

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



Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Microbiologie

Thème

Activité antimicrobienne des Lactobacillus isolées à partir du lait de vache

Soutenu le : 06/07/2022

Présenté par :

M^{lle}. Benhend Siham

M^{lle}. Badjou Imene

Devant le jury :

M^{me} MOHAMED MAHMOUD F.

MCA

USDB

Présidente

M^{me} BENHOUNA I.

MCB

USDB

Examinatrice

M^{me} BOUJEMAA N.

MCA

USDB

Promotrice

Année universitaire :

2021/2022

Remerciement

*Nous tenons tout d'abord à remercier **Dieu** le tout puissant et Miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience pour accomplir ce travail.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué notre promotrice **Mme BOUDJEMA N** qu'a accepté de nos encadrer, nous le remercions infiniment pour son aide, ses orientations, sa patience et sa correction sérieuse de ce travail.*

*Nos sincères remerciements vont aux membres du jury :
Mme MOUHAMED MAHMOUD F. qui a honoré de sa présence ce jury,
en acceptant de le présider ;*

***Mme BENHOUNA I** Examinatrice, de nous avoir accordé le temps et la patience pour évaluer notre travail.*

*Merci à **Mme Zemrak N** et Monsieur **Hafsa M**, qui nous a beaucoup aidé dans la recherche bibliographique.*

Nos remerciements les plus sincères vont également à toute l'équipe du laboratoire d'hygiène de Tipaza.

Enfin, nous remercions tous qui nous ont soutenus de près ou de loin pour réaliser ce travail.



Dédicace

Tout au début, je tiens à remercier le bon Dieu de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :

*Mes très chers parents **Mouhamed** et **Zohra** pour leur amour, leurs encouragements, leur patience et leurs aides continuelles le long de mon parcours d'études.*

*Mes très chers sœurs **Nadjia** et **Bouchra** et chers frères **Abd el halim** et **Sid Ali** à qui je souhaite une vie pleine de bonheur, de santé et de réussites.*

*Toutes ma famille **Benhend** et **Mezidi** petits et grands, cousins et cousines.*

*Ma cher binôme **Imène** et mes amis : **Dalila**, **Amel**, **Malika**, **Djahida** et **fadwa**. et à toute la promotion 2022 de microbiologie à qui je souhaite tout le bonheur et la réussite du monde.*

Siham



Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide d'Allah le tout-puissant.

*À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur que Dieu le garde dans son vaste paradis, Aucune dédicace ne saura exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi, mon cher père **Ahmed**.*

*À la femme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et la source de joie et de bonheur, la flamme de mon cœur, celle qui s'est toujours sacrifiée pour me voir réussir, que Dieu la garde pour moi, ma chère mère **Fadila**.*

*À mes chers frères **islam** et **Abd Nour**.*

*À toute ma grande famille **Badjou et Tidafi** et ma grande mère **Ghania**.*

*Mon fiancé **Abd Rahman** qui m'a soutenu durant toute la durée de réalisation de ce travail.*

*À mon chère binôme **Benhend Siham**. À mes chères amies **Dalila, Sihem, Chiraze et Fadila**.*

Imene



Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

BCPL : Bouillon Lactosé au Bromo Crésol Pourpre.

D° : Degré Dornic.

E: *Escherichia*.

Ech: Echantillon.

EMP: Embden-meyerothoff-parnas.

FBA : Fructose biphosphate aldolase.

GC% : Pourcentage en Guanine et Cytosine.

GRAS: Generally Regarded As Safe.

GN : Gélose Nutritive.

HCL : Acide Chlorhydrique.

LAB: Bactéries lactiques.

MRS: Man Rogosa Sharpe.

NaCl : Chlorure de Sodium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

NSLAB: No starter lactic acid bacteria

pH: Potentiel d'Hydrogène.

Sp : Espèce non précisée.

ZDI : Zone d'inhibition.

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Prélèvement des échantillons du lait de vache de la station expérimentale	19
2	Conservation à courte terme (A), Conservation à longue terme(B)	20
3	Réalisation de l'état frais	22
4	Test de mannitol mobilité	24
5	Ajustement de bouillon MRS a un pH=4 et a un pH=9.6	25
6	Test de l'activité protéolytique des lactobacillus	26
7	Galerie miniaturisé api 20 E	27
8	Standardisation des inoculas	28
9	Mise en évidence du pouvoir antibactérienne par la méthode de spot	29
10	Réalisation de l'effet antibactérien par la méthode des puits	30
11	Cultures des isolats en milieu liquide MRS après 24h d'incubation	31
12	Aspect macroscopique des colonies cultivées sur milieu solide MRS	32
13	Observation microscopique de la souche S2 (GX100) après la coloration de bleu de méthylène, isolées sur milieu MRS	33
14	Observation microscopique des souches de <i>Lactobacillus</i> après la coloration de Gram (Gx100)	33
15	Résultat négatif du test de catalase	35
16	Résultat de test d'oxydase par les disques d'oxydase	35
17	Résultat du Teste de mannitol mobilit	36
18	Résultat de test de type fermentaire des souches de <i>Lactobacillus</i>	36
29	Résultats du test de croissance à différentes températures	37
20	Résultat du test de croissance à différente Ph	38
21	Résultat de thermorésistance.	40
22	Résultat du test d'activité protéolytique	41
23	Résultats des tests de la galerie Api 20 E de la souche S1	42
24	Résultat de l'effet antagoniste des souches de <i>Lactobacillus</i> isolées à partir du Lait de vache vis-à-vis des bactéries pathogènes d'origine alimentaire par les méthodes (A : de disque, B : de spot, C :de puit	44
25	Résultat de l'effet antagoniste des souches de <i>Lactobacillus</i> isolées à partir du Lait de vache vis-à-vis des bactéries pathogènes d'origine alimentaire par la méthode de spot.	46

Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
I	Composition moyenne du lait des différentes espèces animales.	4
II	Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache.	4
III	Caractéristiques organoleptiques du lait.	5
IV	Flore originelle de lait cru.	6
V	Critères différentiels des trois groupes de <i>Lactobacilles</i> .	11
VI	Utilisations commerciales et effets bénéfiques de quelques souches de <i>Lactobacillus</i> probiotique.	13
VII	Les caractères biochimiques de <i>Escherichia coli</i> .	16
VIII	Résultats des tests d'identification des souches <i>Lactobacillus</i> isolées à partir du lait de vache.	17
IX	Les échantillons de lait de vache.	19
X	Caractères macroscopiques des colonies isolées sur le milieu MRS liquide.	31
XI	Caractères macroscopiques des colonies isolées.	32
XII	Résultats de l'étude microscopique.	33
XIII	Résultats des tests d'identification des souches <i>Lactobacillus</i> isolées à partir du lait de vache.	34
XIV	Résultat du test de croissance des lactobacillus isolés du lait de vache à différentes concentrations de NaCl.	39
XV	Résultats de l'activité protéolytique des isolats de <i>Lactobacillus</i> .	40
XVI	Résultats des tests de la galerie Api 20 E.	41
XVII	Observation microscopique des bactéries pathogènes d'origine alimentaire.	43
XVIII	Résultats des diamètres des zones d'inhibitions (ZDI en mm) des souches de <i>Lactobacillus</i> isolées du lait de vache par la méthode de spot.	45
XIX	Résultats des diamètres des zones d'inhibitions (ZDI en mm) des souches de <i>Lactobacillus</i> isolées du lait de vache par la méthode de puits Résultats des diamètres des zones d'inhibitions (ZDI en mm) des souches de <i>Lactobacillus</i> isolées du lait de vache par la méthode de puits.	47

Sommaire

Résumé

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Chapitre I : synthèse bibliographique

Généralité sur le Lait.....	3
Définition du lait.....	3
Importance du lait.....	3
Les composants du lait de différents espèces.....	3
Lait de vache.....	4
Qualité organoleptique du lait de vache.....	4
La microflore du lait.....	6
Les bactéries lactiques.....	7
Découverte des bactéries lactiques.....	7
Définition et caractéristiques.....	7
Habitat.....	8
Classification des bactéries lactiques.....	8
Métabolisme des bactéries lactiques.....	8
Intérêt des bactéries lactiques.....	9
Dans l'industrie alimentaire.....	9
Dans le domaine thérapeutique.....	9
<i>Les lactobacilles</i>.....	10
Caractéristiques générales.....	10
Systematique des <i>Lactobacillus</i>	11
Application des <i>Lactobacillus</i>	11
Utilisation des <i>lactobacilles</i> en industrie laitière.....	11
Effets des <i>lactobacilles</i> sur la santé.....	12
Application des <i>Lactobacillus</i> en tant que probiotiques.....	13
Pouvoir antimicrobiens des <i>Lactobacillus</i>	14

Les acides organiques	14
Le Peroxyde d'hydrogène	14
Le dioxyde de carbone	14
Le Diacétyle	14
La reutérine	15
Les bactériocines	15
Bactéries pathogènes responsables d'altération d'aliments	15
<i>Salmonella</i>	15
<i>Escherichia coli</i>	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
L'intoxication alimentaire	17

Chapitre II : Matériel et méthodes

II. Objectif de travail.....	18
Matériel	18
Matériel biologique.....	18
2. Matériel non biologique	18
Méthodes.....	18
Echantillonnage	18
Isolement des <i>Lactobacillus</i>	19
Purification des souches.....	19
La conservation des souches	19
Pré identification des <i>lactobacilles</i>	21
Critère morphologique	21
Identification biochimique	22
Test de catalase.....	22
Test d'oxydase.....	23
Mannitol mobilité... ..	23
Type fermentaire.....	24

Identification physiologique.....	24
Croissance à différentes températures	24
Croissance à différentes concentrations de NaCl	24
Test de thermorésistante.....	25
Tolérance au pH acide et alcalin	25
Caractéristiques technologiques des isolats	26
Etude de l'activité protéolytique des souches	26
Résistance au téllurite de potassium.....	26
Galerie Miniaturisé (api 20E).....	26
Etude de l'effet antibactérien des <i>Lactobacillus</i>	28
Revivification des souches pathogènes.....	28
Standardisation des inoculas	28
Méthode de spot (méthode de Fleming et al., 1975)	29
Méthode des disques.....	30
Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)	30

Chapitre III : Résultats et discussion

Pré identification des isolats.....	31
Caractères morphologiques	31
Examen macroscopique	31
Examen microscopique	32
Caractéristiques physiologiques et biochimiques.....	34
Test de catalase.....	34
Test oxydase	35
Test de mannitol mobilité	35
Type fermentaire.....	36
Croissance à différente températures.....	37
Croissance à différent pH.....	37
Croissance à différentes concentrations de NaCl.....	38

Thermorésistante	39
Caractéristiques technologiques des isolats	40
Activité protéolytique	40
Résistance au tellurite	41
Etude de la fermentation des sucres.....	41
Observation microscopiques et macroscopique des souches pathogènes.....	42
Activité antibactérienne des <i>Lactobacillus</i>	44
Méthode de spot.....	45
Méthode des disques.....	46
Méthode des puits.....	47

Conclusion	49
-------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Au cours de notre travail, les *Lactobacilles* isolés à partir du lait de vache de la région de Blida et de Tipaza sur milieu Man Rogosa Sharpe (MRS) ont fait l'objet d'une étude sur quelques caractéristiques biochimiques, physiologiques et technologiques avec leur activité antibactérienne vis-à-vis des souches pathogènes responsables d'altération des produits alimentaires.

D'après les résultats obtenus, les trois souches isolées (S1, S2 et S3) sont homofermentaires et immobiles. Nous avons noté que la souche (S1) est thermorésistante par rapport à la S2 et S3 qui sont mésophiles. Ces dernières n'ont aucune activité protéolytique devant la S1 qui a donné une zone claire de 5 mm.

L'étude de l'activité antibactérienne des *Lactobacillus* est réalisée par trois méthodes (méthode de spot, des disques et des puits) vis-à-vis des souches pathogènes (*Escherichia coli*, *Salmonella* et *Pseudomonas aeruginosa*).

Les résultats de l'effet antagoniste ont montré que les trois souches de *Lactobacillus* sont capables d'inhiber la croissance d'*Escherichia coli*, *Salmonella* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des zones d'inhibition variables entre 5 à 23 mm de diamètre par la méthode de spot et puits.

Mots clés : *Lactobacillus*, des souches pathogènes, activité antimicrobienne, une zone d'inhibition.

During our work, *Lactobacilli* isolated from cow's milk from the Blida and Tipaza region on Man Rogosa Sharpe (MRS) medium were the subject of a study on some biochemical, physiological and technological characteristics with their antibacterial activity against pathogenic strains responsible for spoilage of food products.

According to the results obtained, the three isolated strains (S1, S2 and S3) are homofermentative and immobile. We noted that the strain (S1) is heat resistant compared to the S2 and S3 which are mesophilic. The latter have no proteolytic activity in front of the S1 which gave a clear zone of 5 mm.

The study of activity of *lactobacillus* is carried out by three methods (spot method, discs and wells) against pathogenic strains (*Escherichia coli*, *Salmonella* and *Pseudomonas aeruginosa*).

The results of the antagonistic effect showed that the three strains of *lactobacillus* are able to inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Pseudomonas aeruginosa* with variable zones of inhibition between 5 to 23 mm in diameter by the spot method and well.

Keywords: *Lactobacillus*, pathogenic strains, antimicrobial activity, zone of inhibition.

أثناء عملنا، تم عزل العصيات اللبنية من حليب البقر من منطقة البيئة وتبازة على وسط Man Rogosa Sharpe (MRS) وكانت موضوع دراسة حول بعض الخصائص البيوكيميائية والنيزولوجية والتكنولوجيا مع نشاطها المضاد للبكتيريا ضد السلالات المسببة للأمراض المسؤولة عن تلف المنتجات الغذائية. ونقياً
للنتائج التي تم الحصول عليها، فإن السلالات الثلاثة المعزولة (S1 و S2 و S3) هي متجانسة التخمير
وغير متحركة. الحظنا أن السلالة (S1) مقاومة للحرارة بالمقارنة مع السلالة S2 و S3 اللتان تنمضان بالخصائص
الوسطية. هذا الأخير ليس له نشاط تحلل للبروتين أمام S1 مما أعطى منطقة واضحة تبلغ 5 مم. يتم
إجراء دراسة النشاط المضاد للبكتيريا من *Lactobacillus* من خلال ثلاث طرق (تربية البقع والقرص
والأبار) ضد السلالات المسببة للأمراض (*Salmonella*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*).
أظهرت نتائج التأثير المضاد أن السلالات الثلاثة من *Lactobacillus* قادرة على تثبيط نمو *Escherichia*
coli، *Salmonella* و *Pseudomonas aeruginosa* مع نطاقات منغوية من التثبيط بين 5 إلى 23 مم في القطر
بتربية البقع.

الكلمات المفتاحية: *Lactobacillus*، السلالات المسببة للأمراض، النشاط المضاد للميكروبات، منطقة التثبيط.

Introduction

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, il occupe une place stratégique dans l'alimentation quotidienne de l'homme (**Belarbi, 2011**). Ce produit est indispensable à l'équilibre de l'alimentation humaine. Il représente un milieu biologique fortement altérable par voie microbienne en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin de la neutralité et de sa richesse en composants biodégradables. Bien que ces microorganismes soient le principal facteur de dégradation du lait, ils sont historiquement utilisés dans sa transformation et sa conservation (**Huyghebaert, 2006**).

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme inhibiteurs du développement de bactéries pathogènes, ils sont caractérisés par la synthèse de deux types de métabolites antimicrobiennes : les inhibiteurs non spécifiques comme les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène et des inhibiteurs spécifiques tel que les bactériocines. Les bactéries lactiques ayant des rôles différents : dans la préservation des aliments, la prévention d'empoisonnement, l'augmentation de la valeur nutritive et l'amélioration de la qualité organoleptique des aliments et dans la santé. Certaines bactéries lactiques sont largement utilisées comme probiotiques tels que : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* (**Ajao et al., 2021**).

Les *Lactobacilles* sont des microorganismes utilisés 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**). Elles sont naturellement présentes ou ajoutées intentionnellement, pour des raisons technologiques ou pour générer des bénéfices santé chez le consommateur (**Stiles et Holzapfel, 1997**). et jouent un rôle majeur dans leur conservation et contribuent à l'inhibition des germes contaminants (**Guessas, 2006**). Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail dont l'objectif de :

- ✓ Isoler des souches de *Lactobacillus* à partir de lait de vache de la région de Blida et Tipaza.
- ✓ Etude l'activité antibactérienne des *Lactobacillus* vis-à-vis des bactéries pathogènes d'origine alimentaire (*Escherichia coli*, *Salmonella* et *Pseudomonas aeruginosa*).

Introduction

Le mémoire comprend trois parties : la première est relative aux données bibliographiques sur le lait, les bactéries lactiques, les Lactobacilles. 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.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

Généralité sur le Lait**Définition du lait**

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompues d'une femelle laitière bien portante bien nourrie et non surmenée, le lait doit être colostrum» (**Pougheon et Goursaud, 2001**).

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles mammifères après la naissance du jeune. C'est un liquide de composition complexe, blanc et opaque, d'une saveur douce, d'une réaction ionique (pH) voisin de la neutralité. La fonction naturelle du lait est d'être un aliment exclusif des jeunes mammifères pendant la période critique de leur existence, après la naissance, alors que la croissance est rapide et qu'il ne peut lui être substitué d'autres aliments. La grande complexité de la composition du lait répond à cette fonction (**Alais, 1984 ; Amiot et al., 2002**).

Importance du lait

Le lait occupe une place importante dans la ration alimentaire de la population mondiale. En effet, ce produit, irremplaçable pour les nourrissons, est aussi vital pour les autres tranches d'âge, du fait de son apport important en nutriments de base (matière protéique, matière grasse et glucides (lactose)) et sa richesse en éléments minéraux, notamment le calcium et vitamines et caséines. Cette matière alimentaire, source de protéines animales relativement bon marché et ayant une bonne digestibilité connaît une hausse croissante de sa demande, soit en tant que produit commercialisé à l'état de lait frais ou transformé en produits dérivés (fromages, beurre, yaourt, etc.) (**Amellal, 1995**).

Les composants du lait de différents espèces

La composition des différents laits d'animaux varie considérablement d'une espèce à l'autre, mais aussi à l'intérieur d'une même espèce, voire à l'intérieur des types ou des races d'espèces identiques. Cette variabilité peut dépendre de la nutrition, du débit lacté, de l'époque de l'année, du stade de lactation et de l'âge (**Florence, 2010**). Le tableau I donne la composition chimique des différents mammifères.

Tableau I : Composition moyenne du lait des différentes espèces animales
(Vignola, 2002)

Eléments en g/L	Vache	Chèvre	Brebis	Chamelle
Eau	87.5	87.0	81.5	87.6
Matière grasses	3.7	3.8	7.4	5.4
Matières protéiques	3.2	2.9	5.3	3.0
Glucides	4.6	4.4	4.8	3.3
Matières minérales	0.8	0.9	1.0	0.7

Lait de vache

Le lait de vache est le lait produit par la vache dès la naissance de son veau pour le nourrir. Il est très utilisé en alimentation humaine transformé sous forme de fromage, yaourt, etc.

Le lait de vache est un liquide blanc opaque, Il contient un pourcentage élevé d'azote, de calcium et de vitamines fournit un Intérêt alimentaire exceptionnel, les proportions des différents composants du lait de vache varient quelque peu selon les espèces de mammifères font partie de ces espèces par race (Belarbi, 2011).

Le lait de vache possède des propriétés physico-chimiques comme sa majeure composition en eau, son pH plus ou moins neutre, sa densité qui lui confèrent une hétérogénéité dans sa nature biologique (Alais, 1984), Le tableau II présente les principaux paramètres physico-chimiques du lait de vache.

Tableau II : Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache (Alais, 1984)

Constantes	Valeurs
pH (20°C)	6,5 à 6,7
Acidité titrable (°D)	15 à 18
Densité	1,028 à 1,036
Température de congélation (°C)	(-0,51) à (-0,55)
Point d'ébullition (°C)	100,5

Qualité organoleptique du lait de vache

❖ La couleur

Le lait est de couleur blanc mat, qui est due en grande partie à la matière grasse, aux pigments de carotène (la vache transforme le β -carotène en vitamine A) qui passe directement dans le lait (Fredot, 2005).

❖ **L'odeur**

L'odeur caractéristique du lait provient du fait que la matière grasse qu'il contient fixe des odeurs animales. Elles sont liées à l'ambiance de la traite, à l'alimentation, à la conservation (Vierling, 2003).

❖ **La saveur**

- La saveur du lait normal frais est agréable.
- Les laits chauffés (pasteurisés, bouillis ou stérilisés) ont un goût légèrement différent de celui du lait cru.
- Les laits de rétention et de mammites ont une saveur salée plus ou moins accentuée.
- L'alimentation des vaches laitières à l'aide de certaines plantes de fourrages ensilés, etc. Peut transmettre au lait des saveurs anormales en particulier un goût amer.
- La saveur amère peut aussi apparaître dans le lait par suite de la pullulation de certains germes d'origine extra-mammaire (Larpen et al., 1997).

❖ **La Viscosité**

Elle est fonction de l'espèce, on distingue :

- * Un lait visqueux chez les monogastriques (jument, ânesse, carnivores et femme). On parle du lait albumineux.
- * Un lait moins visqueux chez les herbivores (lait de brebis plus visqueux que celui de la vache). Le lait est dit caséineux (Alais, 1984). Le tableau III résume les caractéristiques organoleptiques du lait.

Tableau III : Caractéristiques organoleptiques du lait (Larpen et al., 1997)

	Caractère normal	Caractère anormal
Couleur	Blanc mat Blanc jaunâtre : Lait riche en Crème	Gris jaunâtre : Lait de mammite Bleu, jaune. Lait coloré par des substances chimiques ou des pigments bactériens.
Odeur	Odeur faible	Odeur de putréfaction, de moisi, de rance, etc.
Saveur	Saveur agréable	Saveur salée : Lait de mammite Goût amer : Lait très pollué par des bactéries.
Consistance	Homogène	Grumeleuse : mammite Visqueuse ou coagulée : Pollution Bactérienne

La microflore du lait

On répartit les microorganismes du lait, selon leur importance, en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore contaminants. La flore contaminante est subdivisée en deux sous-classes : la flore d'altération et la flore pathogène (**Plommet, 1987**).

➤ Flore indigène ou originelle

Le lait prélevé chez un animal sain contient peu de micro-organismes, sont des bactéries saprophytes des canaux galactophores. Le lait est protégé pour 1 heure par une substance inhibitrice l'actinine (**Guiraud, 1998**).

Il s'agit essentiellement des germes saprophytes de pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques, *Lactobacilles* (**tableau IV**). Des germes pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire peuvent être présents lorsque le lait est issu d'un animal malade (*Streptococcus pyogène, Corynebacterium pyogenes, des Staphylococcus*) qui sont des agents des mammites et peut exceptionnellement *Listeria monocytogenes, Mycobacterium, Bacillus anthracis* et quelques virus (**Guiraud, 2003**).

Tableau IV : Flore originelle de lait cru (Michel et al., 2002)

Microorganismes	Pourcentage%
<i>Lactobacillus</i>	10-30
Gram négatif	<10
<i>Micrococcus sp</i>	30-90
<i>Streptococcus</i>	<10

➤ Flore contaminant

C'est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait. Elle peut se composer de :

• Flore pathogène

Les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella sp, Staphylococcus aureus, Brucella sp, Bacterium tuberculosis, Clostridium botulinum et Clostridium perfringens, Escherichia coli, Shigella sonei, Mycobacterium tuberculosis, Bacillus cereus, Yersinia enterocolitica, Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni, Brucella abortis*. Certaines moisissures peuvent être associées à ces dernières (**Lambin et German, 1961**).

La présence de microorganismes pathogènes dans le lait peut avoir trois sources : l'animal, l'environnement et l'homme (**Andelot, 1983**).

- **Flore d'altération**

Incluse dans la flore contaminante, la flore d'altération causera des défauts sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture et réduira la vie de tablette du produit laitier. Parfois, certains microorganismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes, l'un n'exclut pas l'autre. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont : *Psuedomonas sp*, *Proteus sp*, les coliformes (les genres *Escherichia* et *Enterobacter*), les sporulées telles que *Bacillus sp* et *Clostridium sp* et certaines levures et moisissures (Andelot, 1983).

Les bactéries lactiques

Découverte des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très anciennes et sont apparues avant les cyanobactéries, il y environ 3 milliards d'années. La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis* obtenue par Lister en 1873. Les bactéries lactiques ont été isolées pour la première fois à partir du lait (Metchnikoff, 1908 ; Sandine et al., 1972 ; Carr et al., 2002). Ces bactéries jouent un rôle essentiel dans la conservation des aliments ce qui a entraîné un intérêt scientifique de leur étude au cours des quelques dernières décennies alors que le concept de bactéries lactiques (LAB) a été mis au point au début des années 1900. (Fennema et al., 2004).

Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (De-Roissart, 1986) et non pathogène, elles forment un groupe hétérogène composé de coques (genre *Streptococcus*, *Lactococcus*) et de bacilles (genre *Lactobacillus*). Dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (Badis et al., 2005).

Les bactéries lactiques regroupent les bactéries à coloration de Gram positif. Généralement, immobiles non sporulées et micro-aérophiles. Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase.

Ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994 ; Ho-thi, 2009). Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme fermentaire.

Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. Elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Les bactéries colonisent des milieux naturels variés tel que la surface des végétaux et les muqueuses des mammifères (intestin, bouches, vagin et surface de la peau) (**Badis et al., 2005**).

Classification des bactéries lactiques

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques (BL) sont classées dans le Phylum des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres (*Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weisella*) (**Pot, 2008**), répartis sur six familles. Les BL appartiennent toutes au groupe des bactéries à Gram positif, mais si la plupart d'entre elles appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif à bas %G+C (**Holzappel et al., 2001**).

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur le mode de fermentation de glucose, la morphologie, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6.5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol, l'hydrolyse de l'arginine, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose, la formation d'acétone, etc. Les marqueurs chimio taxonomique comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (**Konig et Frohlich, 2009**).

Métabolisme des bactéries lactiques

a. Voie Homofermentaire

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pédiocoques, ainsi que certains *lactobacilles*. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**).

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaires et indispensable au fonctionnement de la voie Embden-Meyerhoff- Parnas (EMP).

b. Voie Hétérofermentaire

Doit sa dénomination au fait qu'en dehors du lactate, elle aboutit à la formation d'éthanol, du CO₂ et éventuellement d'acétate. Les bactéries lactiques hétérofermentaires ne contiennent pas de FDP aldolase ni de triose-phosphate isomérase (**Djidel, 2007**). Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains *Lactobacilles* (**Thompson et Gentry- Weks, 1994**).

Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

✓ Dans l'industrie alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bio-conservation des différents aliments (grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent). Elles sont aussi utilisées pour la production des laits fermentés, yaourt et des fromages et d'autres produits alimentaires (produits carnés, végétaux, etc.) (**Yateem et al., 2008**). Les viandes, les poissons, le vin, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques.

Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères :

- Absence de pathogénicité ou activité toxique.
- Capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques.
- Capacité de dominance.
- Facilité de culture et de conservation.
- Maintenance des propriétés désirables durant le stockage.

✓ Dans le domaine thérapeutique

Selon **Salminen et al. (2004)**, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale.

- Jouent également un rôle important dans la maturation du système immunitaire.
- Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires grâce à leur activité protéolytique.
- Certaines souches sont utilisées sous forme des suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les

Femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie (Yateem et al., 2008).

- D'autres effets comme la prévention des gastro-entérites nosocomiales chez le nourrisson, des propriétés anti cancérogènes, anti hyper cholestérolémiques.

Les lactobacilles

Caractéristiques générales

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les *lactobacilles* se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt et al., 2000). Cette différence pourrait s'expliquer par un pH optimal plus faible pour l'enzyme chargée de réguler le pH intracellulaire (translocation de protons par une ATPase) chez les *lactobacilles* (Nannen et al., 1991). Le métabolisme des sucres chez *Lactobacillus* est hétéro- ou homofermentaire.

Les Lactobacilles, de par leur variété, sont présents dans des milieux très différents (Novel, 1993) : cavité buccale, tractus digestif, organes génitaux chez l'homme, produits végétaux, lait et produits laitiers (différents types de fromages), produits carnés, poissons marinés ou fumés. Les *Lactobacillus* sont subdivisés par leur type fermentaire par Orla-Jensen en trois groupes (Tableau V) (Hammes et Vogel, 2012 ; Belhamra, 2017) :

- ✓ **Le groupe *Thermobacterium*** : comprend les *Lactobacilles* homofermentaires stricts, thermophiles qui se développent à 45°C et non à 15°C. Fermentent le glucose et le gluconate sans production de CO₂. Les espèces les plus fréquentes sont *Lactobacillus helveticus*, *L.jugurti*, *L.bulgaricus*, *L.lactis*, *L.acidophilus*, *L.leichamni*, *L.delbrueckii*, *L.kifirofaciens*, *L.mali*.
- ✓ **Le groupe *Streptobacterium*** : regroupe les *Lactobacilles* homofermentaires mais qui peuvent être hétérofermentaires facultatives en fonction du substrat, mésophiles qui se développent à 15°C, le CO₂ est dégagé lors de la fermentation de gluconate et non produit lors de la fermentation du glucose. Il comporte les espèces *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. sakei*, *L. acetotolerans*, *L. graminis*, *L. rhamnosus*...etc.
- ✓ **Le groupe *Betabacterium*** : comprend les *Lactobacilles* hétérofermentaires stricts qui sont *Lactobacillus fermentum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. viridiscens*, *L. kefir*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. sanfrancisco*.

Tableau V : Critères différentiels des trois groupes de *Lactobacilles* (Sharpe, 1981 ; Kandler et Weiss, 1986)

Caractéristiques	Group I, homofermentaires Stricts	Group II, hétérofermentaires Facultatifs	Group III, hétérofermentaires Stricts
Fermentation des pentoses	-	+	-
CO ₂ à partir du glucose	-	-	+
CO ₂ à partir du gluconate	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphokétolase	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. Casei</i> <i>Lb. Curvatus</i> <i>Lb. Plantarum</i> <i>Lb. Sakei</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. Reuteri</i>

FDP : Fructose 1-6 diphosphate aldolase

Systématique des *Lactobacillus* (De vos et al., 2009)

Phylum : *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Lactobacillales*

Famille : *Lactobacillaceae*

Genre : *Lactobacillus*

Application des *Lactobacillus*

Utilisation des *lactobacilles* en industrie laitière

Parmi le genre *Lactobacillus*, la sous espèce *bulgaricus*, indispensable à la préparation du yaourt est la plus utilisée en industrie laitière (Codex Alimentarius, 2003).

La proportion de yaourts est supérieure à celle des fromages. En fromagerie, les *lactobacilles* sont généralement utilisés pour la préparation de pâtes dures ou semi dures typiques des fromages suisse et italien. Jusque dans les années 80, quelques espèces de *Lactobacillus* étaient considérées comme des contaminants (ou NSLAB : No starter lactic acid bacteria) Dans les années 1990, plusieurs auteurs ont démontré que ces espèces participaient

à l'affinage des fromages par leur activité protéolytique, et la formation d'arômes qui en résulte (**Lane et al., 1996**).

Cependant, l'arrivée des techniques de traitement du lait de fromagerie, telle que la pasteurisation basse température couplée à la microfiltration, a contribué à une diminution significative dans le lait de ces NSLAB. Cette constatation a incité les producteurs de ferments fromagers à développer et commercialiser de nouvelles cultures, dites auxiliaires, contenant des souches de *Lactobacillus* capables d'accentuer et d'accélérer l'affinage des fromages (**El Soda et al., 2000**).

Les mécanismes enzymatiques impliqués dans l'activité protéolytique des *lactobacilles* sont moins documentés que ceux de *Lactococcus lactis* sp. Toutefois, les voies métaboliques empruntées par ces deux genres bactériens semblent relativement proches (**Pritchard et al., 1993**). La protéolyse est cependant plus prononcée pour les *lactobacilles* (**Marilley et al., 2004**). Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées sur le caractère probiotique des souches de bactéries lactiques.

Différentes raisons peuvent expliquer ce choix pour le consommateur (**Heller, 2001**) :

- Les produits laitiers fermentés sont perçus comme bénéfiques pour la santé.
- Les consommateurs sont habitués au fait que les produits fermentés contiennent des microorganismes vivants.
- Les probiotiques utilisés comme agent de fermentation combinent les images positives probiotique et fermentation.
- L'image bénéfique pour la santé des produits de type yaourt facilite la recommandation d'une consommation quotidienne. D'un point de vue technologique, les procédés utilisés pour la préparation des produits laitiers fermentés sont déjà optimisés pour permettre la croissance des microorganismes nécessaires à la fermentation. Par conséquent, la technologie existante ne nécessite pas de changements majeurs afin de garantir la survie des probiotiques dans le produit.

Effets des *lactobacilles* sur la santé

Depuis Metchnikoff et ses théories sur l'effet bénéfique des ferments lactiques, l'effet probiotique de certains *lactobacilles* a été et est encore largement étudié (**Isolauri et al., 2004**). Un des effets majeurs des *lactobacilles* sur la santé humaine décrits dans la littérature est leur rôle antagoniste vis à vis des bactéries pathogènes (**Servin, 2004**). Les effets des *lactobacilles* sur les bactéries pathogènes reposent sur différentes propriétés telles que la capacité à

adhérer aux cellules et d'inhiber ainsi l'adhésion des pathogènes, l'inhibition de la croissance des pathogènes, la capacité d'entrer en compétition avec les pathogènes pour les ressources nutritives et la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Reid et Burton, 2002). Aujourd'hui, le débat reste encore ouvert sur l'innocuité des probiotiques, qui pourraient être des opportunistes notamment chez les patients immunodéprimés (Cannon et al., 2005).

Application des *Lactobacillus* en tant que probiotiques

Différents effets positifs sont ainsi attribués aux probiotiques. Cependant, des études doivent encore être réalisées afin de confirmer certains bienfaits. Ces effets sont décrits dans le **tableau VI** et expliqués ci-dessous.

Il est à noter que la validité scientifique de ces effets bénéfiques est très variable. Pour certains effets, des preuves scientifiques irréfutables appuyées par des études cliniques existent et permettent d'attribuer certaines allégations-santé aux produits probiotiques (Moroni, 2007).

Tableau VI : Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés) (Moroni, 2007)

Evidences scientifiques fortes	
Effets des probiotiques	Mécanismes des probiotiques
Aide à la digestion du lactose	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Action de la β- galactosidase bactérienne
Réduction du risque des diarrhées	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activité antipathogène ▪ Stimulation du système immunitaire
Diminution des allergies alimentaires	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Amélioration de la fonction barrière de la muqueuse ▪ Stimulation du système immunitaire ▪ Dégradation des protéines allergènes
Evidences scientifiques prometteuses	
Effets des probiotiques	Mécanismes des probiotiques
Activité hypocholestérolémiante	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Assimilation du cholestérol ▪ Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du côlon	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Production de composés antimutagéniques ▪ Modulation des enzymes fécales carcinogéniques ▪ Stimulation du système immunitaire
Résistance contre les maladies Inflammatoires et irritables des intestins	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activité antipathogène ▪ Stimulation du système immunitaire
Diminution des infections à <i>Helicobacterpyroli</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Activité antipathogène
Effet antihypertenseur	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Action des peptidases sur les protéines du lait donnant des peptides bioactifs

Pouvoir antimicrobiens des *Lactobacillus*

Les acides organiques

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation. Les principaux acides produits sont : l'acide lactique, l'acide acétique et propionique. Ces derniers permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide. L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules (Zhitnitsky et al., 2017).

Le Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) présente un effet antimicrobien qui peut être expliqué par la production de radicaux libres tels que le groupement superoxyde ($O_2\bullet$) et le groupement hydroxyle ($OH\bullet$) capables d'endommager l'ADN bactérien.

Le pouvoir inhibiteur du peroxyde d'hydrogène pourrait être dû à des réactions d'oxydation des groupes sulfhydriles provoquant une modification de la conformation des protéines et donc la perte de fonction des enzymes. De plus, il peut engendrer la peroxydation des lipides membranaires, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane du microorganisme cible (Nair et al., 2017).

Le dioxyde de carbone

Le CO_2 peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobie, qui empêche les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO_2 dans le milieu peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité. Toutefois, le dioxyde de carbone peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries (Singh, 2018).

Le Diacétyl

Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est un produit du métabolisme de citrate qui est responsable de l'arôme "beurre" de produits laitiers et qui inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine. Il est rarement présent dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante (Heita, 2014)

La reutérine

La reutérine est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus*. La reutérine s'accumule alors dans le microorganisme producteur. À haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* sont plus résistantes (**Langa et al., 2014**).

Les bactériocines

La détection de la première bactériocine remonte à **1925** par **Andre Gratia** qui a observé que la croissance de certaines souches d'*Escherichia coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien, dont il a donné le nom de colicin V.

La définition qui reste la plus largement acceptée est celle de **Klaenhammer (1988)** qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action.

Bactéries pathogènes responsables d'altération d'aliments

Salmonella

Les *salmonelles* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* est un groupe de bactérie à Gram négative, non sporulant (**Shveta Sethi et al., 2017**) en forme de bacille (**Korsak, 2004**). Généralement de 2 à 5 microns de long et de 0,5 à 1,5 micron de large ; mobile avec des flagelles en position péritriche à l'exception de sérovars aviaires : *S. Gallinarum* et *S. Pullorum*, qui sont immobiles (**Andino et Hanning, 2015**).

Les *salmonelles* sont des bactéries du tube digestif des vertébrés. Elles sont essentiellement répandues dans le milieu extérieur à partir des excréta (**Rodriguez-Rivera et al., 2014**). Elles peuvent survivre plusieurs mois dans l'environnement (Sol-Eau- Végétaux) ; lorsque les conditions du milieu sont favorables (température et humidité) (**Danyluk et al., 2008**).

Escherichia coli

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. *Escherichia* sont des bactéries bacilles à Gram négatifs, aérobie-anaérobies facultatifs, mobile, parfois immobile, avec une structure flagellaire péritriches et non-sporulée. *E. coli* est une bactérie non exigeante avec une température optimale de croissance de 37°C (Lobry, 1991). Le Tableau VII résume quelques caractères biochimiques d'*Escherichia coli*.

Tableau VII : Les caractères biochimiques de *Escherichia coli* (King et al., 2014)

Tests	Résultats
Catalase	+
Oxydase	-
Uréase	-
Indole	+
Citrate de Simmons	-
Hydrogène sulfuré	-

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa appartient à famille des *Pseudomonadaceae* (Moore et al., 2006). Est une bactérie à coloration de Gram négative, dépourvue de capsule, bâtonnets, aérobie stricte. Habituellement chimioorganohétérotrophes, très variés dans leur nutrition. Croissent souvent sur sels inorganiques, additionnés d'une source de carbone organique, certaines souches sont chimio lithoautotrophes, Catalase-positifs, oxydase-positifs. Se trouvent dans le sol, les eaux et comme agents pathogènes chez l'homme, animaux et les plantes. Les cultures de *P. aeruginosa* dégagent une odeur caractéristique, et produisent le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine (Christiane, 2013).

Le Tableau VIII représente le pouvoir pathogène des bactéries d'origine alimentaire (*Salmonella*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

Tableau VIII : Pouvoir pathogène des bactéries pathogènes d'origine alimentaire

Souches Pathogènes	Les maladies
<i>Salmonella</i>	<p>-La salmonellose (gastro-entérite à <i>Salmonella</i>) est causée par plus de 2000 sérovars de <i>Salmonella</i>, provoquant des symptômes fréquents, dont les douleurs abdominales, diarrhées, qui durent de quelques jours à quelques semaines. La salmonellose la plus fréquente est due à <i>Salmonella Typhimurium</i>. (Prescott et al., 2003).</p> <p>-Elle est rencontrée dans tous les pays elle est isolée chez l'homme, les animaux et dans l'environnement, elle occupe la première place dans l'étiologie des toxi-infections alimentaires (Avril et al., 1992).</p>
<i>Escherichia coli</i>	<p><i>E. coli</i> est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires, elle peut provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales, initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, elle a acquis une résistance fréquente, surtout en milieu hospitalier (Nauciel et Vildé, 2005).</p>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<p><i>P. aeruginosa</i> est un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les personnes immunodéprimées et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.</p>

L'intoxication alimentaire

Les toxi-infections alimentaires (TIA) sont des infections causées par l'ingestion d'aliments ou de boissons contaminés par certains agents infectieux ou par leurs toxines. Les bactéries responsables de TIA ont la capacité de fabriquer des toxines et de les libérer dans l'aliment permettant le développement microbien (Lagrange, 2012). Il peut arriver, très rarement, que les toxines provenant de produits chimiques ou de pesticides causent une intoxication alimentaire (Schlundt et al., 2010).

Chapitre II

Matériel et méthodes

II. Objectif de travail

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène Tipaza et du laboratoire de microbiologie au niveau de la station expérimentale au sein de l'université Saad Dahleb Blida 1, sur une durée de 3 mois (mars à mai).

L'objectif de ce travail repose sur :

- Isoler les bactéries lactiques (*Lactobacillus*) à partir de lait de vache.
- Étude de l'effet antagoniste des *Lactobacillus* vis-à-vis des souches pathogènes responsables d'altération des produits alimentaires.

Matériel**Matériel biologique**

Au cours de notre étude, le matériel biologique utilisé est composé de :

- Lait de vache de la région de Blida et Tipaza.
- Souches pathogènes d'origine alimentaire déjà isolées et identifiées par laboratoire d'hygiène de Tipaza (*Escherichia coli*, *Salmonella* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC : les souches de références).

2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique (l'appareillage, la verrerie, composition des milieux de culture, réactifs) utilisé dans cette étude est décrit en **Annexe III**.

Méthodes**Echantillonnage**

L'échantillon de lait a été aseptiquement prélevé à partir d'une vache de la station expérimentale de la faculté de SNV (université de Blida) et Tipaza (**Tableau IX, Figure 1**). Nous avons réalisé trois prélèvements du lait de vache en respectant les conditions suivantes :

- Un nettoyage préalable de l'extérieur de la mamelle à l'aide d'un linge préalablement trempé dans une solution désinfectante, la mamelle doit ensuite être séchée.
- Se laver soigneusement et se sécher les mains avant la traite.
- Les premiers jets de lait sont éliminés (plus chargés en germes).
- Les échantillons sont recueillis dans des flacons stériles de 250 ml et acheminés dans une glacière (4 °C) au laboratoire.

Tableau IX : Des échantillons du lait de vache

Les échantillons	Source	Origine
Ech1	Lait de vache	Station expérimentale Blida
Ech2	Lait de vache	Tipaza
Ech3	Lait de vache	Tipaza



Figure 1 : Prélèvements des échantillons du lait de vache de la station expérimentale Blida

Isolement des *Lactobacillus*

Pour l'isolement des *Lactobacillus*, nous avons préparé une solution mère, en mélangeant un volume de 25ml de l'échantillon de produit laitier avec 225ml de l'eau physiologique à l'aide d'une seringue stérile.

Les ensemencements sont réalisés sur milieu MRS gélifié en masse. Par la suite incubées en anaérobiose (versé la deuxième couche du milieu MRS pour réaliser la condition anaérobiose) à 37°C pendant 72h.

Purification des souches

La purification consiste, à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, pour les lactobacilles avec une incubation à 37°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur, renseignant sur la pureté des souches (**Karam et Karam, 1994 ; Larpent et al., 1997 ; Idoui et al., 2009**).

La conservation des souches

Nous avons appliqué les deux méthodes de conservation citée par (**Badis et al., 2005 ; Brahimi, 2015**).

- **La conservation à court terme** : des souches pures est effectuée sur bouillon MRS après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à +4°C et le renouvellement des souches se fait toutes les 4 semaines. (**Figure 2.A**).
- **La conservation à long terme** : à partir des cultures de *lactobacillus* de 18 h sur le bouillon MRS, nous avons pris 70% de bouillon MRS dans d'éppendorfs et ajouté 25% de glycérol stérile. Le tout est congelé à -20 °C (**Figure 2.B**).

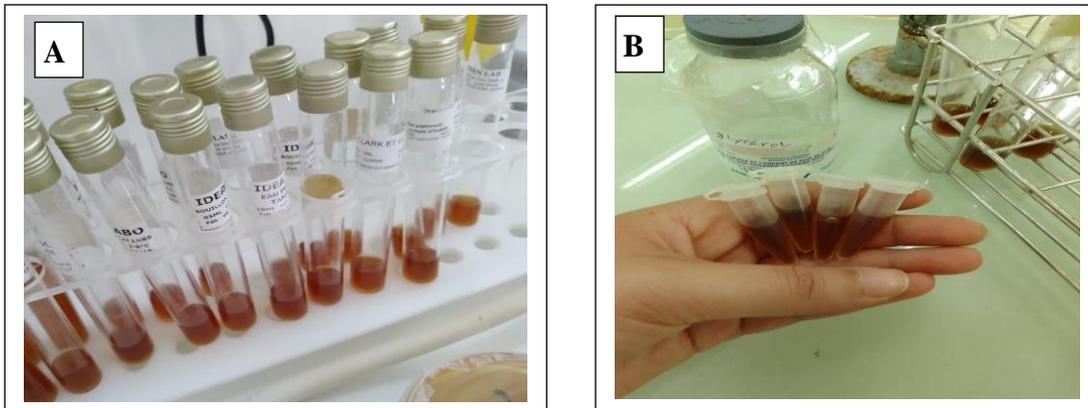


Figure 2 : Conservation à courte terme (A), Conservation à longue terme(B)

Pré identification des *lactobacilles*

Critère morphologique

- ❖ **Examen macroscopique** : Consiste à étudier la forme, l'aspect, le contour, la surface, la couleur des colonies sur le milieu MRS (**Joffin et Leyral, 2006**).
- ❖ **Etude microscopique** : L'observation microscopique au grossissement (Gx100) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 2006**).

A. Coloration de Gram

▪ Principe

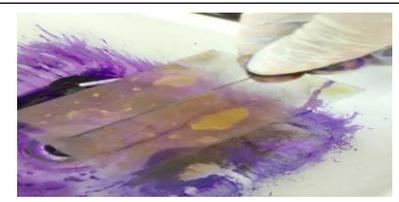
La coloration de Gram est la plus utilisée en histologie pour étudier la classification des bactéries. Le processus permet de séparer la plupart des bactéries en 2 groupes par rapport à la proportion de peptidoglycane contenue dans les membranes (**Tortora et al., 2003**).

▪ **Technique**

Préparation du Frottis

- À partir de la suspension bactérienne, prendre une goutte et l'étaler sur une lame par des mouvements circulaires du centre à la périphérie,
- Laisser sécher à température du laboratoire où à 37C°.
- Fixer à la chaleur 03 fois (**Joffin et Leyral, 2006**).

Réalisation de la coloration

<p>Coloration primaire</p>	<p>Coloration par le violet de gentiane. Laisser agir 1 minute. Rincer brièvement à l'eau du robinet.</p>	
<p>Mordantage au Lugol</p>	<p>Recouvrir la lame par le Lugol et laisser agir 60 secondes puis rincer brièvement à l'eau du robinet.</p>	
<p>Décoloration rapide à l'alcool</p>	<p>Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis, puis stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau du robinet.</p>	
<p>Contre-coloration à la fuchsine.</p>	<p>Laisser agir 1 minute. Laver doucement à l'eau du robinet. Puis Sécher la lame entre deux feuilles des papiers filtres.</p>	

▪ **Lecture**

L'observation se fait au microscope optique avec une goutte d'huile à immersion sur le frottis à l'objectif X 100 (**Larpent et Larpent G, 1997**)

- Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet.
- Les bactéries à Gram négatif apparaissent en rose.

B. Etat frais

Une goutte de la suspension bactérienne est mise entre lame et lamelle après additionné du Bleu de méthylène (et de l'huile de vaseline) est observée au microscope optique au Grossissement X100 pour observer et confirmer la forme et leur mode de regroupement de chaque souche utilisée (**Figure 3**).

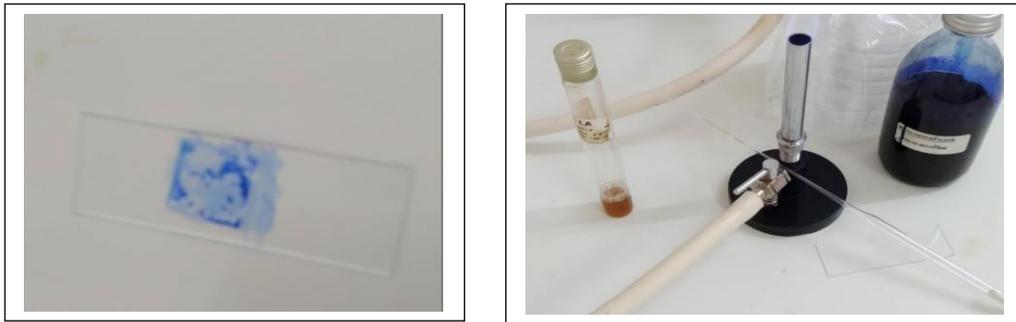


Figure 3 : Réalisation de l'état frais

Identification biochimique**Test de catalase****▪ Principe**

C'est une enzyme de la chaîne respiratoire qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. (Kandler et Weiss, 1986 ; Sharpe, 1979).

**▪ Technique**

- ✓ Déposer sur une lame propre une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes
- ✓ Prélever un petit fragment de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur scellée et dissocier dans l'eau oxygénée

▪ Lecture

La présence de catalase se manifeste par le dégagement de bulles gazeuses.

Test d'oxydase

▪ Principe

L'oxydase est une enzyme du cytochrome qui intervient dans les divers couples d'oxydoréduction et qui assure la fixation de l'oxygène moléculaire sur le cytochrome réduit (Marshal et al., 1987).

▪ Technique

A l'aide de la pipette Pasteur, prélever un fragment de la colonie et le déposer sur une plaque imprégnée d'oxalate de diméthyle-paraphénylène diamine.

▪ Lecture

- ✓ L'apparition d'une coloration violacée en présence d'oxygène et en quelques secondes montre que la souche est oxydase (+)
- ✓ Pas de coloration : oxydase (-)

Mannitol mobilité

▪ Principe

Le milieu mannitol mobilité permet d'étudier la mobilité des germes, et la recherche de la fermentation du mannitol (Le-Minor, 1993).

La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit à la formation de fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes (la couleur du milieu devient jaune).

- Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle : étude de la mobilité.
- Les nitrates du milieu peuvent être réduits en nitrites puis en N₂ : test nitrate réductase.

▪ Technique

A l'aide d'une pipette pasteur, ensemercer le milieu par pique centrale avec la souche à étudier puis incubé à 37°C pendant 24h (figure 4).

▪ Lecture

- ✓ Virage de la couleur du milieu vers le jaune indique la dégradation du mannitol.
- ✓ Diffusion des germes autour de la pique en tourbillonnant indique la mobilité.



Figure 4 : Test de mannitol mobilité

II.2.6.4 Type fermentaire

▪ Principe

Ce test permet de différencier entre les bactéries lactiques homofermentaires et hétérofermentaires (production du gaz CO₂) (Copolla et al., 1997). Certaines espèces sont homofermentaires (homolactiques) ne produisant que l'acide lactique, d'autres hétérofermentaires (hétérolactiques) produisant de l'acide acétique, de l'acétaldéhyde, de l'éthanol et du dioxyde de carbone (CO₂) à côté de l'acide lactique (Devos et al., 2009).

▪ Technique

Les souches ont étéensemencées dans des tubes contenant chacune 10 ml du bouillon lactosé au Bromo Crésol Pourpre (BCPL) et une cloche de Durham. Après incubation à 37°C pendant 24h à 48h, le CO₂ produit par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans les cloches de Durham (Copolla et al., 1997).

Identification physiologique

Croissance à différentes températures

Ce test est important pour distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation de bouillon MRS par les souches de lactobacillus, ensuite les tubes sont incubés pendant 24-48 h aux températures : 4 °C, 37 °C et 44°C. la croissance est appréciée par l'apparition de trouble (Badis et al., 2005).

Croissance à différentes concentrations de NaCl

Quatre tubes stériles contenant 5 ml de bouillon MRS à 2%, 4%, 6,5% de Na Cl ont étéensemencés par une colonie de lactobacillus et incubés à 37 pendant 48h. La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble (Badis et al., 2005).

Test de thermorésistance

Les souches à tester sont préalablement réparties dans des tubes de milieu MRS. Ces tubes sont par la suite exposés à une température de 63,5°C pendant 30 min (dans un bain marie), après refroidissement brusque, les tubes sont incubés à 37°C pendant 48h (Samelis et al., 1994).

I.2.7.4. Tolérance au pH acide et alcalin

La croissance des souches a été testée à différents pH (4 et 9,6) pour les *Lactobacilles*. Lacroissance se manifeste par un trouble en milieu liquide MRS (Guiraud, 1998).

Pour diminuer le pH à 4, nous avons ajouté quelques gouttes de HCl. Une autre quantité du bouillon MRS est ajustée après à 9,6 en ajoutant du NaOH (Guiraud, 2003) (figure 5).

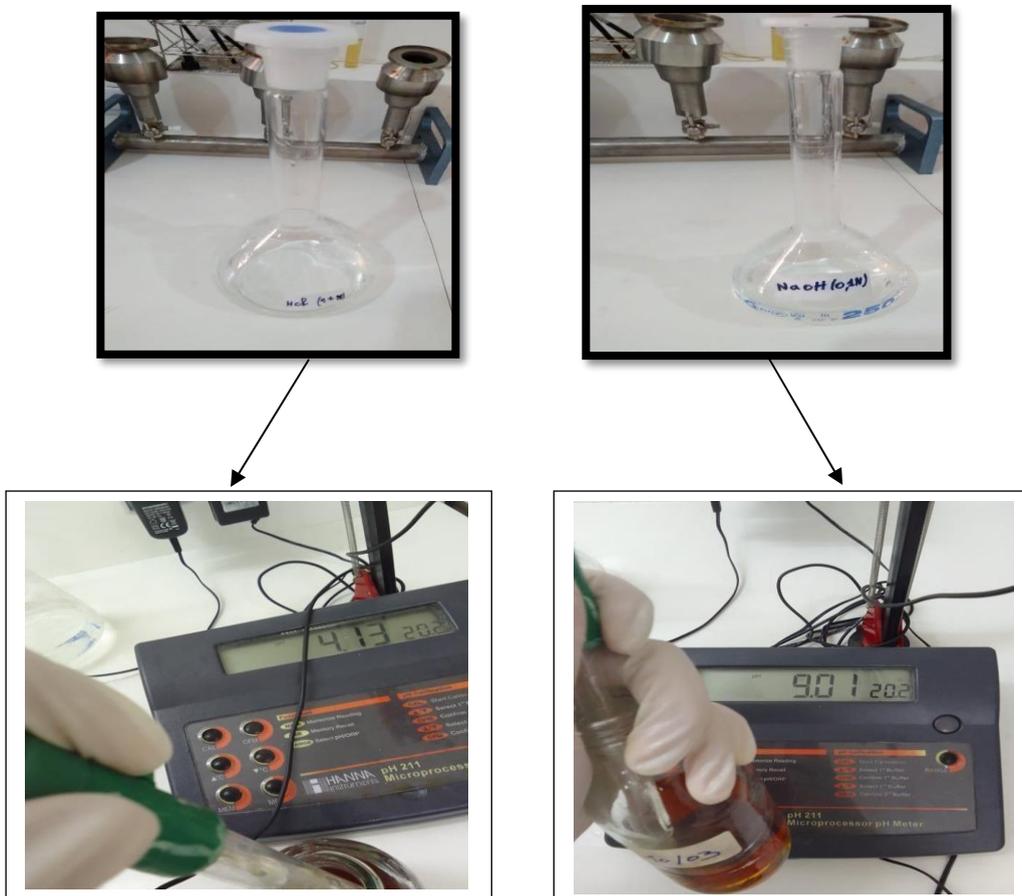


Figure 5 : Ajustement de bouillon MRS a un pH=4 et a un pH=9.6

Caractéristiques technologiques des isolats

Etude de l'activité protéolytique des souches

L'activité protéolytique des souches isolées a été découverte sur milieu MRS contenant 10%(m/v) de lait semi écrémé en utilisant la méthode de spots. Un volume de 20µl d'une culture fraîche de chaque souche a été déposé en spots puis les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48h. La protéolyse se manifeste par une zone claire autour des spots (Boulouf, 2016) (figure 6).

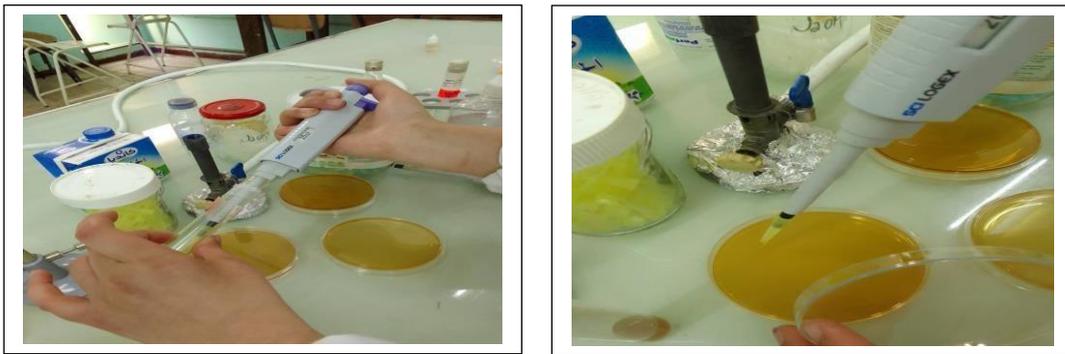


Figure 6 B: Test de l'activité protéolytique des *lactobacillus*

Résistance au téllurite de potassium

La tolérance au téllurite a été recherchée par ensemencement, en stries très serrées, sur une gélose MRS à 0.5% de téllurite de potassium par les souches de *Lactobacillus* (Figure 2, annexe II). Après une période de 24h d'incubation à 37°C, les souches résistantes donnent des colonies noires (Guiraud et al., 2003).

Galerie Miniaturisé (api 20E)

C'est une Galerie de 20 micros tubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques destinés bien que ce type de galerie recommandé pour l'identification des *Enterobacteriaceae*, elle a été employée pour profiter de certains tests biochimiques. (Figure 7).

▪ Principe

- La fermentation des carbohydrates : glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, melibiose, B amylase et arabinose.
- La décarboxylation des acides aminés : lysine, ornithine et arginine.
- La production d'H₂S, l'hydrolyse de l'urée, la formation d'indole, la production d'acétone (VP), l'hydrolyse de la gélatine et l'hydrolyse de l'ONPG.

▪ **Technique**

- ✓ **Préparation de la galerie :** Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et remplir les alvéoles avec de l'eau distillée pour créer une atmosphère humide, ensuite déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- ✓ **Préparation de l'inoculum :** Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé et la mettre dans un tube d'eau distillée stérile pour réaliser une suspension bactérienne de 0,5 Mc Farland.
- ✓ **Inoculation de la galerie :** Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) (Debabza, 2015).

Pour les tests **CIT, VP, GEL** remplir tube et cupule.

- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules).
- Pour les tests : **ADH, LDC, ODC, H2S, URE** créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de vaseline.
- Refermer la boîte d'inoculation et l'incuber à 37°C pendant 24h.

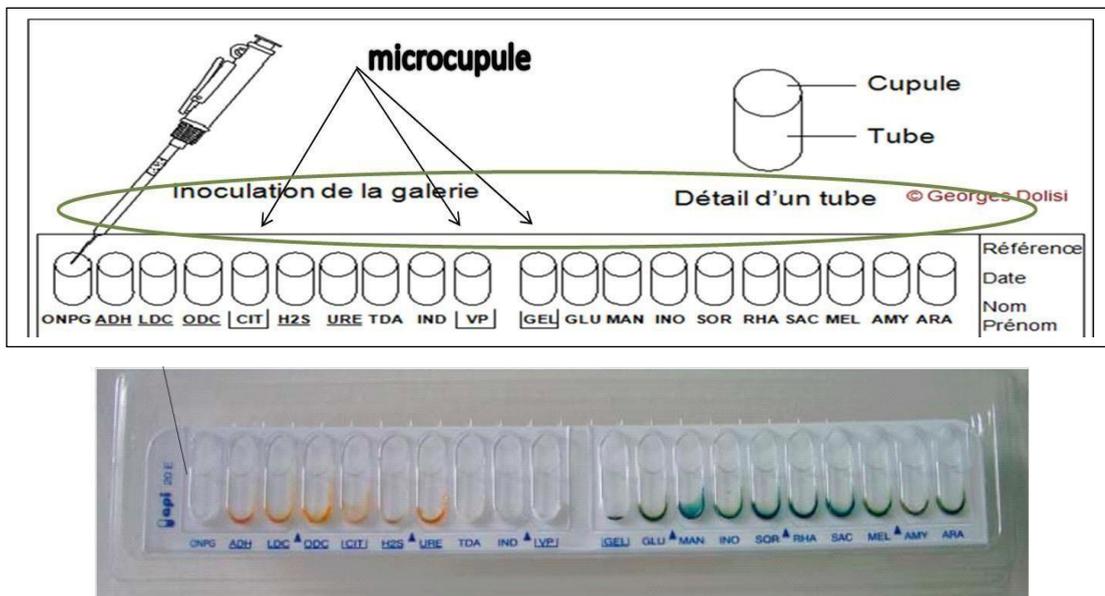


Figure 7 : galerie miniaturisé api 20 E

▪ **Lecture**

Après l'incubation pendant 24h à 37°C, nous rajoutons les différents réactifs pour la lecture :

- Le réactif de Kovacs pour la recherche de la production de l'indole (IND).

- Le chlorure ferrique pour le tryptophane désaminase (TDA).
- Le réactif VPI (solution \square naphтол), et le réactif VP2 (solution aqueuse d'NaOH4N) pour le test de Voges Proskawer (VP).

Etude de l'effet antibactérien des *Lactobacillus*

L'activité antibactérienne est réalisée par la méthode directe de double couche et par diffusion sur milieu gélosé selon **Izquierdo (2009)**. Cette dernière a été réalisée par les trois méthodes directes des puits, des disques selon **Shehata et al. (2016)** et de spot selon **Fleming et al. (1975)**.

Revivification des souches pathogènes

Les bactéries pathogènes testées sont cultivées à 37°C sur 10 ml de bouillon de la gélose nutritive pendant 24h.

Standardisation des inoculas

Afin d'avoir un même nombre de cellules bactériennes dans un 1ml de culture au cours de cette expérimentation, nous avons réalisé une standardisation de l'inoculum bactérien par l'isolement de chaque souche de *Lactobacillus* sur gélose MRS. Après incubation à 37°C pendant 48h, des colonies identiques et bien isolées de chaque souche ont été repiquées dans 9ml de bouillon MRS, puis incubées à 37°C durant 24 h.

La même procédure a été répétée avec les souches pathogènes en repiquant une colonie (après 24h d'incubation sur gélose nutritive) dans le bouillon nutritif incubé à 37°C pendant 24h (**Figure 8**).



Figure 8 : Standardisation des inoculas

Méthode de spot (méthode de Fleming et al., 1975)

Ce test d'antagonisme est réalisé dans le but de révéler la production ou non de produits antibactériens par les souches de bactéries lactiques ; par contre pour connaître la nature exacte de la substance un autre test peut être réalisé qui est le test des puits.

A partir des pré-cultures de souches lactiques sélectionnées obtenues après 18 heures d'incubation à 37°C, 5 µl ont été ensemencées sous forme de spots sur gélose MRS sécher devant bec bunsen à moitié ouverte de façon à obtenir trois spots par boîte de même taille et identiques. Ces boîtes sont laissées séchées près de bec bunsen pendant 30 minutes. L'incubation se fait en anaérobiose à 37°C durant 24 heures.

Après incubation, les boîtes ont été ensuite recouvertes par 10 ml de gélose nutritive semi solide inoculée par 1 ml d'une pré-culture de 18 h de chaque souche pathogène (*E.coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*).

Après faire une autre incubation à 37°C pendant 24h en aérobiose, les boîtes ont été examinées en vue de détecter les zones d'inhibition autour des spots et le diamètre de zone d'inhibition est mesuré (**Figure 9**).

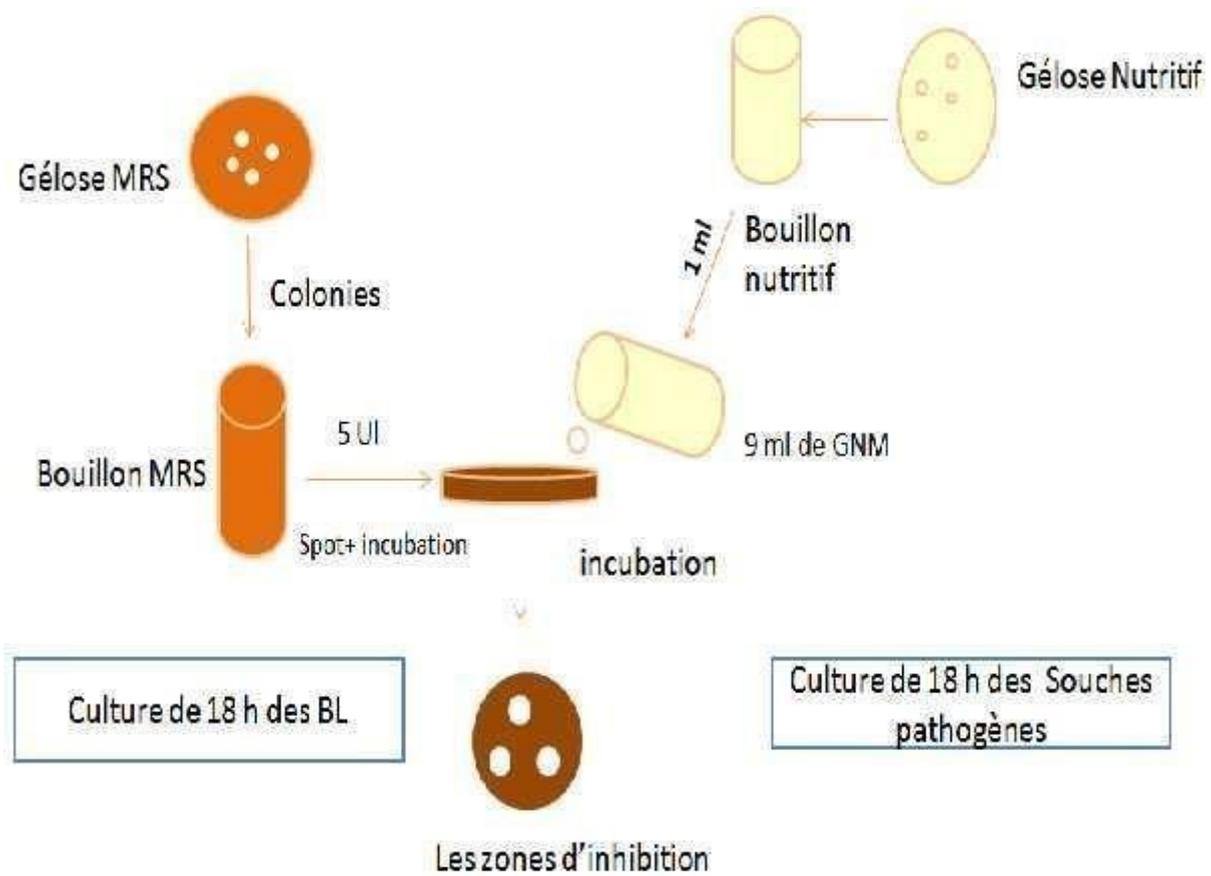


Figure 9 : Mise en évidence du pouvoir antibactérienne par la méthode de spot

Méthode des disques

Le milieu Mueller-Hinton est coulé dans des boîtes de Pétri stériles, après solidification du milieu, les boîtes sontensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène avec un écouvillon stérile, les disques stériles de 05 mm de diamètre sont ensuite déposés sur le milieu de culture (trois disques : un disque pour chaque souche de *Lactobacillus* et chaque disque reçoit un volume de 10 µl de la suspension des *Lactobacillus* (S1, S2 et S3). Une fois les boîtes sont séchées à température ambiante, elles sont incubées à 37°C pendant 24h. souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques et les diamètres des zones sont mesurés (Shehata et al., 2016).

Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)

Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques inhibitrices possédant les plus grandes zones d'inhibition montrant la présence de substances inhibitrices, ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide.

Les *Lactobacillus* sont repiquées dans milieu MRS liquide et incubées pendant une période de 18h à 30°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est réalisée L'inhibition de la à 4000 tr/min pendant 15 min (Figure 10).

Des puits de 5 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'une pipette pasteur sur la gélose nutritive inoculé par la souche pathogène et seront remplies avec 100 µL du surnageant de culture. Les boîtes de Petri sont mises à une température de +4°C/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (Doumandji et al., 2010). Les boîtes sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (Hwanhlem et al., 2011).

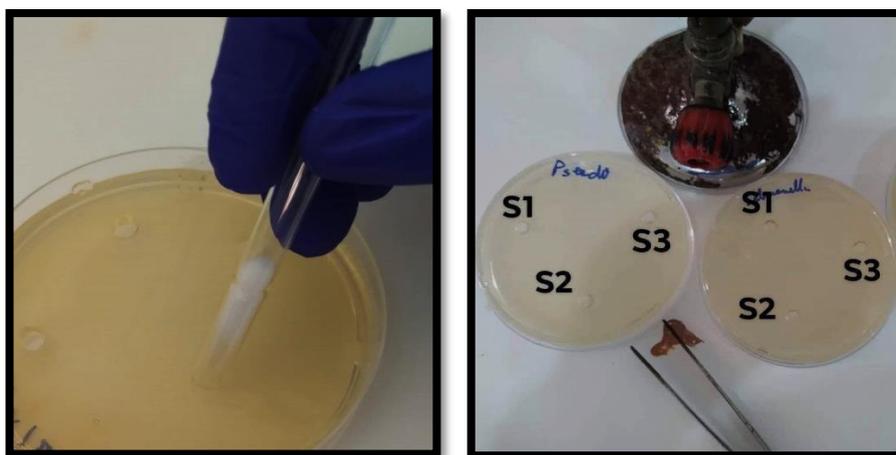


Figure 10 : Réalisation de l'effet antibactérien par la méthode des puits

Chapitre III

Résultats et discussions

Pré identification des isolats

Trois isolats lactiques ont été isolés et purifiés sur gélose Man Rogosa Sharpe (MRS), qui est un milieu spécifique pour les *Lactobacillus*.

L'identification des isolats lactiques a été conduite en utilisant des tests portant sur les caractéristiques culturales, morphologiques (macroscopique et microscopique), physiologiques et biochimiques sur des cultures pures.

Caractères morphologiques

Examen macroscopique

➤ **Sur milieu liquide** : L'observation macroscopique des cultures en milieu MRS liquide a permis de constater que les trois isolats possèdent un trouble homogène concentré au fond du tube indiquant une bonne croissance après 24 h d'incubation (**Tableau X, Figure 11**).



Figure 11 : cultures des isolats en milieu liquide MRS après 24h d'incubation.

Tableau X : Caractères macroscopiques des colonies isolées sur le milieu MRS liquide

	Culot	Trouble
S1	+	+
S2	+	+
S3	+	+

- **Sur milieu solide** : La culture des souches isolées sur le milieu MRS est observée par l’œil nu. L’ensemble des colonies étudiées révèle un aspect presque semblable ; elles sont lisses légèrement bombées, avec contour régulier et arrondi, translucides ou opaques, de petite taille 1 – 3 mm, et de couleur crémeuse (**Tableau XI, Figure 12**)

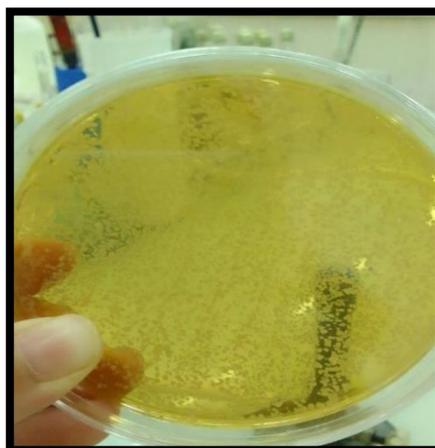


Figure 12 : Aspect macroscopique des colonies cultivées sur milieu solide MRS

Tableau XI : caractères macroscopiques des colonies isolées

Caractère Souches	Dimension Mm	Couleur	Forme	Elévation	Surface	Conteur
S1	3 mm	Crémeuse	Bacille	Bombée	Lisse	Arrondi (régulier)
S2	2 mm	Crémeuse	Bacille	Bombée	Lisse	Arrondi(régulier)
S3	2 mm	Crémeuse	Bacille	Bombée	Lisse	Arrondi(régulier)

D’après **Boukezzoula (2020)**, les colonies de *lactobacillus* sont de petites tailles arrondis (régulières) et lisses. Ce qui est similaires avec nos résultats.

Examen microscopique

A) Etat frais

L’examen microscopique des cultures sur milieux MRS au Bleu de méthylène montre des colonies bleues immobiles, sous forme de bacilles regroupées en chainettes et parfois en paires (**Figure 13**).



Figure 13 : Observation microscopique de la souche S2 (GX100) après la coloration de Bleu de méthylène, isolées sur milieu MRS.

B) Coloration de Gram

Après coloration de Gram et observation microscopique, la pureté des isolats a été constatée et nous a orienté sur l'aspect cellulaire des souches. Ils sont tous Gram positif apparaissent sous forme bacilles fins (**Tableau XII**), d'une couleur violette dont le mode d'associations varie d'une espèce à une autre et Ils sont non sporulés (**Figure 14**).

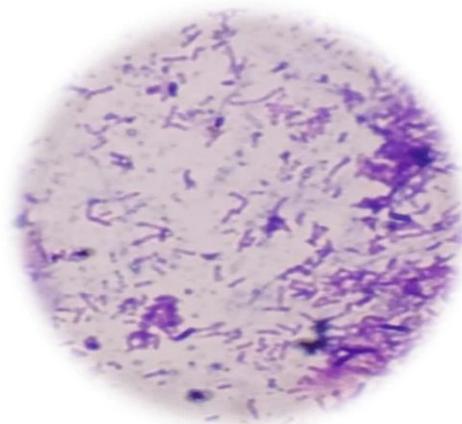


Figure 14 : Observation microscopique de la souche 1 de *Lactobacillus* après la coloration de Gram (Gx100).

Tableau XII : Résultats de l'étude microscopique

Souches	Forme et mode d'association	Gram
S1	Bacille en chainette	+
S2	Bacille en chainette/libre	+
S3	Bacille en chainette	+

Selon Mami (2013), La coloration de Gram montre que tous les isolats sont de Gram positif et de forme bacille, isolés ou regroupés en chaînette ou libre. Ce qui est similaires avec nos résultats.

Caractéristiques physiologiques et biochimique

Les caractères biochimiques, physiologiques et technologiques des isolats de *Lactobacillus* sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau XIII : Résultats des tests d’identification des souches *Lactobacillus* isolées à partir du lait de vache.

Tests biochimiques, physiologiques et Technologiques	Résultats
Catalase	-
Oxydase	-
Mannitol mobilité	mobile/ mannitol +
Type fermentaire	Homofermentaire
Croissance à Température 4°C	+
Croissance à Température 37°C	+
Croissance à Température 44°C	+/-
Mesure de pH 4 à 9,6	+/-
Croissance de NaCl à 2 %	+
Croissance de NaCl à 4 %	+
Croissance de NaCl à 6.5 %	+/-
Thermo-résistance	+
Activité protéolytique	+ /-
Résistance au tellurite	-

(-) : test négatif / (+) : test positif / (+/-) : faible croissance

Test de catalase

La confirmation de la pureté est complétée par la recherche de la catalase. Nous avons noté une absence de la formation des bulles d’air donc l’absence de l’enzyme ce qui reflète l’incapacité des souches á dégrader le peroxyde d’hydrogène, représente une réaction négative(**Figure 15**).

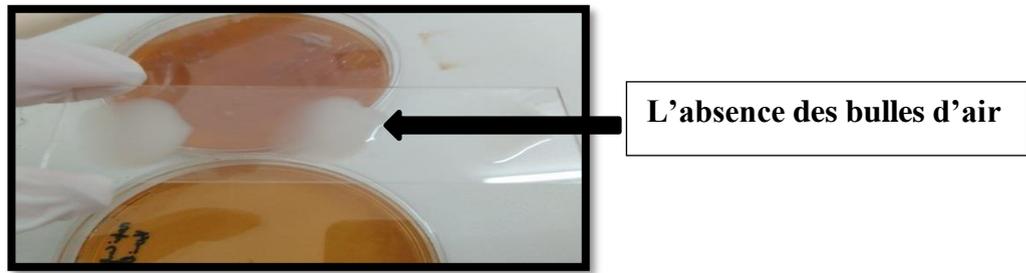


Figure 15 : Résultat négatif du test de catalase

L'analyse de ces résultats démontre que tous les isolats appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif et à catalase négative, caractéristique des bactéries lactiques. Ces résultats sont similaires à ceux de **Benhoua (2019)**.

Test oxydase

Les souches (S1, S2 et S3) n'ont pas produit une couleur violette et n'ont pas réagi avec les disques d'oxydase donc absence de l'enzyme la phénylène diamine oxydase qui capable d'oxyder le réactif N-diméthyl-paraphénylène-diamine Ce qui signifie qu'elles sont oxydase négative (**Figure 16**)

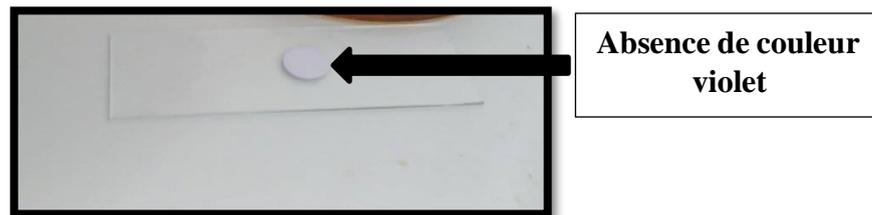


Figure 16 : Résultat de test d'oxydase par les disques d'oxydase.

Test de mannitol mobilité

Le test de mannitol mobilité a montré une croissance seulement dans la piqûre d'ensemencement des tubes testés, ce qui prouve que les souches (S1, S2 et S3) de lactobacilles étudiés sont mobiles tant qu'il y a virage de milieu donc La présence de réduction de D mannose qui ferment le mannitol donc mannitol positif (**Figure 17**).

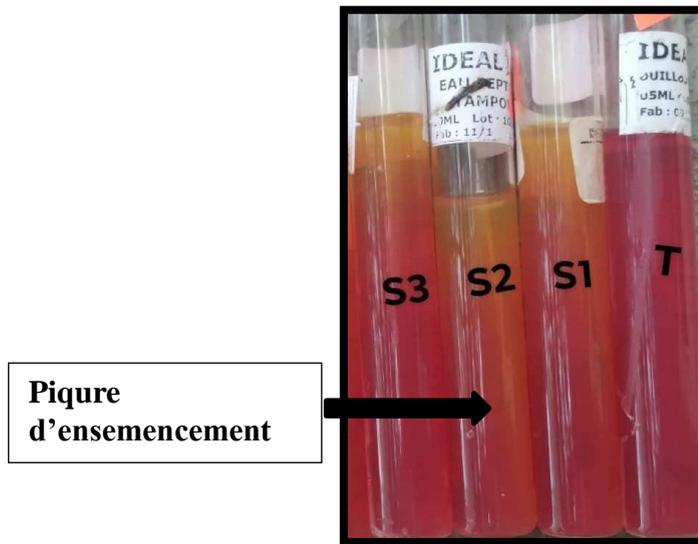


Figure 17 : Résultats de test de mannitol mobilité

Type fermentaire

Le développement d'une souche homofermentaire conduit à l'apparition d'un trouble sans production de gaz (Figure 18).

Aucune production du gaz (CO_2) à partir du glucose n'a été observée chez les trois souches, elles sont considérées comme homofermentaires donc la présence de l'enzyme fructose -1,6-bisphosphate aldolase (FBA), c'est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie homofermentaire (la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP).

Selon Mami et al. (2010), les résultats obtenus confirment que toutes nos souches sont de type homofermentaire.

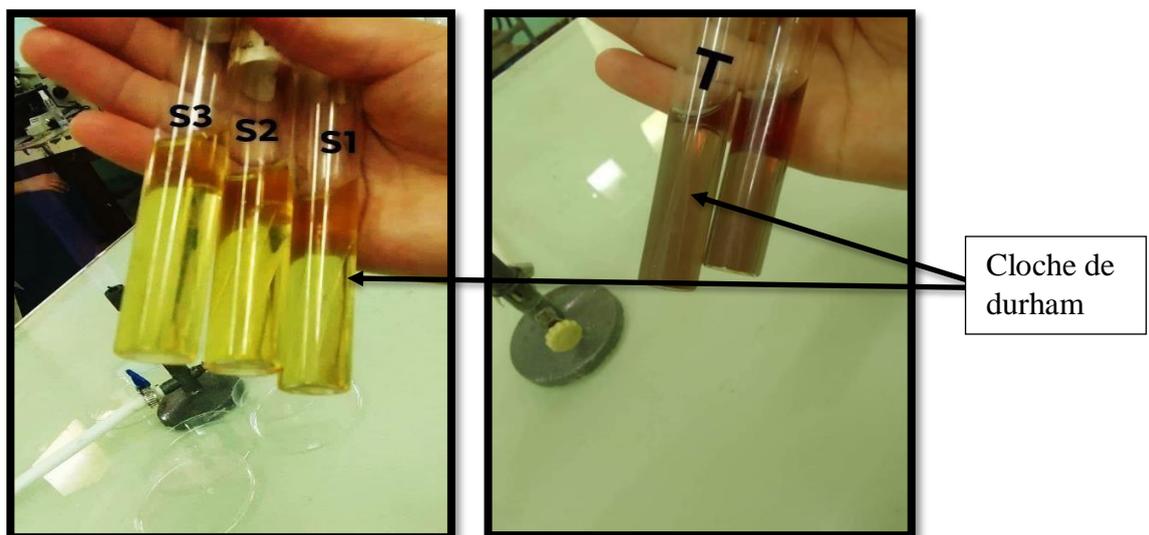


Figure 18 : Résultat de test de type fermentaire des souches de *Lactobacillus*

Croissance à différentes températures

Cette étude est réalisée à 4, 37 et à 44°C pendant 24h. Ce test permet de faire la différence entre la flore thermophile et mésophile (Badis et al., 2005). Les trois souches isolées poussent bien à 4 °C et 37 °C après 24h d'incubation, cependant la souche S1 pousse légèrement à 44°C. Donc les souches (S2) et (S3) sont de type mésophile (Carr et al., 2002) alors que la souche (S1) est qualifiée thermophile (Figure 19).

Selon Belhamra (2017), les souches de genre *Lactobacillus* se cultivent à 15 °C et 45 °C, ce qui est semblable à nos résultats.

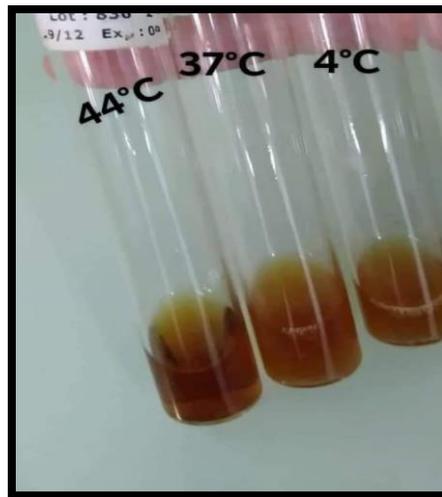


Figure 19 : Résultats du test de croissance à différentes températures (4 °C, 37 °C et 44°C).

Croissance à différent pH

Le pH est un paramètre essentiel en terme technologique qui permet de diviser la souche en plusieurs groupes selon leur adaptation aux différents pH. Dans notre étude les bactéries retenues ont été testées pour leur pouvoir à résister et de se croître à différentes pH (4 et 9.6). À pH =4, la croissance diffère d'une souche à une autre, les souches S1, S2 et S3 ont présenté une légère croissance, ce qui traduit que toutes les souches sont acido-tolérantes.

Tandis que, la souche (S3) ne présente aucune croissance comparativement aux souches (S1) et (S2) qui croient à pH= 9.6 (Figure 20).



Figure 20 : Résultat de test de croissance des isolées du lait de vache à différent pH (4 et 9,6)

D'après **Chahrour (2014)**, les *Lactobacillus* résistent à pH acide (pH=4) ce qui est similaires avec nos résultats.

Selon **Leveau et Bouix (1993)**, les *Lactobacilles* résistent à des pH acides allant jusqu'à 3,5. Cette acidité est due à la sécrétion des métabolites de la part de plusieurs ferments lactiques dans les milieux utilisés. Les variations du pH sont reliées à des variations physiologiques telles que la température du milieu.

Croissance à différentes concentrations de NaCl

Les *lactobacilles* isolés dans le lait de vaches, ont montré des comportements très différents vis-à-vis de leur sensibilité aux différentes concentrations de NaCl. Ce test de croissance à différente concentration de NaCl, nous a permis de déterminer les souches résistantes au stress salin.

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches (S1, S2 et S3) présentes une très bonne croissance en 2% et 4% de NaCl.

En présence de 6.5% de NaCl, seulement la souche (S1) qui présente une croissance, comparativement aux souches (S2 et S3), qui ont montré une incapacité à croître à ce taux de NaCl (**Tableau XIV**).

D'après **De-Angelis et Gobbett (2004)**, cette souche peut être placée au rang de microorganisme facilement inductible en industrie laitière vu que la plupart de ces paramètres sont des facteurs limitant dans le cas de plusieurs *lactobacilles*.

Tableau XIV : Résultat du test de croissance des *lactobacillus* isolés du lait de vache à différentes concentrations de NaCl

% de NaCl \ Les souches	2%	4%	6.5%
S1	+	+	+
S2	+	+	-
S3	+	+	-

(-) : test négatif / (+) : test positif

Thermorésistante

La thermo résistance est un caractère physiologique permettant de distinguer entre les isolats pouvant tolérer une température de 63,5 °C pendant 30 min de celles qui en sont incapables.

Après exposition à une température de 63,5 °C pendant 30 min suivie d'une incubation de 48 h, uniquement la souche (S1) est révélée un résultat positif (**figure 21**). Seule la souche thermophile a poussé, contrairement aux isolats mésophiles qui sont incapables de se développer.

Selon **Klein et al. (1998)**, la souche (S1) obtenue appartient au groupe des thermobactérium. La membrane plasmique joue un rôle essentiel dans la physiologie bactérienne en assurant l'interface entre le milieu intérieur et extérieur. Elle est le siège de nombreux transports actifs et passifs assurant l'équilibre osmotique et l'apport de nutriment à la cellule. Ces fonctions ne peuvent être assurées que si elle est dans un état fluide. Un changement de température (un choc ou une chute thermique), entraîne la transition d'un état fluide (désordonné) vers un état non fluide (ordonné) dont le résultat est une rigidification de la membrane. Un déséquilibre sur les fonctionnalités membranaire peut limiter la croissance bactérienne et nuire à la qualité de la production à l'échelle industrielle.



Figure 21 : Résultat de test de thermorésistance de la souche (S1) isolée à partir du lait devache

Caractéristiques technologiques des isolats

Activité protéolytique

Le test du pouvoir protéolytique, il est important à l'échelle biotechnologique et industriel. La protéolyse est l'un des processus biochimiques les plus importants impliqués dans la fabrication de beaucoup de produits laitiers fermentés. La capacité de produire des protéinases extracellulaires est une caractéristique très importante des *Lactobacillus*. Ces enzymes hydrolysent les protéines du lait, en fournissant les acides aminés et les caséines essentiels pour la croissance. Il est connu que le système protéolytique des *Lactobacillus* dégrade les protéines et par conséquent, change la texture, le goût et les arômes des produits fermentés (El-Ghaish et al., 2011).

Les résultats obtenus ont montré que la souche (S1) présente une activité protéolytique positive sur le milieu MRS avec la concentration de 10% du lait semiécrémé. Ceci se traduit par l'apparition d'une zone claire de 5mm qui entoure les colonies de la souche (S1). Tandis que les souches (S2 et S3) n'ont présenté aucune activité protéolytique, absence de zone claire dans la concentration testée du lait écrémé (Tableau XV, figure 22).

Tableau XV : Résultats de l'activité protéolytique des isolats de *Lactobacillus*.

Souches	S1	S2	S3
Zone de l'activité Protéolytique(mm)	5	0	0

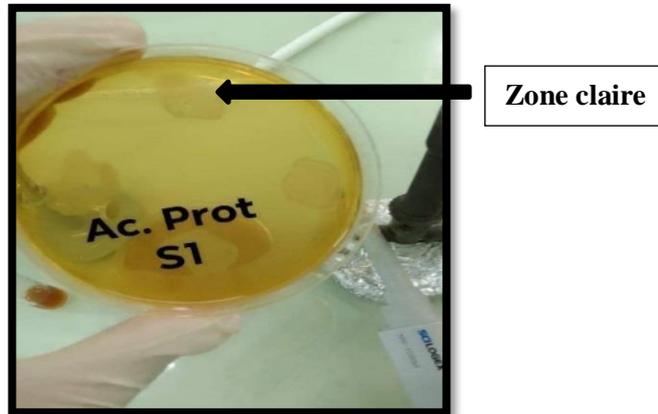


Figure 22 : Résultat de l’activité protéolytique de la S1 isolée du lait de vache

Résistance au téllurite

Les résultats obtenus de la présente étude ont montré une absence totale des colonies noires sur la surface de la gélose MRS additionné de 0.5% de téllurite de potassium, et ce pour les trois souches testées (S1, S2 et S3).

Etude de la fermentation des sucres

Afin de compléter l’identification des *Lactobacillus* isolés à partir du lait de vache, la galerie Api 20E a été exploitée seulement pour la souche (S1) vu qu’elle a présenté une meilleure croissance dans les tests précédents.

La galerie Api20E utilisée pour déterminer le profil fermentaire de certains tests à savoir : l’arginine dihydrolase (ADH), l’utilisation du citrate (CIT), réaction de voges-proskauer (VP), liquéfaction de la gélatine (GEL) et la réduction du nitrate (**figure 23**). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XVI : résultats des tests de la galerie Api20E

Les sucres	MAN	SAC	AMY	ARA	INO	SOR	RHA	MEL
Résultats	+	+	+	+	-	-	-	-



Figure 23 : Résultats des tests de la galerie APi 20E de la souche S1

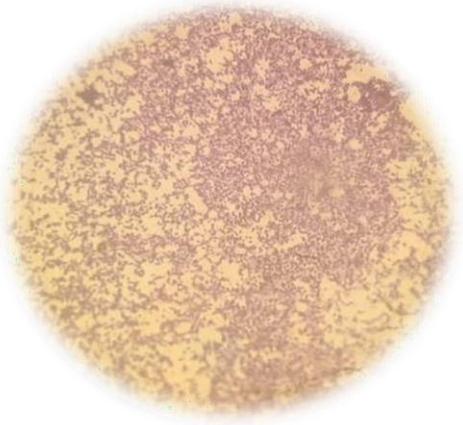
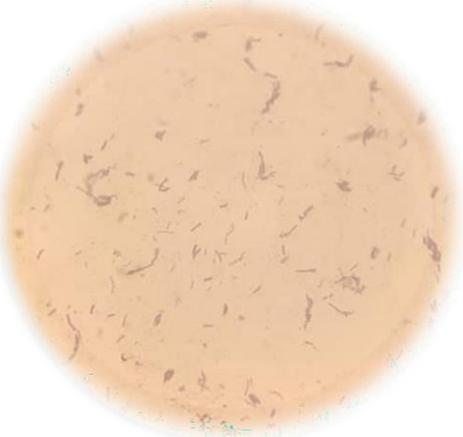
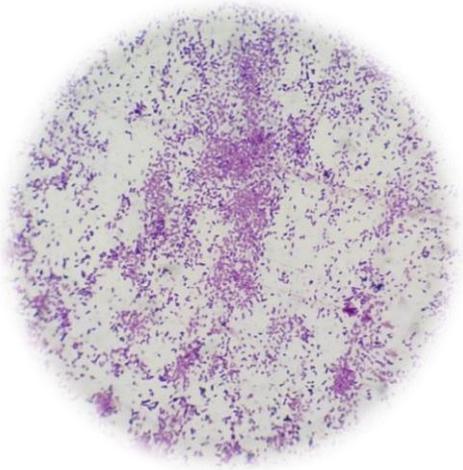
L'identification des espèces repose sur la comparaison de divers caractères phénotypiques de la souche à étudier vis-à-vis de ceux d'une souche de référence (Carr et al., 2002) et les caractères étudiés durant notre travail sont insuffisant pour pouvoir identifier la souche sélectionnée à l'échelle espèce, mais nous pouvons identifier le genre (*Lactobacillus*).

Observation microscopiques et macroscopique des souches pathogènes

L'ensemencement des bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *Salmonella* et *Pseudomonas aeruginosa*) isolées à partir des produits alimentaires dans le milieu liquide (Bouillon nutritif) résulte l'apparition d'un trouble homogène.

L'observation microscopique des colonies a permis d'obtenir des différents aspects, selon les bactéries isolées (Tableau XVII).

Tableau XVII : Observation microscopique des bactéries pathogènes d'origine alimentaire

Les souches pathogènes	Gram	Observation microscopique
 <i>Escherichia coli</i>	Gram -	Bacilles roses isolées ou en amas
 <i>Salmonella</i>	Gram -	Bacilles roses libres
 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	Bacilles roses en amas

Activité antibactérienne des *Lactobacillus*

Les *Lactobacillus* sont connues par la production de plusieurs types de composés antimicrobiens : les acides organiques, les bactériocines, les acides gras, le diacétyle et le peroxyde d'hydrogène (Armas et al., 2017 ; Reuben et al., 2020).

D'un autre côté, l'activité antibactérienne des *Lactobacillus* est de grande importance pour une colonisation réussie des muqueuses intestinales. Ces organismes peuvent fonctionner comme des barrières microbiennes contre les pathogènes gastro-intestinaux par exclusion compétitive, modulation du système immunitaire de l'hôte et la production de composés inhibiteurs (Al-Dhabi et al., 2020 ; Barzegar et al., 2021).

Dans cette partie nous avons testé le pouvoir inhibiteur des trois souches des *Lactobacillus* (S1, S2 et S3) isolées du lait de vache à l'égard des souches pathogènes à Gram négatif d'origine d'altération alimentaire (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et *salmonella sp*). Plusieurs méthodes ont été utilisées (méthode de spot, de disques, de puits) (figure 24).

En général, les tests d'antagonisme sont basés sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans des milieux de cultures solides impliquent la détection de l'inhibition de la croissance des micro-organismes indicateurs sensibles.

L'inhibition des bactéries pathogènes se traduit par la formation de zones claires, autour de ces souches ensemencées. D'après les résultats obtenus, les *Lactobacilles* ont montré un spectre d'activité inhibiteur important, Les diamètres des zones d'inhibition varient entre les souches, une zone d'inhibition maximale était de 23 mm observé contre *Pseudomonas aeruginosa* par la souche (S2). Un diamètre minimum égal à 5 mm a été obtenu par la souche (S3) contre *Escherichia coli*.

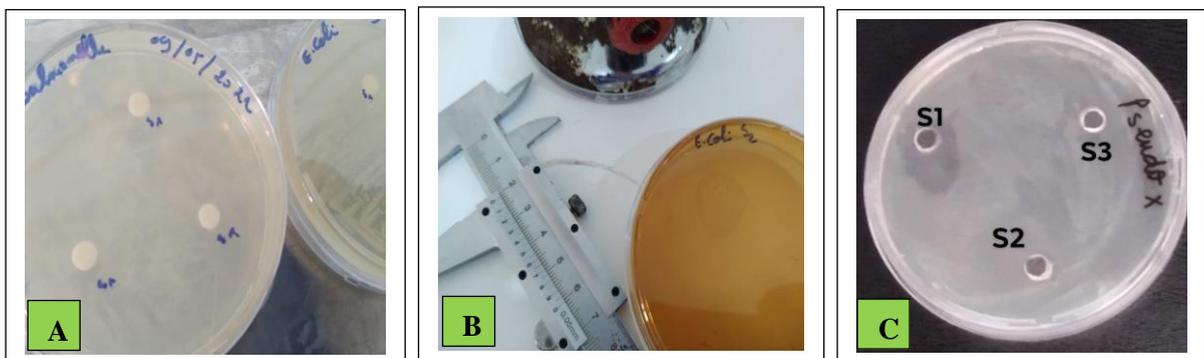


Figure 24 : Résultats de l'effet antagoniste des souches de *Lactobacillus* isolées à partir du lait de vache vis-à-vis des bactéries pathogènes d'origine alimentaire par trois méthodes

(A : de disque, B : de spot, C : de puits).

Méthode de spot

L'activité antimicrobienne des *Lactobacillus* a été testée sur milieu MRS (milieu favorisant la croissance des *Lactobacillus* par la méthode des spots. A travers les résultats obtenus, nous avons constaté que les trois souches (S1, S2 et S3) possèdent une activité antagoniste à l'égard des souches indicatrices utilisées et l'effet inhibiteur diffère d'une souche à une autre dont nous avons noté des zones d'inhibition importante avec les trois souches pathogènes. Cependant, certaines souches présentent des activités antibactériennes plus importantes que d'autres souches.

L'isolat (S2) de *Lactobacillus* isolé à partir de lait de vache a montré une zone d'inhibition de 18 mm en contact avec *Escherichia coli*, 17 mm (S1), et 5 mm (S3). Un diamètre plus élevé de 23 mm et un autre de 14 mm a été enregistré avec la S2 et S1 en contact avec *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement. Les résultats sont représentés dans le tableau XVIII suivant.

Concernant les *Salmonella*, un diamètre d'inhibition de 10 mm a été noté vis-à-vis (S1) et aucun effet inhibiteur avec les autres souches (S2) et (S3). Ce diamètre d'inhibition est inférieur à celui trouvé par **Dib et al. (2012)**, la croissance des Salmonelles est inhibée avec une zone d'inhibition de 20 mm de diamètre. Leur activité reste toutefois supérieure à celles des probiotiques lactiques commerciaux comme *L. acidophilus* et *L. rhamnosus* qui ont montré un diamètre d'inhibition de 11 et de 8 mm respectivement.

Tableau XVIII : Résultats des diamètres des zones d'inhibitions (ZDI en mm) des souches de *Lactobacillus* isolées du lait de vache par la méthode de spot

		Zone d'inhibition des isolats (mm)		
		S1	S2	S3
Méthode de spot	Souches des <i>Lactobacillus</i>			
	<i>Escherichia coli</i>	17	18	5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	23	0
	<i>Salmonella</i>	10	0	0

En utilisant la même technique, les résultats obtenus avec la souche (S1) sont similaires à ceux obtenus par **Belhamra (2017)**. Il est à noter que tous les isolats représentent un effet actif contre *E. coli* (24.5 mm) et *Salmonella* (35 mm). Par contre, aucun effet inhibiteur n'a été observé pour les souches (S2) et (S3) vis-à-vis les Salmonelles. Tandis que des diamètres de 18 mm pour (S2) et de 5 mm pour (S3) ont été enregistrés contre *E.coli*.

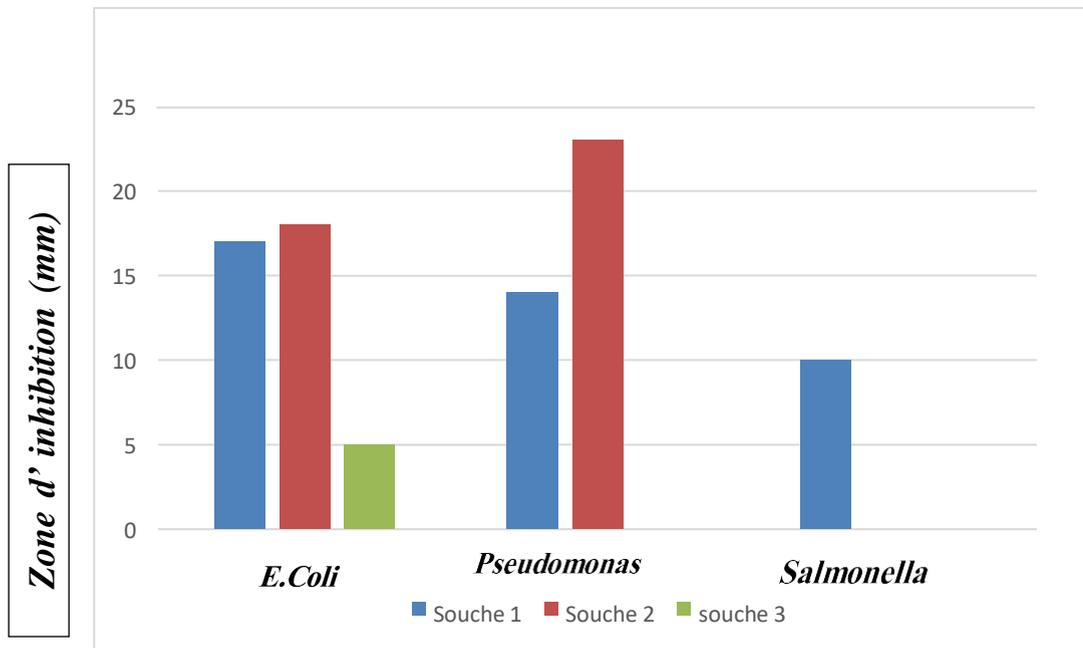


Figure 25 : Résultats des diamètres des zones d'inhibitions (ZDI en mm) des souches de *Lactobacillus* isolées du lait de vache par la méthode de spot

Méthode des disques

Une deuxième technique des disques sur milieu Mueller-Hinton a été appliquée pour tester l'effet d'antagonisme des *Lactobacillus* vis-à-vis des bactéries pathogènes d'origine alimentaire. Cette méthode est la plus utilisée pour le dépistage de ce type d'activité. Le milieu Mueller-Hinton est recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion.

Les isolats (S1, S2 et S3) ne présentent aucun effet inhibiteur en contact avec les souches pathogènes testées à savoir : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella* (Tableau 8, annexe II). Contrairement à ceux trouvés par **Hadjazzem et Mazouz (2021)** .il a noté que d'après souches de *Lactobacillus* testées ont une activité inhibitrice contre les microorganismes pathogènes de gram négatif et elles ont donné un bon spectre d'activité contre *Salmonella gallinarum* (10.9 mm), *E.coli* (11.5 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (8 mm).

Méthode des puits

Pour mieux comprendre les mécanismes de l'activité inhibitrice des *Lactobacillus*, la méthode de diffusion en puits a été aussi effectuée dans cette présente étude. Cette technique permet de mettre en contact la suspension bactérienne des *Lactobacillus* (S1, S2 et S3) avec les souches pathogènes d'origine alimentaire. Cela peut indiquer l'agent responsable impliqué dans le phénomène d'inhibition. L'activité inhibitrice se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits.

Concernant cette méthode, l'isolat (S1) de *Lactobacillus* a montré une zone d'inhibition de 7mm en contact avec *Escherichia coli*, 10 mm en contact avec *Pseudomonas aeruginosa* et un diamètre de 9 mm avec *Salmonella*. Cependant, aucun effet antibactérien n'a été enregistré avec les deux souches (S2 et S3) en contact avec les trois bactéries pathogènes (Tableau XIX).

Tableau XIX : Résultats des diamètres des zones d'inhibitions (ZDI en mm) des souches de *Lactobacillus* isolées du lait de vache par la méthode de puits

		Zone d'inhibition des isolats (mm)		
		S1	S2	S3
Méthode des puits	Souches des <i>Lactobacillus</i>			
	<i>Escherichia coli</i>	7	0	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	0	0
	<i>Salmonella</i>	9	0	0

D'après Allouche et al. (2010), les souches de *Lactobacillus* testées ont une activité inhibitrice négative contre *Escherichia coli* et *Salmonella*. Ce qui est similaire avec nos résultats pour les souches (S2) et (S3).

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que la souche (S1) a un meilleur pouvoir antibactérien par rapport aux deux autres.

Dans cette présente étude, l'effet antagoniste de la souche (S1) est dû probablement à la synthèse des substances inhibitrices. Selon Loso (2007), l'apparition des zones d'inhibitions peut être justifiée par l'effet des substances antibactériennes produites par les Lactobacilles. Divers facteurs peuvent être impliqués dans l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques, parmi ces facteurs la concurrence pour les nutriments, la diminution du pH suite à la production d'acides organiques notamment l'acide lactique et acétique (les *lactobacillus* ont la capacité une grande résistance au pH acide) qui est due à l'inhibition des souches pathogènes de *Salmonella*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. En plus de la production de divers

composés tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est connu comme l'agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques particulièrement celle des *lactobacilles*. Le diacétyl qui est plus actif quand le pH du milieu est inférieur à 7 et il peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif (**Salminen et al., 2004**), et d'autres substances aussi qui ont une action bactéricide ou bactériostatique y compris les bactériocines (**Ammor et al., 2006 ; Tulumoglou, 2013**). Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisées dans la fermentation et la bio conservation des aliments (**Labioui et al., 2005**).

D'après nos résultats nous avons enregistré une différence des zones d'inhibition des souches de *Lactobacillus* isolés et testé allant de **(5 à 23 mm)** et ce en fonction des méthodes utilisées, nous avons remarqué que la méthode de spot c'est la meilleure méthode pour l'activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries pathogènes.

Conclusion

Les bactéries lactiques sont des microorganismes qui ont un effet bénéfique sur la santé en inhibant le développement d'autres microorganismes indésirables ou pathogènes.

Les résultats obtenus à partir des trois prélèvements de lait de vache de la région de Blida et de Tipaza, ont montré trois isolats de *Lactobacillus* (S1, S2 et S3) ayant les caractéristiques suivantes : des bacilles à gram négatif, catalase négatif, oxydase négatif, homofermentaires, immobiles. Parmi les trois souches purifiées la S1 est thermorésistante avec une activité protéolytique de 5mm de zone claire. Alors que la S2 et S3 sont des mésophiles et sans aucune activité protéolytique.

Trois méthodes ont été utilisées (méthode de spot, des disques et des puits), afin de déterminer l'effet antagoniste des isolats des *Lactobacilles* vis-à-vis les bactéries pathogènes d'origine alimentaire à savoir : *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Pseudomonas aeruginosa*.

D'après le test d'antagonisme, les *Lactobacillus* testées étaient productrices des substances inhibitrices dont l'activité la plus importante est obtenue par la souche (S2) vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* (23 mm) par la méthode de spot. Une zone d'inhibition de 14 mm a été notée avec la souche (S1) et absence totale pour la souche (S3).

D'après ces résultats, les souches 1 et 2 pourront contribuer à l'amélioration du goût, de l'aspect et de l'innocuité microbiologique de l'aliment (utilisées comme agent de conservation sous forme d'additif). Ces souches du genre *Lactobacillus* possèdent un effet antagoniste sur les bactéries pathogènes testées à gram négatifs. L'application de ces souches à effet antagoniste aura un grand intérêt dans l'industrie agroalimentaire et dans la conservation des aliments.

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

- ✓ L'utilisation de techniques moléculaire afin d'identifier les souches isolées.
- ✓ Elargir la gamme des bactéries cibles de l'activité antimicrobienne (Gram positif et Gram négatif)
- ✓ L'utilisation des galeries biochimique (la galerie APIC50 CH) pour identifier l'espèce.
- ✓ Recherche la nature des facteurs inhibiteurs à l'égard des souches.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

- **Ajao O., Banwo K., Ogunremi O., et Sanni A. (2021).** Antimicrobial properties and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from raw beef in Ibadan, Nigeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 770-773.
- **Alais C. (1984).** Science du lait. Principes des techniques laitières. 4ème ed. Paris : Editions Sepaic, 814 pages. Alger Algérie. Commission nationale, point focal Algérien pour les ressources génétiques.
- **Al-Dhabi N. A., Valan Arasu M., Vijayaraghavan P., Esmail G. A., Duraipandiyan V., Kim Y. O., et Kim H. J. (2020).** Probiotic and antioxidant potential of *Lactobacillus reuteri* LR12 and *Lactobacillus lactis* I110 isolated from pineapple puree and quality analysis of pineapple-flavored goat milk yoghurt during storage. *Microorganisms*, 8(10), 1461.
- **Allouche, F A, Hellal, A., Laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière, *Nat. Technol.* 3:13-20.
- **Amellal R. (1995).** La filière lait en Algérie : entre l'objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance. In : Allaya M. (ed). *Les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000*. Montpellier : CIHEAM. 1995 : 229-38.
- **Amiot J., Foutier S., Lebeuf Y., Paquin P et Simpson R.L. (2002).** Composition, propriétés physicochimique, valeur nutritive, qualité technologique d'analyse du lait chapitre I.
- **Ammor M S., Flórez A B., Van Hoek A H, De Los Reyes-gavilán C G, Aarts H J, Margolles A, Mayo B. (2006).** Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 14(1-3),6-15
- **Andelot P. (1983) :** Le contrôle laitier, facteur d'amélioration technique. *Rev Lait France*. 416 : 15-16.
- **Andino A., and Hanning I. (2015)** *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Sérovars. Review Article. *Journal the Scientific World*.p.16.
- **Armas F., Camperio C., et Marianelli C. (2017).** In vitro assessment of the probiotic potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens. *PLoS One*, 12(1), e0169543.

Références bibliographiques

- **Avril D. et Denis M. (1992).** Biopréservation by lactic acid bacteria. Antonie de Leeuwenhoek. J. 70 : 331-345.

B

- **Badis A., Laouabdia S., Guetarni D., Kihal, M., et Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et kabyle". Sciences and Technologie, 23, 30-37.
- **Barefoot S.F., Klaenhammer T.R. (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl Environ Microbiol, 45(6) :1808-1815.
- **Barzegar H., Alizadeh Behbahani B., et Falah F. (2021).** Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk cheeses. Food Science et Nutrition.
- **Belarbi F. (2011).** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes : Mémoire de Magistère en microbiologie alimentaire et industrielle intitulée Université d'Oran Es Senia.
- **Belhamra Z. (2017).** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires (Thèse de doctorat, université de Ferhat Abbas Sétif 1).
- **Benhoua I. (2019).** Recherche et exploitation des exo polysaccharides produits par les bactéries lactiques et leur application, thèse de doctorat en microbiologie, université Ahmad Ben Bella 1, Oran.
- **Boukezoula N. (2020).** Isolement et sélection de souches lactiques (*Lactobacillus sp*) productrices de β -galactosidase., thèse de doctorat en nutrition et santé, université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- **Boulouf A. (2016).** Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel "Bouhezza", mémoire de magister en science alimentaire, université des frères mentouri Constantine, Constantine.
- **Brahimi S. (2015).** Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolée à partir des margines d'olives « AMOREDJ » fermentés (Thèse de Magister, Université d'Oran).

Références bibliographiques

C

- **Cannon J. P., Lee T. A., Bolanos J. T. & Danziger L. H. (2005).** Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24 :31-40.
- **Carr F.J., Chill D., Maida N. (2002).** The lactic Acid Bacteria: A Literature survey. *Critical Rev. Microbiol.* 28 :281-370.2.
- **Chahrour W. (2013).** La transformation des sucres solubles des fourrages en acide lactique et propionique par les bactéries lactiques naturellement présente sur le fourrage. Thèse de doctorat en microbiologie appliqué, université d'Oran Es- Sénia.
- **Christiane Y.E. (2013).** Etude épidémiologique de souche de *Pseudomonas aeruginosa* Responsable d'infections et leur bactériophage pour une approche thérapeutique. Thèse. Université paris-sud.
- **Codex Alimentarius. (2003).** Norme codex pour les laits fermentés. Adopté en 2003. Révision 2008, 2010. Codex Stan 243.
- **Copolla R., Iorizzo M., Saotta R., Sorrentino E., Grazia L. (1997).** Characterization of micrococci and staphylococci isolated from molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiology*, 14, 47–53p.

D

- **Danyluk M. D., Nozawa-inoue M., Hristova K. R., Scow K. M., Lampinen B and Harris L.J. (2008).** Survival and growth of *Salmonella enteritidis* PT 30 in almond orchard soils. *J. Appl. Microbiol.*, 104 : 1391-1399.
- **De Angelis M et Gobbetti M. (2004).** Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 70 : 13336-1346.
- **Debabza M. (2015).** Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de doctorat d'état, Université Badji Mokhtar-Annaba, pp. 5-60-61-62-63-64-65.
- **De Roissart H. (1986).** Bactéries lactiques In Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de doctorat. Univ de rennes-France.
- **Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M. C. & Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*, pp. 25-116. Edited by H. de Roissart & F. M. Luquet. Uriage, France : Lorica.

Références bibliographiques

- **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. (2009).** Bergey's manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three: The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg, USA.
- **Dib H. E. H., Mrad, S., Ayoub S., Choueiry R. J., Moussa L., Bitar G. (2012).** Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. Lebanese Science Journal, 13, 43-58.
- **Djidel A. (2007).** Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp : Rhamnosus sur jus de dattes : cinétique et optimisation en culture discontinues semi-continues et continues. Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur en Biotechnologies et industries alimentaires, Institut national de polytechnique de Lorraine. P32, 33.
- **Doumandji A., Hellal A., Saidi N. (2010).** Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11, Rev. Microbiol. Ind. San et Environn., 4 : 25-47.

E

- **El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El Mecherfi, K.E., Bazukyane, I., Choiset, Y., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y.G., A. Kuliev, A., Mozzi, F., Chobert, J.M. et Haertlé, T. (2011).** Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods, Tre. Food Sci. Technol. 1-8.
- **El Soda M., Madkor S.A. et Tong P.S. (2000).** Adjunct Cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. J. Dairy. Sci. 83 : 609-619.

F

- **Fennema O.F., Hui Y.H., Karel M., Walstra P., Whitaker J.R. (2004).** Lactic acid bacteria (Microbiological and Functional Aspects) In: Salminen S, von Wright A, editors. Food science and technology a series of monographs, textbooks, and reference books. New York: Marcel Dekker, Inc. 19–30.
- **Fleming H.P., Etechells J. L., Costilow R. N. (1975).** Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber Brines. Appl Microbiol., 30(6): 1040-1042.
- **Florence C. L. (2010).** Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras voies d'amélioration par l'alimentation, thèse de doctorat en sciences vétérinaires, école nationale d'Alfort, France.
- **Fredot E. (2005).** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier :10-14 (397 pages).

Références bibliographiques

G

- **Guessas Bettache. (2006).** Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat en microbiologie appliqué. Université d'Oran Es-S.
- **Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie Alimentaire, Ed. Dunod, Paris, 136-144p.
- **Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire, Ed. Dunod. Paris. 651p.

H

- **Hadjazzem B et Mazouz M. (2021).** Activité antimicrobienne des bactéries lactiques. Mémoire de Master, université Abd el hafid Boussouf-Milla.
- **Hammes W P., et Vogel R F. (2012).** The genus Lactobacillus. Dans Holzapfel, W. H. N., et Wood B J. (dirs.), The Genera of Lactic Acid Bacteria. Springer Science et Business Media.
- **Heita L. (2014).** Antimicrobial activity profile of traditional fermented milk startercultures from North-Eastern Namibia (Thèse de doctorat, Université de Namibia).
- **Heller Ana B. et Brosch Noah. (2001).** characterization of bacteriocin produced from Lactobacillus plantarum. Worl J. Microbiol. Vol. 2 (2), pp. 46-55.
- **Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. and Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 73(suppl) : 365S–73S.
- **Ho Thi NT. (2009).** Étude de la flore lactique du Nem Chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit, Thèse de Doctorat en Sciences des Alimentsset Nutrition, Université Bordeaux 1, France.
- **Huyghebaert. (2006).** Stratégies des produits à base de lait cru. Bruxelles.
- **Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S. (2011).** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. Food Control., 22: 401-407.

I

- **Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi, E. & Karam N. E. (2009).** Lactic acid bacteria from “Sheeps Dhan”, a traditional butter from sheeps milk: Isolation, identification and major technological traits. Gr. Y. Aceites,60(2), 6 Pp: 177-183.
- **Isolauri E., Salminen S. & Ouwehand A. C. (2004).** Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol 18:299-313.
- **Izquierdo Alegre E. (2009).** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique (Thèse de doctorat, université Strasbourg).

Références bibliographiques

J

- **Joffin J. N., Leyral G. (2006).** Microbiologie technique « Tome 1 » : Dictionnaire des techniques. CRDP Aquitaine, Bordeaux.

K

- **Kandler O., Weiss, N. (1986).** Genus *Lactobacillus*. In Tormo 2010. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., vol 2. P.H. A, Sneath., N. S, Mair., Sharpe, M.E., Holt, J. G (Ed). Williams and Wilkins, Baltimore, M.D.
- **Karam N. E., Karam H. (1994).** Isolement et caractérisation des bactéries lactiques de laits crus d'Algérie. In Alimentation, Génétique et Santé de l'enfant, Ed. M. Touhami et J-F. Des jeux, L'Harmatt an, Pp : 257-264.
- **King L-A., Loukiadis E-P., Mariani-Kurkdjian S., Haeghebaert F-X., Weill C., Baliere S., Ganet M., Gouali V., Vaillant N., Pihier H., Callon R., Novo O., Gaillot D., Thevenot-Sergentet E., Bingen P., Chaud and H de Valk. (2014).** Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157: [H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clinical Microbiology and Infection*. 20 (12), 1136-1144.
- **Klaenhammer. (1994).** In les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la conservation des produits alimentaires. BASE.VOLUME 13. 2009.
- **Klein G., A pack., C Bonaparte., et G Reuter. (1998).** « Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria» *Int J Food Microbiol* 41: 103-125.
- **König H. and Fröhlich J. (2009).** Lactic Acid Bacteria, Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in wine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- **Korsak N., Clinquart A., Daube G., (2004).** *Salmonella spp* dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique. *Méd. Vét.*, 148, pp.174-193.

L

- **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M., Ouhssine M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériocines. Laboratoire de biotechnologie microbienne, Université Ibn Tofail, 14000 Kénitra, BP 133, Maroc : 237-248.
- **Lagrange P du Bugey Belley. (2012).** Toxi-infection alimentaire collective, p 2.
- **Lambien S et German A. (1961) :** Précis de Microbiologie. Masson et Cie, Paris.
- **Lane C.N et Fox P.F. (1996).** Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int Dairy. J.* 6 : 715-728.

Références bibliographiques

- **Langa S., Martín-Cabrejas I., Montiel R., Landete J. M., Medina M., et Arqués J. L. (2014).** Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. *Journal of dairy science*, 97(10), 6116-6121
 - **Larpent J.P and Larpent-Gourgaud M. (1997).** Mémento technique de microbiologie : micro- organismes eucaryotes et procaryotes, structure, métabolisme, systématique, applications industrielles, milieux de culture et réactifs. Tec & Doc Lavoisier, 1039 pages.
 - **Larpent-Gourgaud Monique., Michaux odile., Larpent J.P., Desmasures Nathalie., Desmazeaud Michel., Mangin Irène., Masson Florence., Montel M.C. et Tailliez Patrick. (1997).** Les ferments lactiques et bactéries apparentées In *Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire*. Larpent J-P. Tec & Doc, Lavoisier, pp : 199-255.
 - **Larpent S.P. (1997).** *Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire*. Ed. Tech et Doc, Lavoisier, Paris.
 - **Le Minor L., & Richard C. (1993).** *Laboratory methods for the identification of enterobacteria*. Institut Pasteur : Paris, France ; 217. M.
 - **Leveau J.Y.et Bouix M. (1993).** *Microbiologie industrielle : les uorg d'intérêt industriel*. Edition : Tec&dac-Lavoisier : 170,171-181p.
 - **Lobry J. R. (1991).** Ré-évaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance, Université Claude Bernard-Lyon I. France.
- M**
- **Mami A., Hemedi A R., Henni J., Kerfouf A & Kihal M. (2010).** Activité Antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis- vis de *Staphylococcus aureus*. *Les techniques de laboratoire*, Volume5, N°21.
 - **Mami A. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrice des bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèsede doctorat de l'université d'Oran .25-77p.
 - **Marilley L., Casey M.G. (2004).** Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food. Microbiol.* 90 : 139-159.
 - **Marshal N., Bourdon J. L., Richard C. L. (1987).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3èmeEd. Doin, Pp : 200-210.
 - **Metchnikoff E. (1908).** *Prolongation of life: Optimistic studies*. William Heinemann, London. Pp : 161-183.
 - **Michel V., Hauwuy A., Chamba J.F. (2002).** La flore microbienne de laits crus vache : diversité et influence des conditions de production, *Lait*, 81 : 575-592.

Références bibliographiques

- **Moore E.R.B., Tindall B.J., Martins Dos Santos V.A.P., Pieper D.H., Ramos J.L., et Palleroni N.J. (2006).** Nonmedical: Pseudomonas, p.646-703. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, et E. Stackebrandt (ed.), Prokaryotes, Springer, USA.
- **Moroni O. (2007).** Contribution à l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections entériques à *Listeria monocytogenes* : analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval. 146p.

N

- **Nair M.S., Amalaradjou M.A., et Venkitanarayanan K. (2017).** Anti-virulence properties of probiotics in combating microbial pathogenesis. *Advances in applied microbiology*, 98, 1-29.
- **Nannen N.L., Huntkins R.W. (1991).** Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 74: 747-751.
- **Nauciel C et Vildé J.L. (2005).** Bactériologie médicale : Abrégés Connaissances et pratique. Elsevier Masson. Paris. Pp : 257.
- **Novel G. (1993).** Les bactéries lactiques In *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel*.

P

- **Plommet M. (1987) :** La traite et les infections de la mamelle *Aun nutre Alim.* 20, 4357.
- **Pot B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec&Doc, Lavoisier.* Paris. 1-106.
- **Pougheon Sandra., Goursaud Jean. (2001).** Le lait : caractéristiques physicochimiques In *Lait, nutrition et santé.* Debry G. Tec & Doc, Lavoisier, pp: 3-42
- **Prescott C.E., Hope G.D. et Blevins L.L. (2003).** Identification of newly isolated *Lactobacilli* from stomach mucus of lamb. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae.* 55 : 64-72.
- **Pritchard G.G. et Coolbear T. (1993).** The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 179-206.

Références bibliographiques

R

- **Reid G., Burton J. (2002).** Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection* 4 :319-324
- **Reuben R. C., Roy P. C., Sarkar S. L., Alam A. R. U., et Jahid I. K. (2020).** Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of dairy science*, 103(2), 1223-123.
- **Rodriguez-Rivera L. D., Wright E. M., Siler J. D., Elton M., Cummings K. J., Warnick L. D., & Wiedmann M. (2014).** Subtype analysis of *Salmonella* isolated from subclinically infected dairy cattle and dairy farm environments reveals the presence of both human- and bovine-associated subtypes. *Veterinary Microbiology*, 170(3–4), pp. 307–316.

S

- **Salminen S., Wright A., Ouwehand A. (2004).** Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., U.S.A
- **Samelis J., Maurogenakis F., et Metaxopoulos J. (1994).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry Salami. *Int. J. Food Microbiol.* 23 : 179-196.
- **Sandine W.E., Radich P.C., Elliker P.R. (1972).** Ecology of the lactic streptococci. A review. *J. Milk Food Techn.*, 35 : 176-185
- **Servin A. L. (2004).** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28 : 405-440.
- **Sharpe M.E. (1979).** Identification of the lactic acid bacteria. In: *Identification Methods for Microbiologists*. In: Skinner, F. A. and D. W. (Eds). pp. 233-259. London: Academic Press.
- **Sharpe M.E. (1981).** The genus *Lactobacillus* in *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A Schlege IH. G. Springer-Verlag (Eds) Berlin, 1653-1674.
- **Shehata M. G., El Sohaimy S. A., El-Sahn M. A., et Youssef, M. M. (2016).** Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 65-75.

Références bibliographiques

- **Shlundt J. et Toyofuku H. (2010).** Intoxication Alimentaire : Manuel-Contrôle des Maladies transmissibles 2 p.
- **Shveta Sethi., Vikas Gautam., Kirti Gupta., Vanita Suri., and Archana Angrup., (2017).** Vertical transmission of Salmonella enterica serotype Paratyphi A leading to abortion.
- **Siegmund H., Reisinger K.B., Jakobsen M. (2000).** Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2330-2335.
- **Singh V. P. (2018).** Recent approaches in food bio-preservation-a review. *Open veterinary journal*, 8(1), 104-111. Maladies transmissibles 2 p
- **Stiles M E. and Holzappel W H (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current. *Taxonomy. International. Journal of Food. Microbiology.* 36 : pp1-29.

T

- **Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994).** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques* (De Roissart H. et Luquet F.M.). Loriga, Uriage. 1 : 239-290.
- **Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition dure nouveau pédagogique. Canada. 945p.
- **Tulumoglu S, Yuksekdogan Z N, Beyatli Y, Simsek O, Cinar B, Yaşar E. 2013.** Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe.* 24: 36-42.

V

- **Vierling E. (2003).** Aliment et boisson-Filière et produit, 2ème édition, doit éditeurs, centre régional de la documentation pédagogique d'Aquitaine : 11(270 pages).
- **Vignola Carole L. (2002) :** Science et technologie du lait transformation du lait. Ecole Polytechnique de Montréal 2002.

Y

- **Yateem A., Balba M. T., Al-Surrayai T., Al-Mutairi B., Al-Daher R. (2008).** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J Dairy Sci.*, 3: 194-199.

Z

- **Zhitnitsky D., Rose J., Lewinson O. (2017).** The highly synergistic, broad spectrum, antibacterial activity of organic acids and transition metals. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.

Références bibliographiques

Annexes

Annexe I

Tableau 1 : composition de Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Composants	Quantités
Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Acétate de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MnSO ₄	0.05 g
MgSO ₄	0.1 g
Tween80	1 ml
Peptone	10g
Agar	12g
Eau distillée q.s. p	1000 ml
PH	6.5±0.2 à 37°C



Autoclavage : 121°C /15min.

Tableau 2 : composition de Bouillon MRS

Composants	Quantités
Extrait de levure	4g
Extrait de viande	8g
Acétate de sodium tri hydraté	5g
Citrate d'ammonium	2g
Glucose	20g
Sulfate de manganèse tétra hydraté	2g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2g
Tween80	1 ml
Peptone	10g
Hydrogénophosphate de potassium	2,0 g
Eau distillée q.s. p	1000 ml
PH	6.5±0.2



Tableau 3 : composition de Milieu Mueller Hinton.

Composant	Quantité (g/l)
Extrait de viande	2
Hydrolysate acide de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	10
pH final	7,4



Tableau 5 : Composition de bouillon nutritif

Composant	Quantité
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Chlorure de Sodium	5g
Eau distillée	1000ml
pH final	7,2
Autoclave à 120°C pendant 20 minutes	

Tableau 6 : composition de gélose nutritif (GN)

Composants	Quantités
Extrait de levure	2g
Extrait de viande	1g
NaCl	5 g
Peptone	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml
PH	7

Autoclavage : 121°C /15min.

Tableau 7 : Composition de gélose Hektoen

Composant	Quantité
Protéose-peptone	12g
Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g
Thiusulfate de sodium	5g
Sels biliaires	9g
Citrate de fer ammoniacal	1,5g
Salicine	2g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Fushine acide	0,1g
Bleu de bromothymol	65g
Gélose	13g
Eau distillée	1000ml
pH final	7,6



➤ **Composition du colorants utilisés**

✓ **Violet de gentiane au cristal**

Composants	Quantité
Violet de gentiane	10g
Phénol.	20g
Ethanol à 0.95	100cm ³
Eau distillée	1dm ³



✓ **Lugol**

Composants	Quantité
Iode	5
Iodure de potassium	10
Eau distillée qsp	1dm ³



✓ **Fuchsine de Ziehl**

Composants	Quantité
Fushine basique	10g
Phénol	50g
Ethanol	0,5cm ³
Eau distillée	1dm ³



Annexe II

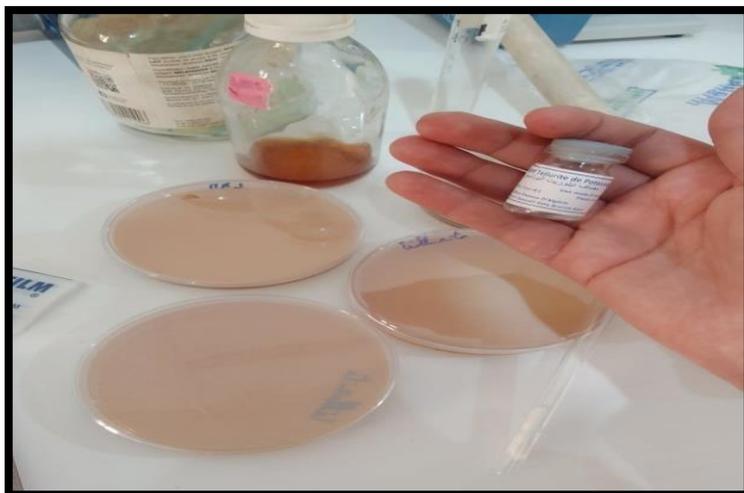


Figure 2 : Test de résistance au télérutte

Tableau 8 : Résultats des diamètres des zones d'inhibitions (ZDI en mm) des souches de *Lactobacillus* isolées du lait de vache par la méthode des disques

		Zone inhibition (mm)		
		S1	S2	S3
Test de disque	Souches des Lactobacillus			
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
	<i>Salmonella</i>	-	-	-

Annexe III : Matériel non biologique



Balance électronique



Vortex



Centrifugeuse



Etuve à 37



Etuve à 44



Bain marie



Autoclave



Microscope optique



Bec bunsen

Verrerie et accessoires :

- ❖ Anse de platine
- ❖ Barreau magnétique
- ❖ Becher graduée de 100ml
- ❖ Erlenmeyer de 1000ml
- ❖ Flacons stériles de 250 ml
- ❖ Lame et lame et Lamelle en verre
- ❖ Portoir
- ❖ Pipette pasteur
- ❖ Seringue stérile
- ❖ Tubes stériles