

Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université SAAD DAHLAB de BLIDA

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

Département de **Biologie**



Mémoire

De fin d'Etudes en Vue de l'Obtention de Master en Biologie

Option : **Microbiologie et Toxicologie Alimentaire**

Thème

Etude de l'effet antimicrobien des *Lactobacillus* isolées à partir du lait de chèvre, miel et jus des dattes dans un yaourt brassé

Présenté par :

soutenue publiquement le : 19/12/2013

M^{elle} AID Zahia

M^{elle} CHEMMAMI Soumia

Devant le jury composé de :

M^{me} BOULKOUR .S.....MAA.....Présidente.....USDB

M^r GRANDI .M.....MAA.....Examineur.....USDB

M^{me} MOHAMED MAHMOUD .F.....MAA.....Examinatrice.....USDB

M^{me} BOUDALI .S.....MAB.....Promotrice.....USDB

Promotion 2012-2013

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donnés le courage, le pouvoir et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude à notre promotrice Madame BOUDALI .S Maître assistante au département de biologie pour son extrême gentillesse, sa disponibilité ses conseils et sa patience tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier les membres de jury :

Madame BOULKOUR .S Maître assistante au département de biologie qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Madame MOHAMED MAHMOUD .F Maître assistante et Monsieur GRANDI .M Maître assistant au département de Biologie qui ont accepté d'examiner ce travail.

Aussi nous tenons à adresser notre sympathie et notre reconnaissance à Mr SADOUKI ANIS de nous avoir autorisé à suivre notre travail au sein du laboratoire de l'unité de trèfle aussi que Mr ADEL et M^{me} KARIMA laborantins et laborantines de l'unité pour leurs disponibilité, et leurs orientation.

Dédicace

*Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage
et la patience pour réaliser un de mes rêves*

*J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail en témoignage de mes
gratitudes et mes profonds remerciements à :*

*Ma très chère mère qui ma suivi dans mes études, guidé vers la réussite avec
grand amour, pour sa disponibilité et sa judicieux conseils.*

Mon très cher père que le Dieu lui pardonne et as pitié de paradis.

*Je voudrais exprimer un infini merci à mon mari, Mohamed pour sa grande patience,
son aide précieuse et ses vifs encouragements.*

J'espère que ce travail soit l'expression de ma pleine reconnaissance et gratitude à

*Mes frères Karim, Ouahab, Ilyass, Ismail et Brahim. et mes sœurs Dahbia, Karima, Djaouida
et Samira et tous les enfants de la grande famille*

Ma belle famille surtout mes beau parents pour leur amour et leur compréhension

Mes belles sœurs Aicha, Habiba et Fatima et beau frère Youssef

Mes cousines Noura, Khadidja Aet Khadidja S

Ma binôme Soumia et tout sa famille

Toutes mes amies surtout Ahlam, Halima, Djimi, Wafa, Soumia, Mery,

Zola, Souhila, lamia, Asma , Amina ,Hadjer ,et Melyne.

Tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

Kenza (Zahia)

Dédicace

*Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage
et la patience pour réaliser un de mes rêves. C'est avec un très
Grand honneur que je dédie le fruit de ce travail comme un geste de reconnaissance à :*

-  *Mes très chers parents: Nacer et Karima, source de tendresse, qui ont sacrifié
pour mon bonheur, qui m'ont constamment soutenu dans ma vie, pour leur
amour et leurs prières « Que dieu me les gardes »*
-  *Mes grands pères et mes grandes mères*
-  *Ma sœur Imen et mon frère Mohamed Ridha*
-  *Ma cousine Amira*
-  *Touts mes cousins et mes cousines*
-  *Mes oncles et leurs femmes et mes tantes et leurs maris*
-  *Ma chère amie et mon binôme Kenza, pour leur soutien, leur patience et leur
amour et toute sa famille*
-  *Toutes mes amies surtout : Djamila, Meriem, Wafaa, Soumia, Souhila, Zola,
Lamia, Hadjer.*
-  *Mes adorables amies Sousou, Hadjer, imen et sa petite Ranime*
-  *Enfin, à tous ceux que j'aime et m'aiment*

Soumia

sommaire

INTRODUCTION	1
---------------------------	---

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. généralités sur le yaourt	2
I.2. les ferments lactiques	2
I.3. action des bactéries lactiques dans les aliments.	7
I.4. Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques	9
I.5. Généralité sur le miel.	10
I.6. Généralité sur lait de chèvre.	11
I.7. Généralité sur les dattes.	13

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODE

II.1. Matériels	17
II.1.1. Matériels non biologiques	17
II.1.2. Matériels biologiques	17
II.2. Méthode	18
II.2.1. Préparation des solutions mères	18
II.2.2. Préparation des dilutions décimales	19
II.2.3. Isolement des <i>Lactobacillus</i>	19
II.2.4. Les tests d'identifications	19
II.2.5. Conservation et revivification des souches	20
II.2.6. Préparations des recettes de yaourt brassé	20
II.2.7. Premier essai étape 1 : contamination par levure <i>Candida</i>	21
II.2.8. Premier essai étape 2 : contamination par levure <i>Candida</i> (4 gouttes)	23

II.2.9. Deuxième essai : contamination par <i>E coli</i>	23
--	----

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1.Résultats.	27
III.1.1. Isolement des <i>Lactobacillus</i>	27
III.1.2. Etude macroscopique	28
III.1.3. Etude microscopique	28
III.1.4. Premier essai étape 1 : contamination par levure <i>Candida</i>	29
III.1.5. Premier essai étape 2 : contamination par levure <i>Candida</i> (4 gouttes)	30
III.1.6.Contamination par <i>E coli</i>	35
III.2. Discussion	40
CONCLUSION	46

Références bibliographiques.

Les annexes.

Liste des tableaux

Tableau 1 : les différents types du yaourt.....	2
Tableau 2 : classification des genres de <i>Lactobacillus</i>	4
Tableau 3 : principaux rôles des bactéries lactiques dans les aliments.....	8
Tableau 4 : les différentes catégories des dattes.....	14
Tableau 5 : constituants de chaque échantillon durant le premier essai étapes 1.	23
Tableau 6 : constituants de chaque échantillon durant le deuxième essai.	26
Tableau 7: modification du pH durant la conservation du yaourt de premier essai étape 2 (contaminé par les levures).....	annexe 3
Tableau 8 : modification de l'acidité durant la conservation du yaourt de premier essai étape 2.....	annexe 3
Tableau 9: les résultats de dénombrement des levures du yaourt de premier essai étape	annexe 3
Tableau 10: modification du pH durant la conservation du yaourt de deuxième essai (contaminé par <i>E. coli</i>).....	annexe 3
Tableau 11 : modification de l'acidité durant la conservation du yaourt de deuxième essai.	annexe 3
Tableau 12 : les résultats de dénombrement des coliformes du yaourt de deuxième Essai.....	annexe 3
Tableau 13 : les espèces des <i>Lactobacilles</i>	annexe 6

Liste des figures

Figure 1 : schéma d'identification des genres des bactéries lactiques (bacilles)	5
Figure 2 : schéma des interactions métaboliques de <i>St thermophilus</i> et <i>Lb bulgaricus</i> _En culture mixte dans le lait.....	7
Figures 3 : schéma de différentes étapes du déroulement du protocole expérimental.....	15
Figure 4 : figure des échantillons.....	17
Figure 5 : les milieux des cultures.....	18
Figure 6 : photos originales de l'isolement des Lactobacilles à partir du miel, lait de chèvre et jus des dattes.....	27
Figure 7 : photos originales des résultats de développement des levures sur milieu Sabouraud d'un yaourt contaminé par levure <i>Candida</i> de l'étape 1 du premier essai.....	30
Figure 8 : schéma d'interprétation graphique des valeurs de pH d'un yaourt contaminé par <i>Candida</i> traité par <i>Lactobacillus</i>	31
Figure 9: schéma d'interprétation graphique de modification de l'acidité d'un Yaourt contaminé par <i>Candida</i> traité par <i>Lb</i>	32
Figure 10 : interprétation graphique de dénombrement des levures d'un yaourt de L'étape 2 essai 1 pendant 21 jours de stockage.....	34
Figure 11 : photos originales de dénombrement des levures d'un yaourt contaminé par Levure <i>Candida</i> traité par les <i>Lb</i>	36
Figure 12 : schéma d'interprétation graphique de modification du pH d'un yaourt Contaminé par <i>E. coli</i> traité par les <i>Lb</i>	37
Figure 13 : schéma d'interprétation graphique de modification de l'acidité d'un Yaourt contaminé par <i>E. coli</i> traité par les <i>Lb</i>	38

Figure 14 : interprétation graphique de dénombrement des <i>E. coli</i> d'un yaourt de l'essai 2 pendant 15 jours de stockage.....	39
Figure 15 : photos originales de dénombrement des <i>E. coli</i> du yaourt de l'essai 2 (Témoin et traité par Lb isolé à partir du miel).....	41
Figure 16 : photos originales de dénombrement des <i>E. coli</i> du yaourt de l'essai 2 (Traité par Lb isolé à partir des dattes et lait de chèvre.....)	43
Figure 17 : diagramme de fabrication du yaourt brassé dans l'unité Trèfle.....	annexe 7

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation.

Ap: après maturation.

Av : avant maturation.

D°: degré dornic.

dvp: développement.

FAO : Food and Agriculture Organisation, organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

FL : ferment lactiques commercialisés.

FIL: Fédération internationale de laiterie.

ISO: Organisation international de normalisation.

Ind : indénombrable.

Kcal : kilo calories.

Lb: *Lactobacillus bulgaricus*.

LbL : *Lactobacillus* isolés à partir du lait de chèvre

LbM : *Lactobacillus* isolés à partir du miel

MG: matière grasse.

MRS: Man- Rogosa –Sharpe.

N: normalité.

St: *Streptococcus thermophilus*.

TSE: Tryptone-sel- eau.

UFC: unité formant colonie.

VRBL : Violet Red Bile Lactose Agar.

Glossaire

L'acide diaminopimélique : (DAP) acide aminé, dérivé epsilon-carboxylé de la lysine . DAP est caractéristique de la paroi cellulaire de certaines bactéries. Le DAP fait partie intégrante du peptidoglycane de certaines bactéries comme *Escherichia Coli*.

Homofermentaire: lactose transformé en acide lactiques principalement.

Hétérofermentaire: lactose transformé en acide acétique, éthanol et CO₂ en plus de l'acide lactique

Point isoélectrique : pH pour lequel la molécule est électriquement neutre

Protocoopération: association de deux espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Cette association est bénéfique pour les deux espèces, mais elle n'est indispensable ni à leur croissance ni à leur survie.

Résumé

Dans la plus part des pays, La contamination des aliments représente un problème majeur pour le consommateur, L'exploitation des interactions bactériennes est un nouveau moyen pour lutter contre les germes indésirables.

L'objectif de notre travail consistera à Isoler des *Lactobacilles* à partir des trois sources alimentaire qui sont : lait de chèvre, miel, et jus des dattes sur milieu MRS ; La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des *Lactobacilles* isolés vis-à-vis levure *Candida* et *Escherichia coli* dans un yaourt brassé.

Nos résultats d'isolement montrent que le lait de chèvre crus est le plus riche en *Lactobacillus* par rapport au miel et jus des dattes, et d'après les résultats de notre essais on a constaté que les *Lactobacilles* isolés à partir des trois sources alimentaires ayant une activité inhibitrice contre levure *Candida* et *Escherichia coli*. Les *Lactobacilles* isolés à partir du miel sont plus active contre *Candida* que les *Lactobacilles* isolés à partir de lait de chèvre.

L'utilisation du milieu MRS facilite l'isolement des *Lactobacilles* à partir de lait de chèvre, miel et jus des dattes et la contamination par levure *Candida* et *E coli* montre l'existence d'une activité antimicrobienne exercé par les *Lactobacilles* isolées contre les germes cités.

Mots clés : lactobacilles, miel, lait de chèvre, jus des dattes, effet antimicrobien.

Summary

The contamination of food is a main issue for the consumer especially during the summer period in the Mediterranean countries, the exploitation of the bacterial interactions is a new means to fight against the undesirable germs. The objective of our work will consist in Isolating from Lactobacilles starting from the three sources food which are: goat's milk, honey, and juice of dates on medium MRS; The description of the antimicrobial activity of Lactobacilles isolated opposite yeast *Candida* and *Escherichia coli* in a brewed yoghurt.

Our results of insulation show that the goat's milk believed is richest in *Lactobacillus* compared to the honey and juice of dates, and of meadows the results of our tests one noted that Lactobacilles isolated having an inhibiting activity against yeast *Candida* and *Escherichia coli*. Lactobacilles isolated starting from honey more active against *Candida* than are lactobacilles insulated starting from goat's milk

Key words: lactobacilles, honey, goat's milk, juice of dates, , antimicrobial effect.

الملخص

يعتبر تلف الأغذية مشكل عويص للمستهلك خاصة في الفترة الصيفية في بلدان البحر الأبيض المتوسط.

تم استثمار التفاعلات البكتيرية كطريقة جديدة للوقاية من الجراثيم غير مرغوب فيها.

-الهدف من انجاز هذه الدراسة هو عزل *Lactobacillus* من ثلاثة مصادر غذائية طبيعية و هي حليب الماعز ، العسل

و عصير التمر؛ و البحث عن تأثير نشاطها على خمائر *Candida* و بكتيريا *Escherichia coli* في الياغورت

الممزوج.

- نتائج العزل بينت بان حليب الماعز هو الأغنى ببكتيريا *Lactobacillus* مقارنة مع العسل و عصير

التمر ، و من خلال التجارب التي قمنا بها استنتجنا أن *Lactobacillus* المعزولة لها نشاط مثبط ضد

Candida و بكتيريا *Escherichia coli*.

-*Lactobacillus* المعزولة من العسل هي أكثر نشاطا ضد خمائر *Candida* مقارنة مع تلك المعزولة

من حليب الماعز.

كلمات المفتاح ،*Lactobacillus*، حليب الماعز، العسل، عصير التمر، التأثير

ضد المكروبات.

Introduction

La consommation des laits fermentés est très répandue dans le monde, en plus de leur intérêt alimentaire et diététique, ils s'imposent dans l'alimentation par leur qualité gustative et rafraichissante. Parmi les laits fermentés le yaourt, préparé à base de lait qui subit des transformations grâce à l'emploi des microorganismes particuliers **(Luquet, 1985)**

Les Lactobacilles sont des microorganismes utilisées dans l'industrie laitière, elles participent dans la fermentation des glucides en produisant de l'acide lactique selon le mode de fermentation obligatoire ou préférentiel et aussi dans la fermentation de beaucoup d'autres produits alimentaires **(Novel, 1993 ; Klaenhammer et al., 1994)**.

Parmi les substances synthétisées par les Lactobacillus, des peptides dénommés bactériocines comme la nisine, sont produits puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique. Ces nouvelles substances naturelles produites par des souches bactériennes universellement reconnues d'usage alimentaire dirigées contre des germes pathogènes pourraient être utilisées comme agent de conservation sous forme d'additif. **(Allouche et al., 2010)**.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail dont l'objectif est d'isoler des souches des lactobacilles à partir de trois sources alimentaire : lait de chèvre, miel et jus des dattes ainsi que l'étude au laboratoire de leurs activité antimicrobienne vis-à-vis des levures *Candida* et *Escherichia coli*.

Le mémoire comprend trois parties : la première est relative aux données bibliographiques sur le yaourt, les bactéries lactiques, les Lactobacilles, le miel, lait de chèvre et jus des dattes. La seconde, décrit le matériel et les méthodes utilisés. La troisième partie porte sur les résultats et la discussion et à la fin une conclusion.

I.1.Généralités sur le yaourt

I.1.1. Définition

Selon la norme du *codex alimentarius* 1975 on définit le yaourt de la manière suivante : « Le yogourt est un produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus*. Dans le produit fini, les microorganismes doivent être à l'état viable et en quantités abondantes (Carol et Vignola, 2002).

Il n'y a pas d'élimination des constituants du lait. Seule une partie du lactose est transformée en acide lactique (Larpen, 1997).

La dénomination du produit varie selon les langues nationales, mais les termes les plus couramment utilisés sont : « yoghourt », « yoghurt » ou « yaourt » (François et al., 2005).

Selon (Mahaut et al., 2000), Les bactéries qui doivent rester viables lors de la vente aux consommateurs doivent être aux environs de 10^7 bactéries par gramme de produit avec une teneur en acide lactique supérieure à 0,8g par 100g du produit fini.

I.1.2. Différents types de yaourts

Selon (Luquet, 1990 ; Assche et Rathe, 1996 ; Carol et Vignola, 2002), il existe différents types de yaourt sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 1: les différents types de yaourts

Selon la matière grasse	Selon la texture
*yaourt maigre : 1% MG, 44Kcal	*yaourt ferme : texture ferme à surface lisse
*yaourt partiellement écrémé : 3%MG, 50Kcal	*yaourt brassé : liquide
*yaourt entier : 3à 3,5%MG, 68à70Kcal	*yaourt à boire : il est battu dans des cuves

I.2.Les ferments lactiques

I.2.1.Historique : bien avant que l'on soit conscient de l'existence des Bactéries lactiques, elles n'ont été utilisées que récemment dans la conservation des aliments à base de lait, viande, de poissons, de légumes et de fruits, c'est à l'époque des grandes découvertes de la

microbiologie. à la fin du XIX^{ème} siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide.

Storch(1890), Conn(1889) et Weigmann(1896) ont conclu que la présence de genre *Lactobacillus* est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème **(Deroissart et Luquet, 1994).**

I.2.2. Définition

Les bactéries lactiques ont toujours présenté un rôle considérable et multiple dans la transformation du lait et des produits laitiers en lait fermentés.

Ce sont des cellules vivantes procaryotes qui produisent de l'acide lactique comme produit majeur durant la fermentation des carbohydrates **(Larpen, 1997).**

Se sont soit des cocci (les Streptocoques) ou soit des bâtonnets allongés (*Lactobacilles*), Gram positif, catalase négatif. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides **(Accolas, 1979).**

L'acide lactique est parfois le seul produit terminal; dans ce cas on dira que c'est une homofermentation, mais parfois à l'acide lactique s'ajoutent de l'éthanol, de l'acétate et du CO₂ et dans ce cas ça sera une hétérofermentation **(Accolas, 1979).**

Les agents responsables de la fermentation du yaourt sont des bactéries lactiques homofermentaires ; il s'agit du : *Lactobacillus bulgaricus* et du *Streptococcus thermophilus* **(Accolas, 1979).**

I.2.3. Les différentes souches de ferments lactiques du yaourt

I.2.3.1. *Lactobacillus bulgaricus*

Les *Lactobacillus* sont des bâtonnets Gram positif souvent groupés en chaîne, micro-aérophiles ou anaérobies, ne forment pas des spores, immobiles en générale, ne possèdent ni cytochrome oxydase ni catalase **(Gravie, 1984).**

I.2.3.1.1. Définition

parmi les bâtons Gram positif, il fait partie de la famille des Lactobacillaceae, il se développe à 45°C mais résiste assez mal à des températures supérieures à 50°C **(Corrieu et al., 2008).**

Sa capacité de fermenter le sucre se limite au glucose (sans production du CO₂), au fructose, galactose et au lactose avec formation d'acide lactique D(-), pour sa croissance, il

requiert quelques vitamines et des acides aminés. Il se caractérise par un caractère thermophile et une sensibilité au sel (Accolas, 1979).

I.2.3.1.2. La classification des genres *Lactobacillus*

La classification remaniée par Kandler et Weiss les subdivise selon leur type fermentaire en trois groupes (Laurent et al., 1998).

Tableau 2 : classification des genres *Lactobacillus*

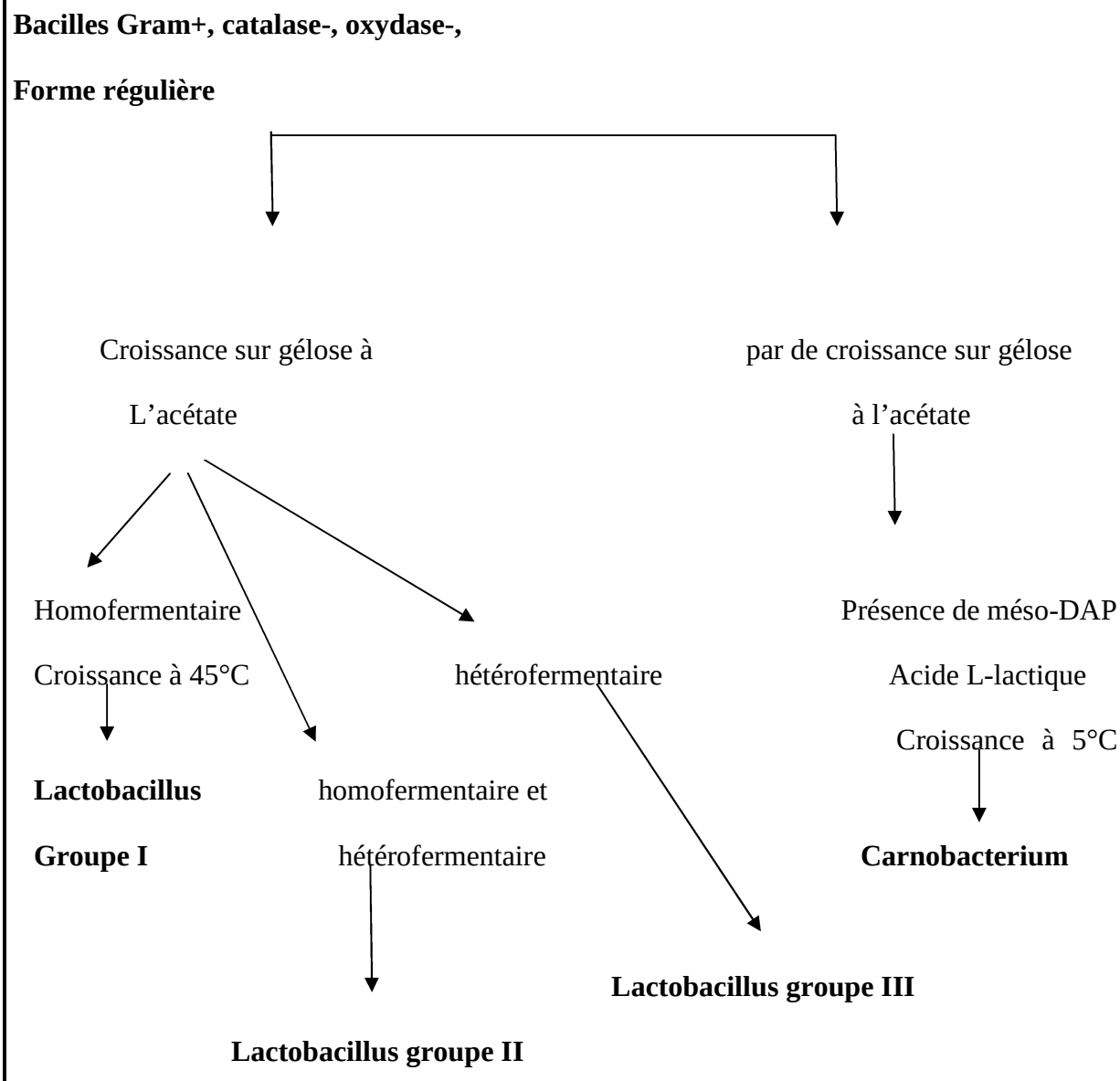
	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Nom	<i>Thermobacterium</i>	<i>Streptobactérium</i>	<i>Betabacterium</i>
Type de fermentation	homofermentaires obligatoires	hétérofermentaires facultatives	hétérofermentaires obligatoires
Nombre d'espèce	25 espèces	vingtaine d'espèces	
Utilisation	produits laitiers	produits carnés et céréaliers	panification
Exemples	<i>Lb.delbrueckii</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb.acidophilus</i>	<i>Lb.curvatus</i> , <i>Lb.plantarum</i> , et <i>Lb.casei</i>	<i>Lb.brevis</i> , <i>Lb.sanfransiscensis</i> , <i>Lb.kefir</i>

Bourgeois et Larpent, 1996 ; Federighi, 2005

I.2.3.1.3. Identification des genres de bactéries lactiques (bacilles)

L'identification du genre est d'abord orientée par la morphologie, puis par le type fermentaire (production de CO₂ à partir du glucose) et les conditions physiologiques de croissance (température, sel, pH). La distinction entre les genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium* qui est plus délicate se fait à partir de la croissance sur gélose à l'acétate, la présence d'acide meso-diaminopimélique dans la paroi et le caractère psychrotrophe.

L'identification des espèces se base, en plus de ces tests, sur le profil de fermentation de différents glucides (20 à 30 composés testés), la dégradation de l'arginine, la production de l'isomère de l'acide lactique (**Federighi et al., 1998**)



Figures 1 : Schéma d'identification des genres de bactéries lactiques (bacilles)

(Federighi et al., 1998)

I. 2.3.1.4. Les intérêts des lactobacilles

➤ Intérêts alimentaires

L'importance des Lactobacilles est de plus en plus recherchée pour leurs qualités et rôles nutritionnels et thérapeutiques surtout dans les préparations appelées probiotiques

(Gilliland, 1985). De même, (Xanthopoulos *et al.* 2000), préconisent l'emploi des souches Lactobacilles pour leurs propriétés organoleptiques et diététiques pour prévenir certaines maladies.

(Welch, 1987), a révélé que la croissance de *Lb. Acidophilus* dans le lait augmente la concentration de nombreuses vitamines indispensables pour l'organisme.

Les travaux de (Klaenhammer *et al.*, 1994) ont montré que l'activité protéolytique et lipolytique des Lactobacilles stimulerait la digestion des aliments.

➤ Intérêts thérapeutiques et médicales

Les études menées par (Bigret, 1989), ont montrés que la consommation du lait contenant *Lb. Acidophilus* faciliterait le transit intestinal et interviennent dans le traitement des diarrhées post-antibiotiques.

L'effet bénéfique des bactéries lactiques sur la cancérogenèse à été fort recherché. Cependant, les recherches entreprises par (Goldin et Gorbach, 1980) ont indiqué que la souche *Lb. Acidophilus* pourrait être responsable d'une résistance à l'apparition du cancer du colon chez l'homme.

I.2.3.2. *Streptococcus thermophilus*

parmi les coques Gram positif, de la famille des Streptococcaceae, il se développe à 42-43°C mais pas à 10°C, il survit à 65°C pendant 30 minutes et sa capacité de fermenter les sucres se limite au lactose, au saccharose, au tréhalose et au glucose (sans production de CO₂). Il aboutit à la formation d'acide lactique L(+), sa croissance exige des acides aminés. (Accolas, 1979).

Streptococcus thermophilus acidifie rapidement le lait, mais il n'abaisse pas le pH au-dessous de 4,8 (Accolas *et al.*, 1980 ; Pernoud *et al.*, 2004).

I.2.4. Effet de l'association des deux espèces de ferments sur le yaourt

Lors de la production du yaourt, l'utilisation combinée de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* permet de valoriser l'interaction indirecte positive existant entre les deux espèces. Cette interaction appelée protocoopération se traduit d'abord par une augmentation des vitesses d'acidification par rapport à l'un d'entre eux dans leurs cultures pures. Quand *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* sont associés, le temps de la coagulation du lait est réduit. Cette protocoopération s'explique ainsi : *Streptococcus thermophilus* avec une faible activité protéolytique nécessite des peptides et des acides aminés

pour sa croissance et *Lactobacillus bulgaricus* stimule sa croissance en libérant une partie des acides aminés à partir de caséine. Par la suite la croissance de *Streptococcus thermophilus* est réduite par la production d'acide lactique (Asseche, 1994).

Inversement *Streptococcus thermophilus* stimule la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* par la formation d'acide formique. Ces deux micro-organismes présentant un taux de croissance qui dépend de la température utilisée. Cette association qui désigne le développement symbiotique des deux espèces se manifeste aussi par l'augmentation de la biomasse. (Asseche, 1994).

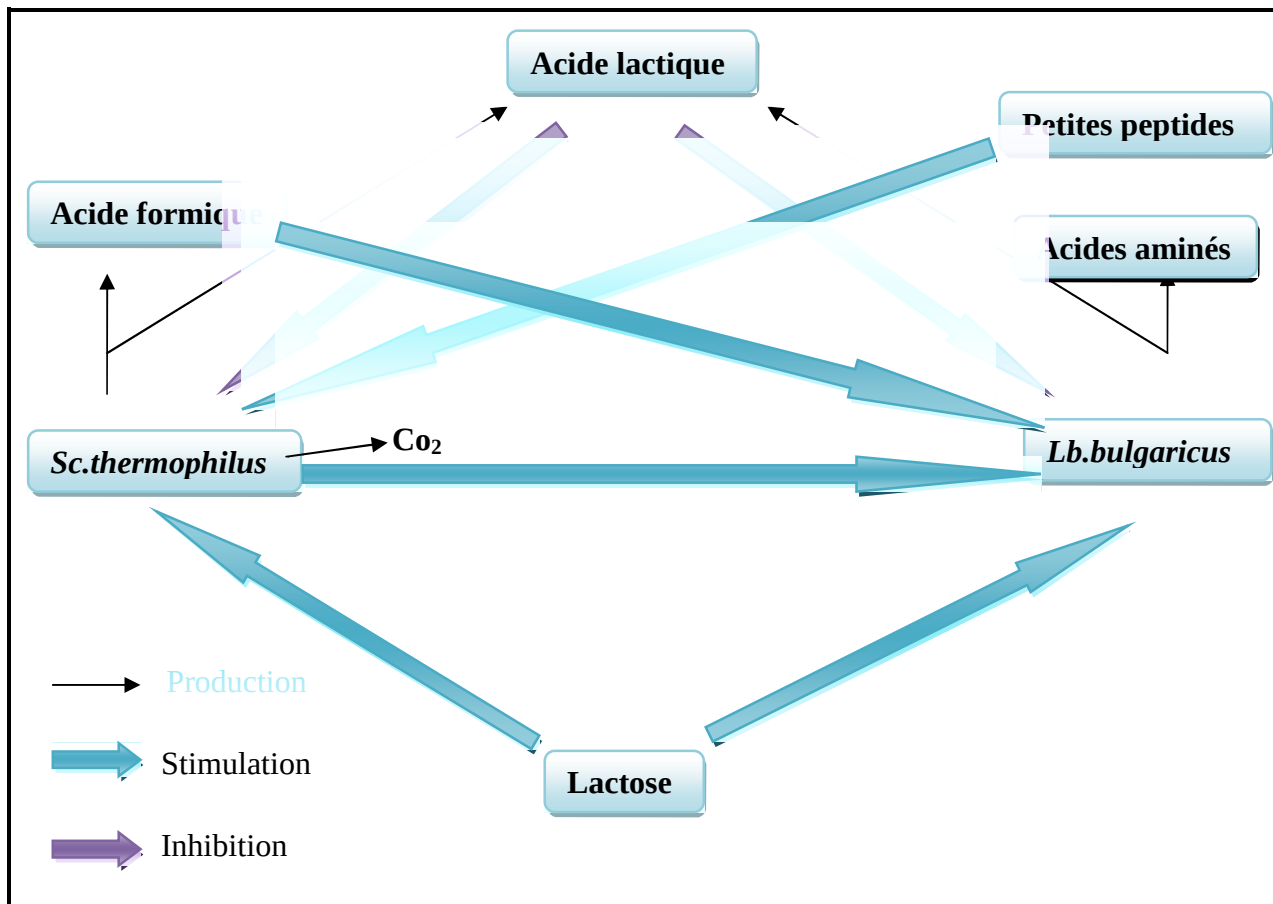


Figure 2: schéma des interactions métaboliques de *Sc. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* en culture mixte dans le lait (Mahaut et al., 2000)

I.3. Action des bactéries lactiques dans les aliments

Les bactéries lactiques ont deux rôles principaux dans les aliments, liés à leurs activités métaboliques (tableau 3) :

Tableau 3 : principaux rôles des bactéries lactiques dans les aliments (Federighi *et al.*, 1998)

Rôles positifs	Rôles négatifs
Structure et texture • Acidification • Polysaccharides Arômes et saveur • Acide organique • Protéolyse Conservation • Acide organique • Bactériocines Nutrition • Digestion du lactose • Colonisation de l'intestin	Altération de l'aspect • CO₂ • Peroxyde d'hydrogène Altération des qualités organoleptiques • Acidification trop poussée Production des composées toxiques • Amines (tyramine)

I.3.1. Rôle des ferments lactiques dans le yaourt

Dans la fabrication du yaourt les deux souches ont quatre rôles :

I.3.1.1. L'acidification

Le lactose métabolisé par ces ferments lactiques donne comme produit final l'acide lactique se faisant à baisser le pH du lait. Ainsi, cette diminution du pH déclenche à partir du pH=5 à 5,2 une déstabilisation des micelles de caséines et aux alentours de pH=4,6 (point isoélectrique) une coagulation complète s'établit. En outre, la diminution du pH entraîne la stabilisation des minéraux tels que le calcium et la phosphore liés aux micelles de caséines (Accolas, 1979).

Le pH bas empêche la croissance des germes indésirables responsables de la putréfaction, ainsi que des germes pathogènes généralement sensibles à l'acidité (Veringa, 1973).

I.3.1.2. La production des composés aromatiques

La fermentation ne conduit pas seulement à la production de l'acide lactique mais il y'a aussi formation de quantités plus ou moins importantes de produits secondaires d'acétaldéhyde, d'acétone et de diacetyl qui sont en fait des composés aromatiques qui confèrent l'arome au yaourts (**Accolas, 1979**).

I.3.1.3. La protéolyse

La protéolyse faite par les ferments lactique du yaourt apport des changements dans la structure physique du yaourt en matière de viscosité et de consistance. Elle contribue à la production de composés aromatiques et augmente la quantité d'acides aminés libres, ce qui aidera à la croissance du ferment (**Carole et Vignola, 2002**).

I.3.1.4. La production d'agents épaississants

Les bactéries lactiques du yaourt produisent une capsule onctueuse glycoprotéique formée de galactose, glucose, de xylose, et d'arabinose et liés à la caséine qui influe sur la texture et sur l'onctuosité du yaourt, ils forment des filaments plus ou moins longs et plus ou moins denses (**Wang et Carvin, 1989**).

I.4. Propriétés inhibitrices des Bactéries lactiques

L'une des principales caractéristiques des produits fermentés est leur stabilité par rapport à la matière première dont ils sont issus. Ce rôle sur la conservation des produits est lié à la présence quantitative des bactéries lactiques dans les produits fermentés, exerçant ainsi un phénomène de compétition vis-à-vis des autres flores. A ce mécanisme, s'ajoutent les propriétés spécifiques d'inhibition des bactéries lactiques qui s'exercent de différentes manières (**Federighi, 2005**).

I.4.1. Production d'acides

Le métabolisme principal des bactéries lactiques a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide. Le pH final dépend de la matière première fermentée et des souches utilisées. Il est le plus souvent entre 4 et 4,5 dans le cas de yaourt, 4,6 à 5,3 dans le cas des saucissons. À ces valeurs de pH le développement de la plupart des flores d'altération et des flores pathogènes est inhibé ce qui participe à la stabilité des produits fermentés (**Federighi, 2005**).

I.4.2. Production de bactériocines

Ce sont des peptides synthétisés par un très grand nombre de souche des bactéries lactiques, qui possèdent une activité antimicrobienne. Ils sont généralement thermorésistants, actifs uniquement sur des bactéries à Gram positif, avec un spectre d'activité étroit. La **nisine** est l'une des premières bactériocine caractérisée et la plus étudiée. Elle est produite par différentes souches de *Lactococcus lactis* et exerce ses effets inhibiteurs vis-à-vis de plusieurs autres bactéries lactiques, mais surtout vis-à-vis de bactéries à Gram positif comme *Listeria monocytogene* ou *Clostridium tyrobutyricum*. La nisine possède une structure peptidique particulière (acides aminés déshydrogénés reliés par un pont monosulfure), et elle est commercialisée comme additif alimentaire (E234). (Federighi, 2005)

I.4.3. Production de peroxyde d'hydrogène

Selon (Daeshel, 1989) en présence d'oxygène et sous l'action d'enzymes de nombreuses bactéries produisent du H_2O_2 particulièrement:

- Des lactobacilles (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*).
- *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* et *Streptococcus thermophilus*, des leuconostocs.

Les bactéries lactiques étant presque toujours dépourvues de catalase, le H_2O_2 produit s'accumule dans le milieu et à partir d'un certain niveau peut exercer une action antimicrobienne (Yeves, 2000)

I.5. Généralité sur le miel

I.5.1. Définition du miel

D'après (Gout 2008), il existe une définition officielle du miel spécifiée dans un décret du 30 juin 2003 :

« Le miel est la substance sucrée naturelle produit par les abeilles de l'espèce *Apis Mellifera* à partir du nectar des plantes ou de sécrétions provenant des parties vivantes des plantes excrétoires lées sur celle-ci par des insectes suceurs qu'elles butinent, transforment en combinant avec des matières spécifiques propres déposent, déshydratent, entreposent et laissent murir dans les rayons de ruches. A l'exception du miel filtré aucun pollen ou constituant propre au miel ne doit être retiré sauf si ceci est inévitable lors de l'élimination des matières organiques et inorganiques étrangères ».

Tout produit ne répond pas à cette définition ne peut recevoir la dénomination de vente miel. **Journal Officiel des Communautés Européennes (2002).**

À côté des levures, les miels contiennent d'autres microorganismes, notamment les bactéries, susceptibles d'engendrer d'autres fermentations (lactique, butyrique, acétique ...)

En générale, lorsque le miel fermente une abondante écume, provenant du dégagement de gaz carbonique, se forme à la surface (**Louveaux, 1985**)

I.6.Généralité sur le lait de chèvre

Le lait de chèvre se présente comme un liquide opaque de couleur blanchâtre mate, du à l'absence de β -carotène. Il est légèrement sucré, d'une saveur particulière et une odeur assez neutre (**Alais, 1984**).

Le lait de chèvre joue un rôle éminent dans l'alimentation infantile de nombreux pays parce qu'il se digère plus facilement que le lait de vache et il est donc recommandé pour les bébés et les personnes qui supportent mal ce dernier (**Freund, 1996**).

Le lait de chèvre frais a un léger goût de chèvre dû à la présence d'acide gras caprique, caprylique et caproïque qui donnent au fromage de chèvre son goût agréable. (**Carole et Vignola, 2002**).

I.6.1. Microflore de lait de chèvre

En raison de la grande diversité des bactéries présentes dans le lait, et en se basant sur certains nombres de propriétés importantes qu'elles ont en commun, on les divise en deux catégories : la flore originale et la flore de contamination.

I.6.1.1. Flore originale

Elle forme un groupe très hétérogène présentant les caractères généraux suivants : Cocci ou bâtonnets, Gram positif, Immobiles et non sporulés, ne possèdent ni catalase, ni oxydase, ni nitrate réductase, ne produisent ni indole ni hydrogène sulfureux (**Delleglio et al., 1994**)

I.6.1.1.1. *Lactobacillus*

Les lactobacilles sont des bâtonnets Gram positif souvent groupés en chaîne, ne possèdent ni cytochrome oxydase ni catalase (**Gravie, 1984**).

Ces bactéries sont exigeantes sur le plan nutritionnel. Ce sont des acidotolérants, leur pH optimal de croissance est compris entre 5,5 et 6,2 (**Leveau et al., 1993**).

I.6.1.1.2. *Streptococcus*

Les streptocoques lactiques sont des germes anaérobies facultatifs, généralement micro-aérophiles et très exigeante du point de vue nutritionnelle (**Guirand, 2003**).

I.6.1.1.3. *Leuconostoc*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique, de CO₂ et d'éthanol (**Laurent et al., 1998**).

I.6.1.1.4. *Entérocoques*

Sont des coques ovoïdes, catalase négatif, sont généralement des anaérobies facultatifs et non mobiles (**Galvez et al., 2011**).

I.6.1.2. Flore de contamination

Elle se compose d'une flore d'altération et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits laitiers (**Guiraud, 2003**).

I.6.1.2.1. Flores d'altération

Les germes d'altération sont généralement exogène et en particulier fécale. Ils sont habituellement apportés par l'animal laitier, l'ouvrier, le matériel. Cette flore regroupe les bactéries thermorésistantes, les coliformes, les psychrotrophe, les levures et moisissures

(**St-Gelais et al., 1999**).

I.6.1.2.2. Flores pathogènes

La présence de microorganismes pathogènes dans le lait peut avoir trois sources : l'animal, l'environnement et l'homme. Ces pathogènes sont dangereux de point de vu sanitaire et peuvent être responsable des maladies et d'intoxication graves (**Guirand, 1998**). Cette flore regroupe : staphylocoques, les entérobactéries (*Salmonelles*, *Brucella*, *Listeria*, *Escherichia coli*).

I.7. Généralité sur les dattes

La datte, fruit du palmier dattier, est une drupe, généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie .elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair. La partie comestible de la datte dite chair ou pulpe, est constituée de :

- Un Péricarpe ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau.
- Un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre.
- Un endocarpe de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau (**Espiard, 2002**).

Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouge, brune plus ou moins foncées (**Djerbi, 1994**).

I.7.1. Classification

D'après (**Espiard 2000**), la consistance de la datte est variable. Selon cette caractéristique, les dattes sont réparties en trois catégories : (tableau 4)

Tableau 4 : les différentes catégories des dattes selon la consistance

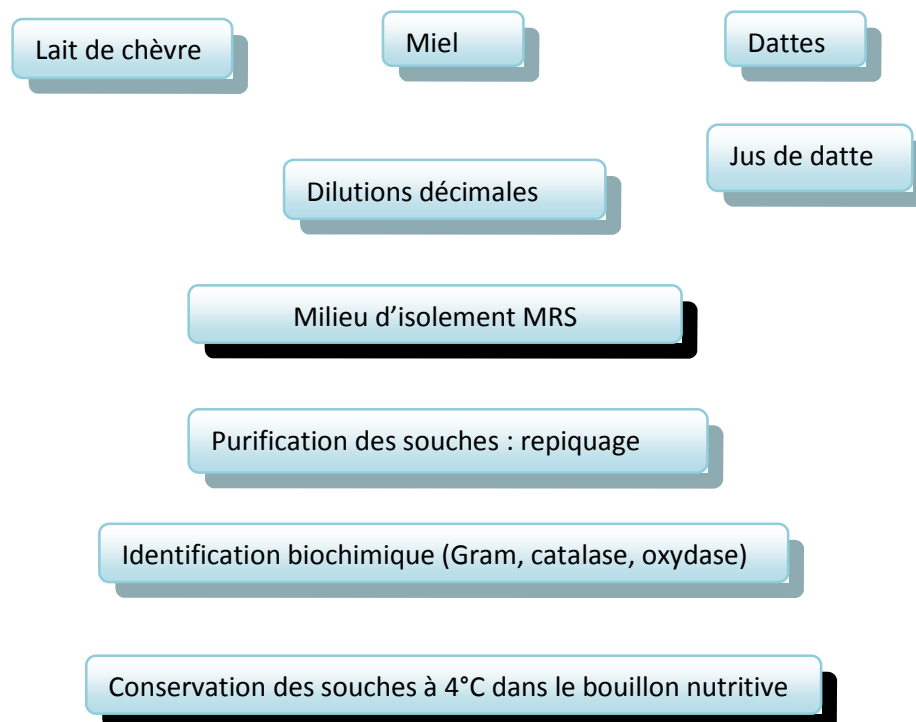
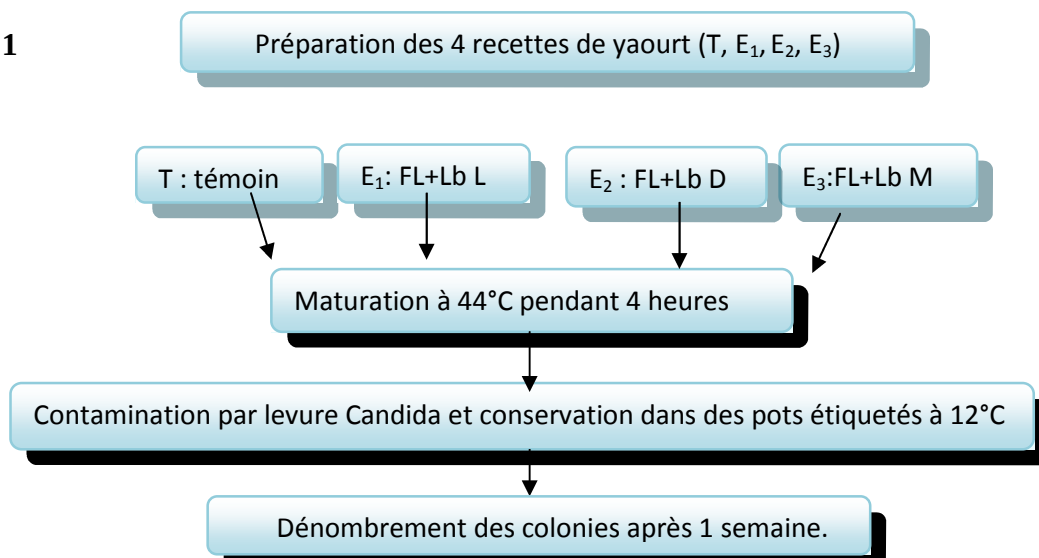
Catégories	Exemples
Dattes molles	Ahmar (Mauritanie), Kashram et Miskani (Egypte, Arabie-saoudite).
Dattes demi-molles	Deglet-Nour (Tunisie, Algérie), Mehjoul (Mauritanie)
Dattes sèches à consistance dure	Degla-Beida et Mech-Degla (Tunisie et Algérie), Amersi (Mauritanie).

- Le jus de datte peut être utilisé comme substrat dans la fermentation pour la production d'acide lactique par une souche de *Lactobacillus rhamnosus*. celle-ci peut produire jusqu'à 30g /l d'acide lactique sur milieu à base de jus de datte contenant 60g/l de sucre totaux. Une production maximale de 47g/l d'acide lactique a été atteinte après optimisation des conditions physico-chimiques (**Boudjelal et Naicib, 2001**)

Objectif :

Notre travail porte sur l'isolement des souches de *Lactobacilles* à partir des trois sources alimentaires : lait de chèvre, miel et jus de dattes. Ainsi que la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces lactobacilles isolés vis-à-vis des levures *Candida* et des bactéries *Escherichia coli*.

L'étude est réalisée au niveau de laboratoires de développement et de la recherche scientifique (microbiologie et physicochimie) au niveau de la laiterie TREFLE (wilaya de BLIDA) pendant trois mois de Mars jusqu' au mois de Mai 2013.

Isolement des *Lactobacillus***Essai 1****études de l'effet antifongiques des *Lactobacillus* vis-à-vis *Candida*****Etape 1**

Essai 1

Etape 2

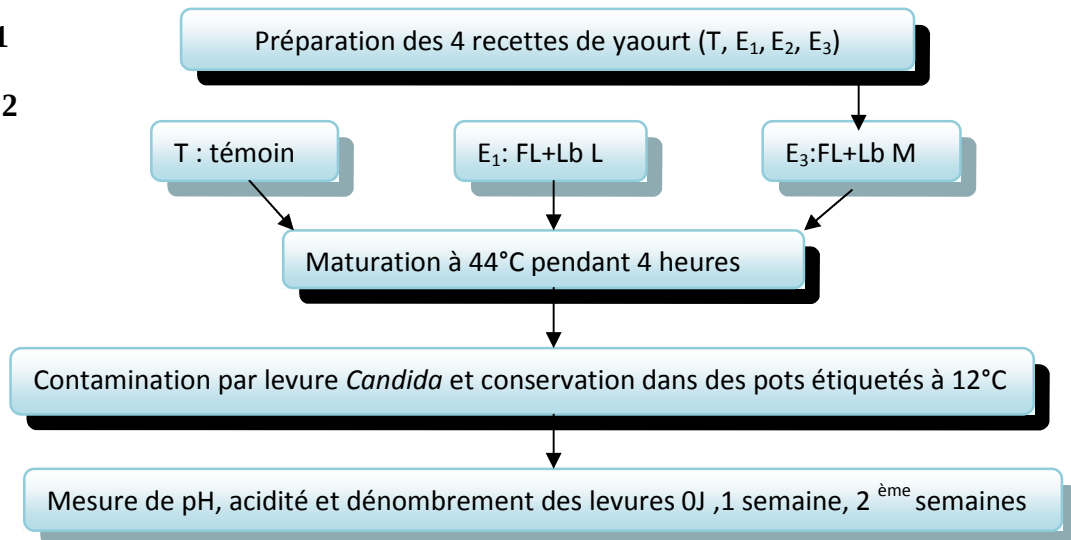
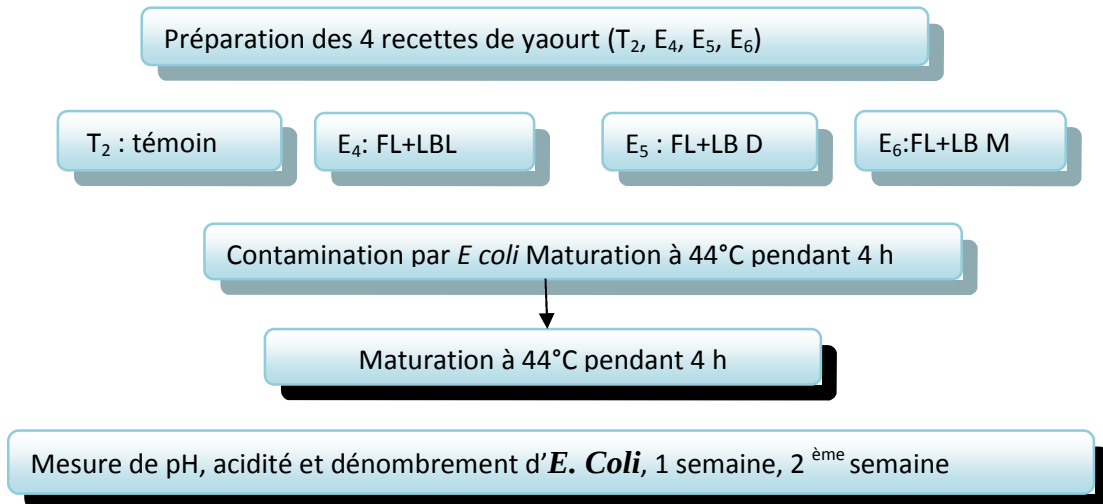
Essai : 2 étude de l'effet antimicrobien des *Lactobacillus* vis-à-vis *E. coli*

Figure 3 : schéma de différentes étapes du déroulement du Protocole expérimental.

T : témoin,

E₁ : yaourt contaminé par les levures *Candida* traité par les Lactobacilles isolés à partir de lait de chèvre.

E₃ : yaourt contaminé par les levures *Candida* traité par les Lactobacilles isolés à partir du miel

T : témoin

E₄ : yaourt contaminé par *E coli* traité par les lactobacilles isolés à partir du lait de chèvre

E₅ : yaourt contaminé par *E coli* traité par les lactobacilles isolés du jus des dattes

E₆ : yaourt contaminé par *E coli* traité par les lactobacilles isolés du miel

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel non biologique

II.1.1.1 Appareillage et équipement (annexe)

II.1.1.2 Verrerie et accessoires (annexe)

II.1.1.3 réactifs et solutions (annexe)

II.1.2 Matériel biologique

II.1.2.1 Echantillonnage

Nous avons travaillé sur quatre échantillons : miel, lait de chèvre les dattes et yaourt.

- Le miel

Nous avons utilisé le miel à origine florale de Jujubier de la région de Djelfa récolté et conditionné au mois de Juillet 2012.

- Lait de chèvre

Nous avons utilisé un lait de chèvre cru et frais provenant de la wilaya de Blida.

- Les dattes

Les Dattes utilisées sont de la catégorie des dattes demi-molles (Deglet-Nour) provenant de l'Algérie.

II.1.2.2. Les milieux de cultures

- Milieu MRS

Il n'existe pas de milieu sélectif pour le dénombrement et l'isolement des bactéries lactiques. En effet, du fait de leurs exigences nutritionnelles, les milieux de culture doivent être très riches en sucres, matières azotées et surtout facteurs de croissance.

Cependant, certains milieux sont plus ou moins adaptés aux différents genres de bactéries lactiques, selon leurs exigences de développement. Le milieu de Man, Rogosa et Sharpe (MRS) est le plus utilisé pour l'isolement et dénombrement des *Lactobacillus* et de la plupart des autres genres de bactéries lactiques (**Federighi et al., 1998**).

- Milieu Sabouraud

La gélose Sabouraud glucosée au chloramphénicol est un milieu sélectif recommandé pour la culture et l'isolement des levures et des champignons filamenteux à partir de

prélèvements poly-microbiens ; ce milieu est utilisé principalement dans le domaine alimentaire et médical, pour le dénombrement ou l'isolement. **(Amélie Gourdin).**

- Milieu VRBL

E. coli forment des colonies sur milieu gélosé sélectif Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL) à 30°C±1°C.

Ensemencement en profondeur et recouvrement avec une couche du même milieu.

(Larpent J-P.1997).

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des solutions mères

II.2.1.1. Lait de chèvre

Devant le bec bunsen et à l'aide d'une pipette stérile, introduire aseptiquement 25ml d'échantillon à analyser Dans un flacon contenant 225ml de bouillon tryptone sel eau (TSE), c'est la dilution 10⁻¹.

II.2.1.2. Le miel

Peser à l'aide d'une spatule stérile devant le bec bunsen, 10g de miel et introduire dans un flacon contenant 90ml de TSE, mélanger et bien homogénéiser.

II.2.1.3. Les dattes

Les dattes sont soigneusement lavées et dénoyautées.

-préparation du jus de dattes :

Le jus de dattes est connu depuis longtemps dans la plupart des pays producteurs de dattes. Ce jus est appelé « Roub » en Algérie et « Debs » en Iraq. Seul Iraq s'est orienté vers une production industrielle **(Dhaia et Passat, 1979)** ;

-peser 100g d'échantillon à analyser ;

-l'eau est additionnée à raison de 500 ml par 100g de pulpes ;

- le mélange est chauffé à 60°C ;

-Broyage manuel à l'aide d'un fouet ;

-filtrer le mélange à fin de séparer les débris cellulotique ;

-le liquide obtenu est recueilli dans un flacon ;

- prendre 25ml de jus, introduire dans un flacon contenant 225ml de TSE (10^{-1}).

II.2.2. Préparation des dilutions décimales

Les dilutions sont réalisées selon la norme **AFNOR NF V08-010 de mars 1996** parallèlement avec la norme **ISO 6887 ,1993**. Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques avec le maximum de précision. Elles sont nécessaires dans le cas de produits contenant un nombre élevé de micro-organismes (**Guiraud, 1998**).

Entre le moment de la préparation de la suspension et la mise en culture, il ne doit pas s'écouler plus de 45 minutes (**Bonnefoy et al., 2002**).

Agiter pour homogénéiser la suspension qui constitue la première dilution 1 /10.

Prélever aseptiquement 1ml de la suspension à l'aide d'une pipette pasteur stérile et introduire dans un tube stérile contenant 9 ml de TSE, c'est les dilutions 1/100 ou 10^{-2} .

La dilution 10^{-3} est obtenue de la même manière (**annexe 4**)

II.2.3. isolement des *Lactobacillus*

L'isolement des bactéries lactiques est de préférence réalisé en anaérobiose. Le dénombrement se fait généralement en profondeur. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 2 à 3 jours (**Federighi et al., 1998**).

A l'aide d'une pipette stérile, prendre 1 ml de chaque flacon (10^{-1}) et le déposer dans les boîtes de Pétri de façon dispersé.

Ecouler les boîtes avec milieu MRS (15 ml)

Incubation à 30°C pendant 3 jours

II.2.4. Les tests d'identifications

II.2.4.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une méthode classique qui permet de déterminer le type anatomique de la paroi cellulaire à partir d'une culture fraîche.

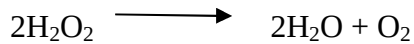
Lecture

Les bactéries Gram+ : gardent leur coloration violette après passage à l'alcool.

Les bactéries Gram - : décolorées par l'alcool, apparaissent rose. (**Annexe 8**)

II.2.4.2. Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart de bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives, elle décompose l'eau oxygénée qui se dégage (**Dellarras, 2004**).



Sur une lame propre et séché déposer une goutte d'eau oxygénée à un volume de 10, ajouter un peu de culture à étudier et mélanger (**Singleton, 1999**).

Si la souche à examiner possède une catalase, on observe un dégagement immédiat des bulles gazeuses.

II.2.4.3. Test d'oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes (**Dellarras, 2004**).

On dépose un disque oxydase humidifié avec une goutte d'eau distillée sur une lame, on prélève une quantité de culture bactérienne que l'on met sur le disque (**Singleton, 1999**).

La présence de l'oxydase se traduit par une coloration violette foncée apparaît immédiatement sur le disque en quelques seconds puis vire au noir.

La purification des souches s'effectue après 3 à 4 repiquages sur MRS en milieu solide pour l'obtention des souches pures.

II.2.5. La conservation et la revivification des souches

Ces trois souches des *Lactobacillus* isolés à partir des trois aliments naturels sont purifiées et conservées dans le bouillon Nutritif à 4 °C.

Avant leur utilisation, les souches ont été activées par l'incubation des tubes pendant 2 heures à 30°C.

II.2.6. Préparation des recettes de yaourt brassé

Les ingrédients

À l'aide d'une balance électrique peser les ingrédients suivants :

-115 g poudre de lait

-87g de sucre

-16g d'amidon

- mesurer le volume 710ml d'eau

La préparation

Peser les ingrédients et chauffer le volume d'eau à 40-50°C puis mélanger les ingrédients avec l'eau soigneusement et les mixer jusqu'à l'hydratation

Laisser le mélange 45min sur la paillasse pour l'hydratation complète puis le pasteuriser à 90°C ensuite laisser le refroidir et mesurer la température chaque fois jusqu'à l'obtention de température 44°C,ensemencer 0,2g des ferments lactiques du yaourt (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*)

Préparer 4 recettes identiques et les verser dans des Bécher puis incuber pour la maturation à 44°C pendant 4 h.

Après la maturation prendre les Bécher et brassée le contenue par un fouet chaque une seul

II.2.7. Premier essai : étape 1 Contamination par les levures *Candida*

Les levures sont des saprophytes dotés d'un grand pouvoir de dégradation, ce sont des contaminants fréquents des produits alimentaires, certaines espèces sont toxigènes, d'autre sont utilisées dans l'industrie en particulier en fromagerie.

Les levures ne sont pas pathogènes mais peuvent produire par leur développement dans les produits alimentaires des altérations de la qualité marchande par formation des troubles (cellule de levures) d'odeur ou de gout annexes anormaux, ou par gonflement des produits ou de leur emballage (CO₂). (Ait Abdelouahanb, 2007)

Prendre une colonie de levure *Candida* avec une pipette stérile et mettre dans un tube contient bouillon nutritive

Ensuit ajouter dans chaque Bécher 1ml de bouillon nutritive qui contient levure *Candida*

Bécher 1 : T₁ laisser comme un témoin.

Bécher 2 : E₁ ajouter 1 ml de bouillon nutritif qui contient *Lactobacillus* qui sont isolées à partir du lait de chèvre

Bécher3 :E₂ ajouter 1 ml de bouillon nutritif qui contient *Lactobacillus* qui sont isolées à partir des dattes

Bécher4 :E₃ ajouter 1 ml de bouillon nutritif qui contient *Lactobacillus* qui sont isolées à partir du miel

Mélanger bien le contenu de chaque Bécher puis les verser dans des pots

Bien fermer les pots, étiqueter, et les conserver à température 12°C.

Tableau 5 : Constituants de chaque échantillon durant le premier essai étape 1

T ₁	Yaourt brassé (<i>St, L.b</i>) + levure <i>Candida</i>
E ₁	Yaourt brassé (<i>St, L.b</i>) + levure <i>Candida</i> + <i>L.b</i> isolées à partir du lait de chèvre.
E ₂	Yaourt brassé (<i>St, L.b</i>) + levure <i>Candida</i> + <i>L.b</i> isolées à partir des dattes.
E ₃	Yaourt brassé (<i>St, L.b</i>) + levure <i>Candida</i> + <i>L.b</i> isolées à partir de miel.

Lb : *Lactobacillus*, St : *Streptococcus*

II.2.7.1. Analyses microbiologiques

Remplir les boîtes à utiliser avec 15ml du milieu Sabouraud et laisser solidifier sur la paillasse.

A partir des dilutions décimales effectuées (10^{-1} et 10^{-4}) de chaque pot. Porter aseptiquement environ 4 gouttes, les déposer sur les boîtes de Pétri après solidification du milieu, et ensemer en stries puis incubé à 25°C pendant 3-5 jours.

Lecture et dénombrement

Lors de la lecture, il faut tenir compte des deux paramètres suivants :

-le facteur de division tout en considérant que l'inoculum utilisé est de quatre gouttes au lieu de 1ml et que pour revenir à 1 ml, prendre en considération la règle suivante :

(1ml = 20 gouttes), dans ce cas il s'agit de multiplier le nombre trouvé par cinq.

-le facteur de dilution, dans ce cas il s'agit de multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution correspondante.

Les résultats sont exprimés en UFC/ml ou UFC/g de produit à analyser.

II.2.7.2. Analyses physico-chimiques

* pH

Le pH est une grandeur mesurant la concentration des ions hydrogènes dans une solution, c'est mesure de l'acidité de la solution. Il correspond à l'opposé du logarithme de la concentration des ions H⁺ (proton) (Mathieu, 1998)

$$\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$$

[H⁺] : concentration des ions (H⁺ mol/l) (**Goudet et Kowalski, 2011**)

Nous avons réalisé la méthode prescrite dans le manuel des techniques d'analyses physico-chimiques des laits et produits laitiers de la laiterie Trèfle, 2005.

Mode opératoire

- Plonger à la fois les deux sondes de température et de pH dans la solution à analyser jusqu'à stabilité du pH mètre.
- Tirer la valeur affichée.

* l'acidité titrable (°D)

L'acidité du lait ou d'un produit laitier est la quantité d'acide lactique libérée par la transformation du lactose en acide lactique en présence des bactéries lactiques, le principe repose sur le titrage de l'acide lactique par une solution alcaline (NaOH 0,11mol/l) en présence d'un indicateur de couleur qui est la phénolphthaléine (**Mathieu, 1998**).

Mode opératoire

- Prélever à l'aide d'une pipette 10 ml d'échantillon à analyser.
- Ajouter deux gouttes de phénolphthaléine.
- Titrer avec de la soude N /9 (0,11N) jusqu'au virage de couleur de l'indicateur au rose clair qui persiste 10 seconds.

Le degré Dornic (°D) correspond à 0,1g /l d'acide lactique (**Goudet et Kowalski, 2011**).

II.2.8. Essai 1 : étape 2 : contamination par levure *Candida* (4 gouttes)

Prendre les souches isolées (à partir du miel et lait de chèvre) pour réaliser un autre essai :

Préparer deux autres recettes avec les mêmes ingrédients et contaminer les bécards par 4 gouttes des levures *Candida* puis verser le contenu des bécards dans des pots, étiqueter et conserver à 12°C pendant 3 semaines.

Lancement des analyses physicochimiques et microbiologiques s'effectue une fois chaque semaine.

(L'étalement se fait à l'aide d'un râtelier stérile).

II.2.9. Deuxième essais : contamination par *Escherichia coli*

Escherichia coli, sont des bactéries produisant du gaz à partir du lactose et l'indole à partir de tryptophane à 44°C, cette espèce constitue généralement de meilleur indicateur de contamination fécale dans le cadre de la recherche des entérobactéries pathogènes (**Guiraud, 1998**).

Préparer quatre recettes avec les mêmes ingrédients.

Prendre une colonie d'*E. Coli* avec une pipette stérile et mettre dans le bouillon nutritive.

Contamination s'effectué par 10 gouttes de la suspension des *E. coli* avant la maturation.

Bécher 1 : T₂ laisser comme un témoin

Bécher 2 : E₄ ajouter 1 ml de bouillon nutritif qui contient *Lactobacillus* isolés à partir du lait de chèvre

Bécher3 :E₅ ajouter 1 ml de bouillon nutritif qui contient *Lactobacillus* isolés à partir des dattes

Bécher4 :E₆ ajouter 1 ml de bouillon nutritif qui contient *Lactobacillus* isolés à partir du miel.

Mélanger bien le contenu de chaque Bécher

Tableau 6 : Constituants de chaque échantillon durant le deuxième essai

T ₂	Yaourt brassé (<i>St, L.b</i>) + <i>E. coli</i>
E ₄	Yaourt brassé (<i>St, L.b</i>) + <i>E. coli</i> + <i>L.b</i> isolées à partir du lait de chèvre.
E ₅	Yaourt brassé (<i>St, L.b</i>) + <i>E. coli</i> + <i>L.b</i> isolées à partir des dattes.
E ₆	Yaourt brassé (<i>St, L.b</i>) + <i>E. coli</i> + <i>L.b</i> isolées à partir de miel.

Lb : *Lactobacillus*, **St** : *Streptococcus*

Mesurer le pH est l'acidité de chaque Bécher

Incuber les Bécher à 45°C pendant 4 heures pour la maturation du yaourt.

Mélanger bien le contenu de chaque Bécher puis les verser dans des pots.

Bien fermer les pots avec papier de cellophane, étiqueter et conserver à 12°C.

Lancer les analyses microbiologiques et physico-chimiques (mesurer le pH et l'acidité) du produit après 1 semaine de conservation.

La recherche et le dénombrement de *E. coli* sont réalisés sur un milieu solide : gélose VRBL, qui renferme une faible teneur en sels biliaires et en citrate suffisante pour inhiber la majeure partie de la flore à Gram positif tout en préservant le développement des Coliformes. (Joffin et Leyral, 2001)

Méthode

Nous avons réalisé la recherche et le dénombrement suivant la méthode prescrite par AFNOR NF V08-050 Décembre 1992.

- A partir des dilutions décimales 10^{-1} à 10^{-3} , porter aseptiquement 0,1ml de chaque dilution dans des boîtes de Pétri vides préparées à cet usage
- compléter ensuite chaque boîte avec 15 ml de gélose VRBL préalablement fondue et refroidie puis nous faisons ensuite des mouvements circulaires en forme de « 8 » pour bien mélanger la gélose à l'inoculum
- laisser les boîtes solidifiées sur la paillasse
- incuber les boîtes couvercle en bas pendant 24h à 48h à 37°C.

III.1. Résultats

III.1.1. Isolement des *Lactobacillus*

L'isolement des lactobacilles à partir des 3 sources alimentaires : lait de chèvre, miel et jus des dattes sur milieu MRS à pH 6,2 incubé à 30°C pendant 72 heures. En anaérobiose, nous a permis d'obtenir des souches des lactobacilles. Seules les boîtes ayant des colonies bien distinctes (de 3 à 4 mm de diamètre en profondeur de couleur blanchâtre) ont été retenues.



Figure 6 : photos originales de l'isolement des *Lactobacillus* à partir de miel, lait de chèvre, et les dattes

a1 : lactobacilles isolées à partir de lait de chèvre sur milieu MRS

a2 : lactobacilles isolées à partir des dattes sur milieu MRS

a3 : lactobacilles isolées à partir de miel sur milieu MRS

Dénombrement des colonies des lactobacilles isolés :

Aliment	dénombrement
Lait de chèvre	420 UFC/ml
Jus des Dattes	340 UFC/ml
miel	35 UFC/ml

III.1.2. Etudes macroscopiques

Les colonies des lactobacilles cultivées sur milieu MRS solide apparaissent sous forme ronde de couleur blanchâtre à blanc crème et présentent un aspect lisse et mat en surface

Après le repiquage des colonies isolées à partir de miel, lait de chèvre et jus des dattes et l'ensemencement sur milieu MRS pour la 2ème fois, les colonies apparaissent avec le même aspect que celles qui sont repiqués.

Les souches des lactobacilles isolés vont par la suite subir des tests d'identification spécifique

III.1.3. Etude microscopique***Coloration de Gram**

Les résultats des observations microscopiques après coloration de Gram montrent que les colonies de lactobacilles présentent des cellules Gram positives (se colore en violet), immobiles, en forme de bâtonnets.

***Test de catalase**

Après la réalisation du test on a conclu que les colonies sont des catalases négatives.

***Test d'oxydase**

Après la réalisation du test on a conclu que les colonies sont des oxydases négatives.

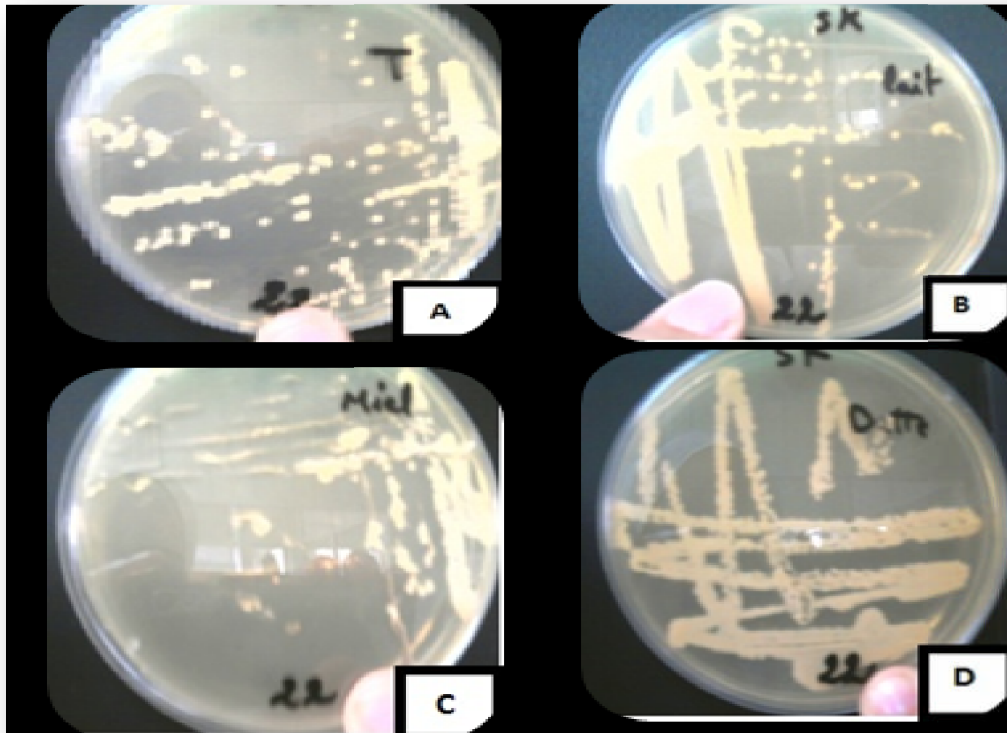
III.1.4. étape1 : contamination par les Levures *Candida*

Figure 7 : les résultats de développement des levures sur milieu Sabouraud d'un yaourt contaminé par levure *Candida* de l'étape 1 du premier essai

Les résultats de dénombrement des levures sur milieu Sabouraud apparaissent dans les figures suivantes :

A : témoin boîte de référence

B : résultats de développement des levures dans un yaourt traité par *Lb* isolé à partir du lait de chèvre.

C : résultats de développement des levures dans un yaourt traité par *Lb* isolé à partir de miel.

D : résultats de développement des levures dans un yaourt traité par *Lb* isolé à partir des dattes.

Par rapport à ces résultats on a sélectionné les souches du *Lb* isolés à partir du miel et lait de chèvre pour réaliser une 2^{ème} étape du premier essai.

III.1.5.étape2 : contamination par levure *Candida* (4 gouttes)

III.1.5.1. Analyse physicochimique

Après contamination du yaourt par levure *Candida*, les résultats des modifications de pH et d'acidité sont mentionnés dans les graphes suivants :

*Modification du pH

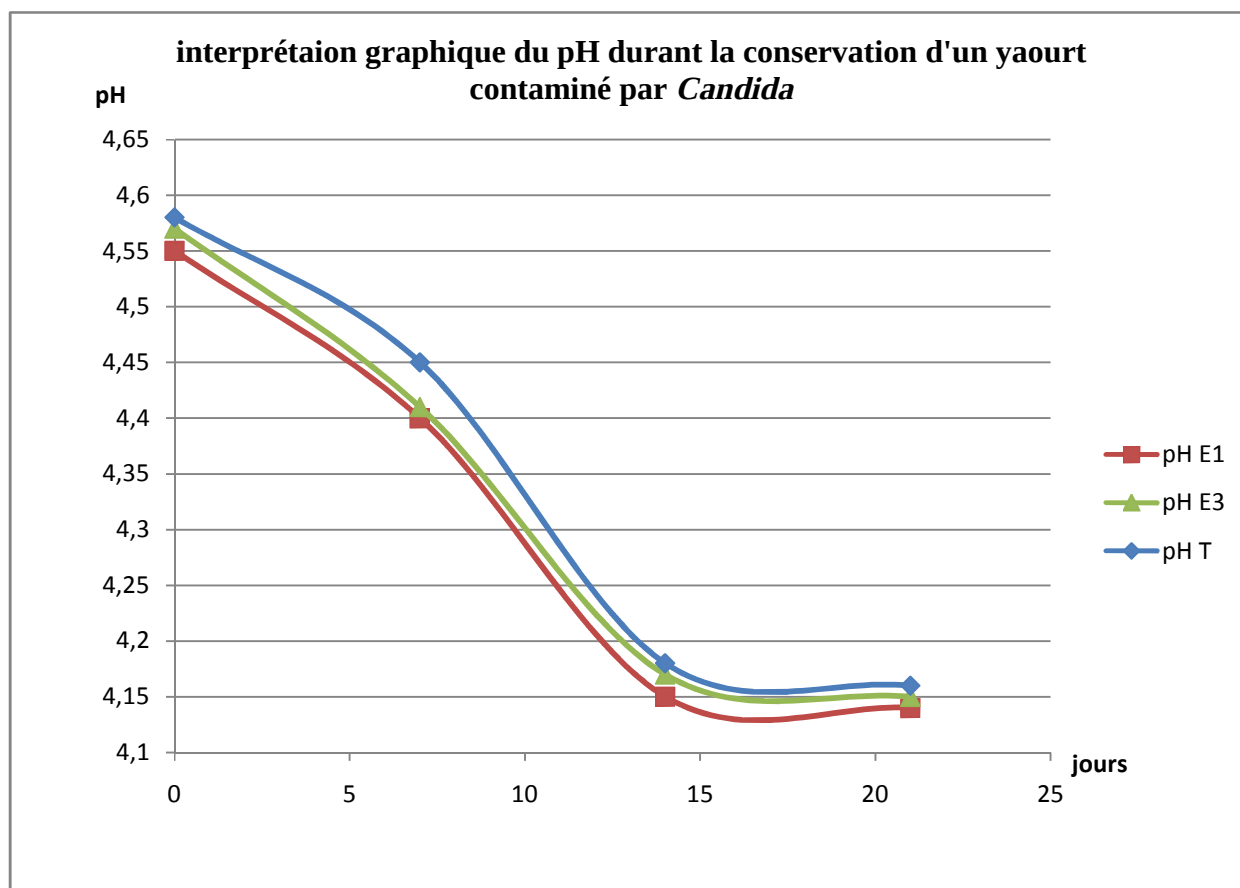


Figure 8: schéma d'interprétation graphique des valeurs de pH d'un yaourt contaminé par *Candida* traité par *Lb*

E₁ : yaourt contaminé par les levures *Candida* traité par les Lactobacilles isolées à partir de lait de chèvre.

E₃ : yaourt contaminé par les levures *Candida* traité par les Lactobacilles isolées à partir du miel.

T : yaourt contaminé par les levures *Candida*.

Les résultats des variations de pH pendant les 3 semaines de stockage montrent que le pH des trois échantillons du yaourt est acide.

De J_0 - J_{14} de stockage, on remarque une diminution progressive des valeurs du pH des deux yaourts E_1 , E_3 ($4,55 \rightarrow 4,15$, $4,57 \rightarrow 4,17$) respectivement par rapport au témoin, puis une légère diminution jusqu'à la fin de l'essai

***Modifications de l'acidité :**

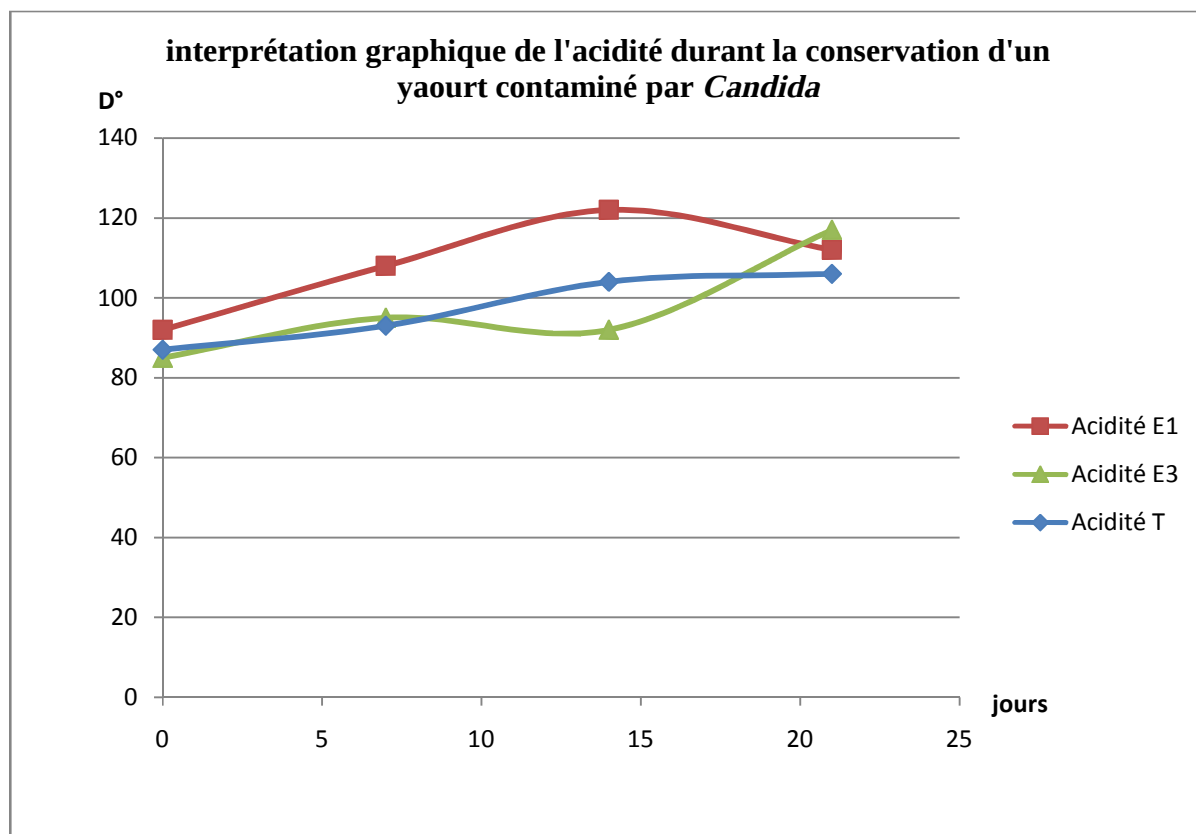


Figure 9: schéma d'interprétation graphique des modifications de l'acidité d'un yaourt contaminé par *Candida* traité par *Lb*.

E_1 : yaourt contaminé par les levures *Candida* traité par les Lactobacilles isolées à partir de lait de chèvre.

E_3 : yaourt contaminé par les levures *Candida* traité par les Lactobacilles isolées à partir du miel.

T : yaourt contaminé par les levures *Candida*

D'après l'interprétation graphique de l'acidité, les valeurs de l'acidité des trois échantillons sont importantes (plus de 85°D).

Nous remarquons une augmentation progressive de l'acidité E_1 au cours des deux premières semaines de stockage et une légère diminution de l'acidité inhabituelle pendant la

troisième semaine, ces valeurs sont élevées par rapport à l'acidité T pendant la durée de stockage.

Une augmentation de l'acidité E_3 durant (J_0 - J_7), puis une diminution inhabituelle jusqu'à l'obtention des valeurs inférieures à l'acidité T , puis nous remarquons un croissement de l'acidité E_3 pendant les jours de stockages qui restent pour arriver à des valeurs plus que celles de l'acidité T .

III.1.5.2. Analyses microbiologiques

Les résultats de dénombrement des levures sont mentionnés dans le tableau 9 (annexe 3) et le graphique suivants

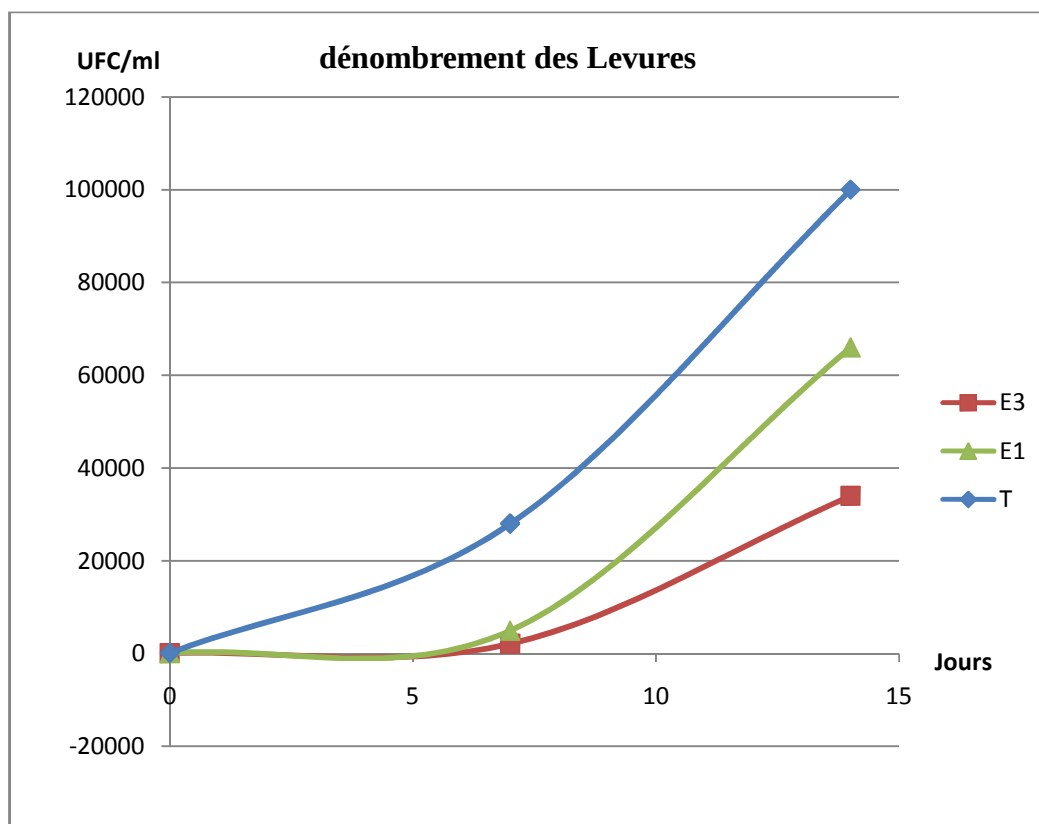


Figure 10:interprétation graphique de dénombrement des levures d'un yaourt de l'étape 2 essai 1.

E_1 : yaourt contaminé par les levures *Candida* traité par les Lactobacilles isolées à partir de lait de chèvre.

E_3 : yaourt contaminé par les levures *Candida* traité par les Lactobacilles isolées à partir du miel.

T : yaourt contaminé par les levures *Candida*

Le développement des levures au cours des trois semaines de stockage augmente de façon successive est cela pour les trois échantillons ; Si en compare le développement des levures on trouve que le nombre des levures des E_1 et E_3 est faible par rapport au T ; on remarque pendant la première semaine que le nombre des levures de : E_1 et E_3 sont proches mais à partir de 7^{ème} jour il y a eu un développement remarquable de levure de E_1 par rapport E_3 .

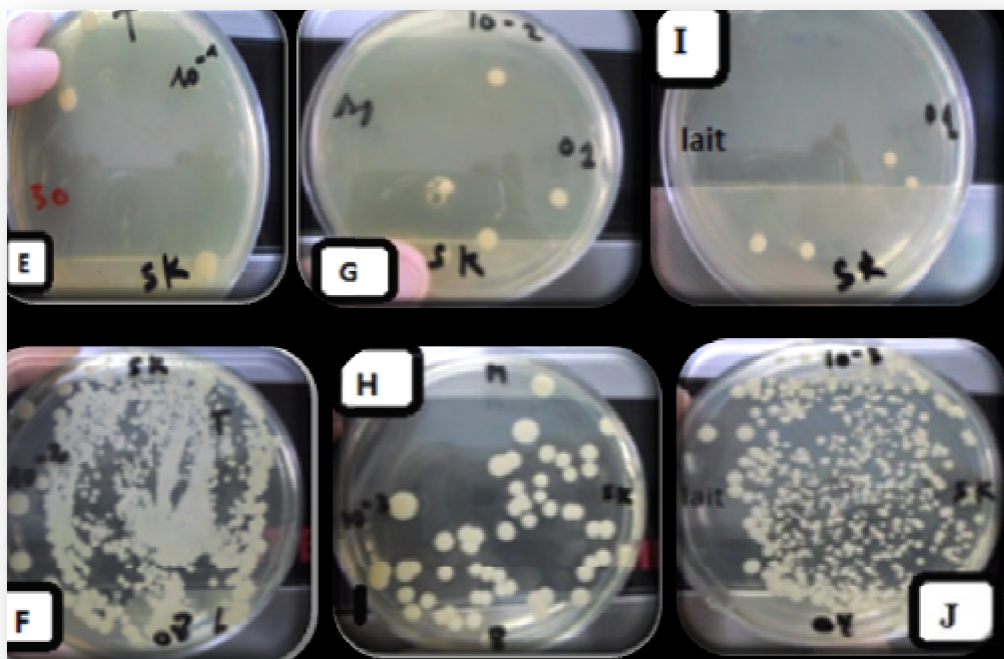


Figure 11 : photos originales de dénombrement des levures d'un yaourt contaminé par levure *Candida* traité par les *Lb*.

E : résultat de dénombrement de levure du yaourt T après 7 jours de stockage

F : résultat de dénombrement de levure du yaourt T après 14 jours de stockage

G : résultat de dénombrement de levure du yaourt traité par *Lb* isolé à partir du miel après 7 jours de stockage

H : résultat de dénombrement de levure du yaourt traité par *Lb* isolé à partir du miel après 14 jours de stockage

I : résultat de dénombrement de levure du yaourt traité par *Lb* isolé à partir de lait de chèvre après 7 jours de stockage

J : résultat de dénombrement de levure du yaourt traité par *Lb* isolé à partir de lait de chèvre après 14 jours de stockage

III.1.6. Essai 2 : contamination par *E. coli*

III.6.1. Analyses physicochimiques

*modification du pH

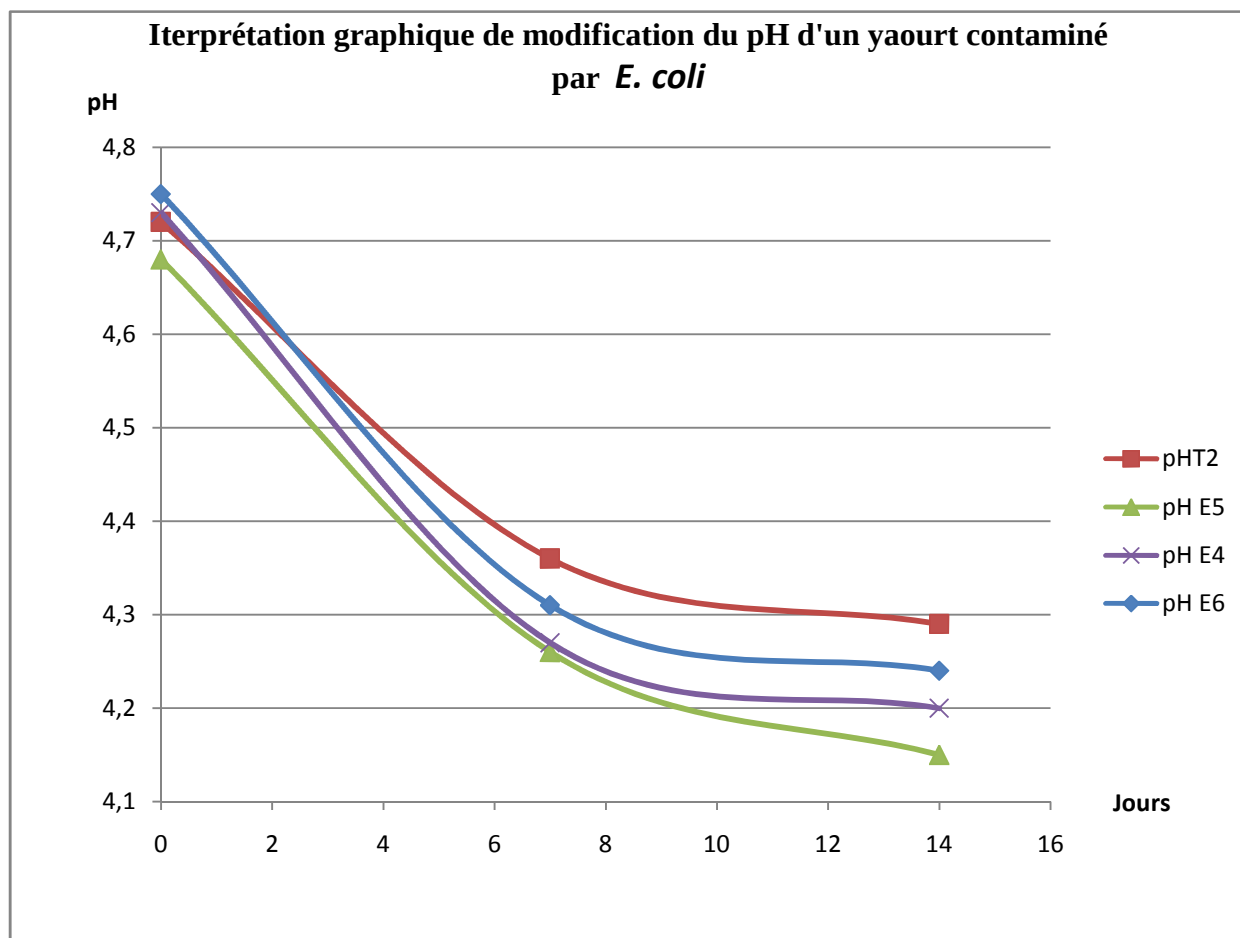


Figure 12 : interprétation graphique de modification du pH d'un yaourt contaminé par *E. coli* traité par les *Lb.*

E₄ : yaourt contaminé par *E. coli* traité par les Lactobacilles isolées à partir de lait de chèvre.

E₅ : yaourt contaminé par *E. coli* traité par les Lactobacilles isolées à partir des dattes.

E₆ : yaourt contaminé par *E. coli* traité par les Lactobacilles isolées à partir du miel.

T₂ : yaourt contaminé par *E. coli*.

On a constaté une baisse remarquable de pH pendant la durée de stockage des échantillons T₂ (4.72 → 4.29), E₄ (4.73 → 4.20), E₅ (4.68 → 4.15), E₆ (4.68 → 4.15).

Nous observons que les valeurs de pH des E₄, E₅, E₆ sont moins par rapport au T.

* modification de l'acidité

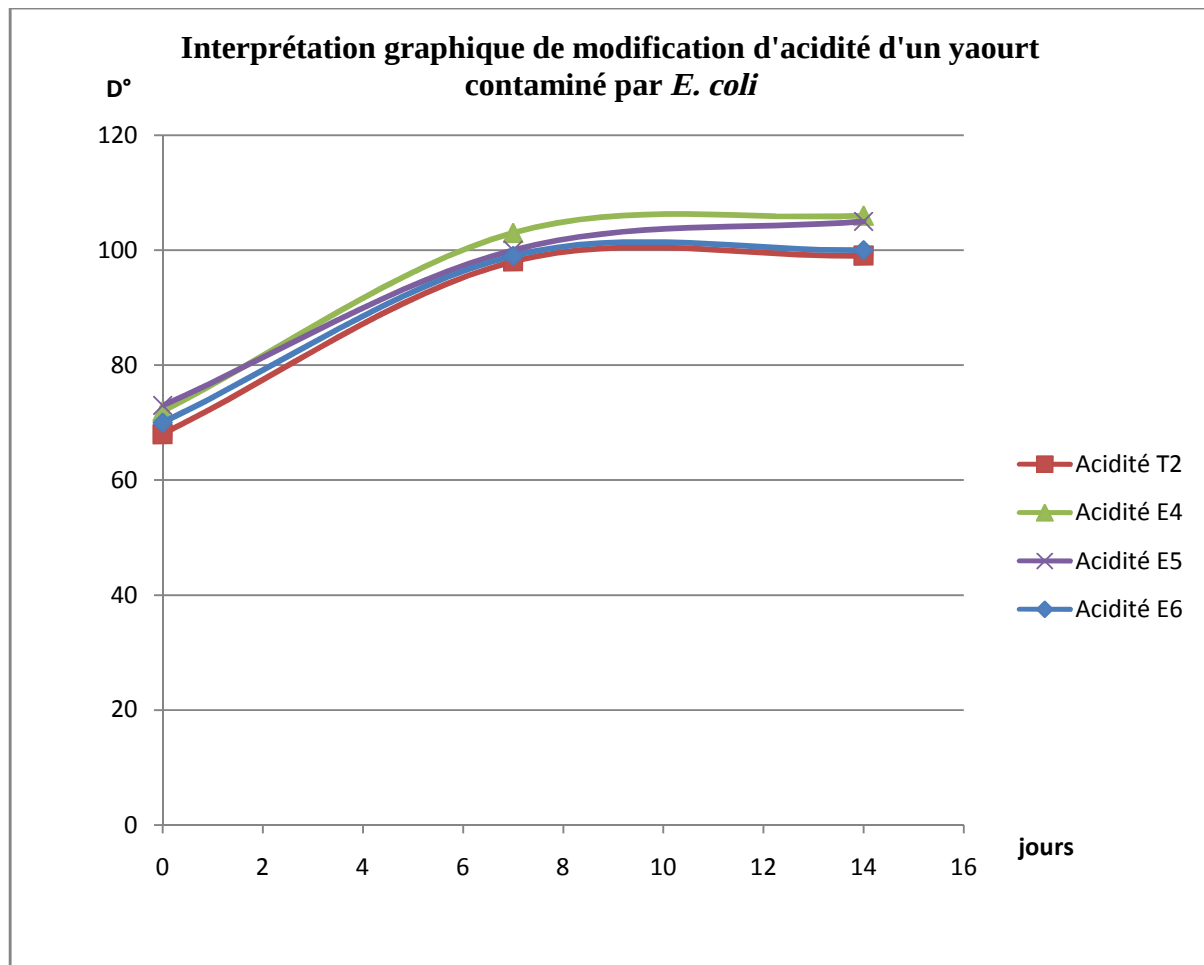


Figure 13: interprétation graphique de modification De l'acidité d'un yaourt contaminé par *E. coli* traité par les *Lb*.

E₄ : yaourt contaminé par *E. coli* traité par les Lactobacilles isolées à partir de lait de chèvre.

E₅ : yaourt contaminé par *E. coli* traité par les Lactobacilles isolées à partir des dattes.

E₆ : yaourt contaminé par *E. coli* traité par les Lactobacilles isolées à partir du miel.

T₂ : yaourt contaminé par *E. coli*.

Les échantillons T₂, E₄, E₅, E₆ contaminés par *E. coli* sont acides (plus de 68°D) et les valeurs de l'acidité de E₄, E₅, E₆ sont légèrement plus que T₂ pendant toute la durée de stockage

III.1.6.2. Analyses microbiologiques

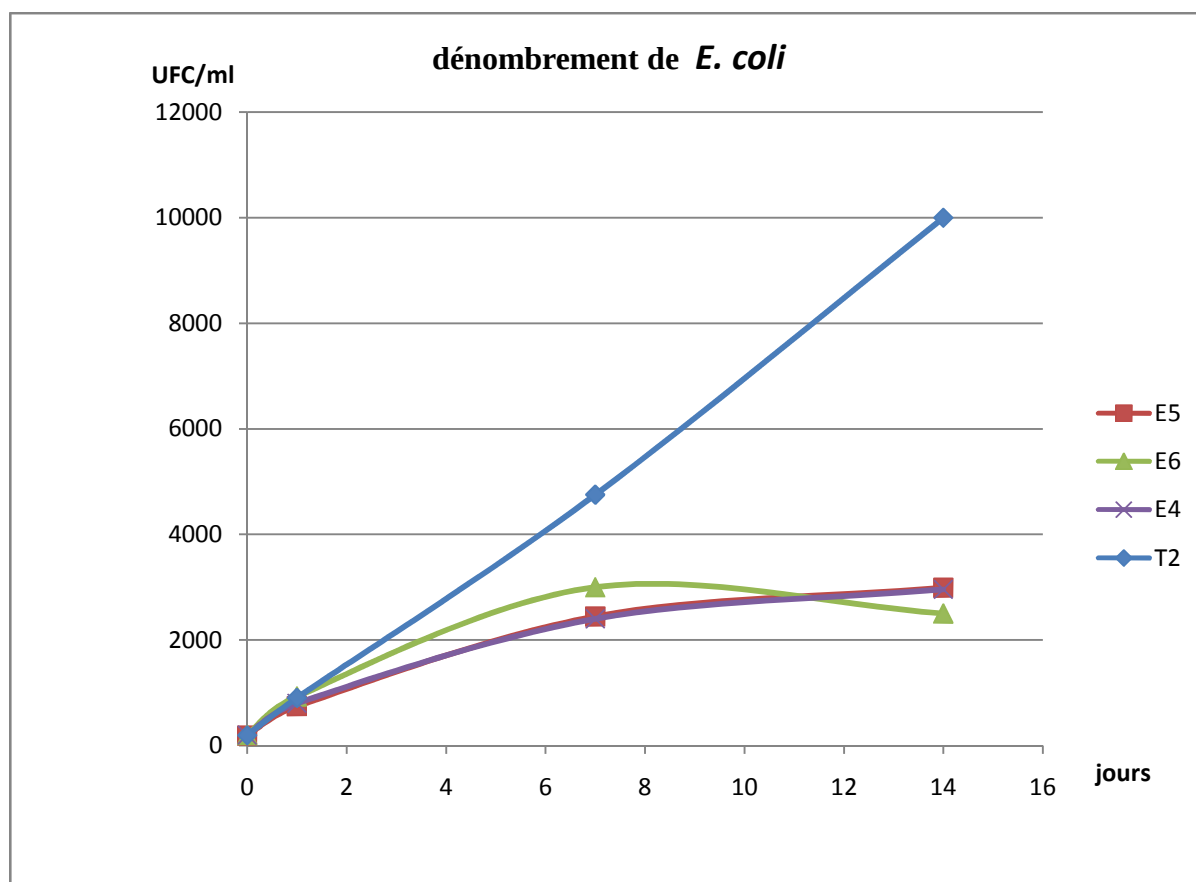


Figure 14: interprétation graphique de dénombrement des *E. coli* d'un yaourt de l'essai 2 pendant la durée du stockage.

E₄ : yaourt contaminé par *E. coli* traité par les Lactobacilles isolées à partir de lait de chèvre.

E₅ : yaourt contaminé par *E. coli* traité par les Lactobacilles isolées à partir des dattes.

E₆ : yaourt contaminé par *E. coli* traité par les Lactobacilles isolées à partir du miel.

T₂ : yaourt contaminé par *E. coli*

Augmentation du nombre des *E. coli* pour tous les échantillons pendant la durée du stockage.

Une augmentation droite remarquable de nombre de *E. coli* du yaourt T₂ alors que les valeurs de dénombrement *E. coli* des E₄, E₅ sont augmentés progressivement avec le temps (le développement T₂ est important que le développement de *E. coli* E₄, E₅, E₆). Les valeurs de E₆ augmentent progressivement durant les 7 premiers jours et qui vas diminuer légèrement au cours des derniers jours.

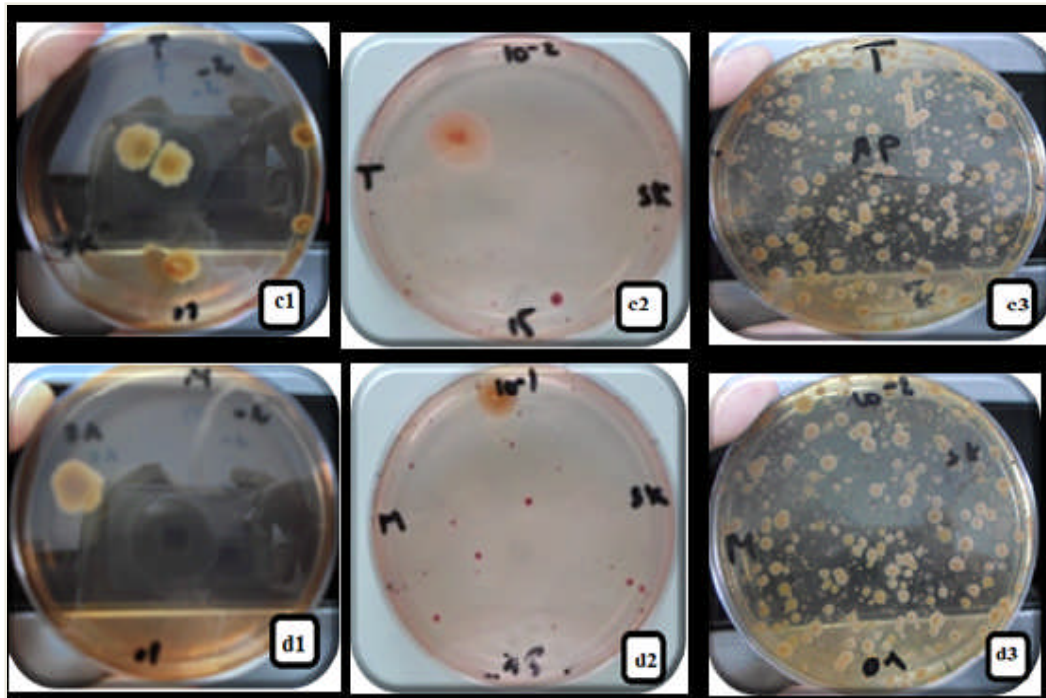


Figure 15 : photos originales de dénombrement des *E. coli* du yaourt de l'essai 2 (témoin et traité par *Lb* isolé à partir du miel).

c1, c2, c3 : les boîtes de Pétri contiennent VRBL etensemencé par yaourt témoin contaminé par les *E. coli* après 0, 7, et 15 jrs de stockage respectivement.

d1, d2, d3 : les boîtes de Pétri contiennent VRBL etensemencé par yaourt contaminé par les *E. coli* et traité par *Lb* isolé à partir du miel après 0, 7, et 15 jrs de stockage respectivement.

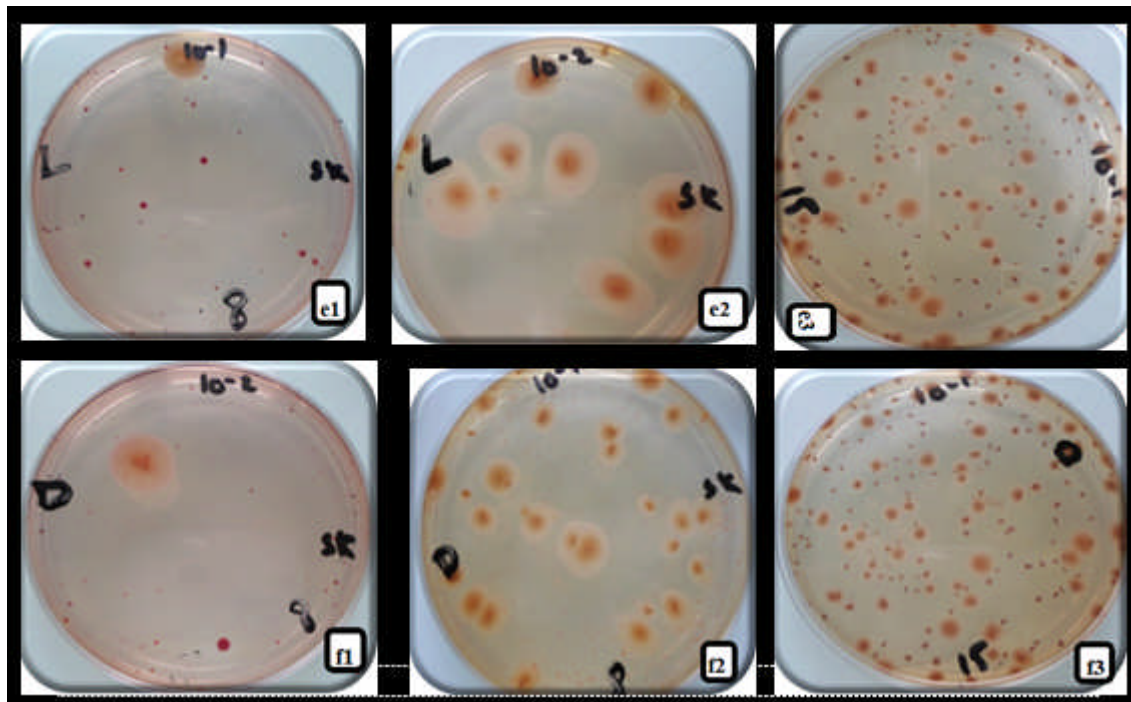


Figure 16 : photos originales de dénombrement des *E. coli* du yaourt de l'essai 2 (traité par *Lb* isolé à partir des dattes et de lait de chèvre).

e1, e2, e3 : les boîtes de Pétri contiennent VRBL et ensemencé par yaourt contaminé par les *E. coli* et traité par *Lb* isolé à partir De lait de chèvre après 0, 7, et 15 jrs de stockage respectivement.

f1, f2, f3: les boîtes de Pétri contiennent VRBL et ensemencé par yaourt contaminé par les *E. coli* et traité par *Lb* isolé à partir des dattes après 0, 7, et 15 jrs de stockage respectivement.

III.2. Discussion

III.2.1. Isolement des *Lactobacillus*

Après 3 jours d'incubation à 30°C les boîtes de Pétri ensemencées développent des petites colonies (de 3 à 4 mm de diamètres) en profondeur de couleur blanchâtre.

Les résultats obtenus après les tests d'identification macroscopique et microscopique montrent que les bactéries isolées sont des Lactobacilles, C'est les mêmes résultats trouvés par (Larpent, 1997; Federighi et al., 1998).

III.2.2. Premier essai étape 1 : Contamination par les levures *Candida*

Si on compare nos résultats par rapport au témoin on trouve que :

Les boîtes de Pétri qui contiennent des Lactobacilles isolés à partir du lait de chèvre développent des colonies des levures plus par rapport au témoin, la contamination produite lors de la manipulation ou naturelle (lait cru).

Les boîtes de Pétri qui contiennent des Lactobacilles isolés à partir du miel développent un nombre moins des colonies des levures par rapport au témoin donc ces Lactobacilles exercent une activité antimicrobienne vis-à-vis des levures *Candida*.

Les boîtes contenant les souches isolées à partir du jus des dattes développent un nombre important des levures par rapport au témoin; la contamination naturelle (dattes), lors de la préparation des jus de dattes, ou lors de la manipulation.

III.2.3. Premier essai : étape 2 Contamination par les levures *Candida* (4 gouttes)

III.2.3.1. Analyses physicochimiques

*modification de pH

La diminution du pH durant les premiers 15 jours s'explique selon (Hermier et Accolas, 1990) par la production d'acide lactique à partir du lactose, ce qui abaisse légèrement le pH et augmente la saveur acide du yaourt.

La stabilité du pH durant la troisième semaine de stockage s'explique selon (Guiraud, 1998) par une faible activité protéolytique.

Les valeurs du pH_T inférieures à celles du pH_{E1} et pH_{E3} puisque le pot T contient des Lactobacilles commerciales seulement mais les pots E₁, E₃ contiennent en plus des Lactobacilles commerciales des Lactobacilles isolées (les Lactobacilles abaisse le pH).

*** modification d'acidité**

Selon (Sodini et Beal, 2003) l'évolution du pH et de l'acidité est inversement proportionnelle.

L'augmentation progressive de l'acidité des 3 échantillons s'explique selon (Vignola, 2002) par la production de l'acide lactique par la fermentation du lactose et aussi selon (Tamime et Robinson, 1999) par l'activité protéolytique qui correspond à la croissance des ferments lactiques.

La diminution inhabituelle de l'acidité s'explique par des erreurs de manipulation et les valeurs de pH montrent ces erreurs. L'acidité E₁ et E₃ est importante par rapport à l'acidité T puisque le pot témoin contient que des ferments lactiques commerciales.

Nos résultats sont similaires avec les travaux de (Hermier et Accolas, 1990; Vignola, 2002).

III.2.3.2. Analyses microbiologiques

Une augmentation du nombre des levures *Candida* durant le stockage des échantillons E₁, T et E₃, ces résultats s'expliquent par la présence des sucres et de la température adéquate qui sont deux facteurs nécessaires pour le développement des levures *Candida*.

Selon (Ait Abdelouahab, 2007), lorsque les teneurs en sucres sont comprises entre 10% et 30%, les levures peuvent se développer. La température optimale de croissance est comprise entre 25 et 30°C (*Candida* peuvent se développer à 0°C).

Le développement du nombre du *Candida* dans les échantillons E₃ et E₁ est moins important que le T, ce qui montre l'existence d'une activité antifongique des *Lactobacillus* vis-à-vis les levures *Candida*.

Les résultats obtenus sont rapprochés aux résultats des travaux du (Cathy et al., 2011).

L'acétate de Sodium, acide phényllactique, acide organique et peptides sont des substances secrétés par des genres de *Lactobacillus* et ont des activités antifongiques contre *Fusarium*, *Aspergillus*, *Candida* et autres, (Chobert et Choiset, 2011).

Une étude menée par (Cathy J, 1997) a montré qu'il existe une diminution de la fréquence d'infections vaginales à *Candida* chez les femmes ayant consommé pendant six mois un yoghourt contenant 108 UFC/ml de *Lb.acidophilus*.

La différence de développement des levures *Candida* chez E₁ et E₃ montre une différence de l'activité inhibitrice des *Lactobacilles* vis-à-vis *Candida* qui s'explique par une différence des souches *Lactobacilles* isolés à partir du miel et celles isolées à partir du lait de chèvre.

Nos résultats concordent avec ceux de (Dib et al., 2012), l'activité inhibitrice de la même bactéries était différente selon le produit dans le quel a été isolé. Ainsi, il existe deux ou plusieurs sous espèces de la même bactérie dans le même produit. En effet et à titre d'exemple quatre types le *Lactobacillus plantarum* de même produit ont été isolés et montrent une activité inhibitrice différente contre les bactéries pathogènes.

III.2.4. deuxième essai : contamination par *E Coli*

III.2.4.1. Analyses physicochimiques

* modification du pH

La diminution des valeurs du pH des échantillons s'explique par la production d'acide lactique selon (Hermier et Accolas, 1990).

La différence entre les pH des échantillons s'explique par la différence des souches des *Lactobacillus* utilisées (qui sont isolées). Les valeurs du pH T₂ est élevé puisque le pot T₂ contient un faible nombre des *Lactobacilles* par rapport les autres.

Nos résultats sont similaires avec les travaux de (Ouhssine et al., 2005), le suivi du pH et de l'acidité montre une diminution progressive du pH pour toutes les souches *Lactobacilles* isolées .

D'après (Sodini et Beal, 2003) La diminution du pH favorise l'activité des ferments lactiques qui se traduit par la production en masse de l'acide lactique.

Selon (Dib et al., 2012) les *Lactobacilles* peuvent survivre à pH 4,6, c'est le pH commun à plusieurs produit fermentés.

Les *Lactobacilles* pourraient être protégées et encapsulées pour résister aux conditions acides (Dib et al., 2012).

A pH 2, le taux de viabilité de la majorité des souches des *Lactobacilles* ne dépasse pas 8% et peut arriver à 50% et 41% pour *L. acidophilus* et *L. rhamnosus* respectivement ; *L. plantarum* et *L. paracasei* étaient sensibles au pH 2 avec une activité antimicrobienne importante contre les bactéries pathogènes. (Dib et al., 2012).

Selon les résultats obtenues (mentionnés dans le tableau 8 (**annexe 3**)) l'acidité est élevée progressivement au cours de la conservation du yaourt c'est résultats sont confirmés par (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Après fermentation, au cours de la conservation du produit à basse température (en général 20 à 40 jours entre 4 et 12 °C), l'acidité acidifiante des ferment se poursuit, elle est d'autant plus intense quand la température est élevée (**Luquet et Corrieu, 2005**).

III.2.4.2. Analyses microbiologiques

Le développement du nombre des *E. Coli* s'explique par la présence de toutes les conditions favorables pour leurs développements.

Le faible développement de *E. Coli* dans les échantillons E₄, E₅, E₆ s'explique par la présence d'un effet antimicrobien des *Lactobacillus* vis-à-vis *E. Coli*, des nombreux travaux expliquent ces résultats par la production des substances antimicrobiennes.

Selon (**Dib et al., 2012**) une des caractéristiques intéressantes des Lactobacilles est leur capacité de ralentir et d'inhiber l'activité de croissance des bactéries pathogènes par la production des facteurs inhibiteurs.

Des études chez l'animal ont permis de mettre en évidence un effet préventif contre les infections provoquées par *E. Coli* chez des souris nourries avec du lait fermenté par *Lb.acidophilus* et *L. casei*, (**Cathy J, 1997**).

La souche *L. plantarum* présente une forte activité bactéricide active sur *Escherichia Coli*. (**Ouhssine et al., 2008**).

D'après les travaux de (**Chambaud et al., 2013**), les Lactobacilles présentent une activité antibactérienne effectuées contre trois souches pathogènes de *Escherichia Coli*.

Selon (**Bazo, 2011**) l'activité antibactérienne des *Lactobacillus* contre *E. Coli* dépend de plusieurs critères : pH, le milieu de croissance et la production des substances antibactériennes comme les bactériocines, les acides organiques, les acides gras et le peroxyde d'hydrogène.

Les travaux des (**Ouhssine et al., 2005**) montrent que *Lactobacillus* peuvent synthétiser des substances antibactériennes et sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments .

Les bactériocines sont des peptides antibactériennes, elles représentent un spectre d'activité étroit vers les espèces pathogènes, elles ont un optimum de stabilité de solubilité et d'activité à pH acide. (**Ouhssine et al., 2005**).

Conclusion et perspectives

Les bactéries lactiques sont reconnues depuis longtemps, pour leur aptitude à produire au cours de leur croissance des substances antagonistes inhibant la croissance d'autres micro-organismes indésirables ou pathogènes.

Dans la présente étude, afin de vérifier les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques, nous avons essayé d'isoler des Lactobacilles à partir du lait de chèvre cru, le miel et jus des dattes.

D'après les résultats d'isolement des Lactobacilles, on a trouvé que le lait de chèvre est le plus riche en Lactobacilles (420 UFC/ml), puis les dattes (340UFC/ml) et en fin le miel (35UFC/ml).

Lactobacillus isolés ayant une activité inhibitrice vis-à-vis les levures *Candida* ; et d'après les résultats de dénombrement des levures *Candida* dans un yaourt traité par les *Lactobacillus*. Les Lactobacilles isolés à partir du miel sont plus active contre *Candida* que les Lactobacilles isolés à partir de lait de chèvre.

L'activité inhibitrice des lactobacilles contre les bactéries pathogènes augmente lors de la croissance des Lactobacilles à PH baisse ce qui vas s'explique par une forte activité protéolytique par la production d'acide lactique à partir du lactose.

Le dénombrement de l'*E. Coli* montre l'existence de substances secrétées par les Lactobacilles, ayant une activité inhibitrice contre les *E. Coli*.

En effet, *Lactobacillus* représente une voie d'avenir pour la production des bactériocines parfaite ment adaptées à un usage particulier. Plusieurs résultats obtenus ont permis de fournir des informations nécessaires pouvant servir de base pour orienter les futurs travaux sur la production des bactériocines destinées à des applications potentielles dans les produits laitiers, sous forme d'additif, soit d'inoculum bactérien producteur de bactériocines au cours de processus de fabrication et en tant que conservateur naturel pour inhiber la croissance des microorganismes indésirables dans les aliments.

En perspective, il serait intéressant d'envisager les études suivantes :

- l'utilisation de techniques moléculaire a fin d'identifier les souches isolées.
- identification et purification des bactériocines produites.

Références bibliographiques

- ***ACCOLAS., (1979).** Les levains lactiques thermophiles. Propriété et comportement en technologie du lait, tome 4, p 487-524.
- ***ALAIS C., (1984).** Science du lait : principe des techniques laitières 4^{ème} éditions .Paris. p 814.
- * **ALLOUCHE FELLA NAOUAL., AMINA HELLAL., ABDENOUR LARABA., (2006).**Article : étude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière.
- * **ALLOUCHE FELLA NAOUEL., AMINA HELLAL., ABDENOUR LARABA., (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Mémoire de Magister l'INA EL Harrach. Algérie
- ***ASSCHE P., ROTHE., (1996).** La fabrication de yaourt éditions : technique et documentation Lavoisier, p 18, 34,452.
- * **BAZO MARI., (2011).** Recherche des effets de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur le staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (sarm), université du Québec à Montréal
- ***BEAL C., SODINI I., (2003).** Fabrication des yaourts et des laits fermentés : Paris : techniques et documentation- Lavoisier, 2003.
- ***BIGRET M., (1989).** Le lactobacille.....aujourd'hui. Bio future. P14 ,35-37.
- ***BONNEFOY C., LEYRAL G., GUILLET F ET VERNE., BOURDAIS E., (2002).**Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaire.
- ***BOUDJELAL ET NAICIB., (2001).** Production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu a bas de jus de dattes revue CDER, production et valorisation – biomasse p41.
- * **BOURGEOIS C.M., LARPENT J.P., (1996).** Microbiologie alimentaire Tome 2. Aliment fermentés et fermentation alimentaire P20-21.
- ***CAROL L., VIGNOLA., (2002).** Science et technologie du lait. Transformation du lait p444-445-459-451-30.

- *CATHY J., (1997).** Lactobacillus acidophilus, newsletter N°13, DANONE WORLD NEWSLETTER.
- *CHAMBAUD ISABELLE., KHLEBNIKOV ARTEM., VILLAIN ANNE-CATHERINE., GROMPONE GIANFRANCO., SAINT DENIS THIERRY, DRUESNE ANNE, SMOKVINA TAMARA., (2013).** Nouvelle souche de Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei dotée de propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrices
- * CHOBERT JEAN-MARC., YVAN CHOISET., (2011).** Développement de cultures bactériennes protectrices antifongiques pour améliorer la conservation des produits laitiers fermentés, INRA Angers Nantes
- * CORRIEU GEORGE., (2008).**Bactéries lactiques. P 788,789.
- * DAECHEL M.A., (1989).** Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use Food preservation. Food .chnol. p.2,24.
- *DALLARRAS C., (2004).**Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse et de contrôle sanitaire. p129, 133, 137,141.
- *DELLEGLIO F., (1994).** Caractéristique des bactéries lactiques Lavoisier. p 01 ,23.
- *DEROISSART H., LUQUET F.M., (1994).** Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologies, volume I. Paris : Lavoisier 1994.
- * DIB H., E HAJJ SEMAAN., R MRAD., J AYOUB., L CHOUEIRY., H MOUSSA ET G BITAR., (2012).** Identification et évaluation de l'effet Probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels, faculté d'agronomie, université libanaise, lebanese science journal.
- *FEDERERIGHI M., LAURENT SUTRA., JEAN., LOUIS JAUNL., (1998-).**Manuel de bactériologie alimentaire, polytechnica.Paris.p246,247.
- *FEDERERIGHI M., (2005).** Bactériologie alimentaire
- *FRANÇOIS.. MARIE LUQUET., GEORGES CORRIEU., (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques, éditions : Lavoisier. Paris.p9-10-11.
- *FREUND G., (1996).** Intérêts nutritionnelles du lait de chèvre. Coll les colloques n°81. Edition INRA. p20, 30.

Références bibliographiques

- ***GALVEZ A., DAUPHIN R., DESTAIN J., CAMPOS D., THANART P., (2011).** Les entérocoques : avantage et inconvénients en biotechnologie. Biotechnol. Agron . Soc. p 68,69.
- ***GAUDET KOWALSKI A., (2011).** « Physique et chimie 1^{er} terminal » édition Educagri. p195.
- * **GOURDIN AMELIE.** Fiche gélose Sabouraud au chloramphénicol.
- ***GOLDIN B R., GORBATCH S.L., (1980).** Effect of *lactobacillus acidophilus* dietary supplementation on 1, 2 dimethylhydrazine dihydrochloride induced intestinal cancer in rats,J. Nat l .Cancer. Inst. p64, 263,265.
- ***GOUT J., (2008).** 250 réponses aux questions d'un ami des abeilles. Edition , latresse.p215.
- ***GRAVIE E., (1984).** Taxonomy and identification of bacteria important in cheese end fermente diary product. In: advances in the microbiology and biochemistry of cheese end fermented milk, f. l. Davies, B. A. law .02.p35-37.
- ***GUILLILAND S.E., (1985).**Bacterial starter culture for foods. Edition CRC press, Boca. Raton. Florid.
- ***GUIRAUD J.P., (2003).** Microbiologie alimentaire. Paris Dunod. P651.
- ***GUIRAUD ET GALZY., 1980-** Analyse microbiologique dans les industries alimentaire édition l'usine nouvelle. P70-72, 239.
- ***HERMIER J., ACCOLAS J.P., (1990).**Techniques d'analyses et de contrôle dans IAA. Edition apria, p589.
- ***JOFFIN J. N ET LEYRAL G., (2001).** Microbiologie technique, dictionnaire de techniques. Volume 1 édition CRDP d'aquitaine, 312p.
- ***KLAENHAMMER T.R., FREMAUX C., HECHARD Y., (1994).**Activité antimicrobienne des bactéries lactiques. In : de Doissart H .Luquet F.M. coordinateurs bactéries lactiques .vol.1 édition Lorica Paris p353, 356.
- ***LARPENT J.P., (1997).** Microbiologie alimentaire technique de laboratoire .p15, 17,704.

Références bibliographiques

- *LAURENT S., MICHAIL F., JAUN L., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire sain plais Paris p236-241.
- *LEVEAU TEVEAU T., BOUIX M., DEROISSART H., (1993).** Les bactéries lactiques microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel p25, 27.
- *LOUVEAU J., (1985).** Les abeilles et leur élevage .2 éme édition MASSON p59.
- *LUQUET F.M., (1990).** Lait et produit laitiers, vaches, brebis, qualité énergétique et table de composition. Technique et documentation, Lavoisier 2 éme édition. p637, 3,56.
- *LUQUET F.M., (1985).** Le lait et produits laitiers vache-brebis-chèvre ; tome3, Paris : Lavoisier.
- *MAHAUT M., JEANTET R., BRULE G., SCHUCK P., (2000).** Les produits industriels laitiers, technique et documentation, Lavoisier. Paris.
- * MATHIEU JACQUE., (1998).** Initiation à la physicochimie du lait. Édition technique et documentation p220.
- * NF V08-010 de mars (1996) :** Microbiologie alimentaire directives générales préparation des dilutions en vue de l'analyse microbiologique.
- *NOVEL G., (1993).**les bactéries lactiques. In : Leveau J.Y. Bouix M, microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Edition technique documentation, Lavoisier. APRIA. P612.
- * OUHSSINE MOHAMMED., HICHAM LABIOUL., LAAROUSSI ELMOUALDI., MOHAMMED EL YACHIOUL., (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes
- *OUHSSINE M., M SOBH, A CHAOUCH, A ECHCHELH, H OUDDA., (2008).** Article: activité antimicrobienne de *lactobacille plantarum*.
- *SINGLETON P., (1994).** Bactériologie. 2 éme cycle, 4 éme édition : Dunod. P144, 146.
- *S-T-GELAIS D.D., OULD-BABA A. M ET TURCOT S.M., (1994).** Composition du lait de chèvre et aptitude à la transformation agriculture et agro-alimentaire, Canada. P 1,33.

Références bibliographiques

***TAMIM ET ROBINSON., (1999).** Science et technologie du lait, transformation du lait, p32.

***VAN ASSECHE., (1994).**Technologie et propriétés des produits laitiers fermentés. P17-19.

***VERINGA., (1973).** Biochemical process in the production of yoghurt, in les levains lactiques thermopiles: proprieties et composition en technologies laitière. P503.

***WANG., CARVIN., (1989).** Yeil and amino acid composition of fraction obtained during to for production cereal chim .p 66,359-361.

***WELCH C., (1987)-.** National and therapeutic aspects of lactobacillus acidophilus in dairy products. Cult.Dairy.Prod. j. p22, 23, 24.

***XANTHOPOLOS V., LITOPOULOU E., TZANETAKI I., TZANETAKIS N., (2000).** Characterisation of *lactobacillus* isolates from enfant faeces as dietary adjuncts. Food. Microbial. 17,205-215

***YEVES D., (2000).**La bio production des aliments: antagonisme microbien au service de sécurité et de qualité microbiologique 2 éme édition. P 13,25.

Annexe 1

Matériel de laboratoire utilisé

1. Appareillage et équipement

- ❖ agitateur magnétique
- ❖ autoclave
- ❖ bain-marie
- ❖ balance analytique
- ❖ bec bunsen
- ❖ Etuve réglable à différentes températures 37°C, 25°C.
- ❖ Incubateur.....
- ❖ pH mètre à affichage numérique.
- ❖ Thermomètre

2. Verrerie et accessoires

- ✓ Bécher
- ✓ bec bunsen
- ✓ boites de petri
- ✓ burette graduée avec robinet
- ✓ disque d'aluminium
- ✓ fiole 500ml
- ✓ flacon 225ml
- ✓ pince de laboratoire
- ✓ pipette graduée
- ✓ pipette pasteur
- ✓ pissette d'eau distillée
- ✓ portoir pour tubes
- ✓ spatule en métal
- ✓ tubes à essai en verre à vis stériles

3. Produits et réactifs

- Milieu MRS
- Milieu VRBL
- Milieu Sabouraud
- Milieu TSE
- Bouillon nutritive
- Hydroxyde sodium
- Violet de gentiane
- Lugol
- Alcool
- Fushine
- H₂O₂

Annexe 2

Les milieux de cultures utilisé

- Milieu sélectif solide
- Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) :
- Peptone -----7g
- Extrait de levure-----3g
- Lactose-----10g
- NaCl-----5g
- Sels biliaires-----1,5g
- Rouge neutre-----0,03g
- Cristal violet-----0,002g
- Agar-----12 à 18g
- Eau-----1000ml

Bouillon nutritif

- ✓ Extrait de viande-----1g
- ✓ Peptone pancréatique-----10g
- ✓ Chlorure de sodium-----5g

Milieu MRS

- ❖ Peptone-----10g
- ❖ Extrait de viande-----10g
- ❖ Tween 80-----1ml
- ❖ Phosphate di potassique-----2g
- ❖ Eau distillée-----800ml
- ❖ Acétate de sodium-----5g
- ❖ Citrate d'ammonium-----2g
- ❖ Sulfate de magnésium-----2g
- ❖ Sulfate de manganèse-----0,005g
- ❖ Agar-agar-----5g

Gélose Sabouraud + chloramphénicol

- Peptone-----10g /l
- Glucose-----20g/l
- Agar-----15g/l
- Eau distillée-----1000ml
- Vitamines et facteurs de croissance
- pH =6,0

***Préparation de la soude (0,11N)**

- Préparer 500ml d'eau distillée dans une fiole.
- à l'aide d'une balance analytique, Peser 2,22 g de la poudre d'hydroxyde de sodium.
- Verser la soude dans l'eau et laisser agiter sur l'agitateur magnétique jusqu'à la dissolution de la poudre d'hydroxyde de sodium en fin d'obtenir une solution homogène.

Annexe 3

Résultats des analyses microbiologiques et physicochimiques

Tableau 7 : modification du pH durant la conservation du yaourt de premier essai étape 2 (contaminée par les Levures).

JOURS	0J	7J	14J	21J
pH_T	4,58	4,45	4,18	4,16
pH_{E3}	4,57	4,41	4,17	4,15
pH_{E1}	4,55	4,40	4,15	4,14

Tableau 8: modification De l'acidité durant la conservation du yaourt de premier essai étape 2.

JOURS	0J	7J	14J	21J
Acidité_T	87	93	104	106
Acidité_{E3}	85	95	92	117
Acidité_{E1}	92	108	122	112

Tableau 9 : Les résultats de dénombrement des levures du yaourt de premier essai étape 2.

JOURS	0J	7J	14J
T	110 UFC/ml	28000 UFC/ml	ind
E₁	120 UFC/ml	4925 UFC/ml	66000 UFC/ml
E₃	100 UFC/ml	2100 UFC/ml	34000 UFC/ml

Tableau 10 : modification du pH durant la conservation du yaourt de 2^{ème} essai (contaminée par *E. coli*).

JOURS	0 J	7J	14J
pH_{E5}	4,68	4,26	4,15
pH_{E6}	4,75	4,31	4,24
pH_{E4}	4,73	4,27	4,20
pH_{T2}	4,72	4,36	4,29

Tableau 11 : modification de l'acidité durant la conservation du yaourt de 2^{ème} essai.

JOURS	0J	7J	14J
Acidité_{E5}	73	100	105
Acidité_{E6}	70	99	100
Acidité_{E4}	72	103	106
Acidité_{T2}	68	98	99

Tableau 12 : les résultats de dénombrement des *E. coli* du yaourt de 2^{ème} essai.

JOURS	Av m	Ap m	7J	14J
T₂	190UFC/ml	900 UFC/ml	4750 UFC/ml	ind
E₆	196 UFC/ml	927 UFC/ml	3000 UFC/ml	2500 UFC/ml
E₄	200 UFC/ml	800 UFC/ml	2400 UFC/ml	2958 UFC/ml
E₅	185 UFC/ml	740 UFC/ml	2442 UFC/ml	2985 UFC/ml

Annexe 4

Lait de chèvre

Jus des dattes

Miel

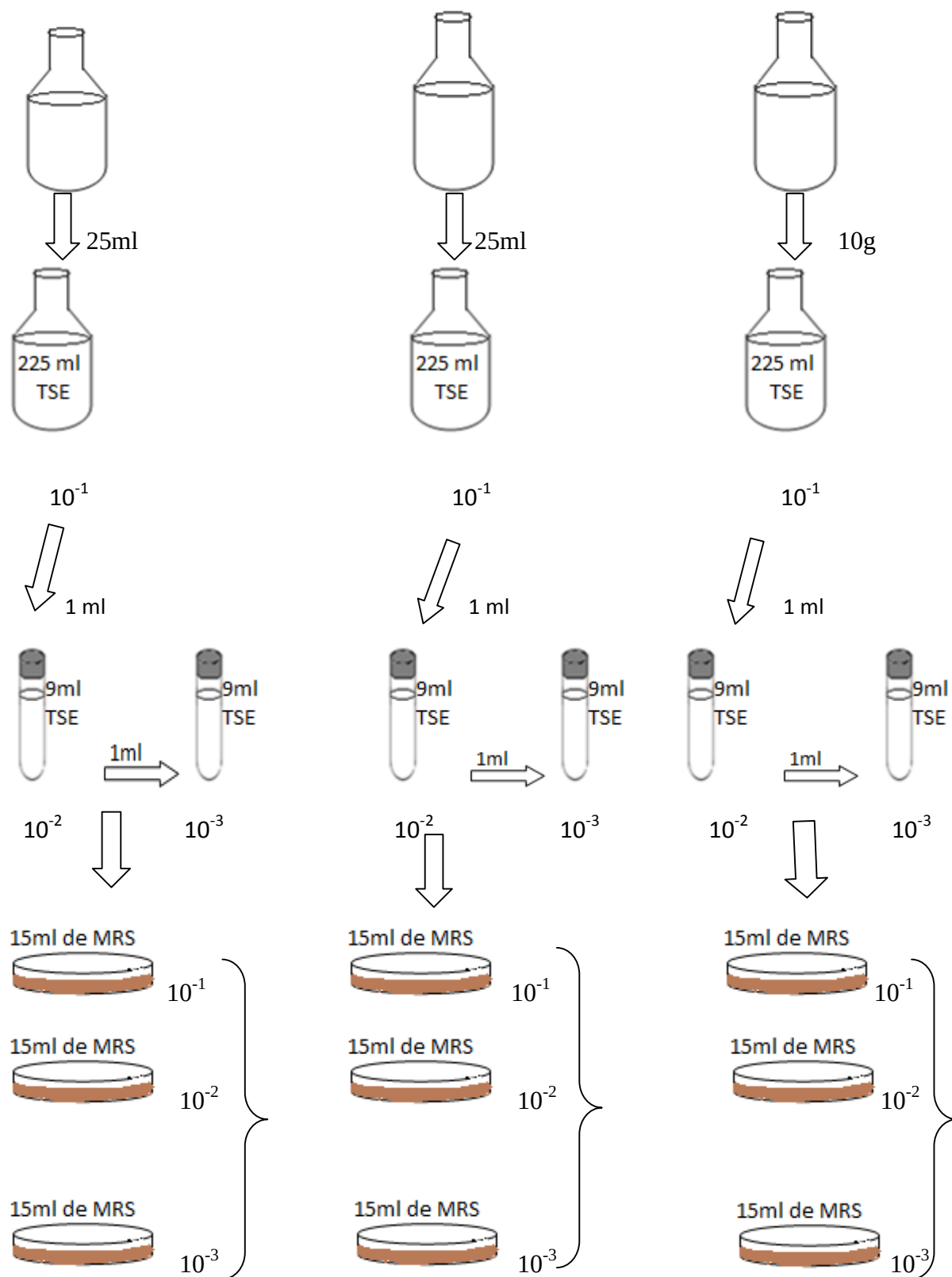


schéma du dilution décimale et l'isolement des *Lactobacillus* sur milieu MRS.

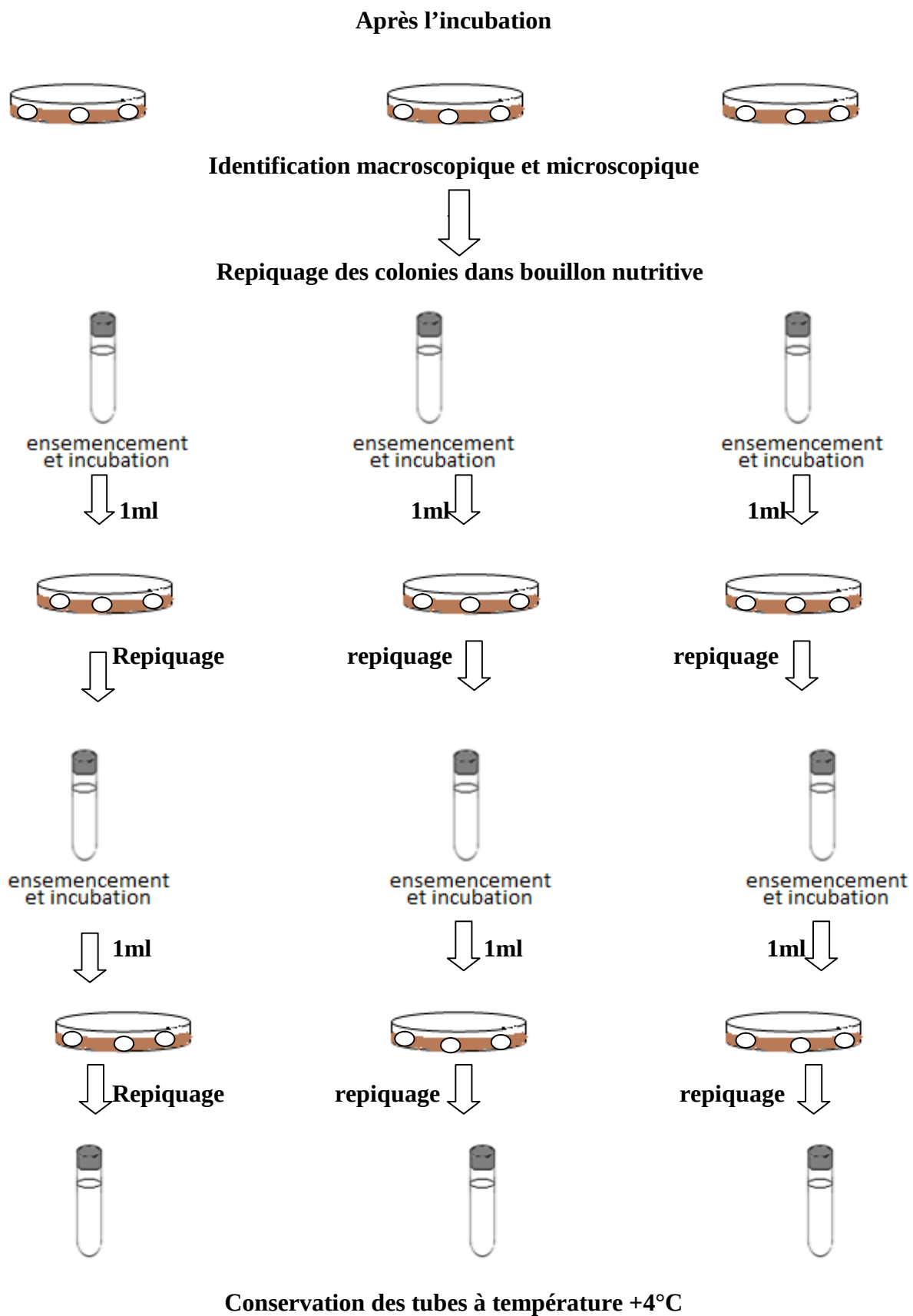


Schéma de purification et conservation des *Lactobacillus*.

Annexe 5

Les appareils utilisés



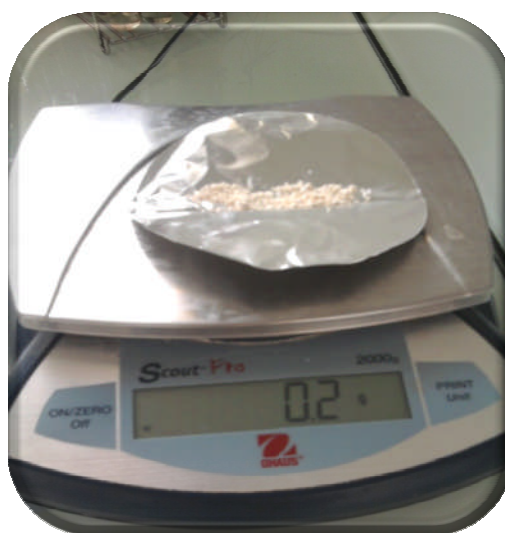
Bin marie



Incubateur à 25°C



pH mètre



Balance



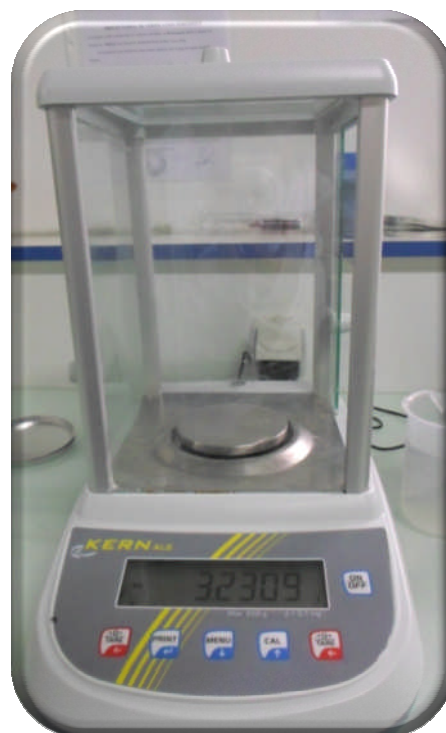
Agitateur magnétique



incubateur à 44°C



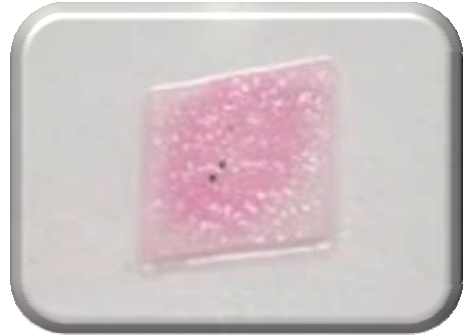
Incubateur à 37°C



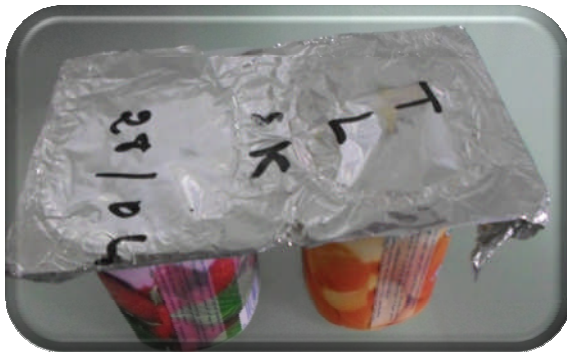
Balance analytique



Aspect du test négatif (Oxydase).



Aspect du test positif (Oxydase).



Etiquetage et conservation des échantillons



NaOH en poudre

Annexe 6

<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	<i>Lactobacillus equi</i>	<i>Lactobacillus paracasei ssp. tolerans</i>
*Lactobacillus acidophilus	<i>Lactobacillus furciminis</i>	<i>Lactobacillus parakefir</i>
<i>Lactobacillus agilis</i>	<i>Lactobacillus ferintoshinis</i>	<i>Lactobacillus paraalimentarius</i>
<i>Lactobacillus algidus</i>	<i>Lactobacillus ferementum</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus fornicalis</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus frutivorans</i>	<i>Lactobacillus perlens</i>
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	<i>Lactobacillus frumenti</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus fruchuensis</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>
<i>Lactobacillus animalis</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus psitanci</i>
<i>Lactobacillus arizonensis</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus aviarius ssp.</i>	<i>Lactobacillus graninis</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Araffinosus</i>	<i>Lactobacillus hansteri</i>	<i>Lactobacillus sakei ssp. cornosus</i>
<i>Lactobacillus aviarius ssp.</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus sakei ssp. sakei</i>
<i>Aviarius</i>	<i>Lactobacillus heteriochii</i>	<i>Lactobacillus salivarius ssp. salivarius</i>
Lactobacillus bifementans	<i>Lactobacillus homohiochii</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
Lactobacillus brevis	<i>Lactobacillus iners</i>	<i>Lactobacillus sharpeae</i>
Lactobacillus buchneri	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	<i>Lactobacillus suebicus</i>
*Lactobacillus casei	<i>Lactobacillus catenaformis</i>	<i>Lactobacillus trichodes</i>
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Lactobacillus vaccinnostercus</i>
<i>Lactobacillus coleohominis</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus vaginalis</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Lactobacillus kifiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus vitulinus</i>
<i>Lactobacillus coryniformis ssp.</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus zeae</i>
<i>Coryniformis</i>	<i>Lactobacillus kimchii</i>	
<i>Lactobacillus coryniformis ssp.</i>	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	
	<i>Torquens</i>	
*Lactobacillus crispatus	<i>Lactobacillus leichmannii</i>	
Lactobacillus curvatus ssp.	<i>Lactobacillus lindneri</i>	
Curvatus	<i>Lactobacillus malfermentans</i>	
<i>Lactobacillus curvatus ssp.</i>	<i>Lactobacillus mali</i>	
<i>Melibiosus</i>	<i>Lactobacillus maltaromicus</i>	
<i>Lactobacillus cypricasei</i>	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	
Lactobacillus delbrueckii ssp.	<i>Lactobacillus mucosae</i>	
Bulgaricus	<i>Lactobacillus murinus</i>	
*Lactobacillus delbrueckii ssp.	<i>Lactobacillus nagelii</i>	
<i>Delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus oris</i>	
Lactobacillus delbrueckii ssp.	<i>Lactobacillus panis</i>	
Lactis	<i>Lactobacillus pantheais</i>	
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	
<i>Lactobacillus durianis</i>	<i>Lactobacillus paracasei ssp.</i>	
	<i>paracasei.</i>	

Tableau 12 : les espèces des *Lactobacills*, (V.Coeuret et al., 2003)

Annexe 7

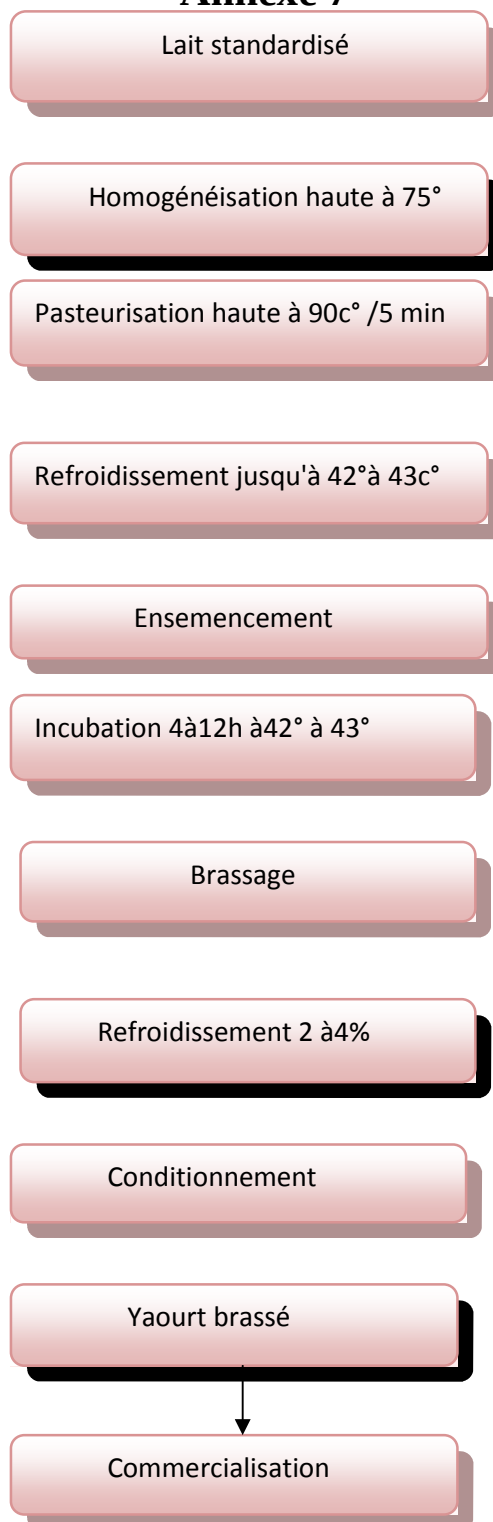


Figure 17: diagramme de fabrication du yaourt brassé dans l'unité de « trèfle »

Annexe 8

Méthode de la coloration de Gram :

1. Technique

Préparer la lame et les échantillons bactériens à examiner

Étalement

L'étalement doit se faire en couche mince et régulière avec une pipette pasteur, sur une lame propre dégraissée.

Dessiccation

Laisser sécher à l'air libre, ou approcher la lame à 15-20cm au-dessus de la flamme du bec bunsen. Le frottis doit devenir terne mais ne doit ni brunir, ni brûler.

Fixation

L'étape de fixation qui suit, consiste à tuer les bactéries, à rendre les membranes plus perméables, à fixer les structures sans les altérer et à faire adhérer le frottis à la lame. Passer trois fois rapidement dans la flamme la face de la lame opposée à l'étalement, sans trop insister sous peine de carboniser le frottis ; sinon tenir la lame avec une pince et écraser trois fois la flamme avec la lame, le frottis est prêt à subir une coloration.

Coloration primaire

Couvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir 2 minutes. Jeter l'excès de colorant.

Mordantage

Egoutter sans rincer et faire deux bains de lugol dont chacun dure 45 secondes.

Décoloration

Egoutter et plonger la lame dans l'alcool 96° durant 30 secondes exactement.

La décoloration trop faible étant des sources d'erreurs.

Arrêter la différenciation par un lavage doux et abondant à l'eau distillée.

Coloration secondaire

Recolorer les germes décolorés par le différenciateur, en faisant agir sur la préparation un colorant de contraste, la fuchsine ou la safranine filtrée pendant 2 minutes.

-Laver à l'eau distillée et sécher la lame au dessus de la flamme.

-Observer à l'objectif à immersion.

-Les bactéries qui ont gardé leur première coloration sont violettes, et sont dites Gram-positives.

-Celles qui ont été décolorées par l'alcool se présentent roses, elles sont appelées Gram-négatives.

A. Les réactifs de la coloration de Gram

- **Le violet phéniqué (coloration primaire)**

Violet de gentiane (crystal violet).....1g
Alcool absolu.....10mL
Eau phéniquée à 1%.....90mL

- **Liquide de lugol (mordant)**

Iode.....1g
Iodure de potassium.....2g
Eau distillée.....300mL

- **Alcool 96° (agent de décoloration)**

- **Solution de fuchsine ou de safranine (coloration de contraste)**

Solution de fushine saturée à l'alcool.....10mL
Eau distillée.....90mL

Annexe 9

		
miel naturel	dattes variété Deglet Nour	Lait de chèvre

Figure des Les échantillons

milieu MRS	milieu VRBL	milieu SABOURAUD
		

Figure des milieux de culture



Introduction



Chapitre I



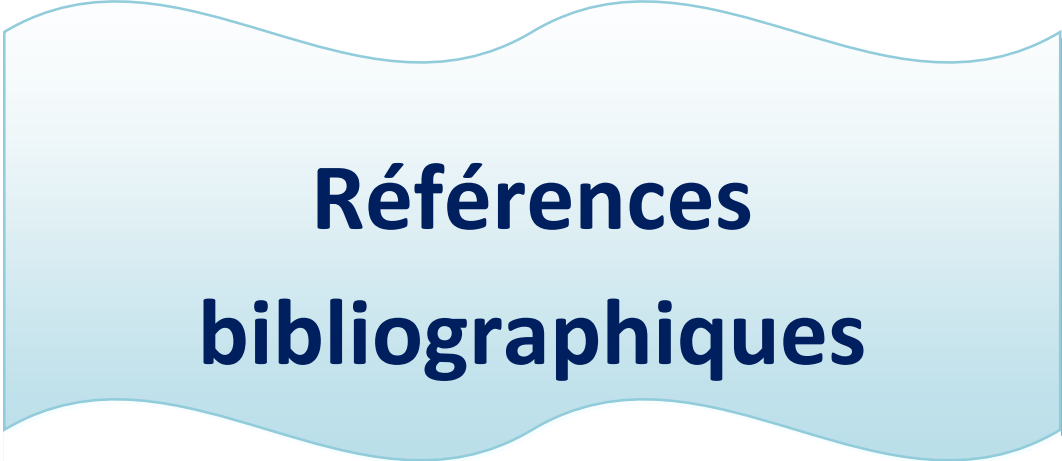
Chapitre II



Chapitre III



Conclusion



Références bibliographiques

Les annexes