

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Aboubekr BELKAÏD Tlemcen



Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers

Département : Biologie

Laboratoire : Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité
biologique

Mémoire présenté par

HAFDI SARAH BOUCHRA

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

**Étude de la sensibilité de quelques souches bactériennes cliniques
à la gentamicine et à la ceftazidime et évaluation de leur capacité à
former des biofilms en cultures mono- et multi-espèces**

Soutenu le 30 /09/2026, devant le jury composé de :

Présidente	Pr. BOUCHERIT OTMANI Zahia	Université de Tlemcen
Encadrante	Dr. HASSAINE LAHFA Imane	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr. MEZOUAR Dounia	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2026 – 2027

الملخص

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم حساسية سلالات بكتيرية مختلفة تجاه المضادين الحيويين الجنتاميسين والسيفتازيديم، من خلال تحديد التركيز المثبط الأدنى (CMI)، باستخدام طريقة التخفيف المجهرى في الوسط السائل. كما تمت دراسة قدرة هذه السلالات على تكوين الأغشية الحيوية في ظروف الزرع أحادي النوع ومتعدد الأنواع، باستخدام طريقة التلوين بالبنفسج البلوري.

أظهرت النتائج تبايناً في حساسية السلالات البكتيرية للمضادات الحيوية حسب النوع البكتيري. تراوحت قيم التركيز المثبط الأدنى للجنتاميسين بين 0.125 و 32 µg/mL، حيث سُجلت أدنى قيمة (0.125 µg/mL) لدى سلالات *Pseudomonas stutzeri* و *Staphylococcus warneri* و *Staphylococcus epidermidis*، في حين بلغت أعلى قيمة (32 µg/mL) لدى *Sphingomonas paucimobilis*. أما بالنسبة للسيفتازيديم، فقد تراوحت القيم بين 0.25 و 1 µg/mL، مع تسجيل قيمة 0.25 µg/mL لدى *Pantoea spp.* و *P. stutzeri*، وقيمة 1 µg/mL لدى *S. paucimobilis* و *S. warneri* و *S. epidermidis*.

كما أظهرت دراسة تكوين الأغشية الحيوية اختلافاً في القدرة على تكوينها بين السلالات المدروسة. فقد أظهرت *S. paucimobilis* و *P. stutzeri* قدرة قوية على تكوين الأغشية الحيوية، بينما كانت القدرة ضعيفة لدى *Pantoea spp.* وفي الزرع متعدد الأنواع، أظهر المزيج المكوّن من *S. warneri* و *S. paucimobilis* قدرة متوسطة على تكوين الغشاء الحيوي، بقيمة كثافة ضوئية بلغت 0.558 عند 620 نانومتر.

تُبرز هذه النتائج أهمية التقييم المتزامن لحساسية البكتيريا للمضادات الحيوية وقدرتها على تكوين الأغشية الحيوية، بهدف تحسين توصيف سلوك السلالات البكتيرية المدروسة والمساهمة في فهم أفضل للعدوى المرتبطة بالأغشية الحيوية.

الكلمات المفتاحية: التركيز المثبط الأدنى، الجنتاميسين، السيفتازيديم، الأغشية الحيوية، الزرع أحادي النوع، الزرع متعدد الأنواع.

Résumé

Cette étude avait pour objectif d'évaluer la sensibilité de différentes souches bactériennes à deux antibiotiques, la gentamicine et la ceftazidime, par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide. Dans un second temps, la capacité des souches bactériennes à former des biofilms a été étudiée en conditions mono-espèce et multi-espèces, par la méthode de coloration au violet de cristal.

Les résultats ont montré une variabilité de la sensibilité aux antibiotiques selon l'espèce bactérienne. Les valeurs de CMI de la gentamicine variaient de 0,125 à 32 µg/mL. La valeur minimale (0,125 µg/mL) a été observée chez *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus warneri* et *Staphylococcus epidermidis*, tandis que la valeur maximale (32 µg/mL) a été enregistrée chez *Sphingomonas paucimobilis*. Pour la ceftazidime, les CMI variaient entre 0,25 et 1 µg/mL, avec une valeur de 0,25 µg/mL pour *Pantoea spp.* et *P. stutzeri*, et de 1 µg/mL pour *S. paucimobilis*, *S. warneri* et *S. epidermidis*.

L'étude de la formation des biofilms a également révélé une variabilité entre les souches étudiées. *S. epidermidis* et *P. stutzeri* ont présenté une forte capacité de formation de biofilm, tandis que *Pantoea spp.* et *S. paucimobilis* ont montré une faible capacité. En conditions multi-espèces, l'association de *S. warneri* et *S. paucimobilis* a présenté une capacité moyenne de formation de biofilm, avec une densité optique de 0,558 à 620 nm.

Ces résultats soulignent l'importance d'évaluer conjointement la sensibilité bactérienne aux antibiotiques et la capacité de formation de biofilms, afin de mieux caractériser le comportement des souches étudiées et de contribuer à une meilleure compréhension des infections associées aux biofilms.

Mots-clés : concentration minimale inhibitrice, gentamicine, ceftazidime, biofilm, mono-espèce, multi-espèces.

Abstract

This study aimed to evaluate the susceptibility of different bacterial strains to two antibiotics, gentamicin and ceftazidime, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the broth microdilution method. In a second step, the ability of the bacterial strains to form biofilms was investigated under mono-species and multi-species culture conditions using the crystal violet staining method.

The results showed variability in antibiotic susceptibility according to the bacterial species. Gentamicin MIC values ranged from 0.125 to 32 µg/mL. The lowest value (0.125 µg/mL) was observed in *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus epidermidis*, whereas the highest value (32 µg/mL) was recorded for *Sphingomonas paucimobilis*. For ceftazidime, MIC values ranged from 0.25 to 1 µg/mL, with a value of 0.25 µg/mL for *Pantoea spp.* and *P. stutzeri*, and 1 µg/mL for *S. paucimobilis*, *S. warneri* and *S. epidermidis*.

The study of biofilm formation also revealed variability among the bacterial strains. *S. epidermidis* and *P. stutzeri* showed a strong biofilm-forming capacity, whereas *Pantoea spp.* and *S. paucimobilis* exhibited a low capacity. Under multi-species conditions, the association of *S. warneri* and *S. paucimobilis* showed a moderate biofilm-forming capacity, with an optical density of 0.558 at 620 nm.

These findings highlight the importance of jointly assessing bacterial antibiotic susceptibility and biofilm-forming capacity in order to better characterize the behavior of the studied bacterial strains and contribute to a better understanding of biofilm-associated infections.

Keywords: minimum inhibitory concentration, gentamicin, ceftazidime, biofilm, mono-species, multi-species.

Dédicaces

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux. Louange à Allah, qui m'a guidée, accordé la patience, la force et la réussite tout au long de mon parcours universitaire et durant ces cinq années d'études.

À ma très chère mère, mon paradis sur terre, celle qui a toujours été mon plus grand soutien, mon refuge lorsque la fatigue ou le doute m'envahissaient. Merci, ma bienaimée, d'avoir toujours été présente à mes côtés, de m'avoir encouragée sans relâche et d'avoir été mon plus bel exemple de courage, de patience et de générosité. Sans toi, je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui.

À mon très cher père, la lumière de mon cœur. Merci pour la confiance que tu m'as toujours accordée, pour la liberté que tu m'as donnée afin de construire mon avenir et pour ton soutien indéfectible à chaque étape de ma vie. Cette confiance a été pour moi une véritable richesse dans les moments les plus difficiles. Je suis profondément fière de vous avoir comme parents. Qu'Allah vous préserve, vous accorde une longue vie et vous comble de santé et de bonheur.

À ma sœur, mon autre moitié, les mots ne suffisent pas à exprimer le bonheur que m'apporte ta présence. Tu as toujours été une sœur, une amie et une confidente. Merci d'avoir partagé avec moi les plus beaux comme les plus difficiles moments de ma vie. Je suis infiniment reconnaissante de t'avoir à mes côtés.

À toute ma famille, en particulier à mes **tantes Amina et Houria**, à **Habiba** ainsi qu'à ma cousine **Tema**, pour leur affection, leur présence et leurs précieux encouragements. Merci d'avoir été mon refuge lorsque le poids du monde semblait trop lourd à porter. Ainsi, mes chères cousines **Amina, Fatma, Khadija, Nawel, Maïssa et Hafsa**, je vous remercie également.

À ma meilleure amie Douaa, merci d'être ce repère précieux et cette épaule sur laquelle je peux toujours me reposer. Durant ces cinq années, notre amitié n'a cessé de grandir, portée par la sincérité de nos cœurs et la pureté de nos intentions. J'adresse également cette dédicace à mes chères amies **Douaa, Chaïma, Bisma, Nesrine, Ibtissam, Dalal, Samia, Assia et Hadjer**, en témoignage de mon affection, de ma gratitude et en remerciement pour leur présence, leur gentillesse et leur soutien. Enfin, je dédie ce travail à toutes les personnes qui ont cru en moi, m'ont soutenue et encouragée tout au long de ce parcours.

À vous tous, j'exprime ma plus profonde reconnaissance !

Remerciements

Je rends grâce à **Allah**, le Tout-Puissant, qui m'a guidée à chaque étape de mon parcours. C'est grâce à Sa volonté que j'ai trouvé la force dans les moments de doute, la patience face aux obstacles et l'endurance nécessaire pour mener ce travail à son terme. Sans Sa miséricorde et Sa lumière, rien de tout cela n'aurait été possible. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à **Madame Hassaine Lahfa Imane**, Maître de conférences classe B au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, qui a accepté d'encadrer ce travail. Je la remercie sincèrement pour sa disponibilité, sa patience, sa confiance, son écoute attentive, ainsi que pour la qualité de ses conseils, de ses remarques et de ses précieuses corrections. Son accompagnement, son exigence scientifique et son soutien constant ont été déterminants dans l'aboutissement de ce mémoire. Je lui adresse ma plus profonde reconnaissance pour tout ce qu'elle m'a appris et pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail.

Je tiens également à adresser mes plus sincères remerciements à **Madame Boucherit-Otmani Zahia**, Professeur au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, pour sa disponibilité tout au long de cette expérience, sa générosité, ses précieux conseils ainsi que pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury.

J'exprime également toute ma gratitude à **Monsieur Boucherit Kebir**, ancien Professeur à l'Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, pour sa présence, son intérêt, ses conseils avisés, ses précieuses corrections et ses remarques constructives qui ont grandement contribué à l'amélioration de ce travail.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à **Madame Mezouar Dounia**, Directrice du laboratoire, pour avoir accepté de faire partie du jury de ce travail. Je lui exprime ma profonde gratitude pour l'intérêt porté à mon étude ainsi que pour ses remarques et suggestions constructives.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à **M^{lle} Azzouzi Kawter**, **M^{lle} Mimoun Amira**, **M^{lle} Benattia Fatima Zohra** et **M^{lle} Laoudj Nadia**, doctorantes au laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (LapSab), pour leur disponibilité, leur patience, leur soutien constant, leurs

conseils avisés et leur précieuse aide tout au long de la réalisation des manipulations expérimentales. Leur accompagnement et leur esprit de collaboration ont été d'une grande valeur.

J'adresse également mes plus vifs remerciements aux ingénieures **Mme Fouzia et**

Mme Rachida, pour leur disponibilité, leur aide, leur gentillesse et leur soutien. Une pensée toute particulière est adressée à **Mme Fouzia**, dont la bienveillance, la patience et les encouragements m'ont profondément **marquée**. Sa présence et son aide précieuse ont rendu cette expérience de laboratoire plus enrichissante et plus agréable.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail et m'ont **soutenue** tout au long de ce parcours universitaire.

À toutes et à tous, j'adresse mes plus sincères remerciements !

Liste des figures

Figure N°1 : Étapes de formation du biofilm bactérien (**Ruixiang et al.,2022**)..... 3

Figure N°2 : Biomasses des biofilms mono et multi-espèces formés *in vitro* par les souches bactériennes quantifiées par la méthode de coloration au cristal violet.....15

Liste des tableaux

Tableau N°1: Identification des bactéries. 12

Tableau N°2: CMI des antibiotiques vis-à-vis des souches étudiées 13

SOMMAIRE

PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	1
DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES	7
1. Purification des bactéries	8
2. Identification des bactéries	8
3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques vis-à-vis des souches isolées	8
4. Évaluation de la capacité des souches co-isolées d'un même prélèvement à former <i>in vitro</i> des biofilms mono et multi-espèce	9
5. Quantification de la biomasse des biofilms formés <i>in vitro</i> par la coloration au Cristal violet	10
TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION	11
1. Identification des souches bactériennes	12
2. Évaluation de la capacité des souches co-isolées à former <i>in vitro</i> des biofilms mono- et multi-espèces	12
3. Concentrations minimales inhibitrices de la gentamicine et ceftazidime vis-à-vis des souches bactériennes étudiées	14
QUATRIÈME PARTIE :	
CONCLUSION	18
CINQUIÈME PARTIE RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES	21

Première partie

Synthèse bibliographique

Les infections associées aux soins constituent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale en raison de leur impact important sur la morbidité, la mortalité et la durée d'hospitalisation des patients. Selon l'enquête européenne de prévalence réalisée en 2022-2023, environ 7,1 % des patients hospitalisés contractent une infection associée aux soins, particulièrement dans les services à haut risque tels que les unités de réanimation et de chirurgie [(**Bourigault et al., 2018 ; ECDC, 2024**)].

L'environnement hospitalier constitue également un réservoir potentiel de microorganismes pouvant contribuer à la transmission des infections associées aux soins (**Cruz-López et al., 2023**).

Ces infections peuvent être liées aux patients hospitalisés eux-mêmes, mais également aux visiteurs ou au personnel exposés à l'environnement hospitalier, incluant l'eau et les surfaces partagées. La transmission peut se faire par différents moyens, principalement par contact direct, par contamination des mains du personnel soignant ou par exposition à des surfaces, objets et dispositifs médicaux contaminés, favorisant ainsi la propagation des microorganismes [(**Hassan et al., 2015**) ; (**Fijan et al., 2024**)]. Les surfaces hospitalières peuvent en outre favoriser la persistance de certains microorganismes, constituant ainsi un réservoir potentiel de contamination (**Schapira et al., 2024**).

Parmi les microorganismes responsables de ces infections, *Staphylococcus aureus* figure parmi les pathogènes fréquemment isolés, aux côtés des espèces du genre *Pseudomonas* et *Escherichia coli*, souvent associées à une résistance accrue aux antibiotiques. La capacité de ces bactéries à adhérer aux surfaces et aux dispositifs médicaux favorise leur persistance dans l'environnement hospitalier ainsi que la formation de biofilms, considérée comme un facteur important de tolérance aux traitements antimicrobiens et de persistance des infections [(**Saikeerthana et al., 2021**) ; (**Weinbsen & Inkster, 2021**)]. Les biofilms peuvent ainsi se développer sur différents types de dispositifs médicaux et contribuer à la persistance des microorganismes dans les infections associées aux soins (**Wang et al., 2024**). Ainsi, le biofilm est défini comme une communauté de microorganismes adhérant à des surfaces biotiques ou abiotiques et enveloppée dans une matrice extracellulaire composée essentiellement de polysaccharides, d'ADN extracellulaire, de protéines et d'autres biomolécules (**Karygianni et al., 2020 ; Zafer et al., 2024**). La formation des

biofilms se déroule en plusieurs étapes successives (**Figure N°1**). Les cellules bactériennes planctoniques migrent initialement vers une surface et s'y attachent de manière réversible sous l'effet d'interactions physico-chimiques. Après l'adhésion, les bactéries commencent à produire des composants de la matrice extracellulaire polymérique, qui renforcent leur fixation à la surface. Les bactéries prolifèrent ensuite progressivement et forment des microcolonies organisées, qui évoluent vers un biofilm mature caractérisé par une forte densité cellulaire et une organisation structurée. Enfin, certaines cellules peuvent se détacher du biofilm mature et coloniser de nouvelles surfaces, participant ainsi à la dissémination des microorganismes (Yajuan et al., 2022)

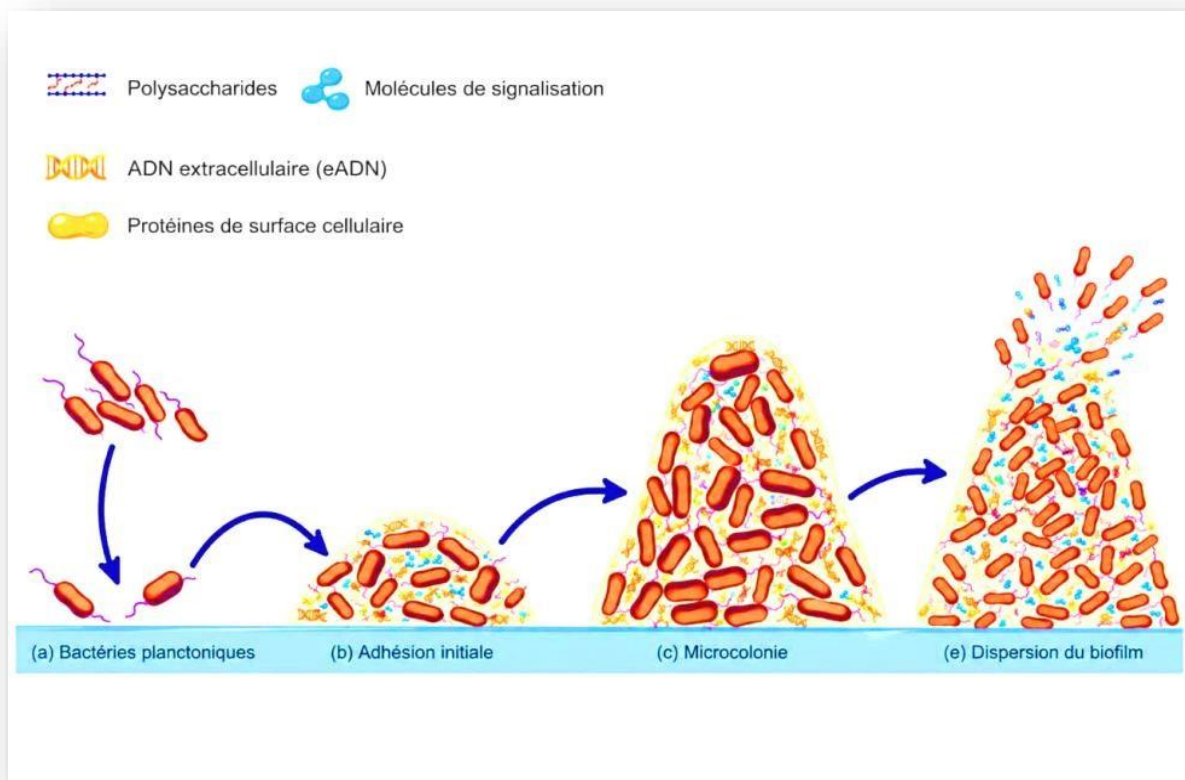


Figure N°1 : Étapes de formation du biofilm bactérien (Ruixiang et al., 2022).

La formation et la maturation des biofilms confèrent aux bactéries des propriétés favorisant leur persistance. Les bactéries organisées en biofilm présentent ainsi une tolérance accrue aux agents antimicrobiens par rapport aux cellules planctoniques.

Cette tolérance repose sur plusieurs mécanismes, notamment l'établissement de gradients de nutriments et d'oxygène au sein du biofilm, l'activation de réponses au stress, le ralentissement de la croissance bactérienne ainsi que la présence de cellules à faible activité métabolique [(**Stewart et al., 2019**) ; (**Zafer et al., 2024**)]. La matrice extracellulaire polymérique (EPS) joue également un rôle essentiel en formant une barrière protectrice pouvant limiter la diffusion de certains agents antimicrobiens et en contribuant au maintien de la stabilité du biofilm (**Hathroubi et al., 2020**). Par ailleurs, les bactéries localisées dans les régions profondes du biofilm sont exposées à de faibles concentrations en nutriments et en oxygène, ce qui peut entraîner un ralentissement de leur croissance. Cette faible activité métabolique peut ainsi diminuer l'efficacité de certains antibiotiques ciblant les cellules en multiplication active (**Beebout et al., 2021**).

Les biofilms peuvent être constitués d'une seule espèce bactérienne ou regrouper plusieurs espèces au sein d'une même communauté. Dans l'environnement hospitalier, les microorganismes peuvent coexister et former des biofilms multiespèces, également appelés biofilms mixtes. Ces communautés sont caractérisées par des interactions entre les différentes espèces présentes, qui peuvent être de nature coopérative ou compétitive et influencer leur croissance, leur organisation spatiale ainsi que les propriétés globales du biofilm [(**Luo et al., 2022**) ; (**Ouidir et al., 2022**)]. Ces interactions peuvent également modifier la réponse des microorganismes aux agents antimicrobiens et entraîner une tolérance différente de celle observée dans les biofilms mono-espèces (**Dittmer et al., 2023**). Elles peuvent ainsi favoriser la persistance des communautés bactériennes et compliquer leur élimination

(**Biswas et al., 2024**). L'étude des biofilms multi-espèces permet donc de mieux comprendre les interactions entre les microorganismes et les facteurs susceptibles de favoriser leur persistance dans différents contextes infectieux (**Kulshrestha et Gupta, 2022**).

Parmi les bactéries susceptibles d'être impliquées dans les infections associées aux soins, les staphylocoques occupent une place importante. *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* figurent parmi les principales espèces de staphylocoques impliquées dans les infections associées aux dispositifs médicaux, en particulier en raison de leur capacité à adhérer aux surfaces et à former des biofilms [(François et al., 2023) ; (Francis et al., 2023)]. Bien que *S. epidermidis* fasse partie de la flore cutanée normale, il constitue un pathogène opportuniste important dans les infections liées aux dispositifs médicaux, notamment grâce à sa capacité à former des biofilms sur les surfaces abiotiques (Daffinee et al., 2023). *Staphylococcus warneri* est également un staphylocoque à coagulase négative pouvant être associé à différentes infections, particulièrement chez les patients porteurs de dispositifs médicaux. Sa capacité à former des biofilms peut varier selon les souches étudiées, ce qui pourrait expliquer les différences de comportement observées entre les isolats [(Szcuka et al., 2016) ; (Ravaioli et al., 2024)].

Par ailleurs, *Pseudomonas stutzeri* possède des capacités d'adhésion et de formation de biofilm associées à la production de substances polymériques extracellulaires (Zhang et al., 2020). *Sphingomonas paucimobilis*, bacille à Gram négatif opportuniste, peut être responsable d'infections chez des patients hospitalisés, en particulier dans certains services à risque (Aşkın et al., 2022). Des infections associées à cette espèce ont également été rapportées dans différents contextes cliniques (Sinha et al., 2023). De plus, certaines espèces du genre *Pantoea* présentent des propriétés associées à la formation de biofilms et à la production de substances extracellulaires pouvant intervenir dans les interactions avec les surfaces (Essghaier et al., 2023).

La capacité des bactéries à persister sous forme de biofilm constitue ainsi un facteur susceptible de limiter l'efficacité des traitements antimicrobiens. Les antibiotiques demeurent néanmoins essentiels dans la prise en charge des infections bactériennes, et l'étude de la sensibilité des isolats à ces agents permet d'évaluer leur réponse aux traitements utilisés en clinique. Parmi les antibiotiques étudiés, la gentamicine et la ceftazidime appartiennent à deux familles pharmacologiques différentes et présentent des mécanismes d'action distincts.

La gentamicine appartient à la famille des aminosides et agit principalement en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien, perturbant ainsi la synthèse protéique et entraînant une altération de la fonction cellulaire bactérienne. Toutefois,

son utilisation doit tenir compte de l'émergence de mécanismes de résistance pouvant compromettre son efficacité [(Webster et Shepherd, 2022) ; (Thy et al., 2023)].

La ceftazidime appartient quant à elle à la famille des céphalosporines de troisième génération. Elle exerce son activité antibactérienne en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par perturbation de la formation du peptidoglycane. Elle présente une activité contre plusieurs bactéries à Gram négatif, dont certaines espèces du genre *Pseudomonas*. Cependant, son efficacité peut être compromise par différents mécanismes de résistance, notamment la production de β -lactamases, les modifications des protéines cibles, les modifications de la perméabilité membranaire et l'activité de pompes d'efflux [(Kamali et al., 2021) ; (Yousefpour et al., 2021) ; (Mojica et al., 2023) ; (Hardie et al., 2025)].

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, qui a pour objectifs de tester la sensibilité des souches isolées vis-à-vis de la gentamicine et de la ceftazidime, puis d'étudier leur capacité à former des biofilms mono- et multi-espèces.

Ainsi, la capacité des bactéries à former des biofilms, associée à leur réponse variable aux antibiotiques, peut favoriser leur persistance dans les environnements hospitaliers. Cette situation est particulièrement complexe lorsque plusieurs espèces coexistent au sein d'un même biofilm, car les interactions entre elles peuvent modifier leurs propriétés et leur comportement. Il apparaît donc nécessaire d'étudier conjointement la sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques et leur capacité à former des biofilms, en conditions mono-espèces et multi-espèces, afin de mieux comprendre leur comportement et leur potentiel de persistance.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques physico-chimie, synthèse et activité biologique » (LapSab) de l'Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.

Cette étude a porté sur une collection de souches bactériennes isolées en 2025 à partir de l'environnement hospitalier du service de chirurgie A du Centre HospitaloUniversitaire (CHU) de Tlemcen.

1. Purification des bactéries

Avant leur utilisation, la purification ainsi que la revivication des souches sont réalisées par passages successifs sur le milieu Chapman pour les bactéries Gram-positives (staphylocoques) et le milieu MacConkey pour les bactéries Gram-négatives. Chaque souche pure est ensuite ensemencée dans un tube contenant de la gélose nutritive inclinée, puis incubée à 37 °C pendant 24 h avant d'être conservée à +4 °C.

2. Identification des bactéries

L'identification des souches a été réalisée par coloration de Gram, croissance sur milieu CHROM-Agar Orientation ainsi que par l'automate VITEK 2 (VK2C17756).

3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques vis-à-vis des souches isolées

Les Concentrations Minimales Inhibitrices de la gentamicine et de la ceftazidime vis-à-vis des souches isolées sont déterminées par la technique de microdilution sur microplaque 96 puits selon le protocole standard du Clinical and Laboratory Standards Institute M100 S23 (CLSI, 2016).

À partir d'une pré-culture de 24 heures sur gélose nutritive, des colonies bactériennes isolées sont prélevées et suspendues dans 3 mL d'eau physiologique stérile à 0,85 %. La turbidité de cette suspension a été ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre afin d'obtenir une densité optique comprise entre 0,08 et 0,13 à 620 nm. Par la suite, une dilution au 1/10 a été réalisée dans du bouillon Mueller-Hinton.

Deux antibiotiques sont testés, la gentamicine et la ceftazidime. Leurs solutions mères sont préparées en extemporané par dissolution dans de l'eau distillée stérile à une concentration de 1024 µg/mL pour la gentamicine et de 2 mg/mL pour la ceftazidime.

Dans les puits d'une microplaque, 50 µL de la suspension bactérienne à une concentration de 10⁸ cellules/mL sont introduits, auxquels sont ajoutés 50 µL de

l'antibiotique à tester avec des concentrations finales comprises entre 128 et 0,25 µg/mL. Un contrôle positif (inoculum seul) et un contrôle négatif (bouillon MuellerHinton seul) sont utilisés. Les microplaques sont ensuite scellées puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

Un contrôle interne est réalisé en utilisant des souches de référence, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Après incubation, les CMI désignent la concentration d'antibiotique à laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible à l'œil nu.

4. Évaluation de la capacité des souches co-isolées d'un même prélèvement à former *in vitro* des biofilms mono et multi-espèces

Les suspensions sont ajustées à 10⁶ UFC/mL pour les bactéries (**Seghir et al., 2015**). Dans des microplaques de polystyrène à 96 puits à fond rond, 100 µL de suspension microbienne sont déposés par puits pour la formation de biofilms mono-espèces.

Afin d'évaluer le potentiel des souches à former des biofilms mono et multi-espèces *in vitro*.

Les précultures des souches bactériennes ont été réalisées dans 1 mL de bouillon cœur-cerveille (BHIB).

Après 24 h d'incubation, les suspensions ont été centrifugées à 1 000 g pendant 15 min à 4 °C. Les culots sont lavés deux fois avec du PBS stérile (pH 7,4 ; 10 mM) puis remis en suspension dans le bouillon trypticase soja (TSB).

Après ajustement, une dilution au 1/10 a été réalisée en mélangeant de la suspension bactérienne ajustée avec de bouillon TSB.

La suspension obtenue a ensuite été distribuée dans une microplaque stérile à 96 puits à raison de 100 µL par puits.

Les suspensions sont ajustées à 10⁶ cellules/mL (**Seghir et al., 2015**). Dans des microplaques de polystyrène à 96 puits, 100 µL de suspension microbienne sont déposés dans chaque puits pour la formation de biofilms mono-espèces. Les microplaques sont ensuite incubées dans une étuve pendant 24 heures à 37°C.

Pour les biofilms mixtes, des volumes égaux (50 µL) de suspensions bactériennes sont combinés dans chaque puits. Les microplaques sont incubées à 37 °C pendant 24 heures. Des puits contenant uniquement le milieu de culture servent de témoin négatif.

5. Quantification de la biomasse des biofilms formés *in vitro* par la méthode de coloration au cristal violet

Après la formation des biofilms, le milieu de culture est aspiré et les puits sont lavés avec du PBS afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Par la suite, les biofilms formés sont traités avec 100 µL de méthanol absolu pour leur fixation. Après incubation à température ambiante pendant 15 minutes, les puits sont rincés puis colorés avec 100 µL de solution de cristal violet pendant 20 minutes. Les puits ont ensuite été lavés, puis 150 µL d'acide acétique à 33 % ont été additionnés afin de libérer le cristal violet lié aux biofilms. Les densités optiques ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaques à une longueur d'onde de 570 nm (**Christensen et al., 1985**).

Les valeurs obtenues ont permis d'évaluer la biomasse des biofilms formés par les différentes souches et leurs associations. Selon les intervalles établis par **Kodori et al. (2021)**, les souches ont été réparties en différentes catégories comme suit :

- Non-formatrices de biofilm ($DO \leq DOC$) ;
- Faiblement formatrices ($DOC < DO \leq 2 \times DOC$) ; □ Modérément formatrices ($2 \times DOC < DO \leq 4 \times DOC$) ; □ Fortement formatrices ($4 \times DOC < DO$).

DO : Densité optique de la souche. DOC : Densité optique du contrôle négatif.

Troisième partie

Résultats et discussions

1. Identification des souches bactériennes

L'identification des bactéries Gram-positives et Gram-négatives isolées à partir de l'environnement du service de chirurgie A du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Tlemcen est réalisée par croissance sur CHROM-Agar et VITEK 2. Les résultats de l'identification sont représentés sur le **Tableau N°1**.

Tableau N°1 : Identification des bactéries étudiées

	Souches
Gram négatives	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	<i>Pantoea</i> spp
Gram positives	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	<i>Staphylococcus warneri</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>

L'identification des isolats a permis de mettre en évidence six souches bactériennes, dont trois à Gram négatif : *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas stutzeri* et *Pantoea* spp., et trois à Gram positif : *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri* et *Staphylococcus aureus*. L'identification des quatre souches déjà étudiées lors du travail réalisé l'année précédente, à savoir *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus warneri*, a été confirmée dans le cadre de la présente étude. Deux nouvelles souches, *Pantoea* spp. et *Staphylococcus aureus*, ont également été identifiées. Certaines de ces souches ont ensuite été étudiées individuellement et en association afin d'évaluer leur capacité à former des biofilms en conditions mono-espèce et multi-espèces.

2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la gentamicine et de la ceftazidime vis-à-vis des souches bactériennes étudiées

Le **Tableau N°2** regroupe les CMI de deux antibiotiques, la gentamicine et la ceftazidime vis-à-vis des souches étudiées

Les résultats des CMI de la gentamicine vis-à-vis des souches bactériennes étudiées montrent une variabilité de la sensibilité. Elles sont comprises entre 0,125 et 32 µg/mL après 24h d'incubation à 37°C. Les plus faibles valeurs (0,125 µg/mL) ont été enregistrées chez *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus warneri*, traduisant une forte sensibilité de ces souches à la gentamicine. À l'inverse, une CMI de 8 µg/mL a été observée chez *Pantoea spp.*, tandis que les valeurs les plus élevées (32 µg/mL) ont été enregistrées chez *Sphingomonas paucimobilis* et *Staphylococcus aureus*.

Tableau N°2 : CMI des antibiotiques vis-à-vis des souches étudiées.

Souches	Gentamicine (µg/mL)	Ceftazidime (µg/mL)
<i>Pantoea spp.</i>	8 µg/mL	0,25 µg/mL
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,125 µg/mL	0,25 µg/mL
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	32 µg/mL	1 µg/mL
<i>Staphylococcus warneri</i>	0,125 µg/mL	1 µg/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,125 µg/mL	1 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	32 µg/mL	1 µg/mL
Souches de références		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5 µg/mL	1 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,5 µg/mL	1 µg/mL

La sensibilité de *Pseudomonas stutzeri* a déjà été rapporté par une étude réalisé par **Wang et al. (2023)**, qui ont décrit une souche de *Stutzerimonas stutzeri*, anciennement désignée *Pseudomonas stutzeri*, sensible à la gentamicine, avec une CMI de 2 µg/mL. Toutefois, l'interprétation de la sensibilité des espèces de *Pseudomonas* autres que *P. aeruginosa* nécessite une attention particulière, compte tenu des différences de profils de sensibilité et de l'existence de critères spécifiques pour certaines espèces (**Simner et al., 2025**).

Pour la souche *Pantoea spp.*, la CMI obtenue dans notre étude (8 µg/mL) indique une résistance intermédiaire. Cela ne concorde pas avec les résultats rapportés par **Hassan et al. (2023)**, qui ont observé une sensibilité à la gentamicine chez des isolats cliniques de *Pantoea spp.* provenant d'une unité de soins intensifs néonataux. Pour *Sphingomonas paucimobilis*, la CMI de 32 µg/mL indique une résistance à la gentamicine selon les critères retenus. Ce résultat diffère de celui rapporté par **Kelishomi et al. (2023)**, qui ont observé une sensibilité de cette espèce à la gentamicine. Ces différences pourraient s'expliquer par l'origine des isolats, leur diversité génétique ainsi que par la présence de mécanismes de résistance variables selon les souches.

Par ailleurs, toutes les souches étudiées se sont révélées sensibles à la ceftazidime, une céphalosporine de troisième génération, selon les critères du **CLSI (2016)**.

Pour la souche *Pantoea spp.*, la faible CMI obtenue (0,25 µg/mL) traduit une bonne activité *in vitro* de la ceftazidime. Ce résultat est en accord avec les observations de **Venincasa et al. (2015)**, qui ont rapporté une sensibilité à la ceftazidime chez des isolats cliniques de *Pantoea agglomerans*.

La souche de *Sphingomonas paucimobilis* s'est également révélée sensible à la ceftazidime, ceci est en accord avec les résultats de **Rohilla et al. (2021)**, qui ont rapporté une sensibilité élevée de cette espèce à cet antibiotique.

De plus, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri* et *Staphylococcus aureus* ont présenté une CMI de 1 µg/mL. Ces résultats témoignent d'une bonne activité de la ceftazidime à l'égard des souches étudiées. Ils rejoignent l'intérêt souligné par **Regecová et al. (2022)** concernant l'évaluation de la sensibilité aux antimicrobiens des staphylocoques isolés en contexte clinique, notamment des staphylocoques à coagulase négative.

2. Évaluation de la capacité des souches co-isolées à former *in vitro* des biofilms mono- et multi-espèces

Le potentiel des souches co-isolées à former *in vitro* des biofilms a été évalué par la technique de coloration au cristal violet, qui permet de quantifier la biomasse du biofilm.

La **Figure N°2** regroupe les résultats de la quantification de la biomasse des biofilms mono-et multi-espèces formés *in vitro* par les souches étudiées.

Selon les intervalles fixés par **Kodori et al. (2021)**, *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis et *Pseudomonas stutzeri* sont fortement formatrices de biofilms. Ces souches présentent les biomasses les plus importantes. En revanche, *Pantoea spp.*, *Sphingomonas paucimobilis* et *Staphylococcus warneri* présentent une faible capacité de formation des biofilms (**Figure N°2**).

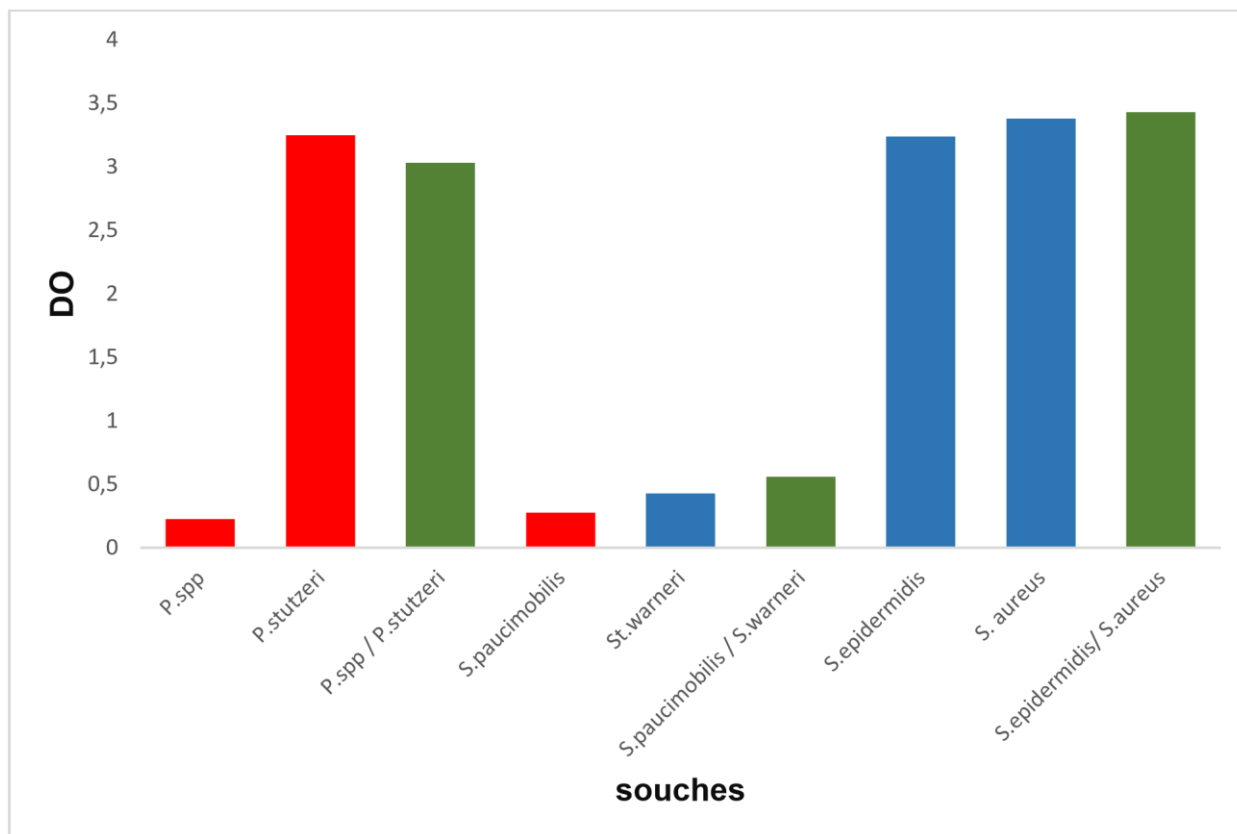


Figure N°2 : Biomasses des biofilms mono- et multi-espèces formés *in vitro* par les souches bactériennes, quantifiées par la méthode de coloration au cristal violet.

Les résultats obtenus montrent une variabilité de la capacité de formation du biofilm selon les espèces bactériennes étudiées. *Staphylococcus epidermidis* a présenté une forte capacité à former des biofilms. Ces résultats sont en accord avec les travaux de

Otto et al. (2018) et **Wojtyczka et al. (2014)**, qui soulignent l'importante capacité de cette espèce à former des biofilms. De même, *Staphylococcus aureus* s'est révélé fortement formatrice de biofilms. Ceci concorde avec les travaux de **Peng et al. (2023)** sur les mécanismes impliqués dans la formation du biofilm chez cette espèce, ainsi qu'avec ceux de **Ball et al. (2022)**, qui ont mis en évidence une variabilité de la capacité de formation du biofilm entre différents isolats de *S. aureus*.

Pseudomonas stutzeri a également présenté une forte capacité de formation des biofilms, rejoignant ainsi les observations rapportées par **Shang et al. (2021)**.

À l'inverse, *Staphylococcus warneri* a présenté une faible capacité de formation des biofilms. Ces observations rejoignent les résultats de **Szczuka et al. (2016)**, qui ont rapporté que 52 % des isolats de *S. warneri* étudiés étaient bonnes formatrices de biofilms.

La faible capacité de formation des biofilm observée chez *Sphingomonas paucimobilis* dans nos conditions expérimentales peut être mise en relation avec les observations rapportées par **(Gulati et Ghosh, 2017)**, qui ont montré que cette espèce possède la capacité de former des biofilms. Cependant, l'intensité de la formation du biofilm peut varier selon les conditions expérimentales et la surface étudiée. Dans leur étude, la formation des biofilms a particulièrement été observée sur différents matériaux utilisés dans les systèmes de distribution d'eau, avec une intensité plus importante sur le PVC, le polypropylène et le polyéthylène. Cette observation est également cohérente avec les travaux de **(Koroli et al., 2024)**, qui ont identifié une souche de *S. paucimobilis* au sein d'un biofilm formé sur une membrane de filtration d'eau.

Concernant les trois associations étudiées, les biofilms multi-espèces présentent des biomasses supérieures à celles des biofilms formés par les bactéries seules sauf pour la souche *pseudomonas stutzeri* qui présente une DO plus importante.

Les densités optiques enregistrés sont de 3,03 pour l'association *Pantoea spp./Pseudomonas stutzeri*, 0,558 pour l'association *Sphingomonas paucimobilis/Staphylococcus warneri* et 3, pour l'association *Staphylococcus epidermidis/Staphylococcus aureus*.

Concernant les trois associations étudiées, les biofilms multi-espèces présentent des biomasses supérieures à celles des biofilms formés par les bactéries seules sauf pour la souche *pseudomonas stutzeri* qui présente une DO plus importante. L'évaluation de la biomasse a révélé des variations selon les associations étudiées. L'association *Pantoea spp./Pseudomonas stutzeri* a présenté une DO de 3,03, correspondant à une biomasse élevée. Cette valeur reste toutefois légèrement inférieure à celle obtenue avec *P. stutzeri* seule (DO = 3,244), suggérant que la co-culture des deux espèces n'entraîne pas systématiquement une augmentation de la biomasse du biofilm.

À l'inverse, l'association *Sphingomonas paucimobilis/Staphylococcus warneri* a présenté une DO de 0,558, supérieure à celles obtenues avec *S. paucimobilis* seule (DO = 0,272) et *S. warneri* seule (DO = 0,425). Cette augmentation suggère un effet favorable de l'association sur la biomasse du biofilm.

De même, l'association *Staphylococcus epidermidis/Staphylococcus aureus* a présenté une biomasse élevée (DO = 3,426), supérieure à celles obtenues avec *S. epidermidis* (DO = 3,237) et *S. aureus* (DO = 3,379) en cultures mono-espèces. Cette observation suggère également un effet favorable de l'association sur la formation du biofilm.

Ces résultats rejoignent les observations de **Gonzalez et al. (2021)**, qui ont montré que les interactions entre *S. aureus* et *S. epidermidis* peuvent varier selon les couples de souches étudiés. Si la majorité des associations testées présentaient une biomasse plus importante en culture mixte, certaines montraient au contraire une diminution de celle-ci, traduisant la diversité des interactions entre les deux espèces.

De plus, **Nuwayhid et al. (2026)** ont montré que l'association de *S. aureus* avec *S. epidermidis* pouvait modifier les caractéristiques du biofilm par rapport aux cultures mono-espèces. Ces observations soulignent que l'effet d'une association sur la biomasse dépend des espèces et des souches impliquées ainsi que des conditions expérimentales.

Quatrième partie

Conclusion générale

Notre étude a porté sur l'évaluation de la sensibilité de différentes souches bactériennes isolées au service de chirurgie A du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Tlemcen vis-à-vis de deux antibiotiques, la gentamicine et la ceftazidime, ainsi que sur l'étude de leur formation de biofilms *in vitro* en cultures mono- et multiespèces.

Les principaux résultats obtenus peuvent être résumés comme suit :

- Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la gentamicine et de la ceftazidime ont montré une variabilité de la sensibilité des différentes souches bactériennes étudiées.
- Concernant la gentamicine, les plus faibles CMI (0,125µg/mL) ont été observées chez *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus warneri*, traduisant une bonne sensibilité à cet antibiotique dans nos conditions expérimentales. À l'inverse, *Sphingomonas paucimobilis* et *Staphylococcus aureus* ont présenté les CMI les plus élevées (32 µg/mL), indiquant une résistance dans les conditions d'interprétation utilisées.
- Toutes les souches étudiées se sont révélées sensibles à la ceftazidime avec des CMI allant de 0,25 à 1 µg/mL.
- L'étude de la formation des biofilms a montré une variabilité importante entre les souches bactériennes. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas stutzeri* ont présenté une forte capacité de formation des biofilm, tandis que *Pantoea* spp., *Sphingomonas paucimobilis* et *Staphylococcus warneri* sont faiblement formatrices de biofilms.
- Concernant les cultures mixtes, l'évaluation de la biomasse des biofilms a montré des différences selon les associations étudiées. Les associations *Pantoea* spp./*Pseudomonas stutzeri* et *Staphylococcus epidermidis*/*Staphylococcus aureus* ont présenté une biomasse élevée.

Afin d'approfondir ce travail, il serait intéressant de :

- Élargir l'étude à un plus grand nombre d'isolats cliniques provenant de différents services hospitaliers afin d'obtenir des résultats plus représentatifs et de mieux caractériser leur sensibilité aux antibiotiques ainsi que leur capacité à former des biofilms.
- Évaluer l'activité d'autres familles d'antibiotiques, utilisées seules ou en association, à l'égard des bactéries sous forme planctonique et au sein des biofilms.
- Approfondir l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux antibiotiques et dans la formation des biofilms.
- Explorer l'efficacité de composés naturels et de nouvelles stratégies thérapeutiques susceptibles de prévenir ou de réduire la formation des biofilms bactériens.

Cinquième partie
Références bibliographiques

1. **Aşkın, D., Yılmaz, N., et al. (2022).** *Sphingomonas paucimobilis* outbreak in a pediatric hematology-oncology hospital: Epidemiological investigation and literature review of an emerging healthcare-associated infection. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 75(4), 374–381.
2. **Ball, A. L., Augenstein, E. D., Wienclaw, T. M., Richmond, B. C., Freestone, C. A., Lewis, J. M., Thompson, J. S., Pickett, B. E., & Berges, B. K. (2022).** Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilms via crystal violet binding and biochemical composition assays of isolates from hospitals, raw meat, and biofilm-associated gene mutants. *Microbial Pathogenesis*, 167, 105554.
3. **Beebout, C. J., Sominsky, L. A., Eberly, A. R., Van Horn, G. T., & Hadjifrangiskou, M. (2021).** Cytochrome bd promotes *Escherichia coli* biofilm antibiotic tolerance by regulating accumulation of noxious chemicals. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 35.
4. **Biswas, T., Ahmed, M., & Mondal, S. (2024).** Mixed species biofilm: Structure, challenge and its intricate involvement in hospital-associated infections. *Microbial Pathogenesis*, 195, 106866.
5. **Bourigault, C., Birgand, G., Lakhal, K., & Bretonnière, C. (2018).** Quelle surveillance des infections associées aux soins en réanimation en 2018 ? *Médecine Intensive Réanimation*, 27(3), 204–210.
6. **Boys, M. T. H., & Pletzer, D. (2025).** A review of recently discovered mechanisms of cephalosporin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 66(2), 107527.
7. **Cruz-López, F., Martínez-Meléndez, A., & Garza-González, E. (2023).** How does hospital microbiota contribute to healthcare-associated infections? *Microorganisms*, 11(1), 192.

8. **Daffinee, K. E., Piehl, E. C., Bleick, C., & LaPlante, K. L. (2023).** Eradication of *Staphylococcus epidermidis* within biofilms: Comparison of systemic versus supratherapeutic concentrations of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(6), e00108-23.
9. **Dittmer, M., Brill, F. H., Kampe, A., Geffken, M., Rembe, J. D., Moll, R., ... & Stuermer, E. K. (2023).** Quantitative insights and visualization of antimicrobial tolerance in mixed-species biofilms. *Biomedicines*, 11(10), 2640.
10. **Essghaier, B., Mallat, N., Khwaldia, K., Mottola, F., Rocco, L., & Hannachi, H. (2023).** Production and characterization of new biosurfactants/bioemulsifiers from *Pantoea alhagi* and their antioxidant, antimicrobial and anti-biofilm potentiality evaluations. *Molecules*, 28(4), 1912.
11. **European Centre for Disease Prevention and Control. (2024).** *Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals – 2022–2023*. European Centre for Disease Prevention and Control.
12. **Fijan, S., Kürti, P., Rozman, U., & Šostar Turk, S. (2024).** A critical assessment of microbial-based antimicrobial sanitizing of inanimate surfaces in healthcare settings. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1412269.
13. **Francis, D., Hari, G. V., Subash, A. K., Bhairaddy, A., & Joy, A. (2024).** The biofilm proteome of *Staphylococcus aureus* and its implications for therapeutic interventions to biofilm-associated infections. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 138, 327–400.
14. **François, P., Schrenzel, J., & Götz, F. (2023).** Biology and regulation of staphylococcal biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5218.

-
15. Guerrero Barrantes, C., Guillén Oneeglio, A., Rojas León, R., Díaz Tello, A., & Noriega Romero, E. (2016). Resistencia antibiótica de bacilos gramnegativos de ambientes intrahospitalarios. *Cátedra Villarreal*, 4(1), 56–70.
16. Gulati, P., & Ghosh, M. (2017). Biofilm forming ability of *Sphingomonas paucimobilis* isolated from community drinking water systems on plumbing materials used in water distribution. *Journal of Water and Health*, 15(6), 942–954.
17. Hassan, G. M. M., Hassan, E. A. S., Agban, M. N., Refat, N. H., Hosni, A. M., & Elkhawaga, A. A. (2023). Insights into the prevalence and the antimicrobial activity of natural product against *Pantoea* spp. isolated from neonatal intensive care unit. *Microbes and Infectious Diseases*, 4(1), 194–204.
18. Hathroubi, S., Hu, S., & Ottemann, K. M. (2020). Genetic requirements and transcriptomics of *Helicobacter pylori* biofilm formation on abiotic and biotic surfaces. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 6, 56.
19. Kamali, E., Jamali, A., Izanloo, A., & Ardebili, A. (2021). In vitro activities of cellulase and ceftazidime, alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *BMC Microbiology*, 21(1), 347.
20. Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm matrixome: Extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681.
21. Kelishomi, F. Z., Mohammadi, F., Khakpoor, M., Malekmohammadi, R., & Nikkhahi, F. (2023). Isolation of *Sphingomonas paucimobilis* from an ocular

infection and identification using ribosomal RNA gene: First case report from Iran.

- 22.Khan, H. A., Ahmad, A., & Mehboob, R. (2015).** Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 509–514.
- 23.Kodori, M., Nikmanesh, B., Hakimi, H., & Ghalavand, Z. (2021).** Antibiotic susceptibility and biofilm formation of bacterial isolates derived from pediatric patients with cystic fibrosis from Tehran, Iran. *Archives of Razi Institute*, 76(2), 397.
- 24.Koroli, S., Buss, K., Blain, J. M., Nakka, G. S., Hong, M., McLean, R. J. C., Plugge, C. M., & Yang, J. (2024).** Draft genome sequence of *Sphingomonas paucimobilis* strain Sph5, isolated from tap water filtration membrane. *Microbiology Resource Announcements*.
- 25.Kulshrestha, A., & Gupta, P. (2022).** Polymicrobial interaction in biofilm: Mechanistic insights. *Pathogens and Disease*, 80(1), ftac010.
- 26.Liu, H. Y., Prentice, E. L., & Webber, M. A. (2024).** Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *NPJ Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 27.
- 27.Luo, A., Wang, F., Sun, D., Liu, X., & Xin, B. (2022).** Formation, development, and cross-species interactions in biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 757327.
- 28.Mojica, M. F., De La Cadena, E., García-Betancur, J. C., Porras, J., Novoa-Caicedo, I., Páez-Zamora, L., ... & Villegas, M. V. (2023).** Molecular mechanisms of resistance to ceftazidime/avibactam in clinical isolates of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in Latin American hospitals. *mSphere*, 8(2), e00651-22.

-
- 29. Nuwayhid, R., Ngoc-Huyen, N., Lippmann, N., Dietze, N., Kursawe, L., Kikhney, J., ... & Kurow, O. (2026).** Synergistic tissue destruction by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in a 3D human skin biofilm equivalent. *Biofilm*, 100361.
- 30. O'Toole, G. A. (2011).** Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47, e2437.
- 31. Otto, M. (2018).** Staphylococcal biofilms. *Microbiology Spectrum*, 6(4).
- 32. Ouidir, T., Gabriel, B., & Chabane, Y. N. (2022).** Overview of multi-species biofilms in different ecosystems: Wastewater treatment, soil and oral cavity. *Journal of Biotechnology*, 350, 67–74.
- 33. Peng, Q., Tang, X., Dong, W., Sun, N., & Yuan, W. (2022).** A review of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and its regulation mechanism. *Antibiotics*, 12(1), 12.
- 34. Ravaioli, S., De Donno, A., Bottau, G., Campoccia, D., Maso, A., Dolzani, P., ... & Arciola, C. R. (2024).** The opportunistic pathogen *Staphylococcus warneri*: Virulence and antibiotic resistance, clinical features, association with orthopedic implants and other medical devices, and a glance at industrial applications. *Antibiotics*, 13(10), 972.
- 35. Regecová, I., Výrostková, J., Zigo, F., Gregová, G., Pipová, M., Jevinová, P., & Becová, J. (2022).** Detection of resistant and enterotoxigenic strains of *Staphylococcus warneri* isolated from food of animal origin. *Foods*, 11(10), 1496.

- 36. Rohilla, R., Raina, D., Singh, M., Pandita, A. K., & Patwal, S. (2021).** Evaluation of *Sphingomonas paucimobilis* as an emerging nosocomial pathogen in a teaching hospital in Uttarakhand. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(5), 617.
- 37. Saikeerthana, D., Prabha, P., Vijayashree, V., & Krishna, G. N. (2021).** Overview of pathogens causing nosocomial infections in various wards of a tertiary health care hospital and their antimicrobial susceptibility pattern—A prospective surveillance study. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(4), 1940–1946.
- 38. Schapira, A.-J., Dramé, M., Olive, C., & Marion-Sanchez, K. (2024).** Bacterial viability in dry-surface biofilms in healthcare facilities: A systematic review. *Journal of Hospital Infection*, 144, 94–110.
- 39. Shang, L., Yan, Y., Zhan, Y., Ke, X., Shao, Y., Liu, Y., ... & Lin, M. (2021).** A regulatory network involving Rpo, Gac and Rsm for nitrogen-fixing biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri*. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 54.
- 40. Simner, P. J., Harris, H., Jacobs, E., et al. (2025).** Establishing Clinical and Laboratory Standards Institute M45 antimicrobial susceptibility testing methods and breakpoints for *Pseudomonas* other than *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 63(8), e00368-25.
- 41. Sinha, P., Mitra, S., Bothra, N., & Ali, M. J. (2023).** Lacrimal drainage infections with *Sphingomonas paucimobilis*: Clinical presentations, complications and outcomes. *Current Eye Research*, 48(6), 605–610.
- 42. Stewart, P. S., White, B., Boegli, L., Hamerly, T., Williamson, K. S., Franklin,**

- M. J., ... & Wallqvist, A. (2019).** Conceptual model of biofilm antibiotic tolerance that integrates phenomena of diffusion, metabolism, gene expression, and physiology. *Journal of Bacteriology*, 201(22).
- 43. Su, Y., Yrastorza, J. T., Matis, M., Cusick, J., Zhao, S., Wang, G., & Xie, J. (2022).** Biofilms: Formation, research models, potential targets, and methods for prevention and treatment. *Advanced Science*, 9(29), 2203291.
- 44. Szczuka, E., Krzysińska, S., & Kaznowski, A. (2016).** Clonality, virulence and the occurrence of genes encoding antibiotic resistance among *Staphylococcus warneri* isolates from bloodstream infections. *Journal of Medical Microbiology*, 65(8), 828–836.
- 45. Thy, M., Timsit, J. F., & de Montmollin, E. (2023).** Aminoglycosides for the treatment of severe infection due to resistant gram-negative pathogens. *Antibiotics*, 12(5), 860.
- 46. Venincasa, V. D., Kuriyan, A. E., Flynn, H. W., Jr., Sridhar, J., & Miller, D. (2015).** Endophthalmitis caused by *Pantoea agglomerans*: Clinical features, antibiotic sensitivities, and outcomes. *Clinical Ophthalmology*, 9, 1203–1207.
- 47. Wang, Z., Sun, X., Chen, X., Wang, H., & He, H. (2023).** The mass spectrometry identification, antimicrobial genes detection, and proteomics analysis of *Stutzerimonas stutzeri* strain isolated from industrial wastewater. *Separations*, 10(9), 461.
- 48. Webster, C. M., & Shepherd, M. (2023).** A mini-review: Environmental and metabolic factors affecting aminoglycoside efficacy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 7.

-
- 49. Weinbren, M., & Inkster, T. (2021).** The hospital-built environment: Biofilm, biodiversity and bias. *Journal of Hospital Infection*, 111, 50–52.
- 50. Wojtyczka, R. D., Orlewska, K., Kępa, M., Idzik, D., Dziedzic, A., Mularz, T., ... & Wąsik, T. J. (2014).** Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4619–4633.
- 51. Yadav, A., Raj, A., & Bharagava, R. N. (2016).** Detection and characterization of a multi-drug and multi-metal resistant *Enterobacterium Pantoea* sp. from tannery wastewater after secondary treatment process. *International Journal of Plant and Environment*, 2(1–2), 37–42.
- 52. Yousefpour, Z., Davarzani, F., & Owlia, P. (2021).** Evaluating of the effects of sub-MIC concentrations of gentamicin on biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Pathology*, 16(4), 403.
- 53. Zafer, M. M., Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M., et al. (2024).** Biofilm-mediated infections by multidrug-resistant microbes: A comprehensive exploration and forward perspectives. *Archives of Microbiology*, 206, 101.
- 54. Zhang, P., Ding, X. S., Zhao, B., An, Q., & Guo, J. S. (2020).** Acceleration of biofilm formation in start-up of sequencing batch biofilm reactor using carriers immobilized with *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2. *Bioresource Technology*, 314, 123736.