm est réalisée sur les microplaques de titration à 96 puits. Pour chaque souche, trois puits de la microplaque de titration sont inoculés indépendamment avec 10 µl de la suspension bactérienne additionnée de glucose à une concentration finale de 0,25 % (p/v) pour une croissance bactérienne optimale. La concentration cellulaire est d'environ 10^8 ufc/ml. Par la suite, les puits sont remplis avec 200 µl du même milieu stérile. Les microplaques sont incubées en aérobiose pendant 2, 4, 6 et 24 h à 20, 37 et 55°C. Les puits de contrôle négatif sont remplis uniquement avec le milieu de culture. Pour chaque souche la technique est réalisée en triplicata.

5.2.2 Quantification des biofilms formés

Pour quantifier le biofilm formé, les étapes suivantes sont appliquées : le contenu de chaque puits jeté pour éliminer les cellules planctoniques, puis lavé deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS).

Les microplaques de titration sont ensuite séchées à température ambiante pendant 15 minutes. Les puits des microplaques sont remplis avec 200 µl du cristal violet à 0,1% (p/v) pendant 15 minutes. L'excès de colorant est éliminé et les microplaques sont rincées avec de l'eau distillée stérile. Un séchage à l'air est effectué par la suite. L'adhérence des cellules et par conséquent la formation de biofilm bactériennes est mesurée par l'absorbance à 596 nm (OD_{596}) à l'aide d'un lecteur de microplaque de titration automatique (BioTek ELx808, fabrique en U.S.A) après solubilisation du colorant avec 150 µl d'une solution d'acide acétique à 33 %.

Troisième partie : Résultats et discussion

La présente étude s'est concentrée sur l'impact des températures rencontrées dans le domaine laitier sur la formation de biofilm par des souches de *Klebsiella pneumoniae* pendant différentes périodes d'incubation à savoir 2, 4, 6 et 24h.

1. Vérification de la pureté des souches étudiées :

Les souches qui ont fait l'objet de la présente étude étaient conservées à -80°C. Pour s'assurer de leur pureté, un ensemencement est réalisé sur le milieu Mac Conkey (Figure 6) et une observation microscopique après coloration simple (figure7) montrant clairement la pureté des souches.

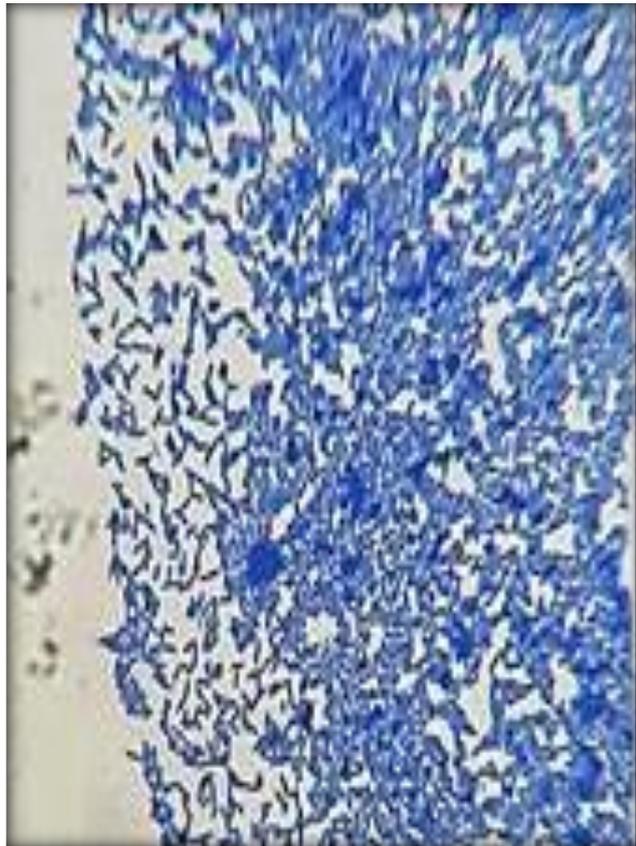


Figure 6 : ensemencement des souches *k.pneumoniae* sur gélose MacConkey

Figure 7: observation microscopique de souche *k.pneumonia* Grossissement100 (Originale).

2. Effet de la température sur la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* :

Afin d'atteindre l'objectif fixé, trois températures couramment rencontrées dans l'industrie laitière ont été choisies à savoir 20, 37 et 55°C. Les biofilms formés à chaque température sélectionnée après différents temps d'incubation (2, 4, 6 et 24h) ont été évalués par la mesure de la DO à 596nm après une coloration au cristal violet. Les résultats ont révélé un effet significatif de la température sur la formation de biofilm.

2.1 Effet de la température sur la formation de biofilm par la souche *K.pneumoniae* lamaabe4-75 :

La formation de biofilm par cette souche sous trois températures différentes comme indiqué dans la figure 8 a montré que la température testée 37°C a favorisé la formation de biofilm avec la valeur maximale enregistrée obtenue après 24H d'incubation et qui était de 1,48 nm qui dépassent celle du témoin par 0,67nm (figure 8, B) 0,81nm. A 20°C, nous avons obtenu des valeurs de DO qui variaient de 0,31 et 0,47nm (figure 8, A), la valeur minimale était obtenue après 2h d'incubation et qui était de 0,31nm, ainsi que la valeur maximale était obtenue après 24h d'incubation. Les résultats obtenus ont indiqué que la température 55°C n'a pas favorisé la formation de biofilm car la valeur de DO enregistrée après 24H d'incubation était inférieure à celle obtenue à 37°C pendant la même période et qui était de 0,86nm (figure 8, C).

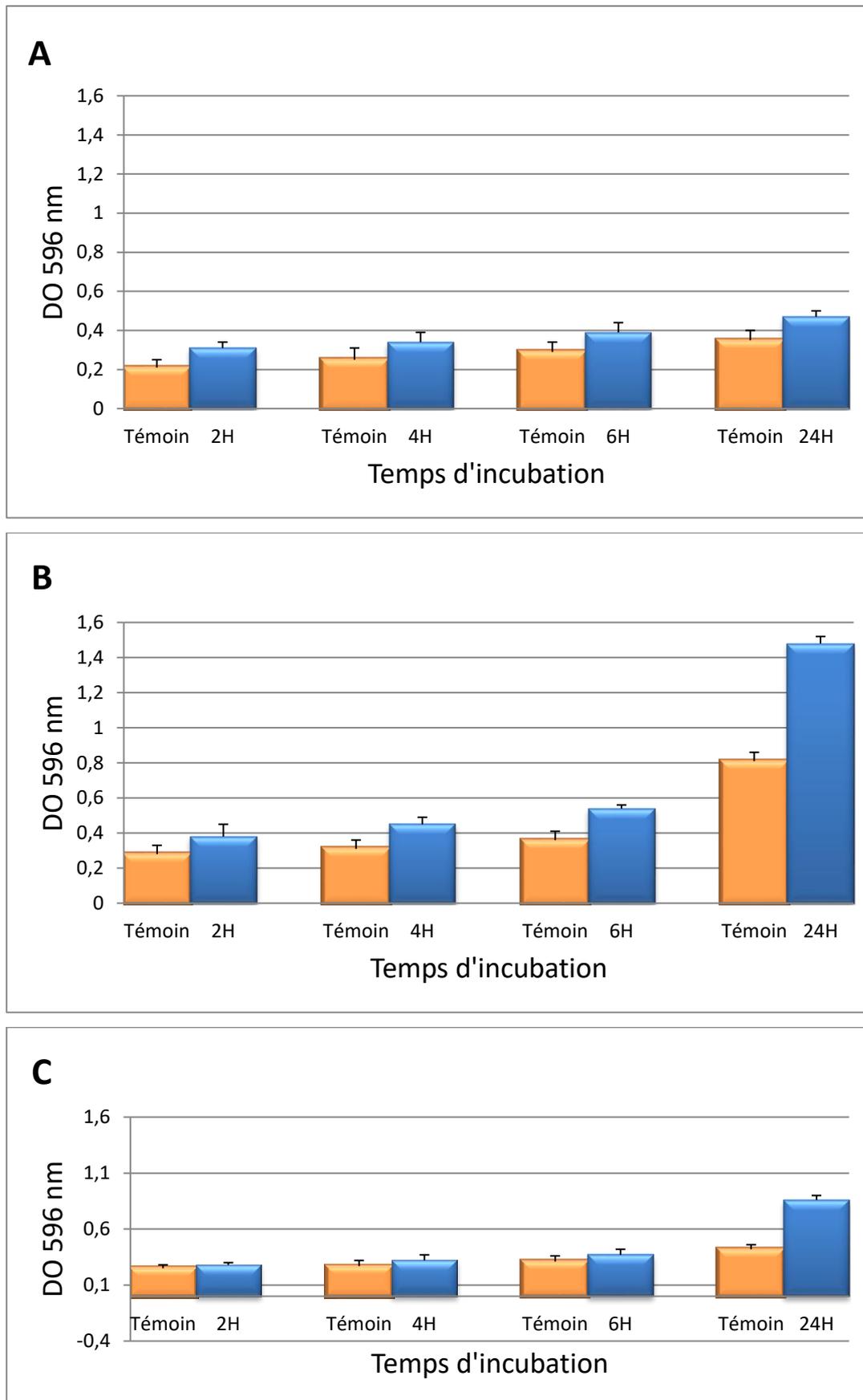


Figure 8 : quantification du biofilm formée par la souche 1 "lamaab75"(A) : la souche 1 « lamaabe4-75 » incubée à 20°C ; (B) : la souche 1 à 37°C ; (C) : la souche 1 à 55°C.

2.2 Effet de la température sur la formation de biofilm par la souche *K.pneumoniae* lamaabe4-63 :

Les résultats enregistrés pour la souche lamaabe4-63 ont montré une différence dans les valeurs DO mesurés après chaque durée d'incubation pour les trois températures testées tout en soulignant l'effet significatif de la température 37°C sur la formation de biofilm par rapport aux autres températures testées. A 37°C, le biofilm formé était plus important que celui formé à 20°C et /ou à 55°C avec une valeur de 1.33 nm après 24h, tandis que la valeur du contrôle négatif c'était 0.87nm (figure9, B). A 20°C, les valeurs variaient de 0,27 à 0,33 nm pendant 2 et 24h, respectivement. Les valeurs enregistrées à 55°C se rapprochent de celles obtenues à 20°C comme indiqué dans la figure 9 .

Ces résultats montrent clairement une augmentation du biofilm formé par cette souche en fonction du temps ; avec une température optimale du croissance de 37°C.

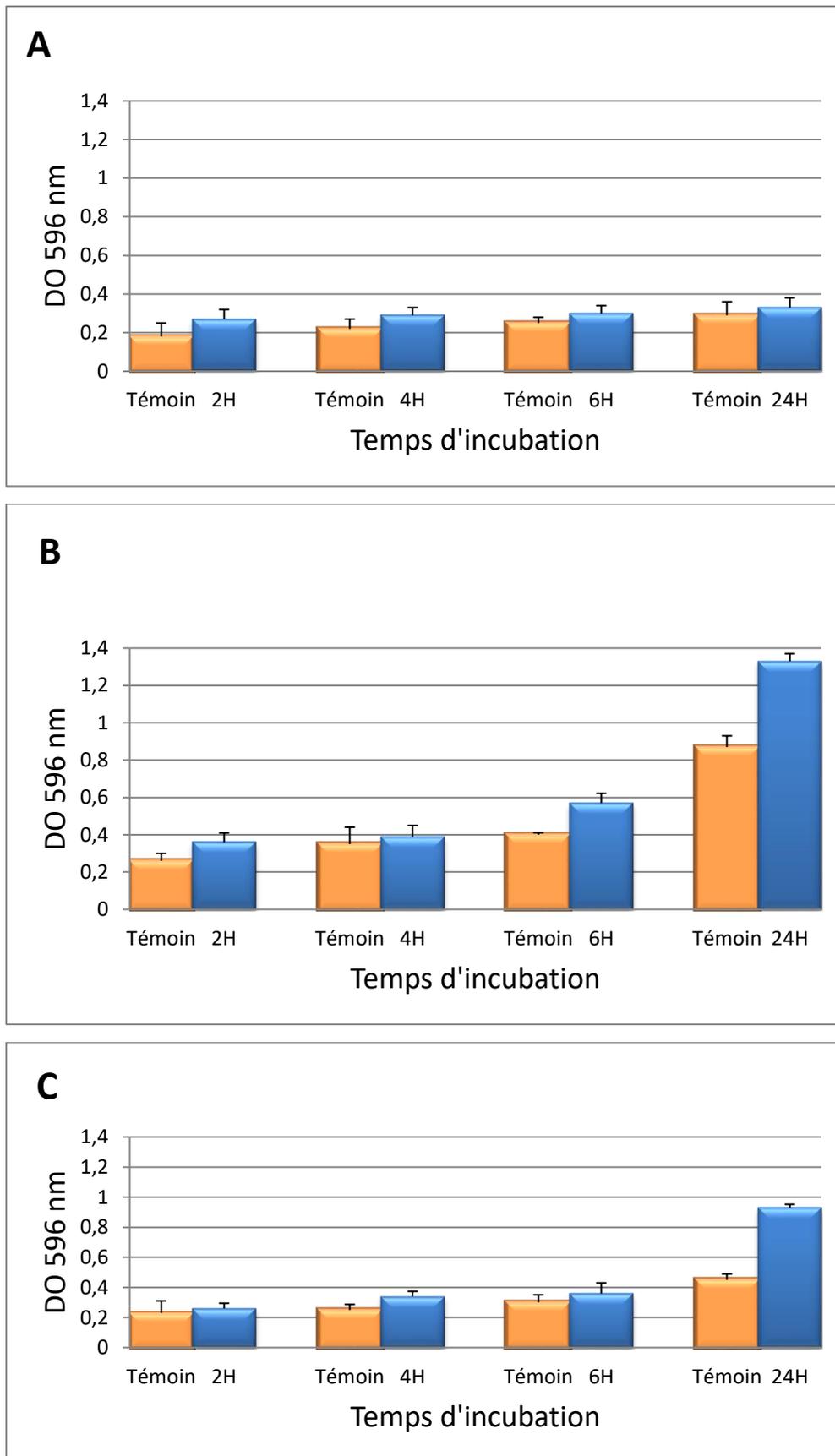


Figure 9: quantification du biofilm formée par la souche 2 "lamaabe4-63". (A) : la souche 2 incuée à 20°C ; (B) à 37°C ; (C) à 55°C

2.3 Effet de la température sur la formation de biofilm par la souche *K.pneumoniae* lamaabe4-90 :

Les valeurs mentionnées indiquent que la formation de biofilm par la troisième souche étudiée était également favorisée par la température de 37°C par rapport aux deux autres températures testées avec un taux croissant en fonction de la durée d'incubation pour atteindre une valeur de 1,58 nm enregistré après 24h d'incubation qui dépassent celle du témoin par 0.85nm, et celles obtenues après 20 et 55°C par 1.1nm et 0.46nm, respectivement (figure10, B). Pour 20 et 55°C, les valeurs de DO obtenues variaient en fonction des temps d'incubation, allant de 0,33 à 0,48 nm et de 0,31 à 1,12 nm, respectivement (figure10).

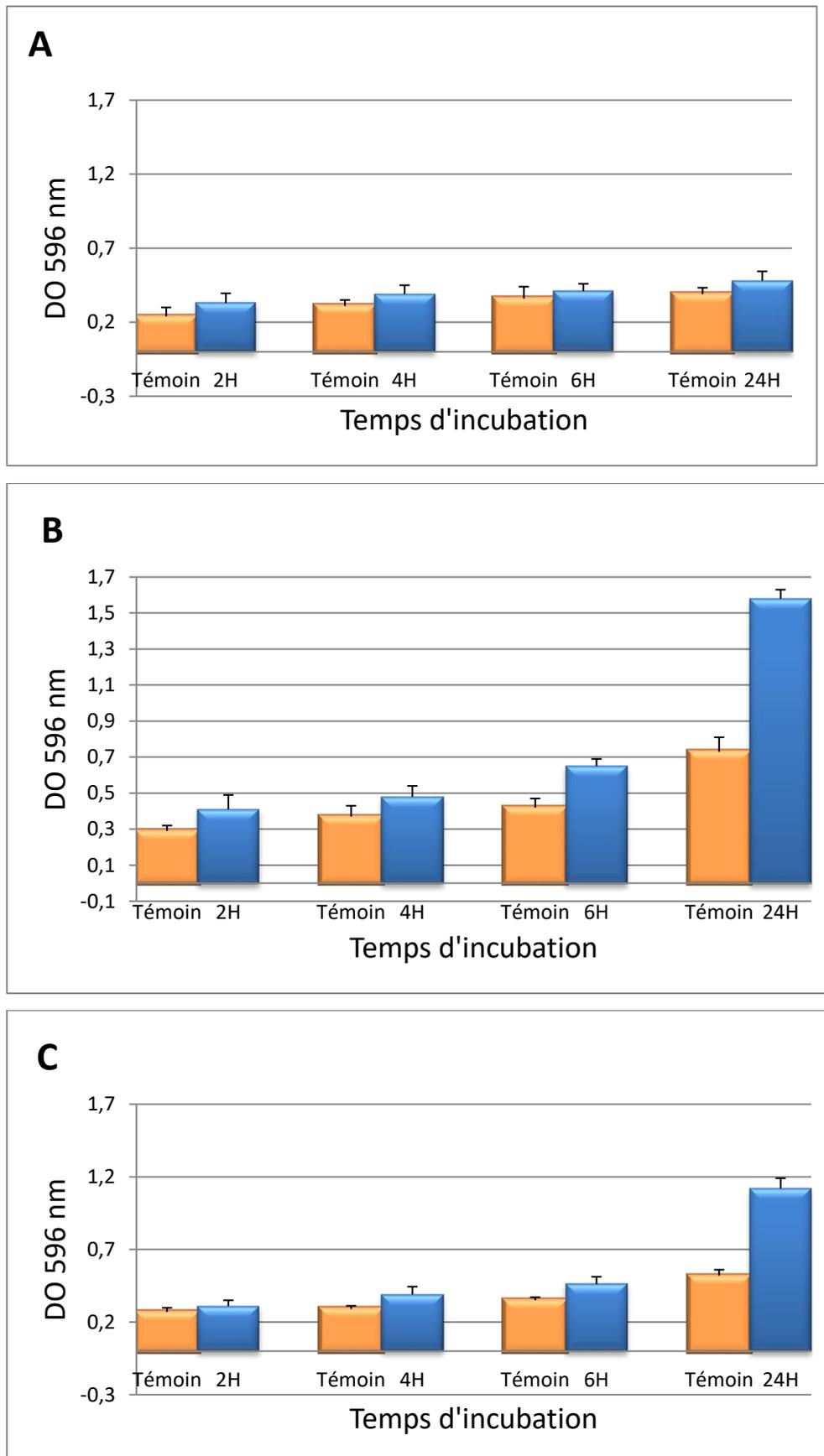


Figure 10: quantification du biofilm formée par la souche 3 "lamaabe4-90". (A) : la souche 3 à 20°C ; (B) à 37°C ; (C) à 55°C

L'ensemble de ces résultats ont permis de soulever les différences suivantes pour les souches de *K.pneumoniae* étudiées. Quand les souches sont mises à 20°C, les valeurs indiquant le biofilm formé étaient croissantes en fonction du temps avec des valeurs légèrement différentes dont la plus grande valeur enregistrée était celle de la souche lamaabe4-90 (0,48 nm) après 24h alors que les valeurs (0,47 nm) Et (0,33 nm) étaient obtenues par les souches lamaabe4-75 et lamaabe4-63, respectivement (**Figure 11**).

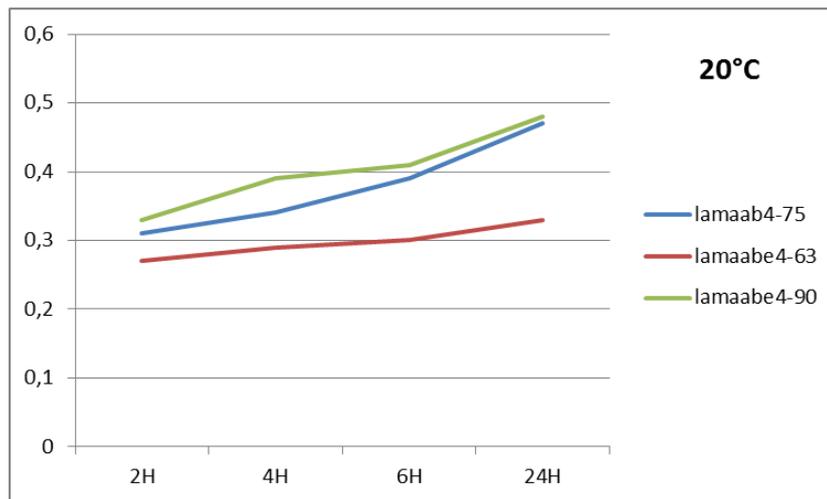


Figure 11 : Cinétique de formation du biofilm par les 3 souches par rapport au température 20°C en fonction du temps

Lorsque la température d'incubation était fixée à 37°C, la même souche a donné une plus grande valeur (DO=1,58 nm) montant l'augmentation de formation de biofilm après 24h d'incubation dépassant celle obtenue à 20°C par 1,1 nm et par rapport aux autres souches (**Figure 12**).

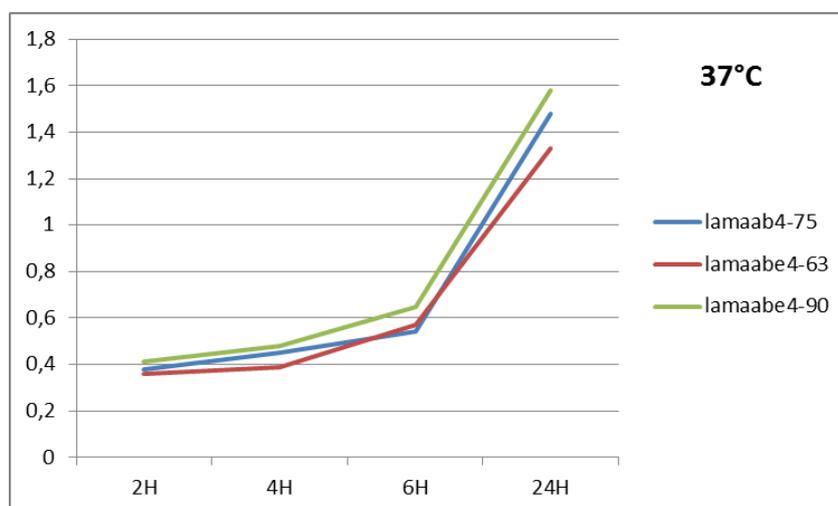


Figure 12: Cinétique de formation du biofilm par les 3 souches par rapport au température 37°C en fonction du temps

étaient croissantes en fonction du temps avec des valeurs légèrement différentes dont la plus grande valeur enregistrée était celle de la souche lamaabe4-90 (1,12 nm) après 24h d'incubation moins que celle à 37°C par (0,46 nm) et plus que celle obtenus à 20°C par (0,64 nm) par rapport aux autres souches (**Figure13**).

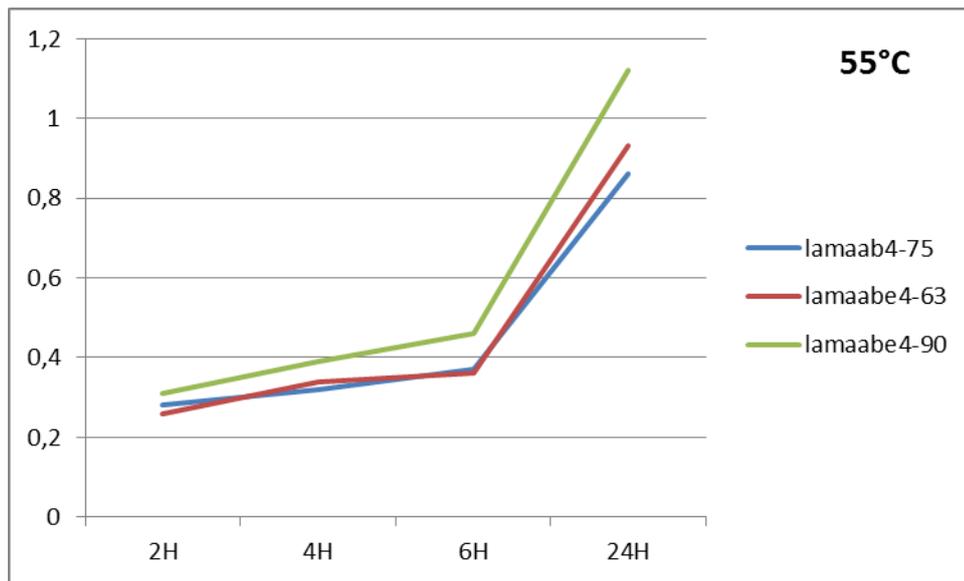


Figure 13: Cinétique de formation du biofilm par les 3 souches par rapport au température 55°C en fonction du temps

Discussion :

La présente étude a visé d'évaluer l'effet de la température sur la formation de biofilm par des souches de *K.pneumoniae*. Ces souches ont été isolées des lignes post pasteurisation de lait cru et après l'application de nettoyage en place. L'évaluation de leur capacité à adhérer et former des biofilms par différentes techniques et sur différentes surfaces a été effectué dans une études antérieure (**Cherif-Antar et al., 2016**).

Les biofilms bactériens peuvent être définis comme des communautés microbiennes adhérant aux surfaces abiotiques et biotiques et formant un mode de croissance sécurisé dans une matrice extracellulaire (**Costerton et al., 1999**).

On estime que jusqu'à 80 % des bactéries sur Terre vivent dans des biofilms, qui offrent une protection contre les stress environnementaux, par exemple la chaleur et la dessiccation, et les traitements antimicrobiens tel que les antibiotiques et les désinfectants (**Sturtevant et al., 2015**).

Les biofilms sont particulièrement importants dans l'industrie alimentaire, car ils fournissent une contamination croisée et post-traitement persistante dans l'environnement de la transformation des aliments. L'apparition de biofilms peut réduire la durée de conservation des aliments et même des risques importants pour la sécurité alimentaire.

L'impact des facteurs environnementaux sur la croissance bactérienne est largement étudié, mais seulement peu de choses sont connues sur la façon dont ces facteurs influencent la formation de biofilms bactériens.

La formation de ces biofilms est l'une des réponses bactériennes au stress dans des conditions environnementales instables (**Toyofuku et al., 2016**).

La capacité des micro-organismes pathogènes et/ou d'altération à former des biofilms en industrie alimentaire est généralement testée à un niveau optimal de conditions de croissance, c'est-à-dire à 37°C. Il est évident que la température est l'un des facteurs les plus importants qui affectent la croissance bactérienne et par conséquent le développement des biofilms.

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* qui ont fait l'objet de cette étude, ont formé plus de biofilms à 37°C. La formation de biofilm a diminué lorsque l'incubation est faite à 20 et 55°C. Cela indique que la température optimale de croissance de cette bactérie a favorisé le mieux la formation de biofilm sachant que la majorité des agents pathogènes sont mésophiles et poussent bien à des températures optimales comprises entre 25 °C et 40 °C (**Mizan et al., 2018**).

Cependant, dans un environnement alimentaire, il est important de savoir si les bactéries peuvent former des biofilms à des températures non optimales, comme à la température de congélation (-18°C) ou environnements de traitement réfrigérés (10–15°C). La température optimale pour la formation de biofilm bactérien s'est avérée dépendante de la souche (**Sizova et al., 2012**) ce qui est en accord avec nos résultats car les souches de *K.pneumoniae* étudiées ont donné un meilleur résultat à 37°C, leur température optimale.

Une étude menée par **Alotaibi** et ses collaborateurs en 2021 a indiqué que la production de biofilm par *K.pneumoniae* était maximale à 40 °C, suivi de 37 °C, alors que l'épaisseur du biofilm était significativement réduite à 25°C et 50°C. La production maximale de biofilms à 40°C pourrait suggérer que cette température est une température idéale pour le développement du biofilm par des souches de *K.pneumoniae*.

Il a également été rapporté que *Pseudomonas putida* tolèrent des températures de 40°C Comparées 30°C par amélioration de la production de biofilm, suggérant un processus de régulation avec un multi-niveau complexe dans lequel de nombreux gènes différents sont impliqués (**Srivastava et al., 2008**).

Une autre étude réalisée par **Bonaventure** et al. (2007) a montré que *Stenotrophomonas maltophilia* ont la capacité de former un biofilm à une température ambiante de 32°C et 37°C. Cela a été interprété comme suggérant qu'une croissance bactérienne plus lente pourrait conduire à l'absorbance plus faible obtenue à température ambiante. De même, la diminution de biofilm par les trois souches de *K. pneumoniae* à 20°C par rapport à 37°C pourrait également être interprété comme étant un résultat des croissance bactérienne lente à 20°C (**Hošťacká et al., 2010**).

Des températures plus extrêmes telles que 50°C pourraient affecter négativement la formation de biofilm en inhibant et/ en ralentissant la croissance. Une étude de la température sur les propriétés polymériques et mécaniques du biofilm de *Staphylococcus epidermidis* a montré que la morphologie, la viabilité cellulaire et les caractéristiques mécaniques des biofilms bactériens peuvent être affectés par des températures plus élevées qui peuvent générer une diminution remarquable de la limite d'élasticité et de la petite déformation du biofilm, suggérant qu'une température élevée peut réduire l'intégrité du biofilm (**Pavlovsky et al., 2015 ; Rühs et al., 2013**).

Les travaux de **Tomaras et al., (2003)** ont montré qu'une souche sauvage d'*A. baumannii* était capable de produire plus de biofilm à une température de 30°C qu'à 37°C. Ce phénomène

est aussi observé chez d'autres espèces bactériennes tell *Hafnia alvei*, un pathogène opportuniste de l'homme et de l'animal est considérablement accéléré à 25°C qu'à 37°C (Vivas *et al.*, 2008). Par contre Miao *et al.*, 2009 ont indiqué que L'environnement optimal pour la formation de biofilm des souches de *S. aureus* alimentaire était de 37 °C. Cette étude a montré que Le biofilm de *S. aureus* était sensible à diverses conditions de température.

Dans une étude antérieure, pour différents sérotypes de Salmonella incluant *S. Kottbus*, *S. meleagridis*, *S. derby*, *S. agona*, *S. Kinston*, *S. calabar*, *S. senftenberg* et *S. Typhimurium*, la formation de biofilms a augmenté à des températures comprises entre 25 et 42°C) mais tout en indiquant que la température optimale était 37°C (Yin *et al.*, 2018). Parmi différents sérotypes de Salmonella, il n'y avait pas de différences sur la formation du biofilm sauf *S. Typhimurium*. Pendant une température plus basse d'incubation la formation de biofilm est diminuée lors de la transformation de la viande bovine sur les surfaces en contracter avec Salmonella (Lianou *et Koutsoumanis*, 2012 ; Yin *et al.*, 2018).

De même, remarqué que des températures plus élevées (25 à 37°C) induisaient à une formation de biofilm plus fort par *V. parahaemolyticus* que 4 et 10°C, ce qui a entraîné la fixation de bactéries en monocouches (Han *et al.*, 2016).

La température d'incubation peut affecter de nombreux aspects qui modulent l'attachement cellulaire et la formation de biofilm, y compris la physiologie cellulaire, les propriétés de la surface cellulaire, la solubilité des composants/nutriments alimentaires, et les propriétés des polysaccharides extracellulaires, mais la réponse varie d'une espèce à l'autre (Yin *et al.*, 2018 ; Yang *et al.*, 2016 ; Pagán *et García-Gonzalo*, 2015 ; Karaca *et al.*, 2013).

Conclusion

Le biofilm est une communauté microbienne hautement structurée qui se forme sur diverses surfaces, y compris les surfaces en acier inoxydable couramment utilisées en industries alimentaires. C'est une source persistante de contamination qui menace l'industrie alimentaire incluant l'industrie laitière. La présence des biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments conduit à de sérieux économiques. Ils peuvent se composer de bactéries pathogènes et/ou d'altération provoquant la détérioration organoleptique et sensorielle des produits laitiers et par conséquent la réduction de leur durée de vie et peuvent être responsables de la transmission de maladie d'origine alimentaire. Plusieurs facteurs peuvent influencer la formation de biofilm, parmi lesquels la température est un important pour la croissance bactérienne et le développement de biofilm.

Klebsiella pneumoniae est une bactérie pathogène opportuniste souvent associée aux infections nosocomiales.

Comprendre ces facteurs est essentiel pour optimiser et/ou mettre en œuvre des stratégies de lutte contre ces biofilms menaçant de tel secteur.

L'objectif de notre étude était d'étudier l'effet de différentes températures couramment rencontrées en industrie laitière sur le développement de biofilm par des souches de *K. pneumoniae* isolée des lignes pré et post-pasteurisation du lait cru. Un total de 4 durées d'incubation a été envisagé à savoir 2,4,6 et 24h pour suivre la cinétique de formation de biofilm en fonction de la température.

Dans l'ensemble, nos résultats ont montré que les températures testées 20, 37 et 55°C ont favorisé une formation croissante de biofilm en fonction du temps. La température optimale de 37°C était la plus favorable pour le développement de biofilm par *K. pneumoniae* avec une valeurs élevée enregistrée après 24h d'incubation, tandis que les deux autres températures testées (20 et 55°C) ont indiqué des valeurs inférieures ce qui montre un ralentissement de croissance à ces températures. Ces résultats soulignent l'importance de la température sur le développement du biofilm bactérien.

Des études plus approfondies sont nécessaires pour comprendre mieux le phénomène de formation de biofilm en industries laitières tout en combinant plusieurs paramètres incluant le pH, la composition du lait, la rugosité de la surface, l'effet du fluide et même la composition variable des microflores bactériennes du lait pour reproduire un microenvironnement des lignes de production laitière.

Référence Bibliographique

B

Balestrino , D. , Ghigo , J.-M. , Charbonnel , N. , Haagensen , J. A. J. & Forestier , C. (2008) . The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides . *Environ Microbiol* 10 , 685-701.

Bachtarzi N., Amourache L., Dekhal G. 2015. Qualité é du lait cru destiné à la fabrication d'un fromage à pâte molle type camembert dans une laiterie de Constantine (Est Algérien). *International Journal of Innovation and Scientifique Research*. Vol 17. N°1, p34-42.

Belbel Z.2013. Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. Thèse de doctorat d'état, université Badji Mokhtar, Annaba, 146p.

Benmesmoudie L.G. (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Tlemcen .Thèse de Doctorat Université Abou Bekr Belkaïd ,Tlemcen ,84p.

Bellifa, S. 2014. Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella Pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

Bentiba K., Bentiba L. (2017). Evaluation de la capacité des souches de *Staphylococcus spp* à former des biofilms dans l'industrie laitière. Mémoire de master en analyses biochimique. Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, 72pp.

Bendinger B., Rijnaarts H.H., Altendorf K., and Zehnder A.J. 2003. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*. 59(11): 3973-3977.

Beuvier E. et Feutry F., 2005. Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage. Publication de l'INRAUnité de Recherches en Technologie et Analyses Laitières, 156, p. 1-6.

Branger A. (2007). Microbiochimie et alimentation .France : Educagri Editions, 2007 .343 p.

Brauge T. (2015). Étude des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms de *Listeria monocytogenes*.415p .Thèse de doctorat, école doctorale des Sciences de la Matière du

Rayonnement et de l'Environnement, Université Lille 1,2015

Brisabois A. Cazin I. Breuil J. Collatz E. Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des Salmonella Euro Surveill., 2 (1997), p. 181

C

Caiazza N.C, O'Toole G.A. (2004). SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*. 186:4476-85.

Characklis , W. (1973) . Attached microbial growths – II . Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res* .

CLAVE ELISABETH. 2013. Compte rendu 133 Bactériologie, Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique, 9p.

Clamerland J. (2018). Etude des biofilms dans les systèmes de filtration en industrie laitière: mécanisme de formation ,caractérisation stratégies de contrôle .Thèse de doctorat en science et technologie des aliments. Université LAVAL (Canada), 104pp

Costerton, J. W. (1995). Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15, 137-140.

Costerton, J. W., Geesey, G. G. & Cheng , K. J. (1978) . How bacteria stick. *Sci Am* 238,86-95.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.

D

Donlan ,RM .,Costerton, JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* ; 15: 167–193.

Donlan , R. M. (2002) . Biofilms : Microbial Life on Surfaces . *Emerg Infect Dis* 8 , 881-890.

Dumas C. 2007. Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.

E

El Khoury J. (2019). Etude de la résistance aux Béta-lactamines chez *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* par des approches omique . Thèse de doctorat en Microbiologie-Immunologie, Canada, 224p.

G

George M Garrity., Julia A Bell et Timothy G Lilburn. 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition. DOI: 10.1007/bergeysoutline 200405.

Goetz C., Dufour S., Aechambault M., Mlouin F., Jacques M. (2016). Importance et contrôle de biofilms formés par les Staphylocoques lors d'infections intramammaires chez la vache laitière. *Médecine vétérinaire*, 167, 7-8, 215-229.

Goller, C.C., Romeo, T. 2008. Environmental influences on biofilm development. *Current topics in Microbiology and Immunology*. 322, 37-66.

Gueye O. (2007). Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. Thèse de doctorat en pharmacie, Sénégal : Université cheikh Anta Diop de Dakar, 120p.

H

Heukelekian, H. & Heller, A. (1940). Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth1 *J Bacteriol* 40, 547-558.

Henrici , A. T. (1933) . Studies of Freshwater Bacteria : I. A Direct Microscopic Technique. *J Bacteriol* 25, 277-287.

Hošťacká A, (2010). Čížnár I and Štefkovičová M. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Official Journal of the Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic and Czechoslovak Society for Microbiology* 55: 75-78.

J

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006). The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. *The Enterobacteria* (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA: ASM Press.

Jones , H. C. , Roth , I. L. & Sanders , W. M. (1969) . Electron Microscopic Study of a Slime Layer . J Bacteriol 99 , 316-325 .

Joly B et Reynaud A., Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic., ed. LAVOISIER,(2002) pp 79,80,83.

K

Karaca, B., N. Akcelik, and M. Akcelik. 2013. Biofilm-producing abilities of Salmonella strains isolated from Turkey. Biologia 68:1-10.

Katsikogianni M and Missirlis Y. F. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteriamaterial interactions. European Cells & Materials, 8, 37–57.

Kukavica-Ibrulj, I. (2007). Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques l'adhésion bactérienne.36-38.

L

Le Minor L & Véron M. (1989). Bactériologie médicale, 2ème édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris 2,428-432.

Liesse Iyamba, J-M. 2012. Etude de l'interaction des souches cliniques de Staphylococcus aureus avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.

Lianou, A., and K. P. Koutsoumanis. 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of Salmonella enterica under various environmental conditions. Int. J. Food Microbiol. 160:171-178.

Lorite, G S., Rodrigues, C M., de Souza, A A., Kranz, C., Mizaikoff, B., Cotta, M A. (2011).The role of conditioning film formation and surface chemical changes on Xylella fastidiosa adhesion and biofilm evolution. Journal of Colloid and Interface Science ; 359(1) : 289–295.

M

Malek F. (2019). Bactéries sporulées et biofilm: un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombiné pasteurisé. *Canadian Journal of Microbiology*, 65 :1-16.

Martinez, L.R., Casadevall, A. 2007. *Cryptococcus neoformans* Biofilm Formation Depends on Surface Support and Carbon Source and Reduces Fungal Cell Susceptibility to Heat, Cold, and UV Light. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 73(14), 4592-4601.

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D., 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(1), 25.

Mizan, M. F. R., M. Ashrafudoulla, M. Sadekuzzaman, I. Kang, and S. D. Ha. 2018a. Effects of NaCl, glucose, and their combinations on biofilm formation on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) surfaces by *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control* 89:203-209.

Mitik-Dineva, Natasa, Wang, James, Truong, Vi Khanh, Stoddart, Paul, Malherbe, Mogha K.V., Shah N. P., Prajapati J. B., and Chaudhari A. R. 2014. Biofilm a threat to dairy industry. *Indian Journal of Dairy Science*, 67(6).

O

O'Toole, G., Kaplan, H., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.

P

Pavlovsky L. (2015), Sturtevant R, Younger J and Solomon M. Effects of temperature on the morphological, polymeric, and mechanical properties of *S. epidermidis* bacterial biofilms (2015) *Langmuir* 31: 2036-2042.

Perrin, C. (2009). Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'*Escherichia coli* K-12. L'Université Lyon I -Claude Bernard, France.

R

Richard Cl. Et Grimont F. Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia, In : LE MINOR (L). Bactériologie médicale, Paris : Flammarion, 1992, 427-31p. LECLERC H., Microbiologie générale, 2e édition, 1983, 95p.

S

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

Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.d., Costerton J.W., Davies D.G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*. 184: 1140-1154
Spiers A.J., Bohannon J., Gehrig S.M., Rainey P.B. (2003). Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology*. 50: 15-27.

Sekhri –Arafa N., Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences (2011).

Sissao M, Millogo V, Ouédraogo GA. 2015. Composition chimique et qualité bactériologique des laits crus et pasteurisés au Burkina Faso. *Afrique Science*, 11(1): 142– 154.

Sizova, Yu.V., Cherepakhina, I.Ya., Balakhnova, V.V., Burlakova, O.S., Sizova, E.V., Pomukhina, O.I., and Fetsailova, O.P. (2012). Variability of properties characterizing the ability of *V. cholerae* to survival in biofilm communities. *Problems of Particularly Dangerous Infections*, 3: 54–57.

Srivastava S., A. Yadav, K. Seem, S. Mishra, V. Chaudhary (2008)., and C. S. Nautiyal, “Effect of high temperature on *Pseudomonas putida* NBRI0987 biofilm formation and expression of stress sigma factor RpoS,” *Current Microbiology*, vol. 56, no. 5, pp. 453–457, 2008.

Sturtevant, R.A., Sharma, P., Pavlovsky, L., Elizabeth, J., Stewart, E.J., Solomon, M.J., and Younger, J.G. (2015). Thermal augmentation of vancomycin against staphylococcal biofilms. *Shock*, 44: 121–127.

T

Tomaras A.P., Dorsey C.W., Edelman R.E., Actis, L.A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*. 149: 3473-3484.

Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., and Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1): 7–12.

Tremblay Y.D.N., Hathroubi S., Jacques M. (2014). Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian journal of Veterinary Research*, 78 : 100-116.

Tremblay, Y. D. N., Hathroubi , S. & Jacques , M. (2014) . Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique . *Can J Vet Res* 78 , 110-116 .

V

Vivas J., Padilla D., Real F., Bravo J., Grasso V., Acosta F. (2008). Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Vet Microbiol*. 129: 150-5

W

Wei, Q. & Ma , L. Z. (2013) . Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa* . *Int J Mol Sci* 14 , 20983-21005 .

Wei , Q. & Ma , L. Z. (2013) . Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa* . *Int J Mol Sci* 14 , 20983-21005 .

Y

Yang, Y. S., M. Miks-Krajnik, Q. W. Zheng, S. B. Lee, S. C. Lee, and H. G. Yuk. 2016. Biofilm formation of *Salmonella Enteritidis* under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. *Food Microbiol*. 54:98-105.

Yin, B., L. Zhu, Y. Zhang, P. Dong, Y. Mao, R. Liang, L. Niu, and X. Luo. 2018. The Characterization of Biofilm Formation and Detection of Biofilm-Related Genes in Salmonella Isolated from Beef Processing Plants. Foodborne Pathog. Dis. 15:660-667.

Z

Zobell , C. E. (1943) . The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity1 . J Bacteriol 46 ,39-56 .

Zobell , C. E. (1943) . The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity1 J Bacteriol 46 , 39-56 .

Site web

Site web 1: <http://www.labomoderne.com/gamme.bactosonic-special-sonification-des-explants.SXB1400.html>

ملخص

الشريط الحيوي هو مجتمع متنوع من الكائنات الدقيقة الحية التي تمتلك القدرة على التثبيت على مختلف الأسطح، سواء كانت حية أو غير حية، مثل اللآلئة والمعدات المستخدمة في صناعة الألبان. هناك العديد من العوامل التي تساهم في تكوين الشريط الحيوي، بما في ذلك درجة الحرارة التي تلعب دورًا حاسمًا. من بين الكائنات الدقيقة الموجودة، تلعب بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* دورًا هامًا في تدهور جودة المنتجات. تهدف هذه الدراسة إلى دراسة تأثير درجة الحرارة على تكوين الشريط الحيوي من خلال سلالات معزولة من *Klebsiella pneumoniae* المأخوذة من خطوط إنتاج الحليب الخام، تحديدًا في الأقسام السابقة واللاحقة للتعقيم، بعد تطبيق بروتوكول التنظيف في المكان. قمنا بتقييم قدرة تكوين الشريط الحيوي باستخدام تقنية أطباق الميكروتيتير بـ 96 وحدة على ثلاث سلالات (lamaabe4-75، lamaabe4-63، و lamaabe4-90) في ثلاث درجات حرارة مختلفة (20 درجة مئوية، 37 درجة مئوية و 55 درجة مئوية) لمدة أربع فترات زمنية (2 ساعة، 4 ساعات، 6 ساعات و 24 ساعة). بعد قياس الكثافة البصرية (DO) لكل سلالة، لاحظنا أن سلالة lamaabe4-90 عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة تظهر أعلى نشاط في تكوين الشريط الحيوي بقيمة DO تبلغ 1.58 نانومتر.

الكلمات الرئيسية: كليبيلا نيومونيا، الشريط الحيوي، درجة الحرارة، مصنع الألبان.

Abstract

The biofilm is a heterogeneous community of microorganisms that have the ability to attach to different surfaces, whether living or inert, such as materials and equipment used in the dairy industry. Several factors contribute to the formation of this biofilm, with temperature playing a crucial role. Among the microorganisms present, the bacterium *Klebsiella pneumoniae*, an opportunistic pathogen, plays a significant role in the degradation of the organoleptic and sanitary quality of finished products. This study aims to examine the effect of temperature on biofilm formation by isolates of *Klebsiella pneumoniae* obtained from raw milk production lines, specifically the pre- and post-pasteurization sections, after the implementation of the cleaning-in-place protocol. We evaluated the biofilm formation capacity using the 96-well microtiter plate technique with three strains (lamaabe4-75, lamaabe4-63, and lamaabe4-90) at three different temperatures (20°C, 37°C, and 55°C) for four durations (2 hours, 4 hours, 6 hours, and 24 hours). After measuring the optical density (OD) of each strain, we found that the lamaabe4-90 strain at 37°C for 24 hours exhibited the highest biofilm-forming activity, with an OD of 1.58 nm.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, temperature, dairy industry.

Résumé

Le biofilm est une communauté hétérogène de micro-organismes ayant la capacité de se fixer sur différentes surfaces, qu'elles soient vivantes ou inertes, telles que les matériaux et les équipements utilisés dans l'industrie laitière. Plusieurs facteurs contribuent à la formation de ce biofilm, dont la température qui joue un rôle crucial. Parmi les micro-organismes présents, la bactérie *Klebsiella pneumoniae*, un pathogène opportuniste, joue un rôle prépondérant dans la dégradation de la qualité organoleptique et sanitaire des produits finis. Cette étude vise à examiner l'effet de la température sur la formation du biofilm par des souches isolées de *Klebsiella pneumoniae* provenant des lignes de production de lait cru, plus précisément des sections pré- et post-pasteurisation, après l'application du protocole de nettoyage en place. Nous avons évalué la capacité de formation du biofilm en utilisant la technique des microplaques de titration à 96 puits sur trois souches (lamaabe4-75, lamaabe4-63 et lamaabe4-90) à trois températures différentes (20°C, 37°C et 55°C) pendant quatre durées (2h, 4h, 6h et 24h). Après avoir mesuré la densité optique (DO) de chaque souche, nous avons constaté que la souche lamaabe4-90 à 37°C pendant 24 heures présentait la meilleure activité de formation de biofilm, avec une DO de 1,58 nm.

Mots clé : *klebsiella pneumonie*, biofilm, température, industrie laitière.