

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ib Khaldoun–Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par

Mlle. Assam Hanane.

Mlle. Ayadi Amira.

Mr. Baghdad Mohamed Abdelaziz.

Thème

**Etude de biofilm positif et des propriétés adhésives
d'une bactérie lactique d'intérêt**

Soutenu publiquement le 03/06/2023

Jury:

		Grade
Président:	Dr. ABBAS Mohamed	MCA.
Encadrante:	Dr. BOUBAKEUR Badra	MCA.
Co-encadrante:	Dr. KHADEM Hafidha	MCB.
Examinatrice:	Dr MEDJEBEUR Nacera	MCB.

Année universitaire 2022-2023

Remerciements

El Hamdou li Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté pour entamer et terminer ce travail à terme.

Ce travail n'aurait pas été aussi enrichissant et n'aurait pas été possible sans l'aide et les directives tant scientifiques que pédagogiques de Mme BOUBAKEUR Badra, à qui nous sommes reconnaissants pour sa disponibilité, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité.

Nos remerciements s'adressent à Mme KHADEM Hafidha, Co-encadrante de ce travail, pour son aide précieuse, sa disponibilité, ses encouragements et son soutien moral.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi aux membres du jury Mme MEDJEBEUR Nacera et Mr. ABBAS Mohamed d'avoir accepté l'évaluation de ce travail.

A notre chef de spécialité

Nous remercions aussi le personnel des laboratoires de biochimie et de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et à Mr. Benhamed Mohamed pour l'accueil cordial et pour l'aide précieuse qui nous a été offerte.



Dédicace

« Je dédie ce travail »

** A mes très chers parents, qui ont été toujours là pour moi, à mes grands-parents mes frères pour leurs encouragements, Que Dieu vous protège et vous donne la bonne santé.*

** A Mes amies et collègues pour leur soutien inconditionnel.*

** A tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.*

** Enfin je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude à mes directrices de mémoire, de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.*

Mr. Baghdad Mohamed Abdelaziz



Dédicace

« Je dédie ce travail »

-A mes chers parents, mes guides affectueux et attentifs en reconnaissance pour leur soutien moral et leurs encouragements durant toutes ces longues années d'étude.

** A ma chère sœur Malika*

** A mes chers binômes Assam Hanane et Baghdad Mohamed Abdelaziz*

** Un grande dédicace avec tous mes respects et remerciements à mes directrices de mémoire*

Mlle Ayadi Amira



Dédicace

Avant tout je remercie Allah qui m'a donnée la capacité, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

Je souhaite avant tout remercier mes directrices de mémoire, pour le temps qu'elles ont consacré à nous aider pour réaliser ce travail.

« Je dédie ce travail »

** A mes très chers parents, qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études, je souhaite que vous restiez toujours près de moi et que Dieu vous protège et vous donne bonne santé.*

** A mes chers frères et sœurs*

** A toutes mes chères amies sans exception*

** A mon binômes Amira et Mohamed qui ont rendu ma vie d'étudiante agréable et plein de bons souvenirs*

** A tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.*

Mlle. Assam Hanane

Liste des abréviations

M17	Milieu M17
M17 RCA	Gélose M17 au rouge Congo
MRS	Gélose (Man rogosa et Sharp)
MRS RCA	Gélose (Man rogosa et Sharp) au rouge Congo
<i>S. thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
UFC	Unité formant colonie
C.V	Cristal-Violet
R.C. A	Agar au Rouge Congo [Red Congo Agar]
PBS	Buffered Saline phosphate [Tampon phosphate Saline]
DO	Densité optique
EPS	Exo-Poly Saccharides
A	Absorbance
T	Temps
pH	Potentiel d'hydrogène
CNRZ	Centre national de recherches zootechniques
INRA	Institut national de la recherche agronomique

Liste des Figures

Figures	Titres	Pages
01	Protocole expérimental.	07
02	Etapas d'extraction des EPSs.	09
03	Etat morphologique de la souche testée	11
04	Courbe d'évolutions de la DO en fonction du temps.	12
05	Courbe de pourcentage d'agrégation en fonction du temps.	13
06	Corrélation entre la croissance et l'auto-agrégation.	15
07	Cercle de pourcentage des EPSs produits par <i>S. thermophilus</i> .	16
08	Comparaison des pourcentages d'auto-agrégation et de production d'EPSs.	16
09	Formation de biofilm dans le milieu Rouge Congo M17/MRS	18
10	Test de coloration au cristal violet sur microplaque.	19
11	Nombre de cellules bactériennes formant le biofilm en fonction du temps	20

Liste des tableaux

Tableau	Titres	Pages
01	Origine et caractères de la souche testée	05
02	Matériel et produits utilisés	06
03	Capacité de formation e de biofilm dans [M17/MRS]	17

Liste des annexes

	Pages
Annexe I Photos des appareils utilisés	28
Annexe II Composition des milieux de culture	31
Annexe III Éléments de l'expérimentation	33

« Sommaire »

1-Liste des abréviations.....	I
2-Liste des figures.....	II
3-Liste des tableaux.....	II
4-Liste des annexes.....	II

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

Chapitre I Matériel et Méthodes

I-1 Objectif de travail.....	05
I-2 Lieu et durée de travail.....	05
I-3 Matériel utilisé.....	05
I-3-1 La souche bactérienne.....	05
I-3-2 Produits utilisés.....	06
I-4 Méthodes.....	07
I-4-1 Protocole expérimental.....	07
I-4-2 Vérification et identification de la pureté.....	08
I 4-3 Préparation d'inoculum.....	08
I 4-4 Cinétique de croissance.....	08
I-4-5 Evaluation du pouvoir adhésif.....	08
I-4-6 Extraction des EPSs.....	09
I-4-7 Détermination du biofilm.....	10
I-4-7-1 Méthode de rouge Congo.....	10
I-4-7-2 Coloration au cristal violet sur microplaque.....	10
I-4-7-3 Coloration au cristal violet sur tube.....	10

Chapitre II Résultats et discussion

II-1	Résultats de la vérification de la pureté de la souche	11
II-1-1	Etude morphologique	11
II-2	Cinétique de croissance.....	12
II-3	Evaluation du pouvoir adhésif [auto-agrégation]	14
II-4	Corrélation entre la croissance et l'agrégation	15
II-5	Extraction et évaluation de la production d'EPS	16
II-6	Résultats de la capacité de formation de biofilm.....	17
II-6-1	Test de rouge Congo	18
II-6-2	Test de cristal violet sur microplaque	19
II-6-3	Test de cristal violet sur tube	20

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Introduction

Introduction

Le biofilm est le mode de vie universel et prédominant pour les bactéries, dans lequel ces dernières adhèrent les unes aux autres à des surfaces vivantes ou inertes, adaptant leur métabolisme et leur physiologie aux conditions difficiles de leur milieu naturel afin de résister aux agressions extérieures (Dufour et al., 2010 ; Tremblay et al., 2014 ; Jamal et al., 2018).

La première description des bactéries agrégées a été démontrée par Anthony van Leeuwenhoek en observant la présence des microorganismes issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire en 1683. Au bout d'un an, Leeuwenhoek a présenté un manuscrit qui est largement considéré comme la première publication scientifique sur les biofilms (Sauer et al., 2007; Baudin, 2017 ; Tasse, 2017).

De 1880 à la fin du 20^e siècle, ce mode de vie des bactéries a été progressivement oublié. Suite à la recherche de Henrici et Zobell en 1932, le développement progressif des bactéries présent sur la surface des lames plongées dans un aquarium a été démontré. Ces bactéries sont majoritairement adhérentes sur une surface pour croître.

Cette découverte a ouvert la porte à une nouvelle recherche qui a été dirigée par Claude Zobell. En 1943, il a prouvé qu'une très petite quantité des nutriments organiques adsorbés sur le verre avec une concentration de matière organique peut favoriser la formation de colonies bactériennes attachées aux surfaces ce qui est connue à présent comme le biofilm (Costerton, 2004 ; Roux et Ghigo, 2006 ; Pantaléon, 2015 ; Salaiün, 2015).

Le biofilm est une structure complexe formée par l'agrégation de divers micro-organismes promus par la matière polymère qu'ils excrètent. Les biofilms offrent de nombreux avantages pour la survie et la reproduction des écosystèmes bactériens, mais posent également d'énormes problèmes pour l'homme et ses activités industrielles (Alnnasouri, 2010). En effet, deux types de biofilms sont distingués ; ceux dont l'impact est néfaste (biofilms négatifs) et d'autre dont l'effet est bénéfique nommés biofilms positifs.

Les microorganismes ont le don d'acquérir les nutriments nécessaires à leur croissance et à leur propagation avec une dépense énergétique minimale. Une façon d'y parvenir est de produire des exo-polymères pour la formation de biofilm, ce qui offre plusieurs avantages aux bactéries ; protection des cellules immobilisées contre les modifications spontanées de l'environnement comme la température, le séchage, le pH, le stockage d'énergie (Alnnasouri, 2010).

Les bactéries lactiques formatrices de biofilm interviennent dans plusieurs utilisations dans différents domaines y compris l'agroalimentaire pour la production d'éthanol dans des réacteurs disposés verticalement et dans lesquels des levures *Saccharomyces cerevisiae* sont immobilisées sous forme de biofilm (Chung et Park 1983 ; Demirci et al., 1997 ; Todd et Gerald, 2001).

Ils sont utilisés également dans la production du vinaigre et d'acide acétique (Bailey et Ollis 1986), d'autre part ils interviennent dans le traitement biologique des eaux résiduaires. Les microorganismes jouent un rôle essentiel dans l'épuration des eaux via leur capacité à dégrader les polluants (de nature C, N et P) (Alnnasouri, 2010).

D'autre part l'EPS élaboré lors de la maturation des biofilms peut être utilisé dans plusieurs procédés de fermentations. On retrouve notamment la symbiose qui subsiste entre les levures et les bactéries lactiques dans la production de kefir, les boissons alcoolisées, levain ou encore de cornichons (Pollard et Woodley, 2007). Les EPSs sont aussi utilisés dans la lutte contre la pollution, dans la biodétoxification de milieux contaminés (Guezennec, 2001)

Les biofilms peuvent avoir aussi des effets négatifs sur les humains ou leurs activités. De nombreuses études ont montré que les bactéries présentes dans les biofilms sont moins sensibles à l'action des nettoyants et des désinfectants que celles à l'état libre (Laithier et al, 2005). D'autres part, les biofilms des espèces pathogènes, peuvent causer de graves problèmes de santé ; tel est le cas au niveau du système digestif et respiratoire, lors des infections pulmonaires ou d'actes médicaux comme à la naissance ou le système respiratoire est soumis à la colonisation par des bactéries présentes dans le milieu environnant mais aussi par la flore maternelle (Dominguez-Bello et al., 2010).

Un autres aspect des biofilms négatifs consiste dans la contamination des équipements de l'industrie alimentaire et donc dans la dégradation de la qualité des aliments (contamination, mauvais goût) (Alnnasouri, 2010).

La formation de biofilm se produit généralement en réponse à une pression environnementale, telle l'indisponibilité en oxygène ou en nutriment (Branger et al., 2007). Selon Agnès et al. (2006), la maturation d'un biofilm s'effectue en cinq grandes étapes :

La première est désignée par le conditionnement de la surface qui consistait en la formation du film primaire et le transport des micro-organismes près de la surface, la base sur laquelle le biofilm se développe et se fixe

Le film de conditionnement, par sa composition de plusieurs substances (protéines, glucides et minéraux), va modifier les propriétés physico-chimiques des surfaces de contact afin de stimuler l'adhésion microbienne (Branger et Garrett., 2007), cette étape est suivie par le transport des micro-organismes près de la surface sous influence des propriétés dynamiques du milieu ainsi que les propriétés physico-chimiques du support. En effet ; différents appendices bactériens tels que les cils et les flagelles sont également nécessaires (Rodney et *al.*, 2002 ; Agnès et *al.*, 2006 ; Branger *et al.*, 2007; Percival et *al.*, 2011).

La seconde étape consiste en l'adhésion, selon Baillif et al. (2010) elle s'effectue en deux phases :

L'adhérence réversible qui se produit lorsqu'une proportion des cellules sera adsorbée à la surface suite aux interactions entre les charges du milieu liquide et la surface solide, cette attraction correspond aux forces de Van der Waals et à la répulsion électrostatique (Grderes et *al.*, 2014). Avant le conditionnement d'un substrat il est susceptible que les bactéries se libèrent de la surface car les forces d'attraction sont inférieures aux forces répulsives (Garrett et *al.*, 2008) , par contre l'adhérence irréversible englobe la fonction de surface, la direction bactérienne, conditions de température et pression et l'énergie qui sont des variables environnementales locales, Au fur et à mesure que les bactéries se multiplient leur adhésion deviennent plus forte (Garrett et *al.*, 2008 ; Philips et *al.*, 2011).

Une fois fixés, les micro-organismes se divisent et forment des micro-colonies (Agnès et *al.*, 2006; Philips et *al.*, 2011), elles aboutissent à la sécrétion d'une matrice environnante appelée substances de polymères extracellulaires, cas des EPSs, il s'agit d'une matrice protectrice qui protègent le biofilm initial (Philips et *al.*, 2011 ; coll, 2014).

Le biofilm se développe et mûrit (Maturation de biofilm), s'épissant jusqu'à ce qu'il devienne macroscopique dans des conditions environnementales optimales e sa structure devient complexe (Branger *et al.*, 2007; Tremblay et *al.*, 2014).

La dernière étape est la phase de dispersion, appelée aussi phase planctonique. En effet ; sous l'effet du vieillissement du biofilm, ainsi que certaines carences ou stress, les cellules microbiennes se séparent du biofilm et se dispersent en se détachant pour adhérer à de nouvelles surfaces et en donnant naissance à un nouveau biofilm (Branger *et al.*, 2007; Tremblay et *al.*, 2014).

Notre étude a pour but d'évaluer le biofilm total de *Streptococcus thermophilus*, une bactérie d'intérêt humain et de déterminer certaines de ses propriétés adhésives.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I
MATERIEL ET METHODES

I. 1. Objectif

Cette étude a pour but d'étudier le pouvoir adhésif d'une souche lactique d'intérêt industriel: *S. thermophilus* à travers l'évaluation de sa capacité de formation de biofilm et de la sécrétion de métabolites (EPS) liés à ce phénomène. Le but visé a été abouti en adoptant ces objectifs :

- Identification macro et microscopique de la souche testée ;
- Evaluation du potentiel adhésif : étude de la cinétique de croissance et d'agrégation ;
- Etude du pouvoir sécrétoire d'EPS dans des conditions optimales ;
- Estimation quantitative et qualitative de biofilm totale

I.2. Lieu et durée de travail

Cette étude a été effectuée durant la période allant du 29 Janvier 2023 au 23 Février 2023 dans les laboratoires de microbiologie et de biochimie au sein de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université IBN KHALDOUN de Tiaret.

I.3. Matériel

I.3.1. Souche bactérienne

La souche bactérienne testée *S. thermophilus* CNRZ 447, est une souche lactique d'une grande importance industrielle de provenance de France (tableau N 01).

Tableau 1 : Origine et caractères de la souche testée.

Souche bactérienne	Origine	Caractères	Référence
<i>Streptococcus thermophilus</i>	INRA	-Catalase négative -Gram positive -Aérobie - Cocci	CNRZ 447

I.3.2. Matériel et produits

Tableau02 : Matériel et produits utilisés lors de notre expérimentation.

Matériel et produits utilisés	
Appareillage	Agitateur magnétique thermique. [VELP. SCIENTIFICA] Autoclave.[WEBECO] Bain marin. [MEMMERT] Balance analytique [SARTORIUS] Microscope optique [FEICA] Spectrophotomètre [JENWAY] Vortex [TECHNO-KARTELL] Incubateur [MEMMERT]
Verrerie et autres	Boîtes de Pétri. Tubes à essai. Béchers. Lames. Cuve. Ecouillons
Milieux de culture	Gélose MRS. Gélose M17.
Produits chimiques Et colorants	Acide sulfurique pure. Acide acétique a 30%. Cristal violet. Glucose. Saccharose. Phénol. Ethanol pure. Fuschine. Lugol. Violet de gentiane.
Autres	Barreaux magnétiques. Bec-bunsen. Micropipettes. Microplaque.

I.4. Méthode

I.4. 1. Protocole expérimental

Les étapes de l'expérimentation suivies pour aboutir à notre objectif sont résumées dans la figure ci-dessous.

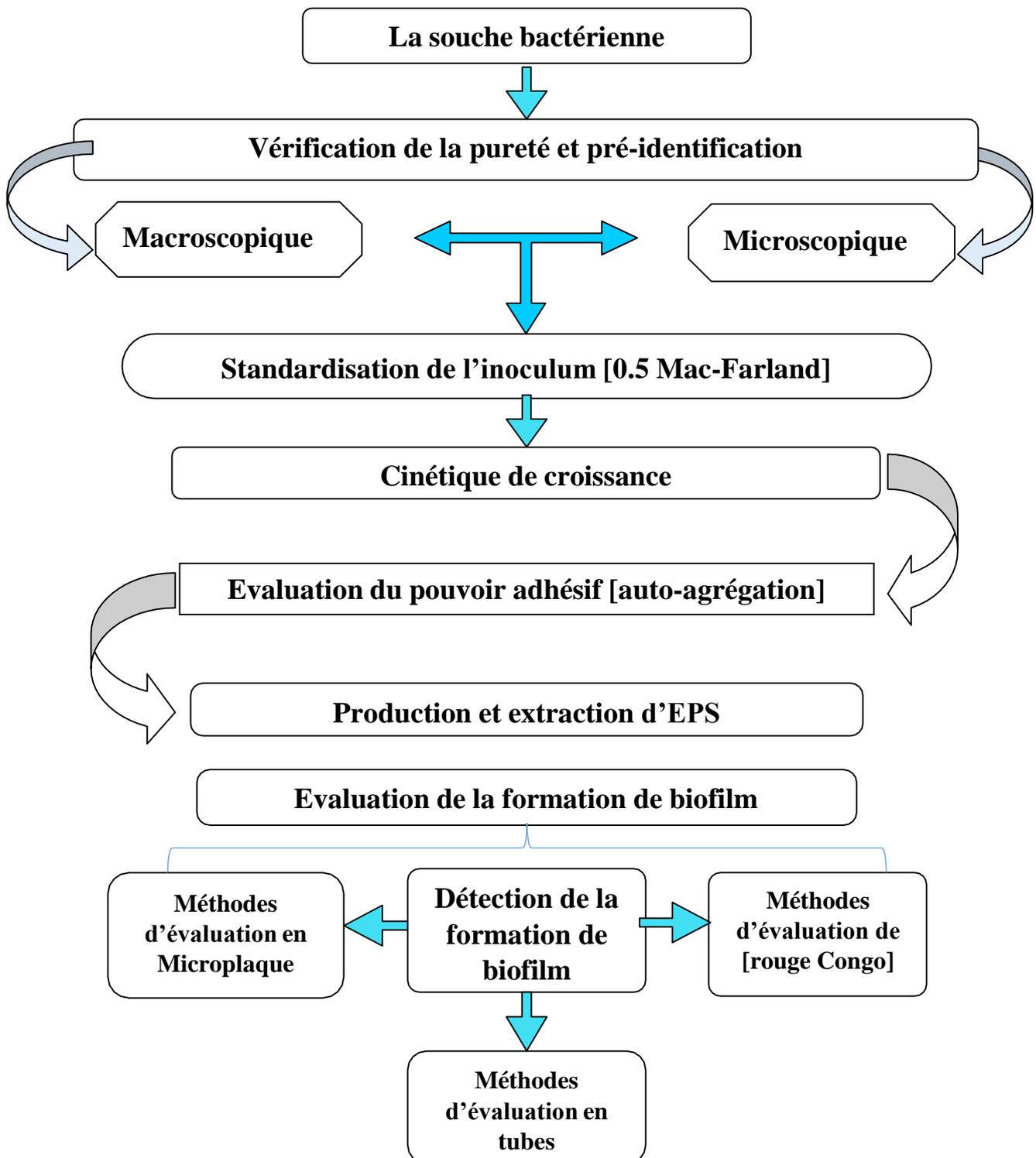


Figure 01 : Protocole expérimental.

I.4. 2. Identification et vérification de la pureté

La souche testée a été conservée plus d'une année, cela a exigé la confirmation de sa pureté par examen microscopique (coloration de Gram) et macroscopique (étude de l'aspect des colonies après culture de 24h à 42°C sur gélose M17).

I.4. 3. Préparation de l'inoculum [0.5 Mac Farland]

La préparation de l'inoculum a été faite selon le protocole décrit par Andrew et *al.* (2008). Des colonies bien distinctes ont été prélevées à partir d'une culture jeune de 18h à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, le contenu a été déchargé dans un volume de milieu M17, et la suspension a été ensuite ajustée à l'échelle **0.5 Mac Farland** ($DO \sim 0.08$ et $0,13$).

I.4. 4. Cinétique de croissance

Dans des tubes à essai contenant 2,25ml de milieu M17 liquide, une quantité de la suspension bactérienne de *S. thermophilus*, ajustée à une longueur d'onde de 578 nm, a été ajoutée. L'incubation a été faite à une température de 42°C. Chaque heure, la densité optique a été lue afin de mesurer la croissance de la souche bactérienne.

I.4. 5. Evaluation du pouvoir adhésive (auto-agrégation)

L'auto-agrégation a été réalisée par la technique modifiée de Kos et *al.* (2003). La suspension bactérienne a été inoculée sur gélose appropriée. Après incubation de 18 à 37°C, rinçage et centrifugation à 5000 g pendant 15 min, la biomasse bactérienne a été récupérée et ajustée à 10^8 germes/ml. Une décantation de cette biomasse a été faite en utilisant le PBS.

Le pourcentage d'agrégation a été calculé chaque heure lors d'une décantation de 5h en appliquant la formule suivante :

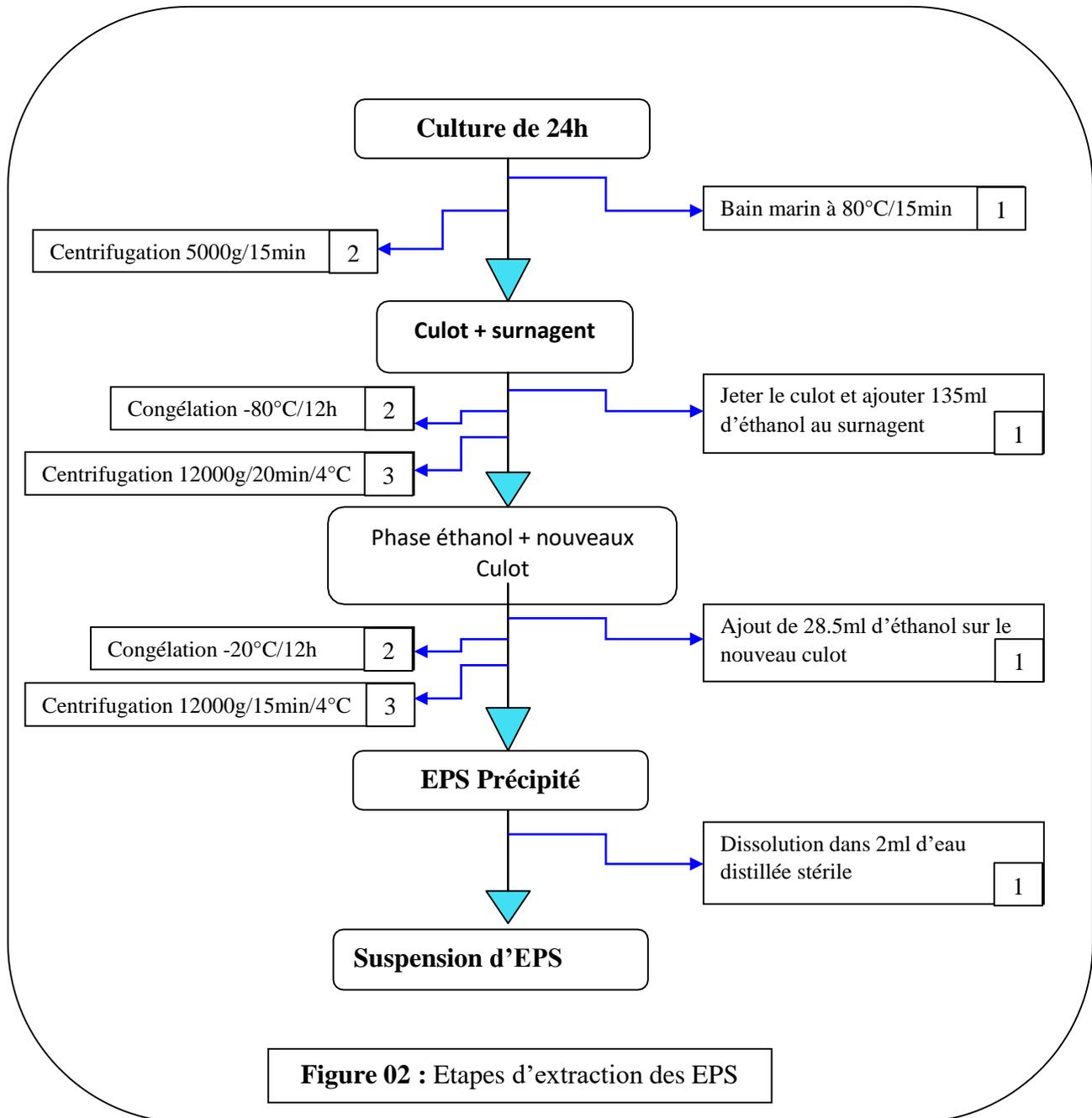
$$\% = (1 - A_t / A_0) \cdot 100$$

A_0 = Absorbance à T_0

A_t = Absorbance après 1h, 2h... 5h

I.4. 6. Extraction d'EPS

Les étapes de l'extraction d'EPS sont résumées dans la figure ci-dessous.



Après extraction, la concentration en EPS a été déterminée par la méthode d'acide sulfurique-phénol démontrée par Gerchakov et Hatchery (1967).

I.4.7. Détermination phénotypique du biofilm

I.4.7.1 Méthode du Rouge Congo

Une gélose à base de rouge Congo a été préparée en ajoutant une quantité du colorant au milieu de culture (MRS et M17) à raison de 0,1 %. Après autoclavage, les boîtes Pétri ont été coulées et inoculées à la surface par une suspension de *S. thermophilus*. Elles ont été ensuite incubées pendant 24h à 42°C, les bactéries formatrices de biofilm (biof⁺) apparaissent en noir (Saad et *al.*, 2017). l'analyse ce fait par observation visuelle

I.4.7.2 Méthodes de cristal violet

L'évaluation de la production de biofilm *S. thermophilus* a été faite à l'aide de la technique standard de coloration par Cristal violet (Djordjevic et *al.*, 2002).

Une série de tubes à essai a été remplie par 2,25 ml de M17 liquide et inoculée par un inoculum de *S. thermophilus* (DO = 0,11) à raison de 0,25 mL, Les tubes ont été incubés à 42°C pendant 24h et 48h. Après incubation, ils ont été vidés et rincés 3 fois à l'eau distillée.

Un volume de 2,5 ml de cristal violet a été versé dans chaque tube. Après incubation de 15 min à la température de laboratoire, le colorant a été rejeté et une prise de photos a été faite. Pour quantifier le biofilm, 2.5ml d'acide acétique (30 %) ont été ajouté et la DO a été prise par la suite à 450 nm.

I.4.7.3 Estimation de biofilm sur microplaque (test de cristal violet)

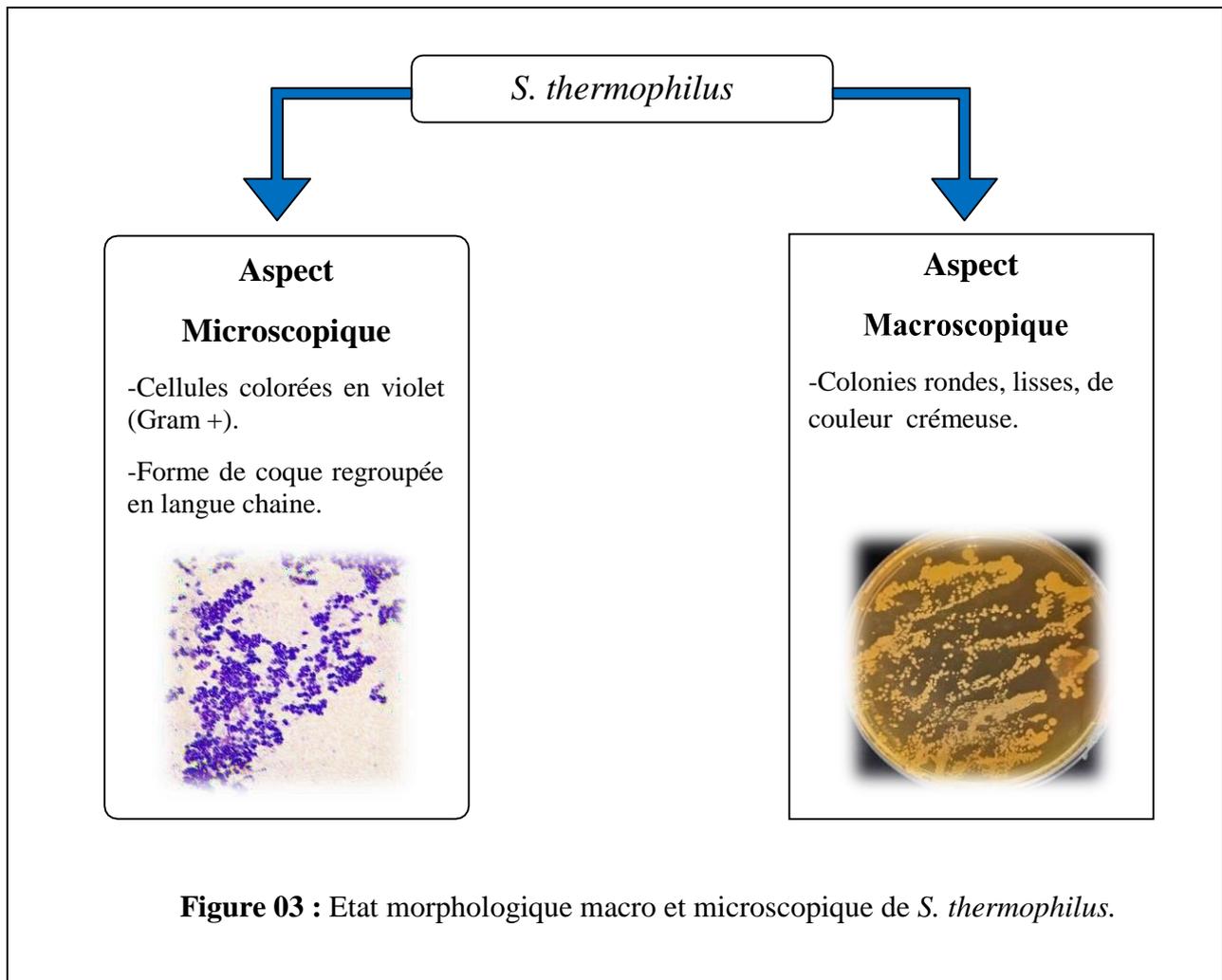
Dans une microplaque de 96 puits, 250µl de suspension bactérienne de *S. thermophilus* ont été ajoutés. La microplaque a été incubée à une température de 42°C pendant 24h. Après incubation, elle a été rincée 3 fois par l'eau distillée et remplie par le cristal violet puis a été incubée pendant 15min à la température de laboratoire l'analyse ce fait par observation visuelle (O'Toole, et Kolter, 1998).

Chapitre II:
RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 Résultats de la vérification de la pureté de *S. thermophilus*

II.1.1 Etude morphologique

L'observation macroscopique et microscopique a permis de visualiser l'aspect morphologique de la souche étudiée (la figure 03).



Streptococcus thermophilus est une bactérie sous forme de coque à Gram positif. Il s'agit d'une espèce thermophile avec un optimum de croissance à 43°C, elle apparaît sous forme ronde, en chaînettes plus ou moins longues (Holzapfel et Wood ,2012). Ces caractéristiques confirment que la souche étudiée est *S. thermophilus*.

II.3. Cinétique de croissance

La croissance sert à la conversion du substrat en biomasse et/ou en produit, depuis la première description de Buchanan (1918), il est classique de distinguer plusieurs phases dans la croissance des cultures bactériennes. Ces phases sont caractérisées par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication de la culture

- 1- la phase stationnaire initiale ou phase de latence.
- 2- la phase d'augmentation de la vitesse de croissance.
- 3- la phase de diminution de la vitesse de croissance.
- 4- la phase stationnaire maximale ou il y a arrêt de la croissance.
- 5- la phase de début de décroissance.
- 6- la phase de décroissance.

Les résultats de la cinétique de croissance de *S. thermophilus* sont représentés dans la figure 40.

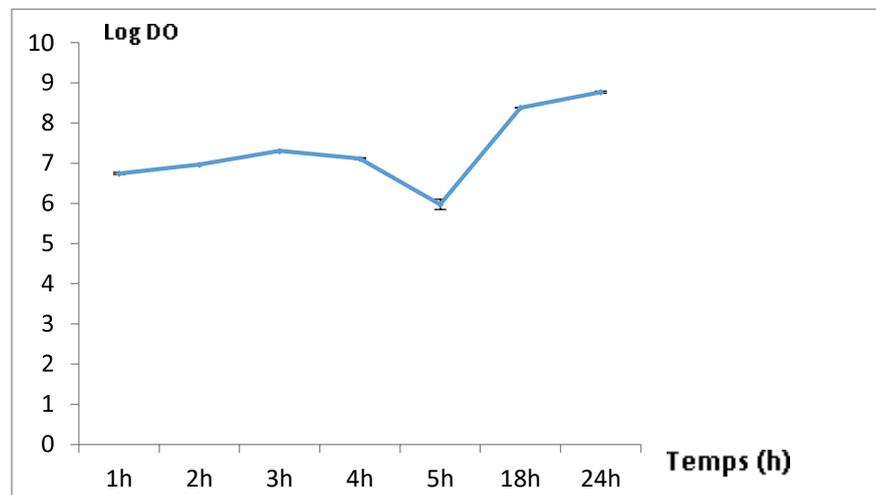


Figure 04 : Courbe d'évolutions de la DO en fonction du temps.

La figure 04, montre les différentes variations de l'évolution de la population bactérienne où une augmentation plus ou moins faible a été marquée dans l'intervalle du temps d'1h à 4h, après 18h on remarque une accélération dans la croissance jusqu'à 24h. L'allure de la courbe obtenue est caractéristique des ferments lactiques

thermophiles (Boubakeur et *al.*, 2015). Pour la dégradation de la courbe à 5h c'est un problème dans le spectrophotomètre lors de la lecture .

Le phénomène d'adhésion, qui permet aux bactéries de coloniser un habitat et de se maintenir bien aussi sur une surface, joue un rôle important dans les résistances aux conditions environnementales : l'osmolarité de milieu, la température, la concentration en oxygène (Beloinet *al.* 2008 ; Auger, 2012). Ce phénomène est conditionné par une bonne agrégation (Kos et *al.*,2003). Les résultats de l'auto-agrégation sont démontrés dans la figure ci-après.

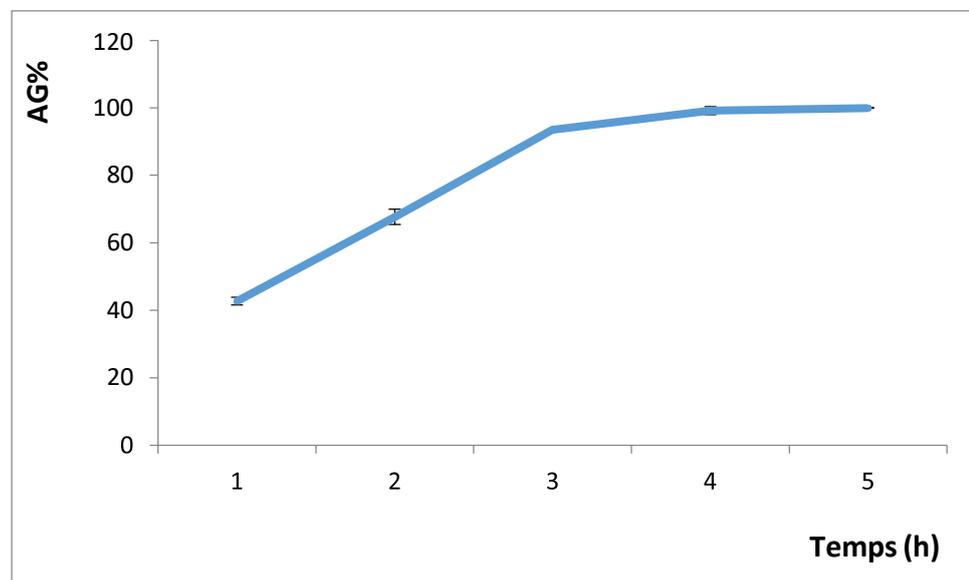


Figure 05 : Courbe de pourcentage d'agrégation en fonction de temps.

II.4. Evaluation du pouvoir adhésif [auto-agrégation]

D'après les résultats illustrés sur la figure 05, on remarque qu'après 1h le pouvoir d'adhésion commence à prendre un parcours d'augmentation à une valeur de pourcentage qui égale à 40%, plus le temps s'écoule plus le pourcentage d'auto-agrégation augmente. Ces résultats concordent parfaitement avec d'autres travaux (Kos et *al.*, 2003 ; Khadem et *al.*, 2020 ; Boubakeur et *al.*, 2016 et 2022).

Selon Kos et *al.* (2003), l'adhésion est conditionnée par une bonne agrégation bactérienne (auto et Co-agrégation).

Le phénomène d'adhésion permet aux bactéries de coloniser un habitat et de s'y maintenir et procure aux espèces un avantage écologique, en effet, les cellules bactériennes sont directement en contact avec leur substrat ce qui évite la diffusion des enzymes dans le milieu extérieur (Akers et *al.*, 2015), et ce qui explique les tendances des bactéries à s'agréger. Ce phénomène est très variable d'une souche à autre et au sein de la souche elle-même ; il est influencé par plusieurs paramètres : la nature de la surface notamment, les conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité du milieu, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et hydrodynamique du fluide (Beloin et *al.*, 2008, Auger, 2012).

II.4. Corrélation entre croissance et l'agrégation

Les résultats de corrélation entre la croissance et l'agrégation suivie pendant 4h sont représentés dans la figure suivante.

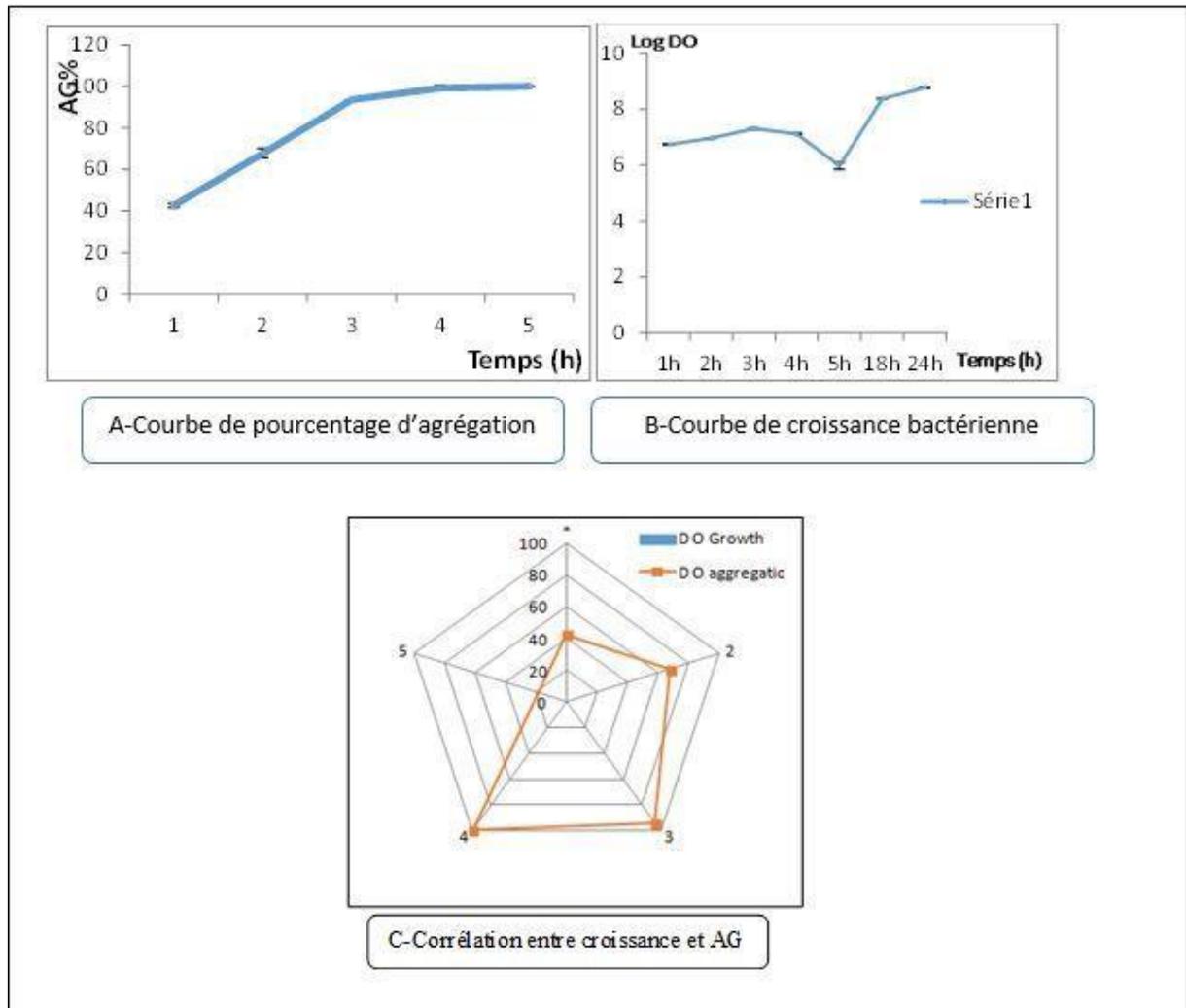


Figure 06 : Corrélation entre croissance et l'agrégation.

Les deux graphes A et B ont abouti à la présentation C de la figure 06, qui démontre une corrélation parfaite entre l'agrégation et la croissance. Plus elle est idéale la croissance plus l'agrégation augmente, il est donc évident que la croissance de la bactérie affecte positivement la capacité d'agrégation [Effet hautement significatif (Sig=0.000041)]. Ces résultats sont en accord avec ceux réalisés par Boubakeur et *al.* (2022) où ils ont démontré que *S. thermophilus* a tendance de s'agréger si le nombre de germe issu de la croissance est important.

II.5. Extraction et évaluation de la production d'EPS

Les EPSs constituent un élément important dans le processus de formation de biofilm chez les microorganismes dans différents habitats (Wolfaardt et *al.* 1999). Les résultats de production des EPSs par *S. thermophilus* en milieu M17 sont illustrés dans la figure 07.

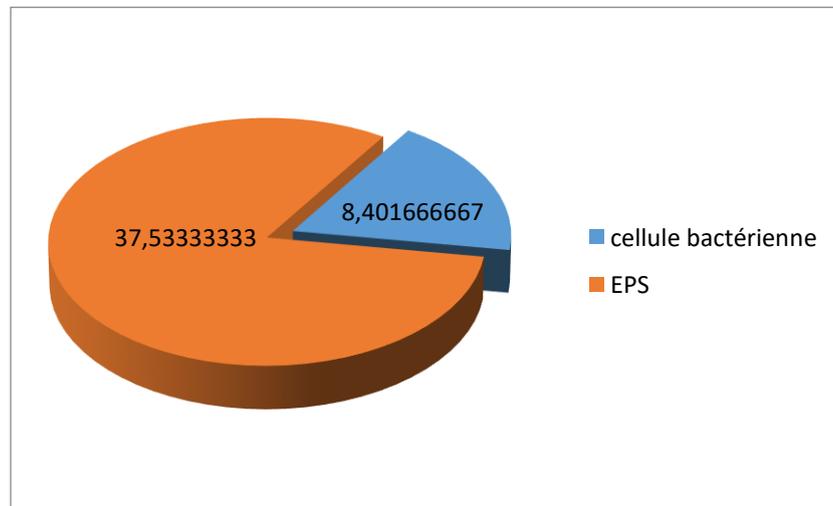


Figure 07 : Pourcentage des EPS produits et nombre des cellules *S. thermophilus*.

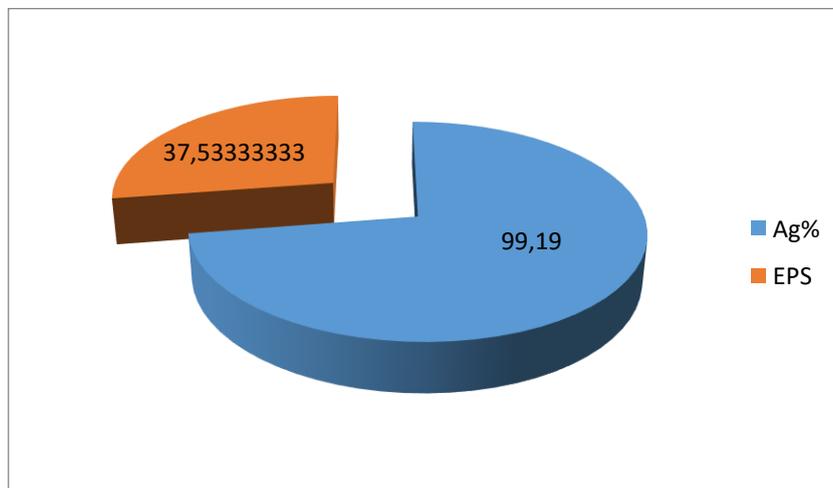


Figure 08 : Pourcentage d'auto-agrégation et production d'EPS.

La figure 07 montre que la quantité d'EPS est trois fois plus importante que le nombre de cellules bactériennes. Selon les résultats de khallil (2010), et les travaux de Boubakeur et al (2018) et par comparaison des résultats on peut dire que *S. thermophilus* peut produire une bonne quantité d'EPS peu importe la quantité des cellules impliquée dans la formation de biofilm.

La figure 08 représente le pourcentage d'agrégation et le pouvoir de formation de biofilm qui est directement influé par la quantité d'EPSs produite. Plus le biofilm mature se forme plus la production d'EPS est importante, dans notre étude la production des EPS est dissociée aux phénomènes d'agrégation de la souche. Kos et al (2003) et Khalil (2010), ont rapporté que l'agrégation est corrélée à la propension de s'organiser en biofilm. Kumar et al. (2007), ont montré que la production d'EPS est affectée quantitativement par les facteurs environnementaux plus que la capacité d'agrégation des cellules.

II.6. Résultats de la formation de biofilm

II.6.1 Méthode du rouge Congo

La gélose additionnée de rouge Congo révèle le pouvoir sécrétoire d'une substance polysaccharidique, elle permet aussi d'identifier les bactéries formatrices de biofilm. Ces dernières apparaissent sous l'aspect d'un point noir sur le milieu.

Sur les deux milieux MRS et M17, on a observé que la colonie bactérienne apparaisse à peine les premières heures, par ailleurs un changement de couleur du milieu après 24h à 37°C a été remarqué.

Tableaux 03 : Capacité formatrice de biofilm dans [M17/MRS]

Capacité formatrice de biofilm	Aspect chromatique de gélose rouge Congo
-Faible [MRS CR]	-Rouge, très rouge.
-Moyen [M17 CR]	-Couleur bordeaux.

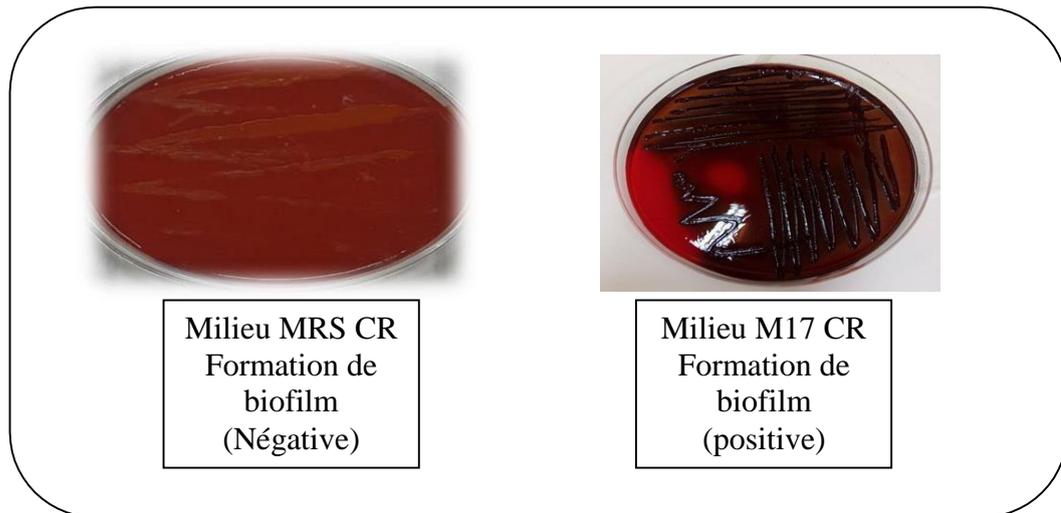


Figure 09 : Formation de biofilm dans le milieu [Rouge Congo de M17 et MRS].

La figure 09 représente le test de gélose au rouge Congo pour la détection de la formation de biofilm, en mettant en évidence la production des EPS qui est aussi nommé "Slime" (Freeman et *al.*, 1989). D'après la littérature les souches productrices de "Slime" sont celles qui donnent des colonies noires sèches, d'autre part les colonies rouge lisses/sèches et roses lisses/sèches sont considérées comme étant non productrices de biofilm (Freeman et *al.*, 1989; Arciola et *al.*, 2001; Darwish et Asfour, 2013).

Certaines études montrent que les colonies noires lisses et rouges sèches sont dues à une formation moyenne de biofilm. Darwish et Asfour (2013) ; Kos et *al.* (2010) ont indiqué que les colonies roses claires sont non productrices de biofilm alors que les colonies rose foncées sont modérément productrices de "slime", ceci aboutit à ce que les phénotypes (noir secs, noire lisse, rouge sec et rose sec) sont donnés par des bactéries susceptibles de former le biofilm.

II.6.2. Méthode d'évaluation au cristal violet sur microplaque

Les résultats de l'évaluation de la formation de biofilm par *S. thermophilus* sont représentés dans la figure 10.

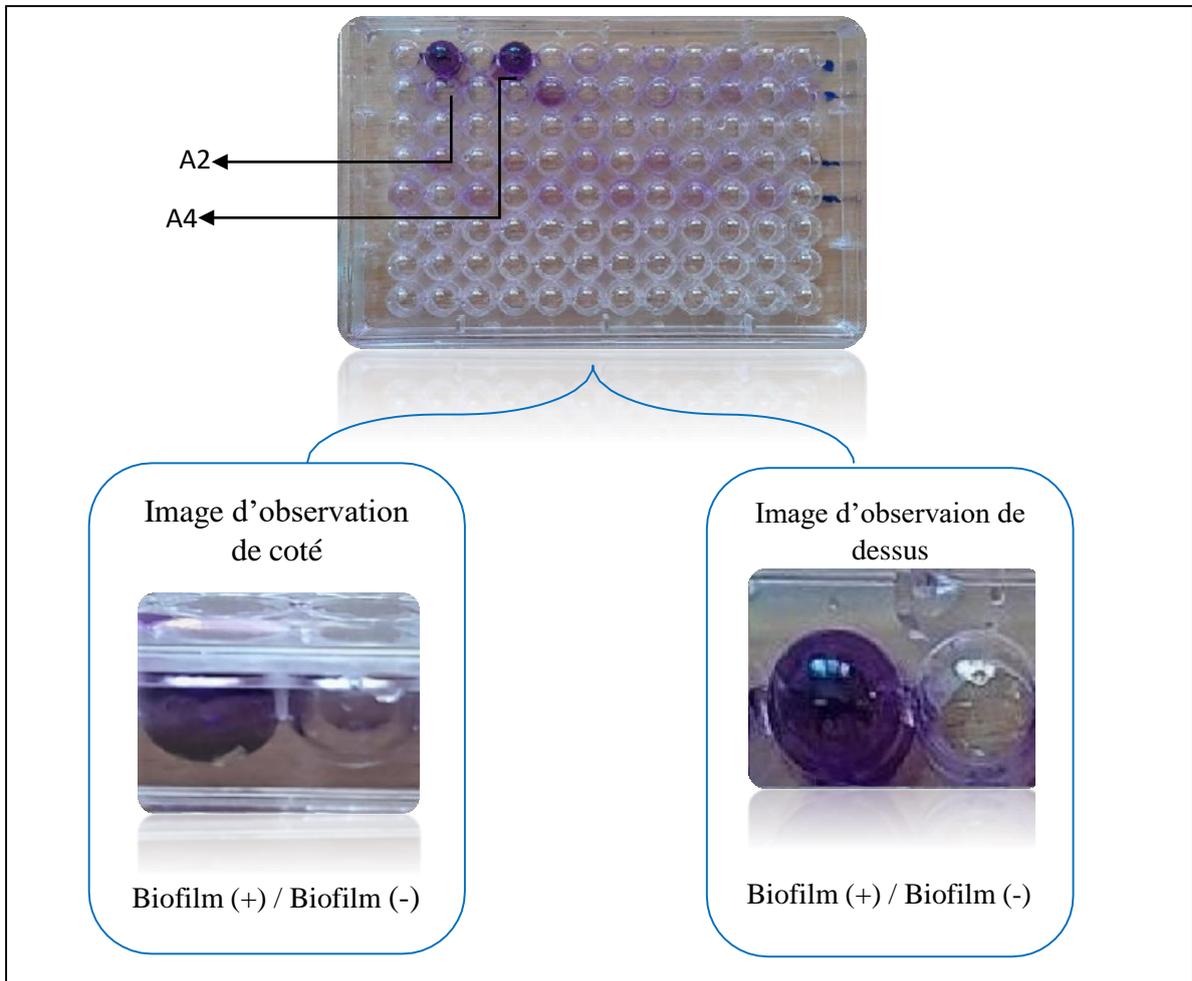


Figure 10 : Test de coloration au cristal violet sur microplaque.

Les résultats obtenus démontrent la capacité la souche de s'organiser en biofilm. Au début, la bactérie se fixe sur une surface en polystyrène (plaque 96 puits), se multiplie et génère un biofilm bactérien. Le CV est utilisé pour colorer les structures polysaccharidiques des bactéries qui sont intégrées dans le biofilm. Après le processus, le lavage à l'eau distillée élimine l'excès de colorant et de bactéries planctoniques. Par observation et analyse visuelle les résultats obtenus ont montré que les puits A2 et A4 présentaient une formation de biofilm robuste. D'après des études réalisées par Diaz et al. (2016), certaines bactéries lactiques comme *Enterococcus durans*, *Lactobacillus brevis* et *curvatus* ont rapporté que l'adhérence est entre forte et faible, de plus Gomez et al. (2016) ont montré que les espèces des bactéries

lactiques ont un fort potentiel de formation de biofilm sur les microplaques en polystyrène, ce qui est comparable aux résultats présentés dans la figure 10.

II.6.3. Evaluation de la formation de biofilm sur tube

Les résultats de l'évaluation de biofilm sur tubes sont montrés dans la figure N 11. Il est bien évident que la propension de biofilm obtenue après 48h d'incubation est plus importante que celle enregistrée après 24h d'incubation, en effet, le temps a affecté considérablement le biofilm formé [Effet hautement significatif (Sig=0.00002)].

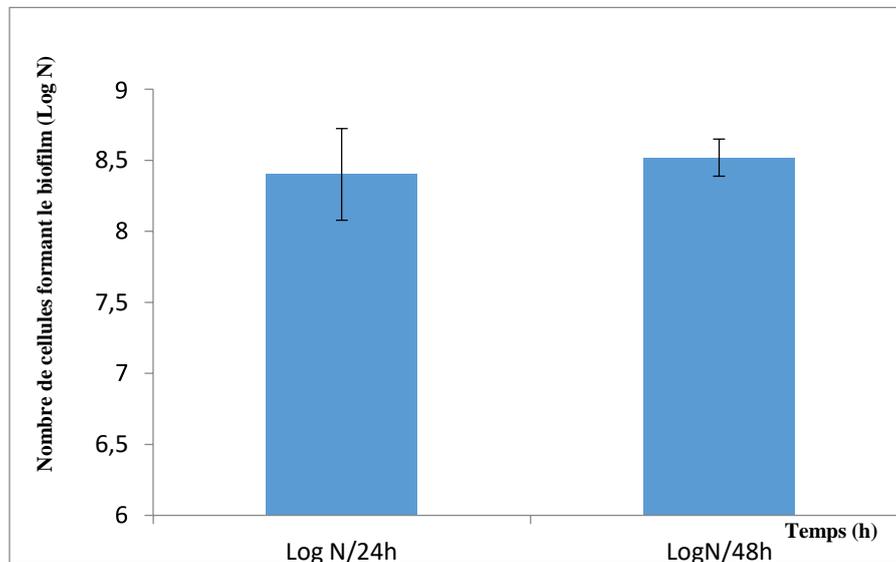


Figure 11 : Nombre de cellules bactériennes formant le biofilm en fonction du temps

Selon Bakir et Ali (2016), cette technique est très utile mais présente un inconvénient qui est la difficulté de visualiser la qualité de biofilm formé, faible ou consistant, de plus certaines études ont démontré que cette méthode n'est pas très recommandée pour identifier les souches formatrices de biofilm mais elle reste meilleure que la technique de la gélose au rouge Congo (Christensen et al., 1995; Mathur et al., 2006; Hassan et al., 2011).

Conclusion

Conclusion

Le mode de vie préféré des bactéries est celui où la population bactérienne est enracinée dans un système de support (état sessile) plutôt que d'être libre dans le milieu environnemental (état planctonique). La capacité de se fixer à une surface est une tactique de survie qui permet aux bactéries de s'installer et de coloniser les surfaces vivantes et non vivantes. Une fois fixées à un support, les bactéries vont établir et faire murir un biofilm.

Ce travail avait pour ambition d'étudier la capacité de formation de biofilm par une bactérie d'intérêt industriel -*Streptococcus thermophilus*- en prenant en compte leurs propriétés biologiques et physicochimiques afin d'estimer son pouvoir adhésif lié à son aptitude de produire des exo-polysaccharides sur n'importe quelle surface.

L'allure de la courbe de la croissance qui a tendance à s'augmenter permet d'avoir une très bonne agrégation bactérienne de la souche étudiée. Le biofilm produit est fortement lié aux différents phénomènes étudiés à savoir la croissance, l'agrégation et la production des EPSs, par contre l'agrégation n'aboutit pas forcément à une meilleure production d'EPS.

De nouveaux outils et approches devraient être adoptés pour mieux cerner les différentes corrélations qui pourraient exister entre les différentes étapes de formation de biofilm.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

« A »

- Alnnasouri, M. (2010)**. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Ecole doctorale de Lorraine.
- Andrew, J, M,(2008)**. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 256-278.
- Akers, K.S., Cardile, A. P., Wenke, J. C et Murray, C. K. 2015**. Biofilm Formation by Clinical Isolates and Its Relevance to Clinical Infections. In: *Biofilm-based Healthcare-associated Infections Volume I* (ed. G. Donelli), p. 193, pp. 1-28.
- Auger, M. 2012**. Formation de biofilm *in vitro* par des souches cliniques d'*Escheichia coli* : impact de la modification des conditions expérimentales. Université de Nantes, faculté de pharmacie. France. P. 83.

« B »

- Bailey JE., Ollis D. (1986)**. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Edition, McGraw-Hill Book Company, New York.
- Baudin M. (2017)**. Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms. Thèse de doctorat : Biologie. France : Université Paris-Saclay, 158p.
- Branger A. (2007)**. *Microbiochimie et alimentation* ; 345-343.
- Baillif S., Hartmann D., Freney J., Kodjikian L. (2010)**. Implant intraoculaire et adhésion bactérienne : influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du matériau. *Journal français d'ophtalmologie*. 33 : 210-221.
- Beloin, C., Roux, A., Ghigo, G.M. 2008**. *Escherichia coli*, fimbriae. *curr Top Microbial immunology*. P249-289.
- Beloin, C., Roux, A. & Ghigo, J. M. (2008)**. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 249-289.
- B. Kos, J. Suskovic, S. Vukovic, M. Simpraga, J. Frece, and S. Matosic (2003)**. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92

-Boubakeur B., Tirtouil A., Meddah B and Khadem H. The evaluation of the effect of synthetic flavonoids on growth of pathogenic and probiotic bacteria.. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2015, 7(10):228-236.

-Boubakeur, B., Drabo, M. S., Khadem, H., Mullier, C., & Tirtouil, A. (2018). Influence of the exopolysaccharides of polyphenol-conditioned lactic acid bacteria on gut microecology and bacterial translocation. Ukrainian Journal of Ecology, 8(3), 1-9.

-Boubakeur B., Tirtouil A., Khadem H., Meddah B., Ahcen S. (2016). An assessment of the effect of aqueous extract from *Thymus fontanesii* on growth, aggregation and biofilm formation of pathogenic and probiotic bacteria. J Appl Environ Bio Sci. 6 (7):51-60.

« C »

-Christensen G.D., Simpson W.A., et Younger J.A., 1995. Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. Journal Clinical Microbiology, 22:996-1006.

-Chung, I J., Park, YS. (1983). Ethanol fermentation by *S. cerevisiae* in a bioreactor packed vertically with ceramic rods. In Proc.-Pac. Chem. Eng. Congr., 3rd, Korean Institute of Chemical Engineering, Seoul, Korea; 4: 174–179.

-Caverly, L.J., LiPuma, J.J. (2018). Cystic fibrosis respiratory microbiota: unraveling complexity to inform clinical practice. Expert Review of Respiratory Medicine, 12(10):857 - 865

« D »

-Demirci, A, Pometto III AL and K-LG Ho. (1997). Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm Reactors. Industrial Microbiology & Biotechnology; 19: 299–304.

-Djordjevic D., Wiedmann M., Mclandsborough L.A. (2002). Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. Applied And Environmental Microbiology; 68(6):2950-2958.

-Dufour, D., Leung, V., Lévesque, C. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. Endodontic topics; 22(1):1-136.

-Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(26):11971-11975.

« F »

-Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T., 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. Journal of clinical Pathology, 42:872-4.

« G »

- Garret TR. (2008).** Bacterial adhesion and biofilm on surface. *Science direct*.
- Gerchakov S. M., Hatcher P. G.(1972).** Improved technique for analysis of carbohydrates in sediments. Wiley online library. P938-943.
- Gómez N.C., Ramiro J.M.P., Quecan B.X.V., et de Melo Franco B.D.G., 2016.** Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1-15.
- Guezennec J. (2001)** - Les exopolysaccharides bactériens d'origine hydrothermale : un exemple de valorisation de micro-organismes extrêmophiles., p. 22-24

« H »

- Hassan A. Usman J. Kaleam F.,Mmair M, Khalid, A.Iqbal M, 2011.** Evalutant of diffrent detection methode of biofilm formation in fhe clinical isolates Barazilian journal of infectons *Discoses* 15(4):305_311

« K »

- Khalil, S.K et A. Rowayd 2010.** Influence of gallic acid and catechine polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain. *Word journal of Microbiology and Biotechnology*. 11: 2069-2079.
- Kaiser T. D. L., Pereira E. M., Santos K. R., Maciel E. L. N., Schuenck R. P., et Nunes A. P. F.2013.** Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(3): 235-239.

« L »

- Laithier, C.Chatelin, Y, M.Talon, R.Barral, J et Tormo,H et Lefrileux,Y.(2005).** Efficacité en laboratoire puis en exploitations de procédures de nettoyage / désinfection sur la sélection positive des biofilms. 12 ème Rencontres autour des recherches sur les ruminants.
- Lamoureux C., Guilloux C.-A., Beauruelle C., Jolivet-Gougeon A., Héry-Arnaud G. (2019).** Anaerobes in cystic fibrosis patients' airways. *Crit. Rev. Microbiol* ,45 1–15

« O »

-O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, 30(2), 295-304.

« P »

-Philips PL., Wolcott RD., Fletcher J., Schultz GS. (2011). Biofilms made easy ; 1(3):1-6.

-Pantaléon, V. (2015). Le biofilm de *Clostridium difficile* : rôle des protéines de surface. Thèse de doctorat : Microbiologie et thérapeutiques anti-infectieuses. France : Université Paris-Sud 11, 174 p.

-Pollard, D.J., Woodley, J.M. (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology*, 25(2):66-73

« R »

-Roux A. et Ghigo J.M. (2006). Les biofilms bactériens. *Académie vétérinaire de France*, 159(3), 261-268.

-Ruzicka F., Hla V., Votava M., et al., 2004. Biofilm detection and clinical significance of staphylococcus epidermidis isolates. *Folia Microbiology (Praha)* , 49 (5) : 596-600.

« S »

-Sauer, K., Rickard, A.H. et Davies, D.G.(2007). Biofilms and biocomplexity. *Microbe*, 2, 347–353.

-Salaün S. (2009). Interactions entre la macroalgue brune *Laminaria digitata* et ses épibiontes bactériens : études moléculaire et spectroscopiques : capacité d'adhésion et de formation de biofilm. Thèse de doctorat : Biologie de santé. Bretagne : Université Européenne de Bretagne, 204 p.

-Saad AM Moghannem, Mohamed M.S.Farag, A. M. Shehab ,Mohamed Salah Azab (2017) Media Optimization for Exopolysaccharide Producing *Klebsiella oxytoca* KY498625 under Varying Cultural Conditions

-Steven Percival L., Sladjana M., Cruz H., David Williams W. (2011). Introduction to Biofilms. *Biofilms and Veterinary Medicine*; P41-68.

-Sharma K., Sharma N., Sharma R., 2018. Study on optimisation of exopolysaccharides from a potential *Lactobacillus casei* KL14 KX774469. *International journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(2):3410-3418.

-Sevan H. Bakir, Fattma A. Ali .,2016. Comparison of Different Methods for Detection of Biofilm Production in Multi-Drug Resistance Bacteria Causing Pharyngotonsillitis.P13-22

« T »

-Tremblay Yannick 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*; 78:110-116.

-Todd B Reynolds, Gerald R Fink. (2001). Bakers Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation. *Science*; 291(5505): 878 – 88.

-TASSE J. (2017). Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections osteo-articulaires aux staphylocoques. Thèse de doctorat : Microbiologie. Lyon : Université Claude Bernard Lyon 1, 210 p.

« V »

-Vieu G. (2014). Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Étude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Toulouse iii – Paul Sabatier. Faculté des sciences pharmaceutiques.

« W »

-Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Korber, D. R. Function of EPS In Microbial Extracellular Polymeric substances: Characterization, Structure and Function, Wingender, J., Neu, T. P., Flemming, H. C., Ed.; Springer-Verlag: New York,

-W. H. N. Holzappel, B. J. Wood. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Springer-Verlag New York Inc., 6 October 2012, softcover reprint of the original 1st ed. 1995 éd.

-Woodley, J.M. (2006). Microbial bio catalytic processes and their development. *Advances in Applied Microbiology*, 60:1-15.

« Z »

-Zemanick, E.T., Wagner, B.D., Robertson, C.E., Ahrens, R.C., Chmiel, J.F., Clancy, J.P., Gibson, R.L., Harris, W.T., Kurland, G., Laguna, T.A., McColley, S.A., McCoy, K., Retsch-Bogart, G., Sobush, K.T., Zeitlin, P.L., Stevens, M.J., Accurso, F.J., Sagel, S.D., Harris, J.K. (2017). Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, 50(5).

Liste des Annexes

Annexe I : Les photos des appareils utilisés



Agitateur magnétique chauffant



Balance électronique



Agitateur Vortex



PH-mètre



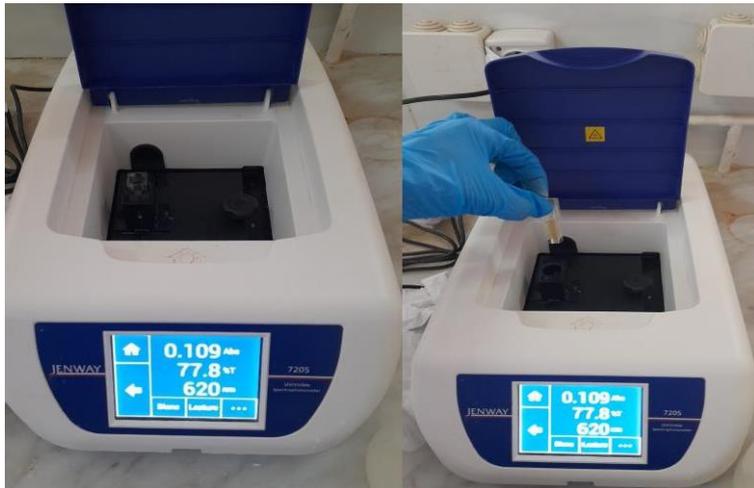
Microscope optique



Congélateur de laboratoire



Incubateur



Le spectrophotomètre UV



Centrifugeuse



BIOREACTEUR

Annexe II Composition des milieux de culture

[Milieu MRS]

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween80	1ml
Phosphate bi potassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.5g
Agar	15g

[Milieu M17]

Tryptone	2.5g
Peptone papainique de soja	5.0g
Peptone pepsique de viande	2.5g
Extrait de viande	5.0g
Extrait auto-lytique de levure	2.5g
Beta-Glycérophosphate de sodium	19.0g
Sulfate de magnésium	0.25g
Lactose	5.0g
Acide ascorbique	0.5g
Agar-agar bactériologique	15.0g
PH à 25°C	7.1 ± 0.2

[Milieu hyper-saccharose]

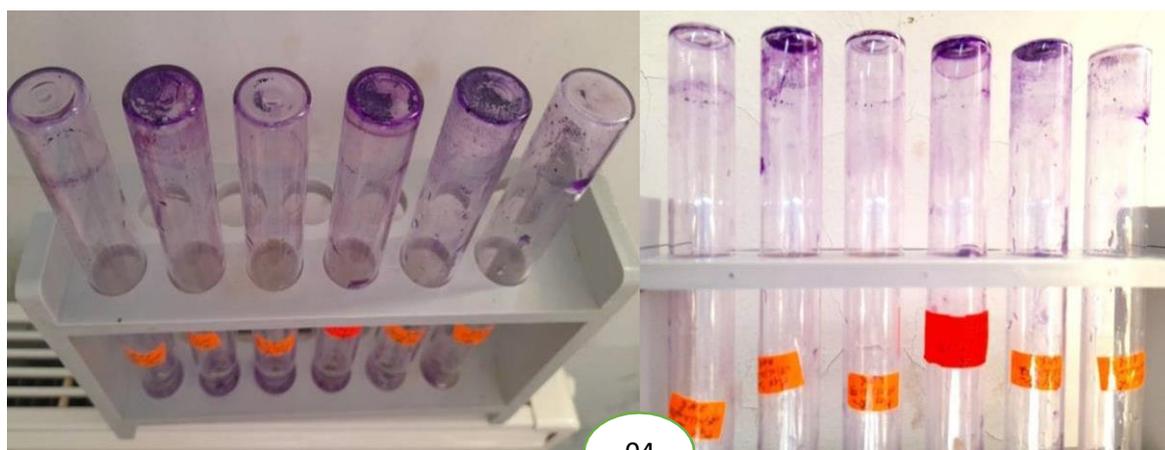
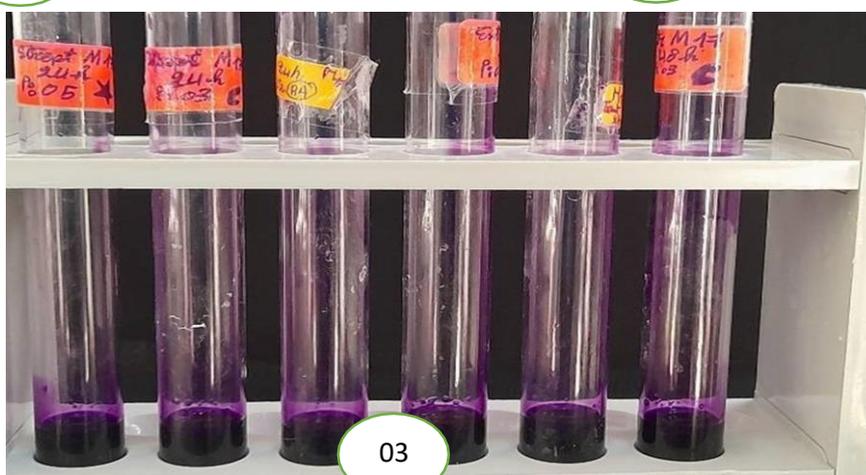
Triston	10g
Saccharose	50g
Kh ₂ PO ₄	5g
pH	6.5

[Pour 1L de PBS]

Chlorure de sodium	8g
Chlorure de potassium	0.2g
Phosphate d'osidique	1.15g
Phosphate (Mono-potassique)	0.2g

Annexe III Éléments de l'expérimentation

III-1-Coloration de cristal violet



B-Test de cristal violet quantification de biofilm dans les tubes

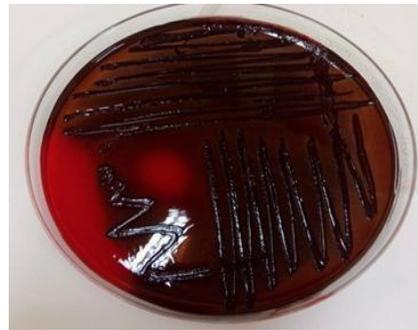
III-2-Aspect de colonies



A) Appréciation de l'aspect des colonies.



Milieu MRS CR
Formation de
biofilm
(Négative)



Milieu M17 CR
Formation de
biofilm
(positive)

B) Test du Rouge Congo [M17--MRS].

Résumé

Un biofilm est une communauté de micro-organismes qui adhèrent à une surface. Selon les effets associés, les biofilms peuvent être considérés comme bénéfiques ou nocifs.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressées à l'étude de biofilm formé par une souche lactique d'intérêt technologique et fonctionnel à travers l'application de trois méthodes aboutissant toutes à l'évaluation phénotypique et ou quantitative du biofilm total et aussi l'étude des corrélations possibles entre le biofilm et d'autres aptitudes impliquées lors de l'installation de ce phénomène dont l'adhésion et la production d'EPS.

Les résultats obtenus montrent que la souche testée est dotée d'une capacité de formation de biofilm, ainsi la propension dépend du paramètre -temps d'incubation-

D'autres part, *S. thermophilus* est capable de produire plus d'EPS peu importe la charge cellulaire impliquée dans la formation de biofilm. Ces résultats sont encourageants et semblent être utiles s'ils sont appliqués en technologie utilisant les biofilms des bactéries lactiques.

Mots clés : Biofilm. Adhésion. Exopolysaccharides. Croissance

Abstract

A biofilm is a group of microorganisms that adhere to a surface. Depending on the associated effects, biofilms may be considered beneficial or harmful.

In this study, we looked at the study of biofilm formed by a lactic strain of technological and functional interest through the application of three methods all leading to the phenotypic and quantitative evaluation of the total biofilm and also the study of possible correlations between the biofilm and other abilities involved in the installation, including adhesion and EPS production.

The results obtained show that the strain tested has a biofilm formation capacity, so the propensity depends on the parameter -incubation time -

On the other hand, *S. thermophilus* is able to produce more EPS regardless of the cellular charge involved in biofilm formation. These results are encouraging and seem to be useful if applied in technology applying lactic bacteria biofilms.

Keywords : Biofilm. Adhesion. Exopolysaccharides. Growth

الملخص

الأغشية الحيوية هي مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة التي يمكنها الاتصال والارتباط بأي سطح أو بغشاء حيوي آخر حيث يمكننا تمييز نوعان المفيد والضار في دراستنا، استعملنا النوع المفيد والمعروف أيضاً باسم الغشاء الحيوي الإيجابي ركزنا في عملنا على دراسة الأغشية الحيوية التي تتكون عن طريق بكتيريا اللاكتيك التي تعتبر ذات فوائد تكنولوجية وعملية. تقتضي هذه الدراسة بثلاث تجارب تهدف جميعها الى تقييم الظاهري والكمي للغشاء الحيوي الكلي وزيادة على ذلك دراسة الارتباطات المحتملة بين الأغشية الحيوية والقدرات التي تتدخل في التثبيت، بما في ذلك الالتصاق وإنتاج

(EPS).

أظهرت النتائج المتحصل عليها ان عينة الاختبار تتميز بقدرة جيدة في تكوين الغشاء الحيوي حيث تعتمد هذه القدرة على عامل -وقت الحضانة المستعمل-

من وجهة نظر أخرى فان بكتيريا *S. thermophilus* قادرة على إنتاج EPS مهما كانت كمية الخلايا الضرورية لإنتاج الغشاء الحيوي.

النتائج التي حصلنا عليها مشجعة ومفيدة إذا طبقت في التكنولوجيا التي تنطوي حول ميدان الغشاء الحيوي لبكتيريا اللاكتيك.

الكلمات المفتاحية: الغشاء الحيوي , الالتصاق , النمو , السكريات الخارجية , (EPS).