

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université SAAD DAHLAB de BLIDA 1**  
**Faculté des sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**



**Mémoire de fin d'étude**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Option : Microbiologie**

Thème

**Effet antibactérien des *Lactobacillus* sur les bactéries  
pathogènes d'origine alimentaire**

Présenté par :

**M<sup>elle</sup> Mimi Samia**

**M<sup>elle</sup> Aftis Ouidad**

Soutenu le 07/07/2020 devant le jury:

**M<sup>me</sup> LOUNACI L.**

**M<sup>me</sup> BENHOUNA I.S.**

**M<sup>me</sup> BOUDJEMA N.**

**MCB/USDB1**

**MCB/USDB1**

**MCA/USDB1**

**Présidente**

**Examinatrice**

**Encadreur**

**Année universitaire 2019/2020**

## *Remerciements*

*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.*

*Nous ne saurions trouver les termes qu'il faut pour exprimer notre profonde gratitude à notre promotrice adorée : **M<sup>me</sup>. BOUDJEMA NOUARA** pour sa gentillesse et sa sympathie, ses précieux conseils, mais surtout sa disponibilité permanente a toujours suscité notre admiration.*

*Nous remercions les membres de Jury d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.*

*Sans oublier d'adresser nos sincères remerciements à **Mr. TEFFAHI Djamel** l'ingénieur de laboratoire d'hygiène qui nous a transmis son immense savoir, avec beaucoup de patience et de rigueur. Nous avons eu la chance et le plaisir de bénéficier de son expérience .Veuillez recevoir nos remerciements pour votre compréhension et vos encouragements.*

*À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire et à tous ceux qui nous ont soutenu moralement par leur affection et qui nous ont permis par leurs conseils et leur aide quotidienne de toujours avancer.*

*Merci pour tout, simplement.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail, fruit de mes études grâce à l'aide de Dieu tout  
puissant à :*

*Mon cher Papa Rachid...*

Aucun mot ne peut exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuits pour mon éducation et mon bien être.

*Ma chère mère Zohra...*

Affable, honorable, aimable : Tu représentes le symbole de la bonté par excellence, l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager ; ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Ce travail est le fruit de vos sacrifices " cher parents" consentis pour mon éducation et ma formation.

*Mes frères Imad Eddine , AbdErrahim et AbdErrezak*

Que dieu vous garde et vous protège, que votre chemin soit plein de succès.

*Particulièrement ma tante Saâdia*

Que Dieu vous garde et vous bénisse

*Mes belles amies Chaima , Fadhela et Djamila*

*Mon cousin Yacine, mes cousines Dalel, Sihem, Lyliia et Meriem*

*Mes grands parents ainsi que mes oncles et tantes*

*Et spécialement à ma binôme et sœur Ouiddad Aftis*

pour le travail, l'aide et l'amitié qui nous a réunis, que dieu vous protège.

*Samia...*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*À mes très chers parents, pour tout ce que vous avez fait et faites encore pour moi aujourd'hui. Merci pour votre amour, votre soutien et vos sacrifices qui m'ont permis de grandir et de réaliser mon rêve. Je vous aime très fort.*

*À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore,*

*À l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, à toi mon père,*

*À mes chères frères: Mohamed islem, Zakaria akram, Zineddine.  
À ma petite sœur ; Alae Djihene*

*À toutes mes amies ; Imane bensalem, Safa Ouira qui je souhaite plein de bonheur et de succès à leur vie.*

*À ma binôme et chère amie Samia, avec qui j'ai partagé des moments difficiles et des moments agréables le long de ce travail.*

*Widad*

## Liste des abréviations

**Aw** : Activité de l'eau.

**BCPL** : Bouillon Lactosé au Bromo Crésol Pourpre.

**D°** : Degré d'ornic.

**DO**: Densité Optique.

**EMP**: Embden-meyerhoff-parnas.

**EPS**: Exo-polysaccharides.

**FAO**: Food and Agriculture Organization.

**FBA** : Bisphosphatealdolase.

**GC%**: Pourcentage en Guanine et Cytosine.

**GN** : Gélose Nutritive.

**LAB** : Bactéries lactiques.

**MRS** : Man Rogosa Sharpe.

**NaCl** : Chlorure de Sodium.

**NaOH** : Hydroxyde de sodium.

**TIAC** : Toxi-infection Alimentaire Collective.

**UFC** : Unité Formant Colonie.

**ZDI** : Zone d'inhibition.

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure1</b> : Facteurs intrinsèques et extrinsèques .....  | 14 |
| <b>Figure2</b> : Site de prélèvement du lait de vache de la ferme de Guerouaou Blida.....   | 19 |
| <b>Figure3</b> : Schéma illustratif des étapes de l'isolement. ....   | 23 |
| <b>Figure4</b> : Test de l'activité protéolytique des souches des <i>Lactobacillus</i> .....  | 27 |
| <b>Figure 5</b> : Schéma de la réalisation du l'effet antibactérien par le test de spots.....   | 30 |
| <b>Figure 6</b> : Réalisation de l'effet antibactérien par la méthode des puits.....  | 31 |
| <b>Figure7</b> : Aspect de colonie des <i>Lactobacillus</i> isolée à partir du lait de vache de la dilution ( $10^{-5}$ ) sur milieu MRS.....   | 33 |
| <b>Figure 8</b> : Résultat de repiquage des souches des <i>Lactobacillus</i> dans le bouillon MRS (milieu liquide).....   | 33 |
| <b>Figure 9</b> : Observation microscopique de la souche S3 (GX40) à l'état frais et S2 (GX100) après la coloration de Bleu de méthylène, isolées sur milieu MRS. ....  | 34 |
| <b>Figure10</b> : Observation microscopique des souches des <i>Lactobacillus</i> après la coloration de Gram (Gx40) (Gx100). ....   | 35 |
| <b>Figure11</b> : Résultat négatif du test de catalase.....   | 36 |
| <b>Figure12</b> : Test d'oxydase par les disques d'oxydase. ....  | 37 |
| <b>Figure13</b> : Résultat de test de Mannitol mobilité des souches de Lactobacilles (T : témoin ; E : ensemencé). ....   | 37 |
| <b>Figure14</b> : Résultat de test de type fermentaire des souches 1 et 2 des <i>Lactobacillus</i> (T : témoin ; E ensemencé). ....   | 38 |
| <b>Figure15</b> : Résultat du test de croissance à pH 4 et 9,6. ....  | 40 |
| <b>Figure16</b> : Résultat de la thermo-résistance.....   | 41 |
| <b>Figure17</b> : Exemple positif d'activité protéolytique. ....  | 42 |
| <b>Figure18</b> : Résultats des tests de la galerie Api 20 <sup>E</sup> de la souche S2.....  | 43 |
| <b>Figure19</b> : Observation microscopique des bactéries pathogènes après la coloration de Gram (Gx40) (Gx100) ( <b>A</b> : <i>Escherichia coli</i> , <b>B</b> : <i>Salmonella</i> , <b>C</b> : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) .....                                      | 44 |
| <b>Figure 20</b> : Résultats de L'effet antagoniste des souches des <i>Lactobacillus</i> isolées à partir du lait de vache vis-à-vis des bactéries pathogènes d'origine alimentaire par les méthodes ( <b>A</b> : de spot, <b>B</b> : de disque, <b>C</b> : de puits). .... | 46 |

**Figure 21** : 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 ) (*Escherichia coli* , *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*). ..... 47

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau I</b> : Composition nutritionnelle moyenne en (%) du lait de vache.....  | 3  |
| <b>Tableau II</b> : Principales constantes physico chimiques du lait de vache.....  | 4  |
| <b>Tableau III</b> : Différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.....  | 6  |
| <b>Tableau IV</b> : Habitats des <i>Lactobacillus</i> .....   | 8  |
| <b>Tableau V</b> : Différents effets des Lactobacilles probiotiques sur la santé humaine). .....  | 10 |
| <b>Tableau VI</b> : Nature et origine de différentes souches pathogènes .....   | 18 |
| <b>Tableau VII</b> : Aspect macroscopique des colonies observées à partir des Boîtes de Pétri de 10 <sup>-5</sup> du lait de vache après 72h d'incubation à 37 °C.....  | 32 |
| <b>Tableau VIII</b> : Résultats des tests d'identification des souches <i>Lactobacillus</i> isolées à partir du lait de vache.....                                      | 35 |
| <b>Tableau IX</b> : Résultats de l'étude microscopique, coloration de Gram et le test de catalase .....   | 36 |
| <b>Tableau X</b> : Résultats du test de croissance à différentes températures .....   | 39 |
| <b>Tableau XI</b> : Résultats du test de croissance dans des conditions hostiles en fonction des souches de <i>Lactobacillus</i> isolées à partir du lait de vache..... | 39 |
| <b>Tableau XII</b> : Résultats de l'activité protéolytique des isolats des <i>Lactobacillus</i> .....   | 42 |
| <b>Tableau XIII</b> : Résultats de la résistance au téllurite de potassium .....  | 43 |
| <b>Tableau XIV</b> : Observation microscopique des bactéries pathogènes d'origine alimentaire.....  | 44 |
| <b>Tableau XV</b> : Résultats des diamètres des zones d'inhibitions des <i>Lactobacillus</i> en (mm).....   | 45 |



## Sommaire

### Résumé

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

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

|  |   |
|--|---|
| I. Généralités sur le lait de vache .....                                      | 3 |
| I.1. Définition .....  | 3 |
| I.2. Microflore du lait .....  | 4 |
| I.2.1. Flore originale .....   | 4 |
| I.2.2. Flore de contamination .....  | 4 |
| I.3. Ferments lactiques .....  | 5 |
| I.3.1. Définition .....  | 5 |
| I.3.2. Classification.....   | 5 |
| I.3.3. Habitat.....  | 6 |
| I.3.4. Voies fermentaires des bactéries lactiques.....                         | 6 |
| I.3.4.1. Voie homo-fermentaire .....   | 6 |
| I.3.4.2. Voie hétéro-fermentaire .....   | 7 |
| I.3.5. Intérêt de la fermentation lactique .....                               | 7 |
| I.3.6. Application des ferments lactique dans l'industrie agroalimentaire..... | 7 |
| I.4. <i>Lactobacillus</i> .....  | 8 |
| I.4.1. Définition des <i>Lactobacillus</i> .....                               | 8 |
| I.4.2. Systématique des <i>Lactobacillus</i> .....                             | 8 |
| I.4.3. Application des <i>Lactobacillus</i> .....                              | 9 |
| I.4.3.1. Application dans l'alimentation humaine .....                         | 9 |
| I.4.3.2. Application dans l'alimentation animale .....                         | 9 |

## Sommaire

---

|  |    |
|--|----|
| I.4.3.3. Applications des <i>Lactobacillus</i> en tant que probiotiques .....      | 10 |
| I.4.4. Pouvoir antimicrobien des <i>Lactobacillus</i> .....                        | 10 |
| I.4.4.1. Production des acides organiques .....                                    | 11 |
| I.4.4.2. Production de diacétyle.....  | 11 |
| I.4.4.3. Production de dioxyde de carbone .....                                    | 11 |
| I.4.4.4. Production d'autres composés organiques de faible poids moléculaire ..... | 11 |
| I.4.4.5. Bactériocines .....   | 12 |
| I.5. Altérations microbiennes des aliments .....                                   | 12 |
| I.5.1. Différents types d'altérations .....  | 12 |
| I.5.1.1. Altération physique .....   | 12 |
| I.5.1.2. Altération chimique et biochimique.....                                   | 13 |
| I.5.1.3. Altération microbienne .....  | 13 |
| I.5.2. Facteurs d'altération des aliments.....                                     | 14 |
| I.5.3. Bactéries pathogènes responsables d'altération d'aliments .....             | 15 |
| I.5.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....  | 15 |
| I.5.3.2. <i>Escherichia coli</i> .....   | 15 |
| I.5.3.3. <i>Pseudomonas</i> .....  | 16 |
| I.5.3.4. <i>Salmonella</i> .....   | 16 |
| I.6. Intoxication alimentaire .....  | 17 |

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| II.1. Objectif de l'étude .....      | 18 |
| II.1.1. Matériel non biologique..... | 18 |
| II.1.2. Matériel biologique.....     | 18 |

## Sommaire

---

|  |    |
|--|----|
| II.2. Méthodes .....   | 18 |
| II.2.1. Echantillonnage .....  | 18 |
| II.2.2. Isolement et dénombrement des <i>Lactobacillus</i> .....                 | 19 |
| II.2.3. Purification des souches .....   | 20 |
| II 2.4. Identification des souches.....  | 20 |
| II.2.4.1. Etude macroscopique.....   | 20 |
| II.2.4.2. Etude microscopique .....  | 20 |
| II.2.5. Conservation des souches isolées .....                                   | 22 |
| II.2.6. Identification biochimique.....  | 24 |
| II.2.6.1. Test de catalase .....   | 24 |
| II.2.6.2. Test d'oxydase .....   | 24 |
| II.2.6.3. Mannitol mobilité .....  | 24 |
| II.2.6.4. Type fermentaire.....  | 25 |
| II.2.7. Identification physiologique .....                                       | 25 |
| II.2.7.1. Croissance à différentes températures .....                            | 25 |
| II.2.7.2. Mesure du pH .....   | 26 |
| II.2.7.3. Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl.....      | 26 |
| II.2.8. Evaluation de quelques caractéristiques technologiques des isolats ..... | 26 |
| II.2.8.1. Thermorésistante.....  | 26 |
| II.2.8.2. Activité protéolytique .....   | 27 |
| II.2.8.3. Résistance au tellurite .....  | 27 |
| II.2.9. Etude de la fermentation des sucres .....                                | 27 |
| II.2.10. Etude de l'effet antibactérien des <i>Lactobacillus</i> .....           | 29 |
| II.2.10.1. Revivification des souches pathogènes .....                           | 29 |

## Sommaire

---

|  |    |
|--|----|
| II.2.10.2. Standardisation des inoculas .....            | 29 |
| II.2.10.3. Méthode de spot.....                          | 29 |
| II.2.10.4. Méthode de diffusion par disques d'agar ..... | 30 |
| II.2.10.5. Méthode de diffusion par puits .....          | 31 |

### **Chapitre III : Résultats et discussions**

|   |    |
|---|----|
| III.1. Isolement et purification.....   | 32 |
| III.2. Pré-identification des <i>Lactobacillus</i> .....                      | 32 |
| III.2.1. Aspect macroscopique.....  | 32 |
| III.2.2. Aspect microscopique .....   | 34 |
| III.3. Caractères, physiologiques, biochimiques et technologiques .....       | 35 |
| III.3.1. Test de catalase.....  | 36 |
| III.3.2. Test d'oxydase.....  | 37 |
| III.3.3. Test de Mannitol mobilité .....                                      | 37 |
| III.3.4. Type fermentaire .....   | 38 |
| III.3.5. Croissance à différentes températures .....                          | 38 |
| III.3.6. Croissance dans des conditions hostiles.....                         | 39 |
| III.3.6.1. Croissance à différents pH .....                                   | 40 |
| III.3.6.2. Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl ..... | 40 |
| III.3.7. Thermorésistante .....   | 41 |
| III.3.8. Activité protéolytique.....  | 41 |
| III.3.9. Résistance au tellurite.....   | 43 |
| III.3.10. Etude de la fermentation des sucres .....                           | 43 |
| III.4. Observation macroscopique et microscopique des souches pathogènes..... | 44 |

## Sommaire

---

III.5. Activité antibactérienne des *Lactobacillus* ..... 45

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Cette présente étude consiste à isoler et identifier des *Lactobacillus* à partir de lait de vache, provenant de la région de BLIDA sur le milieu MRS dont le but d'étudier quelques caractéristiques biochimiques, physiologiques et technologiques. L'effet antagoniste des *Lactobacillus* vis-à-vis d'un groupe de bactéries pathogènes responsables d'altération des produits alimentaires a été également étudié.

Les résultats obtenus semblent plus au moins intéressant, toutes les 04 souches isolées sont signalées mésophiles homo-fermentaires et thermorésistantes. Néanmoins, Seules deux souches (S1 et S2) présentent une activité protéolytique importante (2 à 6 mm) avec une concentration de 1% de lait semi écrémé.

En effet, les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que les 4 souches possèdent une activité variable et parfois absente vis-à-vis des souches testées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella*). Une zone d'inhibition (ZDI) de 24 mm a été enregistrée pour *Pseudomonas aeruginosa* avec la S3 par la méthode de spot, 5 mm pour *Salmonella* avec la S1 par la méthode des disques et 10 mm avec la S2 par la méthode des puits.

Ces résultats incitent l'utilisation des souches sélectionnées appartenant au genre *Lactobacillus* dans l'industrie agroalimentaire comme bio-conservateurs.

**Mots-clés :** Bactérie pathogène, Bio-conservateur, Effet antagoniste, *Lactobacillus*.



This work is based on the isolation and identification of *Lactobacillus* from cow's milk, from the BLIDA region on the MRS medium, the aim of which is to study some biochemical, physiological, technological characteristics. The antagonistic effect to a group of pathogenic bacteria responsible for spoilage of food products has been studied.

The results obtained seem more or less interesting; all 04 strains isolated are reported mesophiles homofermentative and heat resistant. However, only two strains (S1 and S2) show significant proteolytic activity (2 to 6 mm) with a concentration of 1% semi-skimmed milk. Indeed, the results of the antibacterial activity shows that the 4 strains have a variable and sometimes absent activity vis-à-vis the pathogenic strains (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella*) with zones of inhibition (ZDI) 24 mm for *Pseudomonas aeruginosa* with S3 by the spot method, 5 mm for *Salmonella* with S1 by the disc method and 10 mm with S2 by the well method.

These results encourage the use of selected strains belonging to the genus *Lactobacillus* in the food industry can be used as bio-preservatives.

**Keywords:** Antagonistic effect, Bio-preservatives, *Lactobacillus*, Pathogenic bacteria.

يعتمد هذا العمل على عزل وتحديد البكتيريا اللبنية من حليب البقر ، من منطقة البلدية على وسط MRS ، والتي تهدف إلى دراسة بعض الخصائص البيوكيميائية والفسولوجية والتكنولوجية وأنشطتها المضادة للميكروبات. - مجموعة من البكتيريا المسببة للأمراض المسئولة عن تلف المنتجات الغذائية.

تبدو النتائج التي تم الحصول عليها أكثر أو أقل إثارة للاهتمام ، حيث تم الإبلاغ عن جميع السلالات 04 المعزولة من متوسطة متجانسة ومقاومة للحرارة. ومع ذلك ، يظهر سلالتان فقط (سلالة 1 وسلالة 2) نشاط تحلل بروتيني كبير (2 إلى 6 مم) بتركيز 1٪ من الحليب شبه منزوع الدسم. في الواقع ، تظهر نتائج النشاط المضاد للبكتيريا أن السلالات الأربعة لها نشاط متغير وأحياناً غائب مقابل السلالات الممرضة (الاشريكية القولونية والزائفة الزنجارية والسالمونيلا) مع مناطق تثبيط 24 مملزائفة الزنجارية مع السلالة 3 بطريقة البقعة ، 5 مم للسالمونيلا مع السلالة 1 بطريقة القرص و 10 للسلالة 2 بطريقة الحفر.

هذه النتائج التي تم الحصول عليها تشجع على استخدام سلالات مختارة تنتمي إلى جنس العصيات اللبنية في صناعة الأغذية يمكن استخدامها كمواد حافظة حيوية.

**الكلمات المفتاحية :** العصيات اللبنية ، النشاط المضاد للبكتيريا ، المواد الحافظة الحيوية ، التخمر اللبني



# **Introduction**

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec près de à 120 L/an /habitant **(Kacimi-El Hassani, 2013)**. Cet aliment occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, pour sa grande richesse en vitamine et sa composition nutritionnelle équilibrée en protéines **(Senoussi, 2008)**. La microflore du lait de vache est composée essentiellement de bactéries lactiques **(Hermier et al., 1997)**.

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentation. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques (diacétyle, acétaldéhyde et acétate et ce à partir du citrate). La flore lactique fermente les glucides en acide lactique, d'où une diminution du pH favorable à la bio-conservation des aliments **(Alaoui et al., 2016)**.

Les *Lactobacillus* sont ajoutés dans le but d'accélérer le processus de fermentation, d'améliorer les qualités organoleptiques et de réduire les accidents de fabrication **(Larpen et Bourgeois, 1989)**. Ce qui permet de satisfaire les besoins de point de vue sanitaire en industrie alimentaire et d'inhiber la prolifération des micro-organismes pathogènes **(Ross et al., 2002)**. Notamment les *Lactococcus* et *Lactobacillus* sont utilisées pour leur différentes propriétés, elles ont la capacité de produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques, des dérivés du métabolisme à l'oxygène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des substances naturelles de nature protéiques douée d'activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération **(Vinod Kumar et al., 2006)**.

Ceci suggère que les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques fonctionnelles permettent de réduire le nombre d'autres micro-organismes indésirables dans les produits laitiers ainsi d'effectuer un rôle essentiel dans la préservation de produits destinés à la consommation humaine **(Joffraud et al., 2006)**.

La détérioration des aliments constitue un problème important dans toutes les sociétés. Elle peut se produire à n'importe qu'elle stade de la production, du transport, du stockage ou de la préparation. Lors d'une intoxication alimentaire, les micro-organismes se multiplient dans les aliments et produisent des toxines qui affectent alors la santé du consommateur **(Guiraud, 1998 ; Prescott et al., 2003)**.

En Algérie, les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont devenues aujourd'hui un problème de plus en plus préoccupant tant par leur fréquence grandissante que par leur étendue.

Selon le **Relevés Epidémiologiques Mensuels d'Algérie (2017)**, le taux d'incidence des toxi-infections alimentaires collectives a nettement augmenté, passant de 14,92 à 23,03 cas pour 100.000 habitants. De ce fait, il est à noter que cette recrudescence des TIAC survient conjointement aux nouvelles conditions d'industrialisation de l'alimentation, touchant la production, l'équipement des locaux, les diverses manipulations, la distribution, les habitudes culinaires (**Bouza, 2009 ; Diallo, 2010**).

Dans ce contexte, nous avons orienté notre travail dont l'objectif de :

- Isoler, purifier et identifier les souches de ferments lactiques « *Lactobacillus* » à partir du lait de vache. En déterminant les caractéristiques morphologiques biochimiques et technologiques.
- Evaluer le pouvoir antibactérien de *Lactobacillus* sur les bactéries pathogènes responsables d'altération des produits alimentaires.

**Chapitre I.**  
**Synthèse bibliographique**

## I. Généralités sur le lait de vache

### I.1. Définition

Selon le **Codex STAN 206-1999** de la norme Générale pour l'utilisation de termes de laiteries : Le lait est la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur.

Le lait est produit naturellement chez les mammifères femelles, il est sécrété lors de la traite des glandes mammaires et c'est un produit indispensable à l'équilibre de l'alimentation de l'homme et des animaux (**Roudaut et al., 2005**).

Le lait de vache se présente sous forme d'un liquide opaque, de couleur blanche mat légèrement bleutée ou jaunâtre selon la concentration en  $\beta$ -carotènes et en matière grasse, son odeur est peu marquée et un goût douceâtre (**Fredot, 2012**). Le lait de vache contient de nombreux nutriments qui fortifient l'organisme à savoir protéines, glucides, lipides, sels minéraux, vitamines et oligo-éléments (**tableau I**) (**Jensen, 1995**).

**Tableau I** : Composition nutritionnelle moyenne en (%) du lait de vache (**Jensen, 1995**).

| Composants | Lait de Vache (%) |
|------------|-------------------|
| Protéines  | 3.4               |
| Caséines   | 2.8               |
| Lipides    | 3.7               |
| Lactose    | 4.6               |
| Minéraux   | 0.7               |

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 variabilité et une hétérogénéité dans sa nature biologique (**Larpen, 1997**). Le **tableau II** présente les principaux paramètres physico-chimiques du lait de vache.

**Tableau II** : Principales constantes physico-chimiques du lait de vache(FAO, 1990).

| Constantes                                    | Vaches              |
|---|---------------------|
| Energie (Kcal/litre)                          | 705                 |
| Point de congélation (°C)                     | 1,028 – 1,033       |
| Densité du lait entier à 20°C                 | 0,520 – 0,550       |
| pH à 20°C                                     | 6,60 – 6,80         |
| Acidité titrable(°D)                          | 15 – 17             |
| Tension superficielle du lait entier à 15°C   | 50                  |
| Conductivité électrique à 25°C(siemens)       | $45 \times 10^{-4}$ |
| Indice de réfraction                          | 1,45 – 1,46         |
| Viscosité du lait entier à 20°C (centipoises) | 2,0 – 2,2           |

## I.2. Microflore du lait

Dans de bonnes conditions d'hygiène normale, le lait cru renferme de nombreux germes constituant la flore originale. Cette microflore est représentée essentiellement par des Lactobacilles et des Streptocoques lactiques commensaux provenant du pis et des canaux galactophores (Hermier et al.,1997).

Le lait cru peut être contaminé par différents micro-organismes avant, pendant et après la traite, ils peuvent être classés dans les flores suivantes :

### I.2.1.Flore originale

Cette flore est représentée par le lait non contaminé et contient essentiellement des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores: Microcoques, Streptocoques lactiques et Lactobacilles(Guiraud, 1998).

### I.2.2. Flore de contamination

Selon le mode de contamination, cette flore est classée en :

- ✓ La flore issue de contamination fécale qui est dangereuse pour le consommateur c'est le cas de : *Bacillus cereus*, *Clostridium*, *Escherichia coli* et des représentants des genres *Brucella* et *Salmonella*(Bourgeois et al.,1996).

- ✓ Flores psychrotrophes : Il s'agit essentiellement de : *Acinetobacteres*, *Clostridium*, *Pseudomonas* et *Flavobacterium* qui se développent à une température de 3 à 7°C (Leveau et Bouix, 1991). *Listeria monocytogenes* est capable de se multiplier à une température comprise entre 0 et +10°C est qualifiée de ce fait de psychrotrophe (Rosset, 2001).

### I.3. Ferments lactiques

#### I.3.1. Définition

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres (Hadeff, 2012).

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives, généralement nitrate réductase négative, 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 ; Hogg, 2005).

#### I.3.2. Classification

Les bactéries lactiques sont un groupe uni par une constellation de caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. Elles appartiennent à la lignée des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et l'ordre des *Lactobacillales* (Tableau III) (Garrity et Holt, 2001).

Les genres qui étudiés sont : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Bifidobacterium* (Stiles et Holzappel, 1997 ; Ercolini et al., 2001 ; Holzappel et al., 2001).

**Tableau III :** Différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent et al., 1998).

| Genre                  | Morphologie       | Type de fermentation       | Température optimale       | Nombre d'espèces                       |
|------------------------|-------------------|----------------------------|----------------------------|--|
| <i>Lactobacillus</i>   | Bacilles          | Homo ou hétérofermentaires | Thermophiles ou mésophiles | Genre1 :23<br>Genre2 :16<br>Genre3 :22 |
| <i>Lactococcus</i>     | Coques            | Homofermentaires           | Mésophiles                 | 5                                      |
| <i>Streptococcus</i>   | Coques            | Homofermentaires           | Mésophiles ou thermophiles | 19                                     |
| <i>Leuconostoc</i>     | Coques            | Hétérofermentaires         | Mésophiles                 | 11                                     |
| <i>Bifidobacterium</i> | Forme irrégulière | Acide acétique et lactique | Mésophiles                 | 25                                     |

### I.3.3. Habitat

Les bactéries lactiques sont très abondantes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, de végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Hadeif, 2012).

### I.3.4. Voies fermentaires des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres. Il s'agit des voies homofermentaires (Embden-Meyerhoff- Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate). Ainsi, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces homo ou hétérofermentaires selon la nature et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation du glucose (Makhloufi, 2012).

#### I.3.4.1. Voie homo-fermentaire

Comprend les espèces de *Streptococcus sp*, *Enterocoques sp*, *Lactococcus sp*, *Pédiococcus sp* et *Lactobacillus sp*. Ils convertissent le glucose en acide lactique (Djidel, 2007). 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. Lafructose-1,6-



bisphosphatealdolase (FBA), est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP(Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

#### **I.3.4.2. Voie hétéro-fermentaire**

Représenté par les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites hétéro-fermentaires. Les principaux groupes de bactéries pour ce type de métabolisme sont les *Leuconostocs* et certains *Lactobacilles*. Ces microorganismes utilisent la voie des pentoses phosphate (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

#### **I.3.5. Intérêt de la fermentation lactique**

La fermentation lactique sert à augmenter la stabilité du produit, par inhibition des altérations microbiennes et enzymatiques éventuelles et, par conséquent, d'allonger sa durée de conservation. Elle permet également d'obtenir des produits sains, c'est-à-dire exempts de micro-organismes pathogènes. Enfin, elle confère aux produits obtenus des propriétés nutritionnelles et organoleptiques particulières (texture, arômes, saveur)(Beal *et al.*,2003).

#### **I.3.6. Application des ferments lactique dans l'industrie agroalimentaire**

Les ferments lactiques, contenant une ou plusieurs cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques, sont largement utilisés en agroalimentaire (Holzapel, 2002).

Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et augmenter la durée de conservation (Djadouni, 2013).

Les bactéries lactiques sont la base de la fabrication des différents produits alimentaires tels que les produits laitiers (yaourt, fromage, ...), les produits carnés, et les produits végétaux, aussi elles procurent une meilleure conservation pour ces denrées alimentaire. Ainsi elles sont dotées de plusieurs pouvoirs (Boumediene, 2013).

L'effet conservateur des LAB (bactéries lactiques) est souvent dû à la capacité à produire des composés inhibiteurs, y compris le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, les acides organiques (acide lactique et acétique), le dioxyde de carbone, les bactériocines ou les substances analogues aux antibiotiques (Ngozi, 2017).

## I.4. *Lactobacillus*

### I.4.1. Définition des *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus*, qui contient près de 80 espèces, représente la plus grande famille de bactéries lactiques (Wilson *et al.*, 2008). Les lactobacilles sont des bactéries lactiques ubiquitaires qui colonisent beaucoup d'habitats (Tableau IV). Ce sont des bactéries Gram<sup>+</sup>, asporulées, immobiles, en forme de bacilles isolés ou groupés en paires ou en chaînettes. Elles forment des colonies de petites tailles, lisses, brillantes non pigmentées et souvent opaques (Hammes *et al.*, 2009).

Les *Lactobacillus* ont un métabolisme énergétique saccharolytique où le lactate est l'acide organique majoritaire (De Vuyst et Vandamme, 1994). Il regroupe des espèces présentant des caractères phénotypiques très hétérogènes, cette hétérogénéité est due à un GC% allant de 32-55% (Axelsson, 2004 ; Felis et Delaglieo, 2007).

**Tableau IV:** Habitats de *Lactobacillus* (Hammes *et al.*, 2009).

| Habitat/Produit   | Espèces rencontrées   |
|---|---|
| Matériel végétal en décomposition (Cornichons, ensilage et choucroute). | <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> ,<br><i>Lb. acidophilus</i> .   |
| Laiterie (Fromage, yaourt, etc.)  | <i>Lb. delbrukii</i> , <i>Lb. Lactis</i>  |
| Tractus gastro-intestinal des animaux.                                  | <i>Lb. salivrus</i> , <i>Lb. gasseri</i> ,<br><i>Lb. rhamnosus</i> .<br><i>Lb. casei</i> , <i>Lb. Plantarum</i> |
| Vagin des mammifères  | <i>Lb. vaginalis</i>  |

### I.4.2. Systématique de *Lactobacillus*

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. Ils appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* (De Vos *et al.*, 2009).

### I.4.3. Application des *Lactobacillus*

#### I.4.3.1. Application dans l'alimentation humaine

Les *Lactobacillus* mésophiles, bien qu'ayant seulement une influence relativement faible sur la protéolyse de certains aliments comme le fromage, ont la capacité d'influencer de manière significative certains attributs importants comme l'arôme et la saveur (Lynch et al., 1999).

Certaines espèces et sous-espèces du groupe *Lactobacillus delbrueckii* comme *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* sont des bactéries des yaourts et des laits fermentés (Collins et al., 1989).

Les cultures de pain de levain contiennent des bactéries d'acides lactiques qui ont la capacité d'inhiber la croissance de certaines moisissures (Magnusson et Schnurer, 2001).

Les arômes des fromages fabriqués à base du lait bovin avec les souches de lactobacilles sont différentes que ceux sans l'ajout de lactobacilles. Ces fromages présentent aussi des caractéristiques sensorielles supérieures comme ils ont un goût aromatique et sucré sans amertume (Thage et al., 2004). *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* et *Lactobacillus helveticus*, deux lactobacilles des levains sont utilisés dans la fabrication des fromages à pâte pressée cuite (Collins et al., 1989).

#### I.4.3.2. Application dans l'alimentation animale

Ajouté à l'alimentation des chevaux, ces cultures peuvent activer le système immunitaire, diminuer la reproduction de micro-organismes pathogènes, réduire l'influence des substances pro-carcinogéniques qui peuvent être produites pendant certains processus digestifs à activités enzymatiques des micro-organismes dans le côlon (Supuková et al., 2010).

*Lactobacillus paracasei* du lait fermenté diminue le niveau excessif de cholestérol du sang total chez les lapins. Des résultats semblables ont été constatés chez les rats (Dilmi Bouras et al., 2007).

Elles sont aussi appliquées en alimentation porcine et avicole. Elles permettent l'engraissement des animaux, jouent un rôle de régulateurs métaboliques, immunomodulateurs, détoxifiants, contrôleurs de contaminations microbiennes, améliorateurs de la valeur nutritionnelle, additifs sensoriels et séquestrants de mycotoxines (Bernardeau et al., 2009).

### I.4.3.3. Applications des *Lactobacillus* en tant que probiotiques

Le tableau ci-dessous présente les différents effets des *Lactobacillus* probiotiques sur la santé humaine

**Tableau V** : Différents effets des lactobacilles probiotiques sur la santé humaine (FAO/OMS, 2001 ; WGO, 2008).

| Effet probiotique                       | Mode d'activité proposé   |
|---|---|
| Réduction des risques des diarrhées     | -Résistance à la colonisation des pathogènes.<br>-Stimulation du système immunitaire.   |
| Diminution des allergies alimentaires   | -Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité membranaire intestinale.<br>-Stimulation du système immunitaire   |
| Amélioration de la digestion du lactose | -Action de la $\beta$ galactosidase dans l'intestin grêle   |
| Traitement des maladies inflammatoires  | -Modulation de la flore intestinale.<br>-Stimulation du système immunitaire.  |
| Réduction du cholestérol                | -Assimilation du cholestérol.<br>-Déconjugaison des sels biliaires.   |
| Prévention du cancer du côlon           | -Stimulation du système immunitaire.<br>-Production de composés antimutagéniques<br>-Modulation des enzymes fécales carcinogéniques.<br>-Dégradation des carcinogènes.<br>-Élimination des bactéries impliquées dans la production de carcinogènes. |

### I.4.4. Pouvoir antimicrobien des *Lactobacillus*

L'activité antimicrobienne des *Lactobacillus* est due à la production de plusieurs substances comme : les acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide formique), le peroxyde d'hydrogène et le dioxyde de carbone. L'inhibition peut être aussi due à la production de bactériocines (Nissen-Meyer *et al.*, 1997).

#### **I.4.4.1. Production des acides organiques**

Grâce à la production des acides organiques, en particulier l'acide lactique et l'acide acétique, les lactobacilles diminuent le pH du milieu, dans lequel ils se multiplient, en inhibant la croissance d'une autre partie de la flore qui s'y développe comme les bactéries pathogènes dans les produits alimentaires fermentés, le tube digestif et le tractus génital humain et animal **(Zalanetal., 2010)**.

Cependant, certaines bactéries pathogènes peuvent développer certains mécanismes de résistance appelés « la réponse de tolérance aux acides » dû à l'exposition longue à des pH acides. Ce mécanisme de résistance leur permet de survivre durant le transit intestinal **(Dortu et Thonart, 2009)**.

#### **I.4.4.2. Production de diacétyle**

Le diacétyle est produit suite à la dégradation du citrate, il est synthétisé par différentes espèces de bactéries lactiques appartenant à plusieurs genres comme *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. Il présente des propriétés antimicrobiennes contre les levures, les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif non lactiques. La concentration nécessaire à l'obtention d'une inhibition dépend essentiellement du microorganisme cible **(Dortu et Thonart, 2009)**.

#### **I.4.4.3. Production de dioxyde de carbone**

Le CO<sub>2</sub> est formé pendant la fermentation hétérofermentaire, il crée un environnement anaérobie qui inhibe les micro-organismes aérobies. L'accumulation du CO<sub>2</sub> dans la bicouche lipidique peut provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire **(Dortu et Thonart, 2009)**.

#### **I.4.4.4. Production d'autres composés organiques de faible poids moléculaire**

Plusieurs composés organiques de faible poids moléculaire doués d'activité antibactérienne sont produits par les lactobacilles comme la reutérine qui inhibe les enzymes à groupement thiol. Elle présente un large spectre d'activité qui inclue des bactéries, des champignons et des protozoaires **(Ganzleetal., 2000)**.

#### **I.4.4.5. Bactériocines**

Le terme « bactériocine » est employé pour la première fois par **Jacob et al. (1953)** pour les peptides à spécificité importante, produits par certaines souches et actifs contre les souches de la même espèce. La première bactériocine, nommé la colicine était produite par *Escherichia coli* S(**Gratia, 1925**).

Les *Lactobacillus* sont connus par leur production de bactériocines ayant une activité antibactérienne sur des espèces souvent proches à l'espèce productrice. Cette dernière produit une protéine d'immunité pour se protéger des effets délétères de la bactériocine qu'elle produise (**Klaenhammer, 1993**).

Les bactériocines peuvent avoir trois types d'effets :

- ❖ Effet bactériostatique : se manifeste par un ralentissement ou arrêt de la croissance telle que la lactocine 27(**Piard et al., 1992**).
- ❖ Effet bactéricide : se traduit par une perte de la viabilité avec une lyse cellulaire telle que la nisine et la curvacine IFPL 105 (**Casla et al., 1996**).
- ❖ Effet bactéricide sans lyse cellulaire telle que la pédiocine SII (**Schved et al., 1994**).

#### **I.5. Altération microbiennes des aliments**

La contamination des denrées alimentaires peut être à l'origine d'une altération du produit, traduit par une modification de ses caractéristiques organoleptiques et de sa qualité sanitaire (**Cuq, 2007**). Les activités bactériennes ont une grande incidence sur la qualité intrinsèque et donc commerciale des produits qui peut être améliorée ou abaissée sur la qualité hygiénique.

##### **I.5.1. Différents types d'altérations**

De nombreux types d'altérations des denrées alimentaires dues à l'action des bactéries et d'autres facteurs. Selon les cas, la nature et la composition de l'aliment, la consistance, la couleur, l'aspect, l'odeur et la saveur du produit peut être affectée. Il existe en effet plusieurs types d'altérations (**Guiraud, 1998**).

**I.5.1.1. Altération physique**

Chocs, blessures, changements d'état, variation de la teneur en eau, changement de couleur. Les modifications de la consistance du produit, notamment par production d'exopolysaccharides à l'origine par exemple d'une consistance filante des laits décrite avec les genres *Micrococcus* et *Alcaligenes* (Guiraud, 1998).

**I.5.1.2. Altération chimique et biochimique**

Oxydation (rancissement) par les enzymes (brunissement enzymatique, lyses, destruction des vitamines et de certains nutriments). Cette altération engendre l'apparition de colorations, d'odeurs et de saveurs anormales. Il existe aussi une altération par protéolyse et lipolyse.

- La protéolyse conduit à la formation d'acides aminés libres et volatiles puis de produits de leur décarboxylation ou de leur désamination qui sont à l'origine d'odeurs et de saveurs désagréables (*Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bacillus* et les entérobactéries) (Cuq, 2007).
- Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *St. thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal et al., 2008).

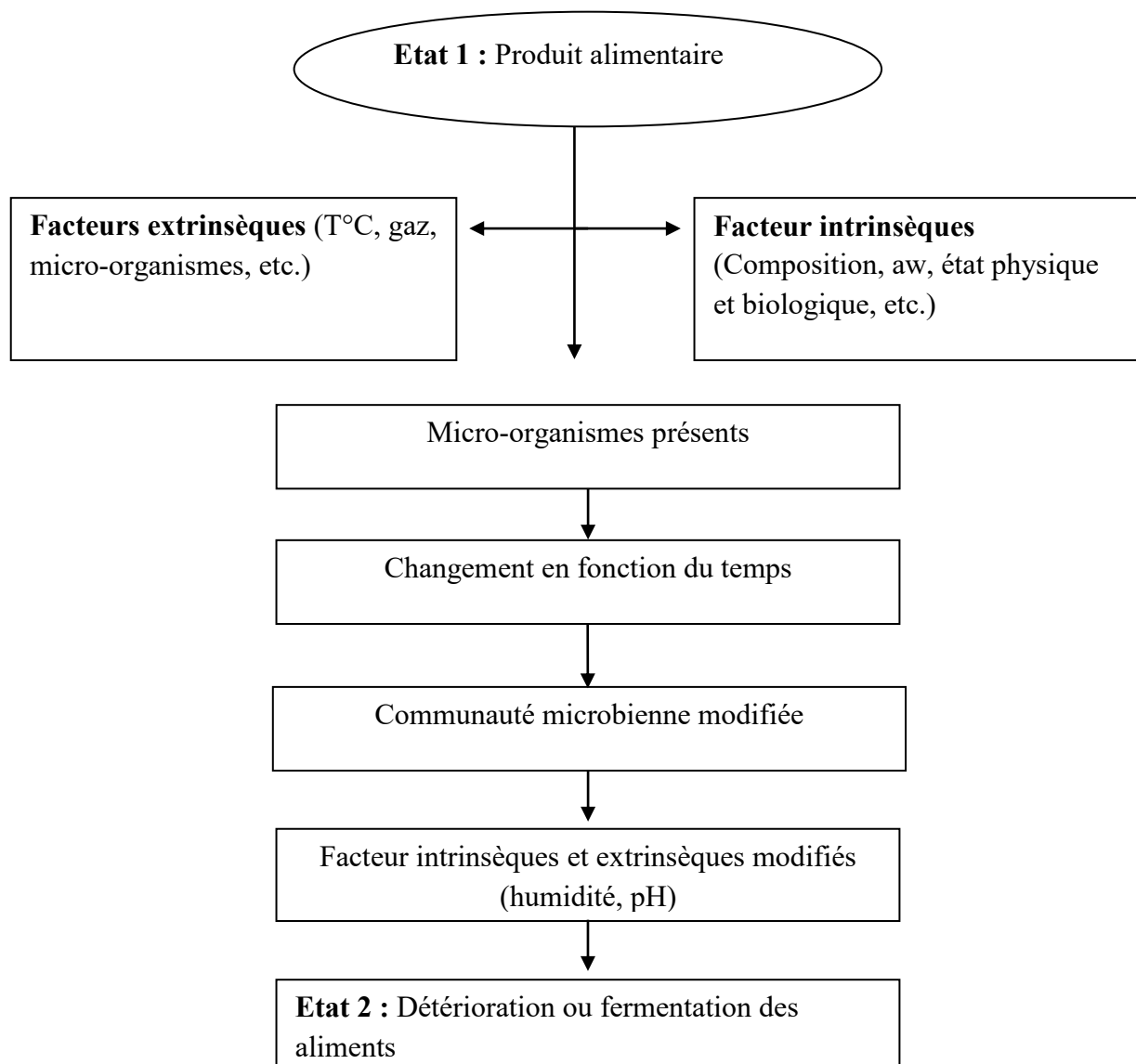
Mais il est à noter que l'hydrolyse des lipides comme origine d'une grande diversité de composés volatils rencontrés dans les produits laitiers peut entraîner l'apparition de flaveur rance, d'amertume ou de goût de savon (Molimard et al., 1997). Les acides gras volatils à chaîne courte sont responsables de l'arome rance du lait (El Soda et al., 1995).

**I.5.1.3. Altération microbienne**

Les phénomènes d'acidification, par fermentation des sucres, activité caractéristique du groupe des bactéries lactiques, soit les genres *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus*. Lors de processus hétéro-fermentaire, la formation de gaz, d'aldéhydes et de cétones est à l'origine de modifications du goût et de l'odeur du produit. (Bornert, 2000).

### I.5.2. Facteurs d'altération des aliments

Le schéma suivant (figure 1) résume les facteurs extrinsèques (température, condition environnementales, etc) ainsi que les facteurs intrinsèques en relation avec le produit alimentaire (composition,  $A_w$ , état physique, etc.). Ces facteurs sont en interaction en modifiant la flore initiale et les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des produits alimentaires, ce qui provoque une altération alimentaire.



**Figure 1 :**Facteurs intrinsèques et extrinsèques (Prescott et *al.*,2010 ; Boudjema, 2015).



### I.5.3. Bactéries pathogènes responsables d'altération d'aliments

#### I.5.3.1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* appartient à la famille des *micrococaceae*. Trente-deux (32) espèces ont été individualisées ; le critère de leur classification est la production de coagulase. Seules trois espèces peuvent coaguler le plasma de lapin oxalate : *S. aureus*, *S. intermedius* et *S. hyicus*, qui sont considérées comme potentiellement pathogènes.

En ce qui concerne *S. aureus*, il s'agit de cocci à Gram positif, le plus souvent disposé en grappes, non sporulés, immobiles, coagulase positive, catalase positive, ayant un métabolisme fermentatif. C'est un germe mésophile, sa plage de multiplications comprise entre 4°C et 46°C. C'est également une bactérie aéro-anaérobie facultative mais qui préfère le métabolisme aérobie. *S. aureus* accepte un large éventail de pH allant de 5 à 9. Il accepte également une Aw égale à 0.90. C'est un germe halophile résistant à des teneurs en sel de 7 à 15% (Fosse et Magras, 2004).

Les toxi-infections à *S. aureus* sont en réalité des intoxications dues à l'ingestion d'aliments dans lesquels une souche de *S. aureus* s'est multipliée et a produit une ou plusieurs entérotoxines. Les symptômes les plus fréquemment observés lors de ces intoxications sont des vomissements violents et répétés, des nausées, des diarrhées aqueuses et des douleurs abdominales (Federighi, 2005).

#### I.5.3.2. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est un bacille ou colibacille Gram négative de la famille des *Enterobacteriaceae*, oxydase négative, catalase positive, sporulés. Ces bactéries réduisent les nitrates en nitrites, elles fermentent le glucose et sont anaérobie facultatives ;se multiplient facilement sur milieu ordinaire à pH neutre à une température de 37°C, ce sont des hôtes naturels de l'intestin de l'homme et des animaux et sont responsables d'intoxication alimentaire à cause d'un développement rapide et se sont des contaminants alimentaires très fréquent (contamination fécale directe ou indirect). (Joseph, 2003).

Etant l'espèce bactérienne anaérobie facultative prédominante dans l'intestin et les fèces, la présence d'*E.coli* dans les aliments et l'eau est considérée comme une indication de contamination fécale. La contamination a lieu le plus souvent lors de la production et de la

transformation d'aliments crus d'origine animale, ou indirectement, via la contamination par de l'eau contaminée (**Feng, 2001 ; Ray, 2001 ; Eslava et al.,2003**).

#### **I.5.3.3. *Pseudomonas***

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négative aérobies, non capsulés, non sporulés, mobiles (plusieurs flagelles polaires), mésophiles, producteurs de pigment fluorescents (fluorescéine) ou pas (pyocyanine, pyorubine genre est capable de synthétiser le film bactérien (**Carip,2008**).

C'est une bactérie saprophyte d'eau, ubiquitaire de l'environnement humide, son réservoir naturel est le sol, les lacs, les rivières, l'eau polluée, les piscines et les jacuzzis (**Green et al., 1974 ; Floret, 2009**).La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est omniprésente dans l'environnement, on la trouve dans de très nombreux milieux : végétaux, poussières, aliments crus (particulièrement les légumes : tomates, carottes, céleris) et même parfois commensale du tube digestif de l'homme (**Leclerc, 2002**).

#### **I.5.3.4. *Salmonella***

Les bactéries de genre *Salmonella* appartiennent à la famille des *Entérobacteriaceae*, bacilles à Gram négatif, mobiles grâce à une ciliature péritriche ou immobiles, aéro-anaérobies facultatifs(**Bourgeois et al.,1996**).Les salmonelles survivent très bien aux basses températures (réfrigération, congélation) mais sont relativement sensibles à la chaleur et sont détruites par la pasteurisation(**Sutra et al., 1998**).

Les infections à *Salmonella* représentent actuellement la cause la plus fréquente de diarrhée aiguë bactérienne d'origine alimentaire ; parmi les salmonelloses humaines on peut distinguer deux groupes nosologiques essentiels :

- a) Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes dues à des sérovars strictement humains : *S.typhi*, *S.paratyphi*A et B.
- b) Les toxi-infections alimentaires et gastroentérites aiguës : dues à des sérovars ubiquitaires (**Haslay, 1993**). Cependant, toute *Salmonella*, quel que soit son sérovar, peut être responsable de toxi-infections.

### **I.6. Intoxication alimentaire**

L'intoxication alimentaire ou les empoisonnements alimentaires est une maladie courante **(Morere, 2015)** généralement bénigne mais qui, parfois, peut être mortelle. Elle se produit lorsqu'une personne absorbe un aliment ou une boisson contaminée par une bactérie ou une toxine. Il peut arriver, très rarement, que les toxines provenant de produits chimiques ou de pesticides causent une intoxication alimentaire **(Schlundt et al., 2010)**.

Les micro-organismes sont présentes partout dans notre environnement (air, alimentation, surfaces des objets, etc.), certains sont utiles et ne présentent pas des risques pour les consommateurs (*Lactobacillus*), mais d'autres sont une source de contamination de nombreux produits alimentaires (*Salmonella*) **(Borges, 2014)**.

En Algérie, la toxi-infection alimentaire est inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire (Arrêt ministériel du 17 novembre 1990) **(Ziane, 2015)**.

En 2017, pour les neuf premiers mois 6650 personnes ont été touchées sur le territoire national, dont 4846 cas enregistrés au niveau de la restauration collective, des fêtes familiales et des repas familiaux. Les wilayas les plus touchées par les intoxications alimentaires, Blida (la commune de Guerouaou) qui vient en « tête » avec 933 cas (15,50%), Médéa 368 (6,11%), Constantine 328 (5,44%) et Batna 317 (5,26%) **(Maouchi, 2018)**.

# **Chapitre II.**

## **Matériel et Méthodes**

## II.1.Objectifs de l'étude

Notre travail est réalisé au niveau de laboratoire d'hygiène de Blida pour une durée prévue de 3mois du 01-02-2020 au30-04-2020.

L'objectif de ce travail est d'isoler les ferments lactiques (*Lactobacillus*) à partir de lait de vache. Les *Lactobacillus* isolés ont fait l'objet d'une identification biochimique et d'une évaluation du pouvoir antagoniste sur des souches pathogènes responsables d'altération des produits alimentaires.

### II.1.1.Matériel non biologique

Le matériel non biologique (équipements, composition des milieux de culture, réactifs) utilisé dans cette étude est décrit en **Annexe II**.

### II.1.2. Matériel biologique

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

- Lait de vache
- Souches bactériennes d'origine alimentaire déjà isolées et identifiées par le laboratoire d'hygiène de Blida (**voir tableau VI**).

**Tableau VI:** Nature et origine de différentes souches pathogènes utilisées.

| Souches                       | Source (aliment contaminé)         |
|-------------------------------|------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>       | Eau de source (C. Chiffa ,W.Blida) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |                                    |
| <i>Salmonella</i>             | Sandwich de poulet (Restaurant)    |

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Echantillonnage

L'échantillon de lait a été aseptiquement prélevé à partir d'une vache, et qui a été collecté dans une ferme El Aichi située dans la région de Guerouaou de BLIDA(**figure 2**).Le pis et la mamelle ont été nettoyés à l'eau javellisée. La traite est réalisée après lavage soigné des mains et aseptisation. Le lait a été recueilli dans deux flacons en verre de 250ml stérile, après avoir éliminé quelques jets. L'échantillon est soigneusement étiqueté (lieu, date de prélèvement et origine, etc.) et acheminé directement au laboratoire dans une glacière à 4°C .



**Figure 2:** Site de prélèvement du lait de vache de la ferme de Guerouaou Blida.

### II.2.2. Isolement et dénombrement des *Lactobacillus*

Pour l'isolement et le dénombrement des *Lactobacillus*, nous avons mélangé 25ml de l'échantillon de produit laitier avec 225ml de l'eau physiologique à l'aide d'une seringue stérile (Figure 1, Annexe I). Après homogénéisation, une série de dilution décimale de 1/10 jusqu'à  $10^{-5}$  a été préparée à partir de cette solution mère, en utilisant de l'eau physiologique selon la formule suivante :

$$\text{Loi de dilution : } \frac{\text{Volumed'inoculum}}{\text{volumetotal}} = \frac{1\text{ml}}{1\text{ml}+9\text{ml}} = \frac{1}{10} \text{ml} = 10^{-1}\text{ml}$$

Un volume de 1ml de chaque dilution a fait l'objet d'un ensemencement sur gélose Man Rogosa Sharpe (MRS) à raison de 2 boites par dilution, qui sont par la suite incubées en anaérobiose à 37°C pendant 72h.

### II.2.3. Purification des souches

La purification des *Lactobacillus* a été réalisée alternativement sur gélose et bouillon MRS à pH 5,4 afin de s'assurer la pureté des cultures (colonies identiques).

Après repiquages successives, nous avons choisi les colonies en catégories en fonction de leur aspect microscopique (mode d'association), coloration de Gram et test de catalase. Dans chaque catégorie, un choix aléatoire d'une colonie représentative a été réalisé parmi celles observées pour la réalisation des premiers tests d'identification.

### II. 2.4. Identification des souches

Nous avons effectué un examen macroscopique, microscopique suivi par des tests biochimiques classiques pour une éventuelle identification.

#### II.2.4.1. Etude macroscopique

C'est une observation visuelle des colonies sur la surface des milieux MRS et M17 solides, pour caractériser leurs formes, leurs tailles, leurs contours et leurs couleurs (**Badis et al., 2005**).

- ❖ La forme des colonies : bacille, circulaire, irrégulière, fusiforme, etc.
- ❖ La taille des colonies par la mesure du diamètre.
- ❖ L'élévation: bombée, plate, élevée, convexe, bossue.
- ❖ Couleur : crème , blanche.
- ❖ Bord : arrondi , ovale.
- ❖ La surface: lisse, rugueuse, brillante.

#### II.2.4.2. Etude microscopique

L'observation microscopique au grossissement X100 permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire ,leur mode d'association (**Joffin et Leryal ,1996**).

Nous avons effectué un état frais pour déterminer la forme et la mobilité des cellules des bactéries lactiques utilisées suivi par la coloration de Gram (état fixé).

Préparation de la suspension bactérienne : Un tube de 3ml de bouillon MRS a été inoculé par une colonie, en incubant à 37°C pendant 24 à 48h, jusqu'à l'apparition d'un trouble bactérien.

**a) Etat frais**

Une goutte de la suspension bactérienne de chaque souche est mise entre lame et lamelle est observée au microscope au grossissement X40 afin de vérifier la mobilité et forme.

Une autre goutte de la suspension bactérienne est mise entre lame et lamelle après avoir additionnée de 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 souches utilisées.

**b) Etat fixé (Coloration de Gram)**

La coloration de Gram est une coloration classique en microbiologie. Elle permet de distinguer deux (2) types de bactéries, les bactéries Gram négatives (G -)et les bactéries Gram positives (G+).Celles-ci diffèrent par la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane ou par la présence d'une membrane externe(**Larpent et Larpent, 1990 ; Tortora et al., 2003**).

**b.1) Réalisation de frottis**

Dans des conditions aseptiques, une goutte de la suspension bactérienne (tube repiqué)a été prélevée et déposée au centre de la lame. Un étalement mince est réalisé à l'aide d'une pipette stérile, suivi par un séchage en portant la lame au-dessus de la flamme du Bec Bunsen.

**b.2) Coloration de Gram(Baldent, 1997 ).**

Pour ce fait, nous avons :

- ✓ Plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute.
- ✓ Laver la lame à l'eau distillée.
- ✓ Plonger la lame dans une solution de Lugol pendant 1 minute.
- ✓ Laver à l'eau distillée.
- ✓ Décolorer dix secondes à l'alcool.
- ✓ Rincer immédiatement à l'eau distillée.
- ✓ Plonger la lame dans la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 1 minute.
- ✓ Laver la lame à l'eau distillée.
- ✓ Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph.

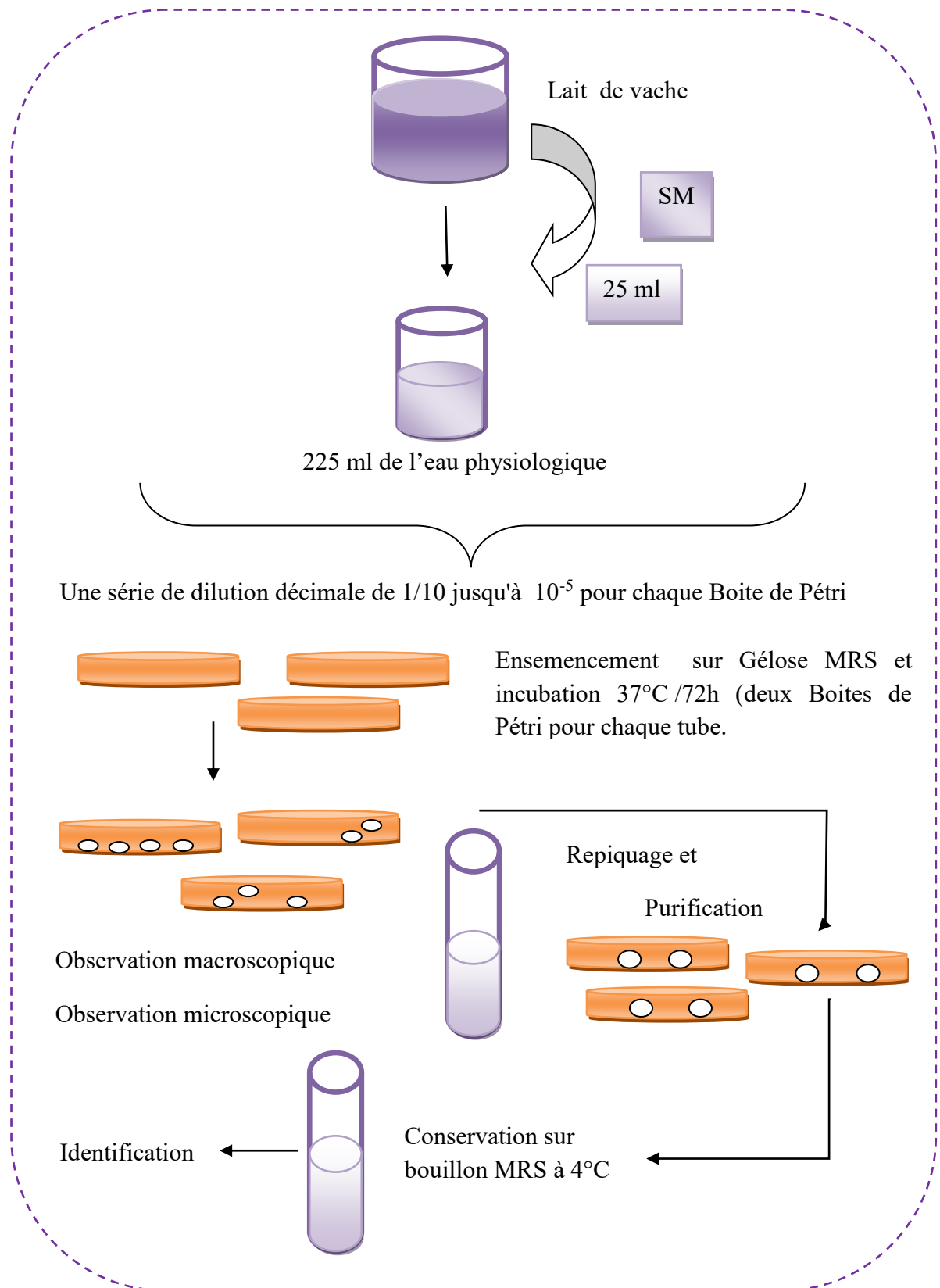


Pour l'observation microscopique (GX100), avec une goutte d'huile d'immersion. En notant que les bactéries à Gram + apparaissent d'une couleur violette et en rose pour les bactéries à Gram-.

### **II.2.5. Conservation des souches isolées**

Nous avons appliqué la méthode de conservation citée par **Guiraud (2003)**, les souches pures des *Lactobacillus* ont été isolées et ensemencées dans des tubes de bouillon MRS. Après incubation à 37°C, les tubes ont été conservés à 4°C et le renouvellement des souches se fait toutes les 4 semaines.

La(**Figure 3**)présente un schéma recapulatif sur l'isolement des *Lactobacillus* isolées du lait de vache.



**Figure 3 :** Schéma illustratif des étapes de l'isolement.

### II.2.6. Identification biochimique

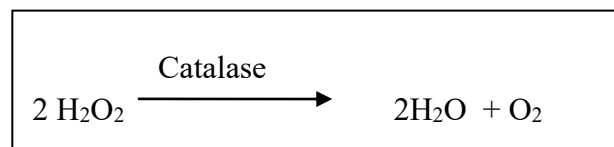
L'identification des *Lactobacilles* est effectuée par des tests biochimiques classiques qui sont :

#### II.2.6.1. Test de catalase

- **Principe**

L'enzyme catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) qui résulte de l'oxydation mise en évidence par contact de la culture bactérienne avec l'eau oxygénée (Guiraud, 2003).

Selon la réaction suivante :



- **Technique**

Une goutte de  $H_2O_2$  est déposée sur une lame qui contient une colonie prélevée à partir de la gélose MRS. La décomposition de  $H_2O_2$  est traduite par un dégagement gazeux sous forme de mousse et de bulles (Guiraud, 2003).

#### II.2.6.2. Test d'oxydase

- **Principe**

Il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral (Joffin et Leyral, 2005).

- **Technique**

A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée une colonie est déposée sur des disques imprégnés du réactif oxalate de N-diméthyl-paraphénylène-diamine de couleur rose. Si la couleur du disque vire vers un violet noirâtre, il s'agit de bactéries oxydase positive (Joffin et Leyral, 2005).

#### II.2.6.3. Mannitol mobilité

- **Principe**

Ce test permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. La fermentation du mannitol se traduit par virage de la couleur du milieu du rouge au jaune. Les bactéries mobiles se déplacent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble dans

le milieu, alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (Gerhardt *et al.*, 1994).

- **Technique**

Nous avons ensemencé des souches de *Lactobacillus* par piqûre centrale jusqu'au fond de la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur suivie d'une incubation à 37°C pendant 24h.

#### II.2.6.4. Type fermentaire

- **Principe**

Ce test permet de différencier entre les bactéries lactiques homofermentaires et hétérofermentaires (production du gaz CO<sub>2</sub>) (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 (CO<sub>2</sub>) à côté de l'acide lactique (Devos *et al.*, 2009 ; Nanatani et Abe, 2011).

- **Technique**

Les souches ont été ensemencées dans des tubes contenant chacune 10 ml du bouillon lactosé au BromoCrésol Pourpre (BCPL) et une cloche de Durham. Après incubation à 37°C pendant 24h à 48h, le CO<sub>2</sub> produit par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans les cloches de Durham (Copolla *et al.*, 1997).

#### II.2.7. Identification physiologique

##### II.2.7.1. Croissance à différentes températures

- **Principe**

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Leveau *et al.*, 1991). La croissance des isolats a été testée à des températures croissantes (4°C, 37°C et 44°C) (Badis *et al.*, 2005).

- **Technique**

Nous avons inoculé du bouillon MRS par des cultures fraîches de *Lactobacillus*, les cultures ont été incubées à différentes températures (4°C, 37°C et 44°C) pendant 24 à 48h.

La croissance se traduit par l'apparition d'un trouble dans le milieu (Guiraud et Galzy, 1980).

### II.2.7.2. Mesure du pH

- **Principe**

Ce test est réalisé en bouillon MRS dont le pH est ajusté à 9,6. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 72 heures en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (Guiraud, 2003).

- **Technique**

Nous avons mesuré le pH de notre bouillon MRS, après, l'ajusté à pH=4 avec une quantité du bouillon MRS suffisante pour l'ensemencement des souches de *Lactobacillus* (Figure 2, Annexe I). Pour diminuer le pH à 4, nous avons ajouté quelques gouttes de HCl. Une autre quantité du bouillon MRS est ajusté après à 9,6 en ajoutant du NaOH (Guiraud, 2003).

### II.2.7.3. Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl

Le bouillon MRS est additionné de 2%, 4% et 6.5% de NaCl, puis il est réparti en tubes et ensemencé par les souches lactiques isolées. Le résultat obtenu après incubation à 37°C pendant 24h à 48h est considéré comme positif s'il y a apparition de trouble (Badis et al., 2005).

## II.2.8. Evaluation de quelques caractéristiques technologiques des isolats

### II.2.8.1. Thermorésistance

- **Principe**

Ce test permet de sélectionner les espèces thermorésistantes (Badis et al., 2005).

- **Technique**

Des tubes contenant du bouillon MRS sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30min, après refroidissement brusque, ils sont incubés à 37°C pendant 48 à 72h. Un résultat positif se traduit par un trouble bactérien (Badis et al., 2005).

### II.2.8.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des souches isolées a été révélée sur milieu MRS contenant 1%(m/v) de lait semi écrémé en utilisant la méthode de spots (**Figure 4**).Un volume de 5µl d'une culture fraîche de chaque souche a été déposé en spots puis les boites ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48h. La protéolyse se manifeste par une zone claire autour des spots(**Moulay et al., 2006**).



**Figure 4** :Test de l'activité protéolytique des souches de *Lactobacillus*.

### II.2.8.3. Résistance au téllurite

La résistance au téllurite a été recherchée en utilisant la gélose MRS additionnée à 0,4% de téllurite(**Figure3,Annexe I**). Les souches ont été ensemencées par strie sur la surface du milieu, ensuite elles ont été incubées à 37°C pendant 24h.Celles qui donnent des colonies noires après l'incubation sont considérées résistantes aux téllurite(**Facklam, 1972**).

### II.2.9.Etude de la fermentation des sucres

Nous avons fait l'étude de la fermentation des sucres par la galerie API20E. Cette galerie comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydraté, et dont seront inoculés par la suspension bactérienne de la souche à tester (S2).Malgré que ce type de galerie soit recommandé pour l'identification des entérobactéries, elle a été employée dans le but de profiter de certains tests biochimiques qu'elle contient, ces tests sont :

- ✓ L'arginine dihydrolase (ADH),
- ✓ L'utilisation du citrate (CIT),
- ✓ Réaction de Voges-Proskauer (VP),
- ✓ Liquéfaction de la gélatine (GEL),
- ✓ Réduction du nitrate (GLU) après l'ajoute des deux réactifs : Nitrite 1 et Nitrite 2.
- ✓ **La dégradation des sucres** : Glucose (GLU), Mannose (MAN), Inositol(INO), Sorbitol (SOR), Rhamnose (RHA), Saccharose (SAC), Melibiose (MEL), Amygladine (AMY), Arabinose (ARA).

### Technique

- Préparation de la galerie : Elle consiste à remplir avec de l'eau distillée stérile les alvéoles de la boîte d'incubation afin de créer une atmosphère humide, ensuite y déposer stérilement la galerie.
- Préparation de l'inoculum : 2 à 3 colonies de la souche (S2) ont été dissociées dans un tube contenant 5ml d'eau physiologique pour créer une suspension bactérienne très dense.
- Ensemencement de la galerie : la suspension bactérienne a été introduite dans les micro-tubes de la galerie par une pipette Pasteur stérile en évitant la formation des bulles d'air, et suivant les instructions suivantes :
  - ✓ Remplir avec la suspension le tube et la cupule pour les trois tests CIT, VP, GEL. Et remplir uniquement le tube pour les autres tests.
  - ✓ Recouvrir la suspension avec l'huile de paraffine pour le test d'ADH,
  - ✓ Incubation de la galerie pendant 24h à 37°C.
  - ✓ Lecture des résultats a été faite par observation du virage de couleur pour chaque test directement après incubation, ou indirectement révélée après 10 min d'ajout du réactif pour les 2 tests suivants :
    - Test VP : ajout d'une goutte de VP1 et de VP2.
    - Test GLUC : ajout d'une goutte de Nitrite 1 et de Nitrite 2.

### II.2.10. Etude de l'effet antibactérien des *Lactobacillus*

Ce test permet d'étudier la capacité des *Lactobacillus* à inhiber les souches pathogènes d'origine alimentaire (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella*)celles recommandées par JORA (2017). L'activité antibactérienne est réalisée par la méthode directe de double couche et par diffusion sur milieu gélosé. Cette dernière a été réalisée par les deux méthodes indirectes des puits et des disques.

Au préalable, une revivification des souches pathogènes, et une standardisation des souches cibles testées a été réalisée.

#### II.2.10.1. Revivification des souches pathogènes

Les bactéries pathogènes testées sont cultivées à 37°C sur 10 ml de bouillon de la gélose nutritive pendant 18à24h(Figure 4 ,Annexe I).

#### II.2.10.2. 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 18h.

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 18h.

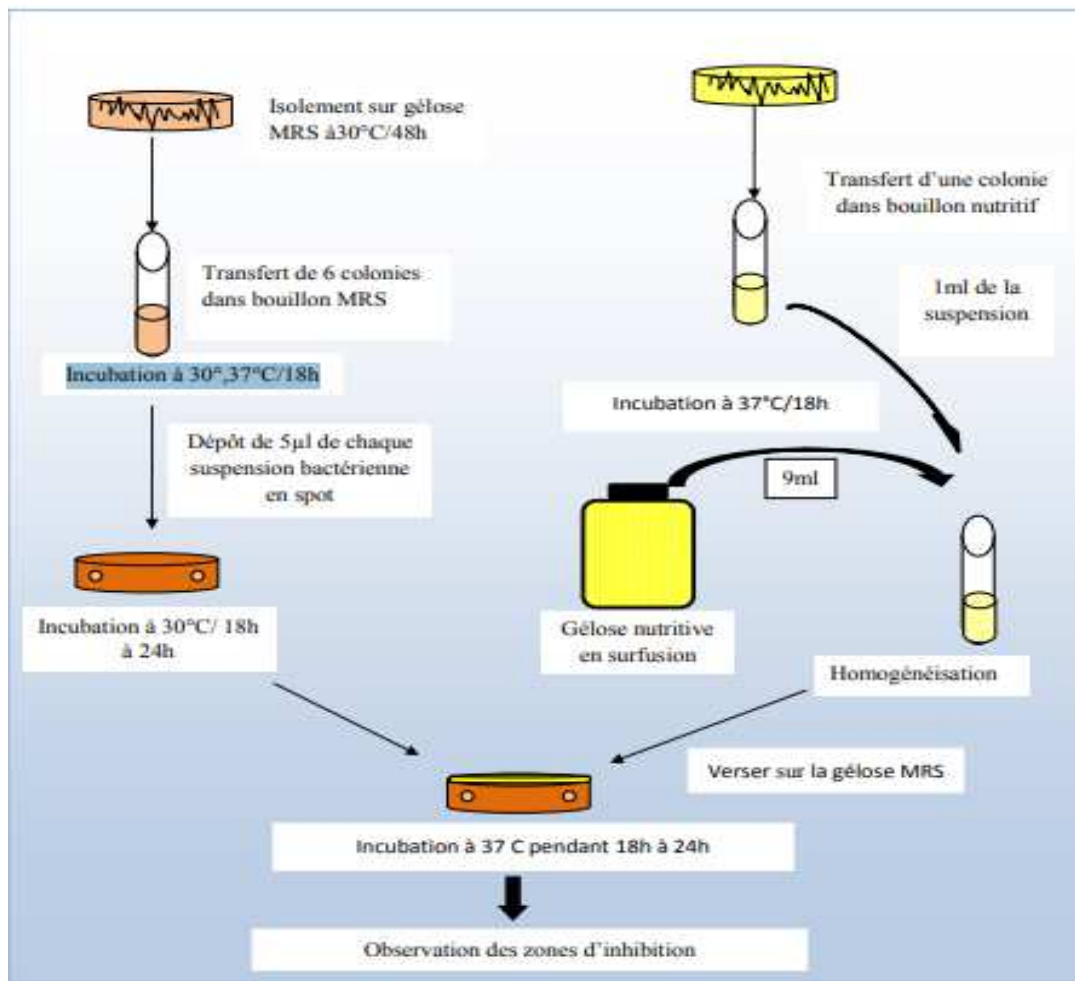
#### II.2.10.3. Méthode de spot

Un volume de 5µl de la culture de *Lactobacillus* fraîche (18h) à raison de 10<sup>9</sup> UFC/ml est déposé en spot sur la gélose MRS(Figure 5,Annexe I).Les spots sur gélose ont été séchés 10min devant le bec bunsen. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h en anaérobiose(Fleming et al., 1975).

Après la période d'incubation, les boîtes ont été recouvertes de 9 ml d'une gélose nutritive, préalablementensemencée avec 1ml de la suspension bactérienne fraîche du pathogène à tester, puis ré-incubées à 37°C en aérobiose pendant 24h.La présence d'une zone claire autour



du spot est notée et considérée comme une inhibition positive et se traduit par la mesure de cette zone d'inhibition(**Figure 5**).



**Figure 5:** Schéma de la réalisation de l'effet antibactérien par le test de spots.

#### II.2.10.4. Méthode de diffusion par disques d'agar (Vardar-Unlu et al., 2003).

La méthode de diffusion sur gélose est utilisée pour le dépistage (screening) des activités antimicrobiennes de la souche étudiée. Les disques d'agar (5 mm de diamètre) sont déposés dans des boîtes de Pétries contenant de la gélose Muller Hinton déjà ensemencée. Après incubation à 30°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition (ZDI) sont alors mesurés en millimètre (Mayachiew et al., 2008). Nous avons utilisé une règle afin de déterminer le diamètre des zones d'inhibition.

### II.2.10.5. Méthode de diffusion par puits

Selon la méthode de diffusion en puits de **Barefoot et Kaenhammer(1983)** un volume du milieu Mueller-Hinton agar est coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boîtes sontensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène (100µl, DO= 0,1 à 0,08), puis des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham) sur la gélose et seront remplis par 60 à 80µl de surnageant filtré et neutralisé, obtenu après centrifugation à 4000 tours / min pendant 15 min d'une culture de la souche lactique (dans le bouillon M17 et le bouillon MRS).

Les boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/2 h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures et l'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits (**Tabak et Bensoltane, 2011**).

Vu la période du confinement causée par le COVID-19, nous n'avons pas pu réaliser l'étape de la centrifugation, alors nous avons rempli directement les puits par la suspension bactérienne à l'aide d'une seringue de 5ml, 100 µl dans chaque puits. (**Figure6**).



**Figure 6** : Réalisation de l'effet antibactérien par la méthode des puits.

Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits seront mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2 mm. La mesure du diamètre d'inhibition ZDI est effectuée selon la formule suivante :

$$\text{ZDI en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (6 mm)}$$

# **Chapitre III.**

## **Résultats et discussions**

### III.1. Isolement et purification

Au cours de notre étude, nous avons isolé 04 souches de ferments lactiques à partir de lait de vache. La purification des souches lactiques isolées par plusieurs repiquages successives sur le milieu MRS (Man Rogosa Sharp) a permis d'obtenir 04 isolats de souche pure de ferment lactique.

### III.2. Pré-identification des *Lactobacillus*

Les résultats de l'identification des souches de *Lactobacillus* isolées du lait de vache, par des tests biochimiques classiques sont les suivants :

#### III.2.1. Aspect macroscopique

##### A) Sur milieu solide

La culture des souches isolées sur le milieu MRS est observée par l'œil nu pour une identification morphologique. Nous avons regroupé les caractéristiques macroscopiques des colonies obtenues sur notre boîtes de Pétri des isolats dans le **tableau VII**.

**Tableau VII** : Aspect macroscopique des colonies observées à partir des Boîtes de Pétri de  $10^{-5}$  du lait de vache après 72hd'incubation à 37 °C.

| caractère<br>Souche | Taille | Couleur  | Forme   | Elévation | Surface | Bord    |
|---------------------|--------|----------|---------|-----------|---------|---------|
| S1                  | 2 mm   | crémeuse | bacille | bombée    | lisse   | arrondi |
| S2                  | 4 mm   | crémeuse | bacille | bombée    | lisse   | arrondi |
| S3                  | 2 mm   | crémeuse | bacille | bombée    | lisse   | arrondi |
| S4                  | 3 mm   | crémeuse | bacille | bombée    | lisse   | arrondi |

Nous avons remarqué une diversité dans la taille des colonies dont le diamètre variant de 2 mm à 4 mm avec une dominance des couleurs crème blanchâtre. De plus, la présence de la forme bacille. Toutes les souches possèdent un bord arrondi avec des aspects lisses, brillants et non pigmentées (Figure7).

Ces critères macroscopiques des isolats correspondent aux propriétés culturales décrites pour les *Lactobacillus* selon **Badis et al. (2005)** et **Mami (2013)**.



**Figure7** : Aspect de colonie de *Lactobacillus* isolée à partir du lait de vache de la dilution( $10^{-5}$ ) sur milieu MRS.

D'après **Denis et al.(2007)**les colonies de *Lactobacillus* sont généralement de petites taille lisses brillantes, non pigmentées et souvent opaques. Ce qui est similaires avec nos résultats.

### **B) Sur milieu liquide**

La croissance des bactéries apparait sous forme de trouble homogène et fumeux dans le milieu MRS liquide(**Figure 8**). Il est concentré au fond à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries. Nos résultats sont semblables à ceux de **Kihal (1996) et Carr et al. (2002)**.



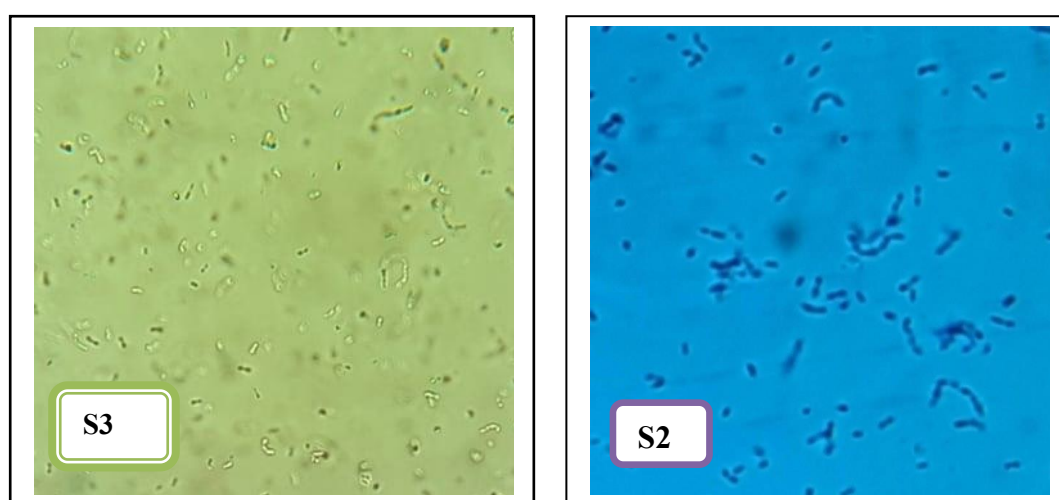
**Figure 8**: Résultat de repiquage des souches des *Lactobacillus* dans le bouillon MRS (milieu liquide).

## II.2.2. Aspect microscopique

### A) Etat frais

Les souches sélectionnées ont conservé le même aspect après plusieurs repiquages, et souvent immobiles regroupées en chaînettes, parfois en paires. Cet aspect microscopique correspond aux caractéristiques décrites par **Larpent(2000)** et **Guiraud et Rose (2004)**.

L'examen microscopique des cultures sur milieu MRS au Bleu de méthylène montre des colonies bleues immobiles, sous forme de bacilles regroupées en chaînettes(**Figure 9**).



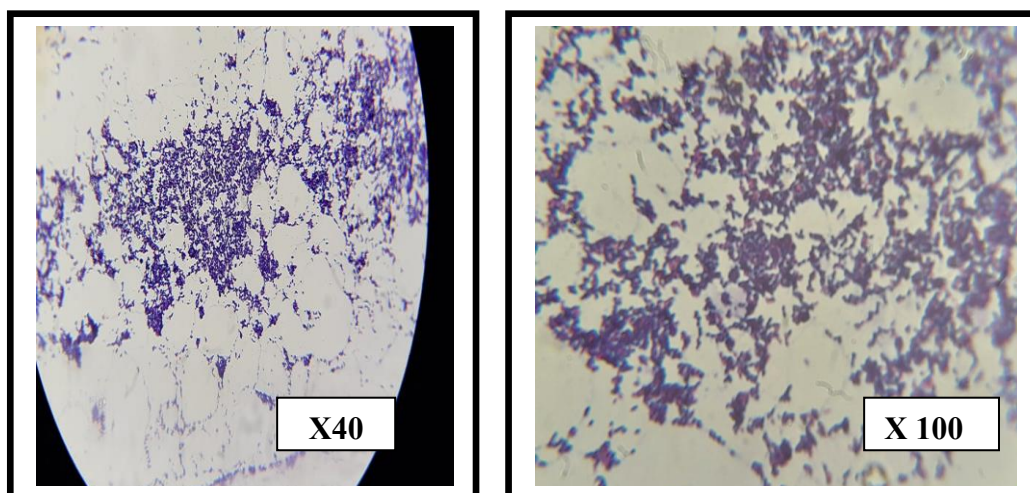
**Figure 9** :Observation microscopique de la souche S3 (GX40) à l'état frais et S2 (GX100) après la coloration de Bleu de méthylène, isolées sur milieu MRS.

### B) Etat fixé (coloration de Gram)

L'observation microscopique aux grossissements (Gx40) et (Gx100) avec l'huile à immersion, où nous avons observé que les isolats apparaissant sous forme bacilles fins, d'une couleur violette dont le mode d'associations varie d'une souche à une autre(**Figure 10**).

Ces observations permettent de classer initialement les isolats selon le Gram, leurs morphologies cellulaires et leur mode d'association (**Joffin et Leryal, 1996**).La coloration de Gram a permis de classer nos isolats en Gram positif .

D'après les travaux de **Kandler et Weise (1986)**,**Axelsson (1993)**les souches de *Lactobacillus* sont constituées de bacilles longs et fins ou de coccobacilles (coccoïde).



**Figure 10** : Observation microscopique des souches de *Lactobacillus* après la coloration de Gram (Gx40) (Gx100).

### III.3. Caractères physiologiques, biochimiques et technologiques

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

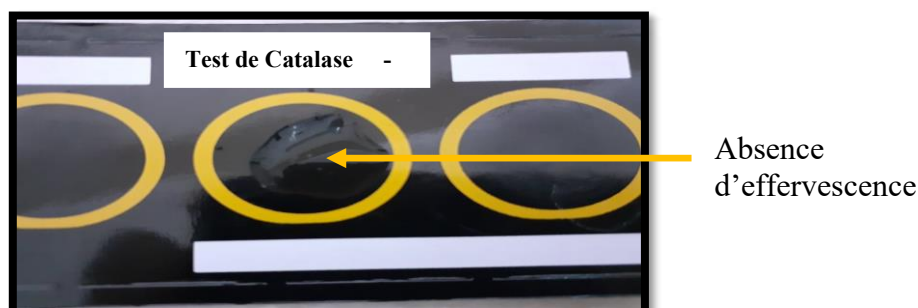
**Tableau VIII** : Résultats des tests d'identification des souches *Lactobacillus* isolées à partir du lait de vache.

| Test biochimique, physiologique et technologique | E1              |
|--|-----------------|
| Catalase   | -               |
| Oxydase  | -               |
| Mannitol mobilité                                | Immobile        |
| 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 téllurite                          | + /-            |

(-) : test négatif ; (+): test positif .

### III.3.1. Test de catalase

L'absence des bulles d'air après le dépôt de l'eau oxygénée sur les colonies cibles montre que toutes les souches de *Lactobacillus* sont catalase négative(**Figure11**).Ce qui est conforme aux résultats trouvés par **Kihal (1996)** et **Carr et al.(2002)**.



**Figure 11:** Résultat négatif du test de catalase.

Après avoir effectué l'examen de la catalase et la coloration de Gram, toutes les bactéries à Gram positif et à catalase négative sont présumées comme bactéries lactiques. Ce qui est le cas avec nos résultats. Certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (**Condon, 1987**)et selon le *Bergey's Manuel de la Systématique Bactérienne*, les *Lactobacillus* sont classées parmi les fermicutes à catalase négative (**De Vos et al.,2009**).

D'après les résultats de l'aspect microscopique (Forme et mode d'association), coloration de Gram et le test de catalase, nous avons obtenu 2 catégories :

- ✓ Catégorie 1 : regroupe des bacilles en chaînette/libre(S1 et S3).
- ✓ Catégorie 2 : regroupe des bacilles en chaînette (S2 et S4).

**Tableau IX :** Résultats de l'étude microscopique, coloration de Gram et le test de catalase.

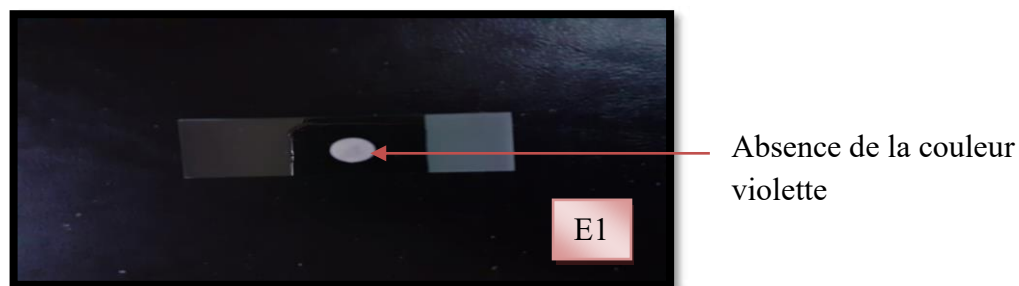
| Souche | Forme et mode d'association | Gram | Catalase |
|--------|-----------------------------|------|----------|
| S1     | Bacille en chaînette/libre  | +    | -        |
| S2     | Bacille en chaînette        | +    | -        |
| S3     | Bacille en chaînette/libre  | +    | -        |
| S4     | Bacille en chaînette        | +    | -        |

(+) : positive ; (-) : négative



### II.3.2. Test d'oxydase

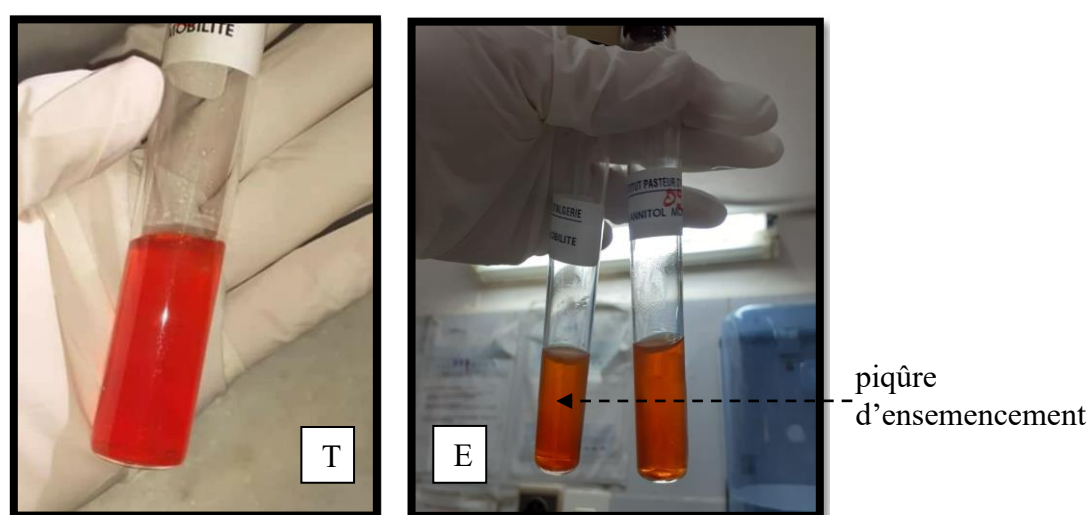
Toutes les souches étudiées n'ont pas produit une couleur violette et n'ont pas réagi avec les disques d'oxydase (oxalate de N-diméthyl-paraphénylène-diamine). Ce qui signifie qu'elles sont oxydase négative (**Figure 12**).



**Figure 12** : Test d'oxydase par les disques d'oxydase.

### III.3.3. 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 de lactobacilles étudiées sont immobiles (**Figure 13**). Ces résultats sont similaires à ceux de **Gerhardt et al. (1994)**.

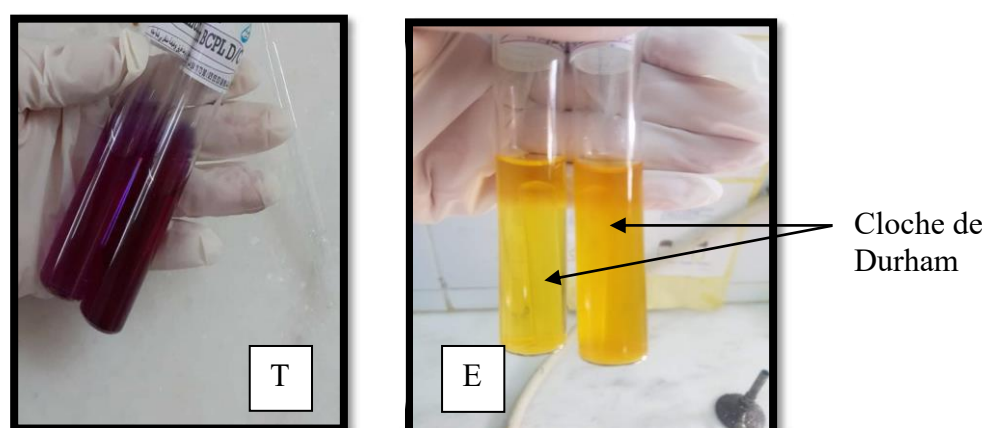


**Figure 13** : Résultat de test de Mannitol mobilité des souches de *Lactobacillus* (T : témoin ; E : ensemencé).

### III.3.4. Type fermentaire

Ce test permet de différencier les isolats lactiques de l'étude du pouvoir fermentaire (**Figure 14**).Après une incubation à 37°C pendant 24 heures jusqu'à 48 heures, les résultats, obtenus ont montré que toutes les souches isolées sont de type homofermentaires.

Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par la molécule de glucose consommée(**Thompson et al., 1994**).



**Figure 14** : Résultat de test de type fermentaire des souches 1 et 2 de *Lactobacillus*

(T : témoin ; E : ensemencé).

Le développement d'une souche homofermentaire conduit à l'apparition d'un trouble sans production de gaz. Par contre, dans le cas d'un métabolisme hétérofermentaire, la croissance se manifeste par l'apparition d'un trouble avec production de gaz recueilli dans la cloche de Durham (**Dicks et Van Vuvren,1987 ; Axelsson,2004**). La production de gaz se manifeste par le flottement de la cloche qui est vidée du milieu (**Kheddid et al., 2006**).

### III.3.5. Croissance à différentes températures

Nous avons testé la croissance des isolats à 4°C,37°C et à 44°C pour différencier entre la flore thermophile et mésophile. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches ont poussé à 4°C et 37°C.Cependant elles ne possèdent aucune croissance à 44°C, ce qui explique que les souches testées de lait de vache sont de type mésophiles (**Tableau X**).

D'après les travaux de **De-Roissart et Luquet (1994) ; Kouakou et Thonart (2011)**.ont montré qu'une culture de *Lactobacilles* peut être observée à des températures allant de 2 à 53°C. La température optimale de croissance des *Lactobacillus* est généralement comprise

entre 30 et 40°C, elle est de 37°C pour la plupart des espèces (**Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994**).

**Tableau X:** Résultats du test de croissance à différentes températures.

|      | S1 | S2 | S3 | S4 |                                 |
|------|----|----|----|----|---------------------------------|
| 4°C  | +  | +  | +  | +  | Mésophiles                      |
| 37°C | +  | +  | +  | +  |                                 |
| 44°C | -  | -  | -  | -  | Absence de souches Thermophiles |

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

Selon **Larpent et Bourgeois (1989)**, les souches du genre *Lactobacilles* se cultivent à 7,15,30 et 45°C, ce qui est semblable avec nos résultats.

### II.3.6. Croissance dans des conditions hostiles

Les résultats de la croissance des souches *Lactobacillus* dans des conditions hostiles (pH et NaCl) sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau XI :** Résultats du test de croissance dans des conditions hostiles en fonction des souches de *Lactobacillus* isolées à partir du lait de vache.

| Souches |      | S1 | S2 | S3 | S4 |
|---------|------|----|----|----|----|
| pH      | 4    | +  | +  | +  | +  |
|         | 9,6  | +  | +  | +  | -  |
| NaCl    | 2%   | +  | +  | +  | +  |
|         | 4%   | +  | +  | +  | +  |
|         | 6,5% | -  | +  | -  | -  |

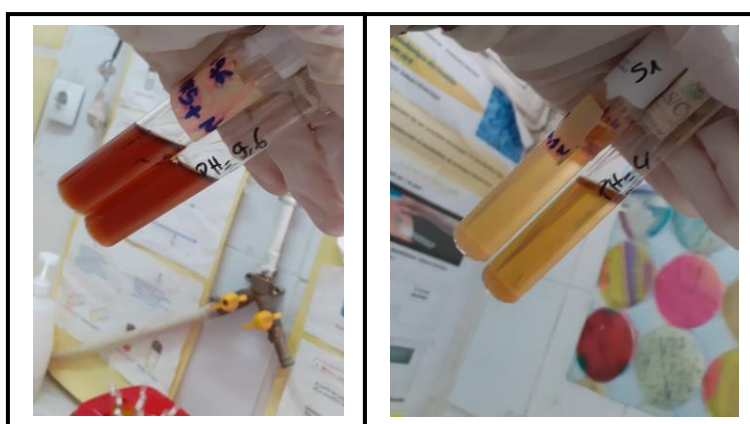
(-) : test négatif ; (+) : test positif

#### II.6.3.1. Croissance à différents pH

Toutes les des souches de *Lactobacilles* isolées à partir du lait de vache ont poussé à pH acide (pH= 4) et basique mise à part la souche (S4), aucune croissance n'a été enregistré à

un pH 9,6 (**Figure15 ,Tableau XI**).Les *Lactobacillus* croient à pH 4,5 (**Larpenet, 2000**)et sont des acidotolérants dont de nombreuses espèces sont impliquées dans des fermentations alimentaires (**Federighi et al., 2005**).

Selon **Leveau et Bouix (1993)**, les *Lactobacillus* résistent à des pH acides allant jusqu'à 3,5. La diminution du pH par l'effet acidifiant de ces bactéries est favorable à la bio- conservation des denrées alimentaires (**Requena et Buist , 2000**).Le pH atteint dans certains de ces produits (yaourt, pH ;4, saucisson sec, pH 4,5 à 5,3) suffit à éliminer certains contaminants (**Huang et al., 1986**).



**Figure 15** : Résultat du test de croissance à pH 4 et 9,6 .

### II.6.3.2. Croissance à différente concentration de NaCl

Les résultats de la croissance des *Lactobacilles* à différente concentration de NaCl, ont montré des comportements très différents selon leur sensibilité à la salinité.

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches étudiées présentent une très bonne croissance en présence de 2% et 4% de NaCl. Cependant, en présence de 6,5% de NaCl, la majorité des souches ne tolèrent pas cette concentration à l'exception de la souche (S2) isolée du lait de vache.

En effet, selon **LarpenetBourgeois (1989)**, les *Lactobacilles* peuvent résister à des concentrations de 4,6et 10% de NaCl. Ce qui induit leur utilisation dans les saumures et charcuteries (**Giraud et Rosec, 2004**).

### III.3.7. Thermorésistance

Nous avons observé une croissance sur le bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 63,5°C pour la plupart des souches étudiées et donc elles sont thermorésistantes.

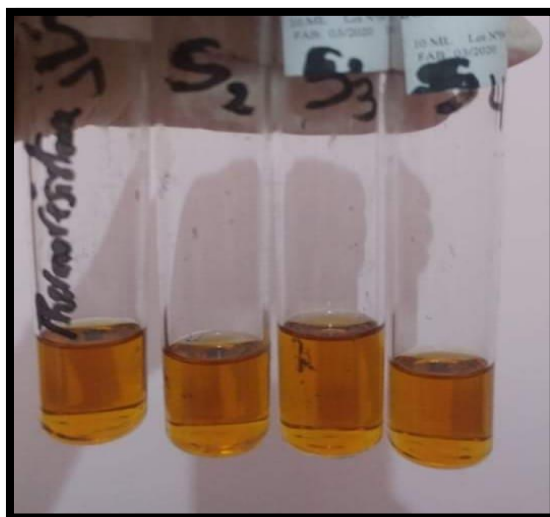


Figure 16 : Résultat de la thermorésistance .

Selon **Tailliez (2004)**, la plupart des *Lactobacillus* se multiplient dans une gamme de températures comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches de *Lactobacillus* dites «thermorésistante » restent viables à 55 °C. Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (**Abeet et al., 1995 ; Hugenholtz et Kleerebezem , 1999**).

### III.3.8. Activité protéolytique

L'activité protéolytique est une caractéristique technologique importante chez les bactéries lactiques puisqu'elles leur confère la capacité de croître efficacement dans le lait (**Maghnia, 2011**).

Les résultats obtenus montrent que les souches (S3et S4) ne présentent pas une activité protéolytique (pas de zone claire) dans la concentration testée de 1% lait écrémé (**Tableau**

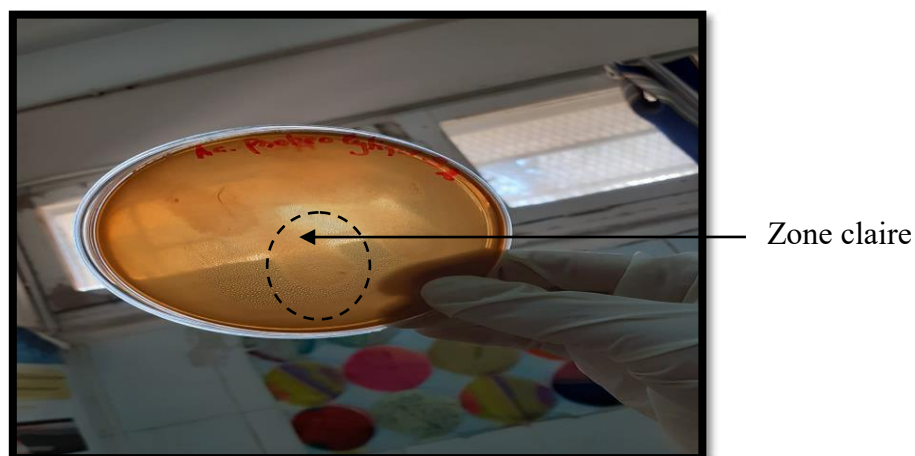
**XII** ).Seulement deux souches (S1, S2) possèdent une activité protéolytique dont le diamètre de la zone claire varie entre 2 mm (S1) à 6 mm (S2).

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

| Souche                               | S1 | S2 | S3 | S4 |
|--------------------------------------|----|----|----|----|
| Zone de l'activité protéolytique(mm) | 2  | 6  | 0  | 0  |

Le diamètre est plus important au niveau du milieu MRS à 1% de lait écrémé où la souche (S2) a montré le plus important diamètre de protéolyse (6 mm) par rapport à d'autres souches(**Figure 17**).

L'activité protéolytique des souches isolées a été traduite par la présence d'un halo claire d'hydrolyse de la protéine du lait (caséine) sur boîte de MRS additionnée de lait écrémé à des concentrations de 1% et 2% (**Maghnia, 2011 ; Hassaine, 2013**).



**Figure 17**: Exemple positif d'activité protéolytique.

Ces résultats nous permettent de confirmer d'une part le caractère protéolytique ou non des souches isolées et d'autres parts la présence d'une protéase de paroi comme il a été rapporté par les travaux de **Desmazeaud (1983)**. Les espèces du genre *Lactobacillus* ont besoin d'un système de protéolyse pour tirer le maximum d'acides aminés de la caséine (**Chen et al., 2004**).

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans le lait ainsi que pour le développement des propriétés organoleptiques des différents produits laitiers (Savoy et Hébert, 2001 ; Hassaïne et al.,2007).

### III.3.9. Résistance au téllurite

D'après nos résultats, la répartition selon la résistance au téllurite de potassium est variable entre les souches. La présence des colonies noires sur la surface de la gélose MRS qui est additionné de 0.4% de téllurite de potassium a été observé seulement dans la souche S1, et absentes dans les autres souches (Tableau XIII).

**Tableau XIII:** Résultats de la résistance au téllurite de potassium.

| Souche                               | S1 | S2 | S3 | S4 |
|--------------------------------------|----|----|----|----|
| Résistance au téllurite de potassium | +  | -  | -  | -  |

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

### III.3.10. Etude de la fermentation des sucres

Afin de compléter l'identification des *Lactobacillus* isolées du lait de vache, la galerie Api 20E a été exploitée seulement pour la souche (S2) vu qu'elle a présenté une meilleure croissance dans les tests précédents, pour établir le profil fermentaire des sucres: 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 18:** Résultats des tests de la galerie Api 20<sup>E</sup> de la souche S2.

Nous avons noté que la (S2) dégrade les sucres suivants (MAN, SAC, AMY et ARA) et une fermentation négative pour (INO, SOR, RHA et MEL).

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.

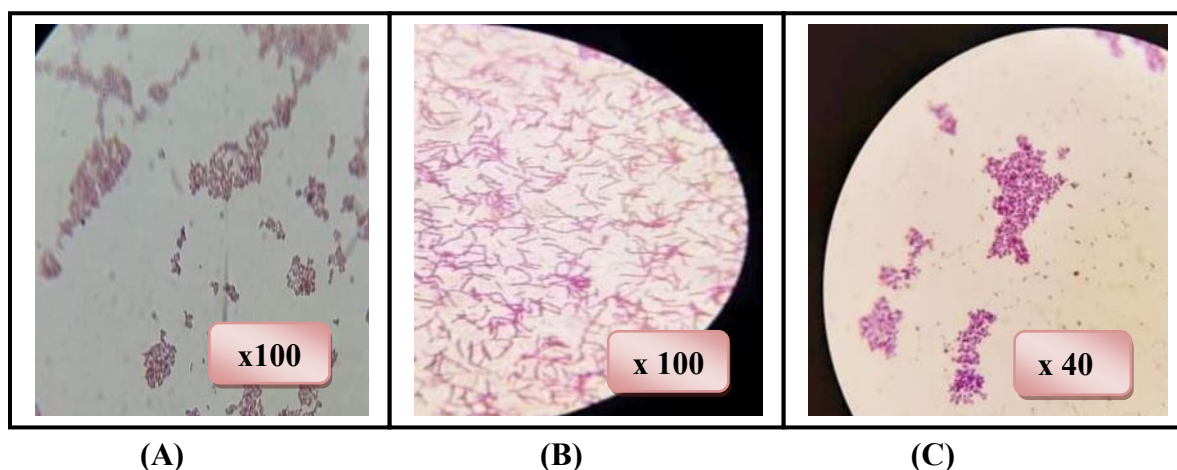
#### III.4. Observation macroscopique et microscopique des souches pathogènes

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

L'observation microscopiques des colonies a permet d'obtenir des différents aspects, selon les bactéries isolées(Figure19, Tableau XIV).

**Tableau XIV:**Observation microscopique des bactéries pathogènes d'origine alimentaire.

| Souche pathogène             | Produit alimentaire             | Gram         | Observation microscopique         |
|------------------------------|---------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>      | Eau de source(Chiffa W. Blida)  | Gram négatif | Bacilles roses isolées ou en amas |
| <i>Salmonella</i>            | Sandwich poulet (Restaurant)    | Gram négatif | Bacilles roses libres             |
| <i>Pseudomonasaeruginosa</i> | Eau de source (Chiffa W. Blida) | Gram négatif | Bacilles roses en amas            |



**Figure 19 :**Observation microscopique des bactéries pathogènes après la coloration de Gram (Gx40) (Gx100) (A :*Escherichia coli* , B :*Salmonella*, C :*Pseudomonas aeruginosa* ).



### III.5. Activité antibactérienne des *Lactobacillus*

L'activité antibactérienne des quatre souches des *Lactobacillus*(S1,S2,S3et S4)isolées du lait de vache ont été testées pour leur capacité à inhiber des bactéries pathogènes d'origine d'altération alimentaire: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella*.

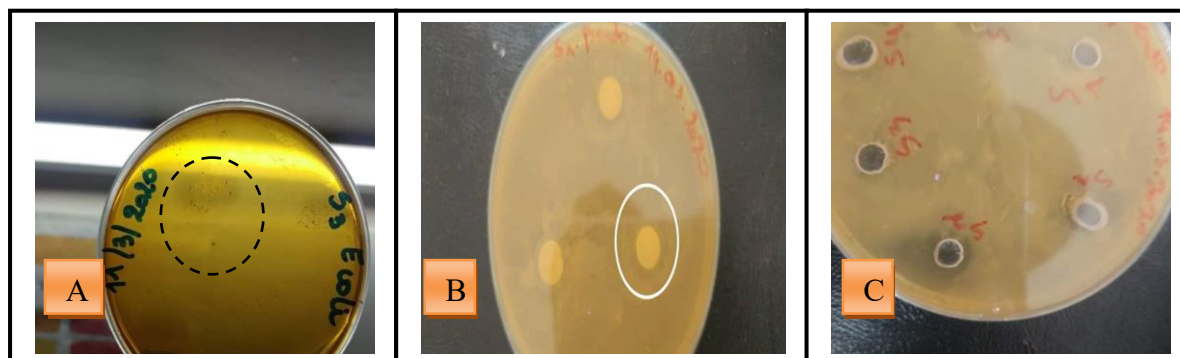
D'après les résultats obtenus, les *Lactobacilles* ont montré un spectre d'activité inhibiteur important et varié en fonction des espèces. L'effet inhibiteur des *Lactobacillus* a été déterminé par la mesure des zones d'inhibition (en mm). Les résultats sont représentés dans le **tableau XV**.

**Tableau XV:** Résultats des diamètres des zones d'inhibitions (ZDI en mm) des souches de *Lactobacillus* isolées du lait de vache.

|                |                                  | Zone d'inhibition (mm) |    |    |    |
|----------------|----------------------------------|------------------------|----|----|----|
|                |                                  | S1                     | S2 | S3 | S4 |
| Test de spot   | Souches des <i>Lactobacillus</i> |                        |    |    |    |
|                | <i>Escherichia coli</i>          | 15                     | 18 | 19 | 8  |
|                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | -                      | 15 | 24 | -  |
|                | <i>Salmonella</i>                | -                      | 11 | -  | -  |
| Test de disque | <i>Escherichia coli</i>          | -                      | -  | -  | -  |
|                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | 4                      | -  | -  | -  |
|                | <i>Salmonella</i>                | 5                      | -  | -  | -  |
| Test de puits  | <i>Escherichia coli</i>          | 8                      | 6  | -  | -  |
|                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | 7                      | 9  | -  | -  |
|                | <i>Salmonella</i>                | 6                      | 10 | -  | -  |

(-) absence d'activité antimicrobienne, diamètre = 0.

D'après les résultats notés dans le tableau **XV**, nous avons enregistré une différence des zones d'inhibition des souches de *Lactobacillus* isolées et testées allant de 4 à 24 mm et ce en fonction des méthodes appliquées (test en spot, test de disque et de puits) (**Figure 20**).



**Figure 20 :** 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 les méthodes (A : de spot ,B: de disque , C :de puits).

Selon **Schillinger et Lucke (1989)**, les *Lactobacillus* sont notées positives lorsque la ZDI est supérieure à 1 mm, ce qui le cas avec les résultats obtenus dans cette présente étude. D'après **Fleming et al. (1975)**, les souches ayant une zone claire d'extension latérale supérieure à 0,5 mm sont considérées comme productrices de substances antibactériennes.

L'isolat (S3) de *Lactobacillus* isolé à partir de lait de vache a montré une zone d'inhibition de 19 mm en contact avec *Escherichia coli*, 18 mm (S2), 15mm (S1) et 8mm (S4) et ce avec la méthode de spot. Tans dis que un diamètre plus élevé de 24 mm a été enregistré avec *Pseudomonas aeruginosa* en contact avec la souche (S3), 15 mm en contact avec (S2) et une absence totale de l'effet inhibiteur avec les souche (S1) et (S4).

La souche (S2) a montré un spectre d'activité de 11mm en contact avec *Salmonella* et absence totale l'effet inhibiteur avec les autres souches par méthode de spot.

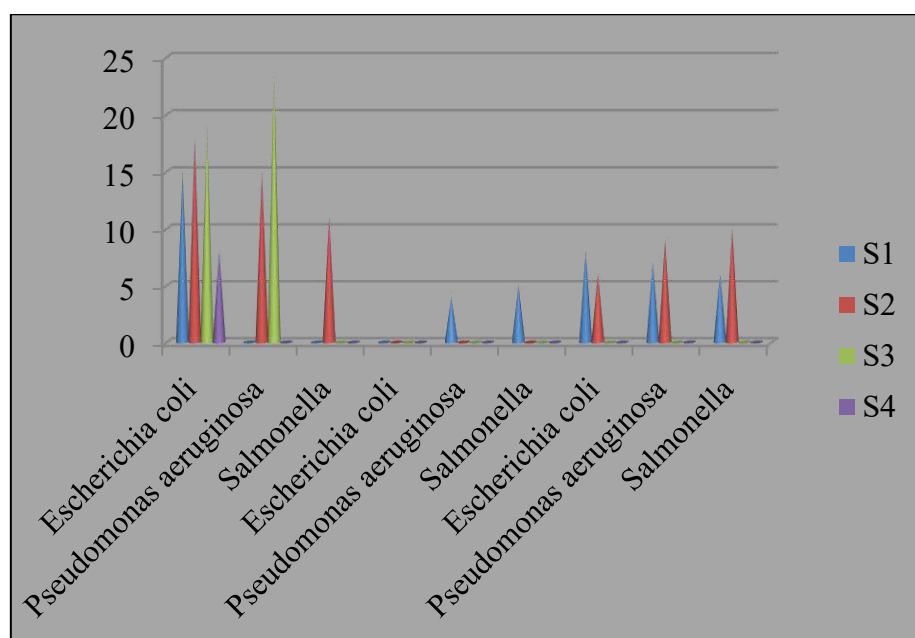
En utilisant la méthode de disque, les isolats (S2,S3et S4) ne présentent aucun effet inhibiteur en contact avec les souches pathogènes(*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella* )

Cependant, la souche (S1)a montré la plus faible zone d'inhibition de 4 mm en contact avec *Pseudomonas aeruginosa*, une ZDI de 5 mm vis-à-vis *Salmonella*

Concernant la méthode de diffusion par puits, l'isolat (S1) de *Lactobacillus* a montré une zone d'inhibition de 8 mm en contact avec *Escherichia coli*, 6 mm (S2), et aucun effet antibactérien a été enregistré avec les deux souches (S3 et S4).

La souche (S2) a montré un spectre d'activité de 9 mm en contact avec *Pseudomonas aeruginosa*, 7 mm (S1) et absence totale l'effet inhibiteur avec les autres souches. Tans dis que un diamètre plus élevé de 10 mm a été enregistré avec *Salmonella* en contact avec la souche (S2), 6 mm en contact avec (S1) et une absence totale de l'effet inhibiteur avec les deux souches (S3 et S4).

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que la souche (S3) a un meilleur pouvoir antibactérien(**Figure 21**).



**Figure 21** : 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) (*Escherichia coli* , *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Selon **Makras et al.(2006)** quelques souches de *Lactobacillus* empêchent la croissance de *Salmonella* seulement par la production de l'acide lactique.

Dans une étude menée par **Jinet et al. (1996)**, il est suggéré que l'inhibition de *Lactobacillus* à l'égard des souches pathogènes de *Salmonella* et de *Escherichia coli* est du à la production d'acides organiques par *Lactobacillus*.

D'après **Makras et al. (2006)** ; **Pelaez et Martin-Orue (2009)** ont observé que l'activité antibactérienne de la souche de *Lactobacillus* contre *Salmonella* inhibiteurs, dont la proportion s'est élevée avec la diminution du pH .

L'activité inhibitrice des *Lactobacillus* peut avoir deux origines :

- ✓ La première est la production de l'acide lactique et/ou acétique ; en effet les *Lactobacillus* sont connues pour avoir une grande résistance au pH acide contrairement aux autres genres de bactéries lactiques (**Wong et Chen, 1988** ; **Podolak et al., 1996**, **Wilson et al., 2005**).
- ✓ La deuxième provient de la production de substances organiques et probablement des bactériocines (**Oyetayo et al., 2003**, **Avila et al., 2005**, **Cocolin et al., 2007**).
- ✓ Généralement, les espèces du genre *Lactobacilles* sont catalase-négative et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (**Condon, 1987**). Le peroxyde d'hydrogène est toxique et capable d'inhiber de nombreux germes pathogènes qui ne peuvent pas le dégrader (**Otero et Nader-Macias, 2006**; **Pridmore et al., 2008**).
- ✓ D'après **Federighi (2005)**, le diacétyl produit du métabolisme du citrate par plusieurs *Lactobacilles* est capable d'inhiber des bactéries à Gram négatif.

Les bactéries lactiques et/ou leurs métabolites utilisés depuis des millénaires d'une façon empirique par de nombreuses populations, peuvent contribuer à la conservation des aliments (**Ross et al., 2002**) .

## Conclusion

---

L'isolement des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* a été effectué à partir du lait de vache de la région de Blida, nous a permis d'obtenir 4 isolats de ferments lactiques. Tous les 4 isolats qui ont été caractérisés sont des bacilles à Gram positif, catalase négative, oxydase négative, immobiles. Ils ne présentent aucune activité protéolytique mise à part 2 isolats (S1 et S2), thermorésistantes, homo-fermentaires, mésophiles et poussent en anaérobiose.

L'étude de l'activité antibactérienne de 4 souches de *Lactobacillus* vis-à-vis *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella* a montré un effet inhibiteur important avec des diamètres de zones d'inhibition varient entre 4 mm et 24 mm en fonction de la bactérie cible. D'après les résultats enregistrés sur la souche (S3), cette dernière a montré un meilleur pouvoir inhibiteur vis à vis *Pseudomonas aeruginosa*.

En effet, un essai expérimental a été prévu sur la conservation des jus par la souche (S3), et en raison de l'état actuel du coronavirus (COVID-19), le travail n'a pas été achevé.

Pour conclure, les résultats sont prometteurs pour l'utilisation des *Lactobacillus* dans l'inhibition des bactéries d'altération à Gram négatif, et dans l'industrie agro-alimentaire comme bio-conservateurs. Néanmoins, une étude plus approfondie sur le mode de conservation par les ferments lactiques est nécessaire.

En perspective, il sera intéressant de :

- Répéter ces tests plusieurs fois afin de confirmer les résultats obtenus ;
- Etablir une identification des souches isolées en réalisant plus de tests biochimiques ou en utilisant des galeries biochimiques (la galerie APIC50 CH) et moléculaire ;
- Etudier d'autres propriétés technologiques tel que : le pouvoir acidifiant, aromatisant, texturant, épaississant, etc.
- Élargir la gamme des bactéries cibles de l'activité antibactérienne et chercher l'origine de cette activité (bactériocines).

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

### A

- ✓ **Abee T., Krockel L., Hill C.(1995).** Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol.* 28:169-185p.
- ✓ **Alaoui Ismaili M., Guilal J., Hamama A., Saidi B., Zahar M. (2016).** Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The international Journal of multi-disciplinary sciences.* 1 :81-92p.
- ✓ **Avila M., Garde S., Medina M., Nunez M. (2005).** Effects of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. *J. Food Prot.* 68: 1026-1033p.
- ✓ **Axelsson L. (1993).** Lactic acid bacteria :classificationand physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S and Von Wright A Marcel Dekker Inc. New York. 1-63p.
- ✓ **Axelsson L. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Clasificationand physiology. *In* Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspect. Third Edition. MarcelDekker, New York, 1-66p.

### B

- ✓ **Badis A., Guetarni D., Kihal M., Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Science and Technologieie,* 23 : 30-37p.
- ✓ **BaldentF.(1997).** Coloration usuelle en Bactériologie. *Revue de Développement et santé.* Février (1997).
- ✓ **Barfoot S.F.etKlaenhammer T.R. (1983).** Detection and Activity of Lactacin B, aBacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied andEnvironmentalMicrobiology.* 45(6), 1808-1815p.
- ✓ **Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F.,ObertJ.P.(2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. 661-765p.
- ✓ **Beal C. et Sodini I. (2003).** Fabrication des yaourts et des laits Fermentés, Ed Tec. Ing,37p.
- ✓ **Borges F. (2014).** Sécurité sanitaire des aliments. Projet. Université de Lorraine. 55 p.
- ✓ **Bernardeau M. et Vernoux J.P. (2009).**“Overview of the use of probiotics in the Feed/Food chain”. In: “Probiotics: Production, Evaluation and Uses in Animal Feed”, 2009: 15-45. Editors: Nelson Pérez Guerra and Lorenzo Pastrana Castro. *Biotechnology and AppliedBiochemistry,* Kerala,India.ISBN: 978-81-308- 0323.68-69P.
- ✓ **Bornert G. (2000).** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. Synthèse scientifique, Service Central d'Études et de Réalisations du

## Références bibliographiques

---

Commissariat de l'Armée de Terre, B.P. 309, 00447 Armées. *Revue Méd. Vét.* 151, (11) : 1003-1010p.

- ✓ **Boudjema N. (2015).** Microbiologie alimentaire. Polycopié de microbiologie.46p.
- ✓ **Boumediene K. (2013).**Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Thèse magistère microbiologie non publiée, Université Tlemcen, Tlemcen.19p
- ✓ **Bourgeois C.M., Mescle J.F.,Zucca J.J. (1996).** Microbiologie alimentaire aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed.Tec. Et Doc. Lavoisier, vol (1), 174p.
- ✓ **Bouza A. (2009).** « *Les toxi-infections alimentaires collectives dans l'est Algérien* ». Diplôme de post-graduation spécialisée. Université mentouri-Constantine. P : 28-36 p.

### **C**

- ✓ **Carr F., Chil D., Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey *Critical Rev. Microbiol.* 28. 281-370p.
- ✓ **Casla D.,Requena T.,Gomez R.(1996).** Antimicrobiol activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus carvatus* IFPL 105. *J. Appl. Bacteriol.*,81:1,35-41p.
- ✓ **Chen Y.S., Yanagida F.,Shinohara T.(2004):** Isolated and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 195-200 p.
- ✓ **Cocolin L., Foschino R., Comi G., Fortina M.G. (2007).** Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiol.* 31:753-758p.
- ✓ **Codex alimentarius(1999).** Norme générale codex pour l'utilisation de termes de laiterie - Définitions. P1 STAN 206
- ✓ **Collins M. D., Phillips B. A.,Zanoni P. (1989).**Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov. subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov, comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*; 39 : 105-8p.
- ✓ **Condon S. (1987).** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS. Microbiol. Lett.* 46:269-280 p.
- ✓ **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



## Références bibliographiques

---

- ✓ **Cuq J.L. (2007).** Microbiologie alimentaire. Cours de Microbiologie Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc. *Polytech Montpellier STIA4*. 134p.

### **D**

- ✓ **De Roissard H. et Luquet F.M. (1994).** Bactéries lactiques *Lorica Uriage* 1 ; 6- 1p.
- ✓ **De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. (2009).** Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In: « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd. New York.19-511p.
- ✓ **De Vuyst L., et Vandamme E. J. (1994).** A bacterial potential of lactic acid bacteria. Dans: bacteriocin of lactic acid bacteria. End. Blacki Academic and Profitionel, Londre.91-142p.
- ✓ **Dellaglio F., De Roissard H., Torriani S., Curk M.C., Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.).*Lorica,Uriage*. 1 : 25-116p.
- ✓ **Denis F., Poly M.C., Bengen E., Quentin R. (2007).** Bactériologie médicale, techniques usuelles. 2ème Ed. Elsevier Masson, Paris.417p.
- ✓ **Desmazeaud M. (1983).** Comment les bactéries lactiques se comportent elles dans le lait .technique laitière .976 :11-14p.
- ✓ **Diallo M.L. (2010).** Contribution à l'étude de qualité bactériologique des repas servis par Dakar Catering selon les critères du groupe SERVVAIR Thèse : Méd ; Vét. Dakar.4p
- ✓ **Dicks L.M.T.et Van vuuren H.J.J. (1987).** A modification of the hot-tube method for the detection of carbon dioxide produced by heterofermentative *lactobacillus* strains. *J. Microbiol. Meth.*, 6: 273-275p.
- ✓ **Dilmi-Bouras A., Koïche M.,Tabti M. (2007).**The effect of *Lactobacillus paracasei* on the rabbit's cholesterolemia. Laboratoire de Microbiologie, Institut d'Agronomie, Université H. B. Chlef. *African J. Biotechnol.*; 6 (24), 2840-2845p.
- ✓ **Djadouni F.(2013).** Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats des bactéries lactiques et détermination des spectres d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération. Thèse doctorat microbiologie non publiée, Université d'Oran, Oran.27p.
- ✓ **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 présenté pour obtenir le grade de Docteur en Biotechnologies et industries alimentaires, Institut national de polytechnique de Lorraine.32-33p.

## Références bibliographiques

---

- ✓ **Dortu C. et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bio-conservation des produits alimentaires. Edition: l'Usine nouvelle. Paris : 240p.

### **E**

- ✓ **El Sodfa M., Law J.T., Sakalldou E., Kalantzopoulos G. (1995).** Lipolytic activity of cheese related microorganisms and its impact on cheese flavour. In : Charalambous, G. (ed.), Food Flavour: Generation, Analysis and Process Influence. Elsevier Science BV. 1823-47p.
- ✓ **Ercolini D., Moschetti G., Blaiotta G., Coppola S. (2001).** Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current Opinion in Microbiology*, 42:199-202p.
- ✓ **Eslava C., Villaseca J., Hernandez U., Cravioto A. (2003).** *Escherichia coli* (123-135). In International Handbook of Foodborne Pathogens, Miliotis MD, Bier JW (eds). Marcel Dekker: New York. 688p.

### **F**

- ✓ **Facklam R. (1972).** Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl. Microbiol*, 23 : 1131-1139p.
- ✓ **FAO. (1990).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO/Alimentation et nutrition. 28p.
- ✓ **FAO/OMS. (2001).** Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé OMS). Working Group Report. Cordoba, Argentina. 1-4p
- ✓ **Federighi M. (2005).** Bactériologie alimentaire. Compendium d'hygiène des aliments, 2ème édition. 32-39p.
- ✓ **Federighi M., Magras C., Pilet M.F. (2005).** Bactériologie alimentaire: compendium d'hygiène des aliments. 2ème édition. Paris : 220 p.
- ✓ **Felis G.E. et Delloglio F. (2007).** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Caar. Insues International Microbiol.*, 8 : 44-61p.
- ✓ **Feng P. (2001).** *Escherichia coli* (143-162). In Guide to Foodborne Pathogens, Labbé RG. 143-162p
- ✓ **Fleming H.P., Etchells J. L., Costilow R. N. (1975).** Microbiol Inhibition by an Isolate of pediococcus from Brines. *Applied Microbiology*. vol. 30, N°6. 1040- 1042p.

## Références bibliographiques

---

- ✓ **Floret D.(2009)**. Immunization: process of elaborating guidelines and their evolution in France. Ann Pharm Fr, 67 : 219-223p.
- ✓ **Foss F., et Magras C.(2004)**.Dangers biologiques et consommation des viandes.147-148p.
- ✓ **Fredot E.(2012)**. Connaissance des aliments :Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique .Techniques et documentation Lavoisier,Paris,609p.

### G

- ✓ **Ganzle G.M., Holtzel A., Walter J., Jung G.,Hammes P.W. (2000)**. Characterization of Reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH 2584. Appl. Environ. Microbiol.66(10): 4325–4333p
- ✓ **Garrity G.M.et Holt G. (2001)**.Taxonomic outline of the archaea and bacteria.P.155-166 in Bornne D.R and. Canten R.W. Vol3. Bergeymanuel of systematic bacteriology 2ed vol 1.
- ✓ **Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W.A., Krieg N.R. (1994)**. Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington DC, ASM, USA, 791p
- ✓ **Gratia.(1925)**. Sur un remarquable exemple d'antagoniste entre souches colibacilles. Conseil Royal Société Biologie.93 : 1040-1041p.
- ✓ **Green S.K., Schroth M.N., Cho J., Kominos S.K., Vitanza-Jack V. B.(1974)**.Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol, 28: 987-991.groupebacteriens: p180.
- ✓ **Guiraud G.et Galzy P. (1980)**. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires.Éditions de l'usine nouvelle, Paris, Collection Génie alimentaire,119p
- ✓ **Guiraud J.P. (1998)**. Microbiologie alimentaire. *Dunod*, Paris, p 652.
- ✓ **Guiraud J.P. (2003)**. Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, paris : 91, 92-292 p.
- ✓ **Guiraud J.P. (2003)**. Microbiologie alimentaire. Edition: Dunod. Paris : 615p.
- ✓ **Guiraud J.P. (2003)**.a.Microbiologie alimentaire. Edition. Dunod., Paris. 315-320p.
- ✓ **Guiraud J.P. et Rosec J.P. (2004)**. Pratique des normes en microbiologie alimentaire, edition Saint-Denis la plaine AFNOR DL. 118-120p.
- ✓ **Guiraud J.P.et Rosec J.P. (2004)**. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR : 241 p.
- ✓ **Guiraud J.P. (2003)**.Microorganisme intervenant dans l'industrie alimentaire, microbiologie alimentaires application à l'étude des principaux groupes microbiens. 1 Fds 91.

## Références bibliographiques

---

### H

- ✓ **HadefS. (2012)**. Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Thèse de magister de microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbeh-Ouargla. 88p.
- ✓ **Hammes W.P. et Hertel C. (2009)**. Genus I. *Lactobacillus*. Dans: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 465-511p.
- ✓ **Haslay C. et Leclerc H. (1993)** : Microbiologie des eaux d'alimentation. 78-79p.
- ✓ **Hassaine O. (2013)**. Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien. Thèse de doctorat en biotechnologie : l'université d'Oran-Essenia .57-102p.
- ✓ **Hassaïne O., Zadi-Karam H., Karam N.E. (2007)**. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *Afr. J. Biotechnol.* 6 (14): 1720-1727p.
- ✓ **Hermier J., Lenoir J., Weber F. (1997)**. Rôle des bactéries lactiques dans la production des facteurs antimicrobiens, les groupes microbiens d'intérêt laitier. Ed. Cepil. Paris. p960.
- ✓ **Holzappel W.H. (2002)**. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology.*, vol. 75, 197-212p.
- ✓ **Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. (2001)**. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(suppl): 365S-73S.
- ✓ **Hugenholtz J. et Kleerebezem M. (1999)**. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(5), 492-497p.

### J

- ✓ **J.O.R.A. (2017)**. Journal Officiel de la République Algérienne N°39.
- ✓ **Jacob F., Lwoff A., Siminovitch A., Wollman E. (1953)**. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie, *Ann. Inst. Pasteur.* 84:222-224p.
- ✓ **Jensen R. (1995)**. Handbook of milk composition-General description of milks, Academic Press, Inc: 3 919p.
- ✓ **Jinet A., Champagne C.P., Girard F., Morin N. (1996)**. Bacteriophage development in an immobilized lactic acid bacteria system. *Biotechnol. Lett.* 10:463p.
- ✓ **Joffin J. N. et Leryal G. (1996)**. Microbiologie technique. Centre Régional de documentation Pédagogique d'Aquitaine Boreaux, France. 219-223p.

## Références bibliographiques

---

- ✓ **Joffin J.N. et Leryal G. (2005).**Microbiologie Technique Tome I Dictionnaire des techniques Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine,171-189p.
- ✓ **Joffraud J.J., Cardinal M., Cornet J., Chasles J.S., Leon S., Gigout F., Leroi. (2006).**Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. International journal of food Microbiology 112,51-61p.

### **k**

- ✓ **Kacimi El Hassani S. (2013).** La dépendance alimentaire en Algérie : importation de lait en poudre versus production locale, quelle évolution ? Mediterranean Journal Of Social Sciences Vol 4, N°11, 152-158p.
- ✓ **Kandler O., Weiss N.(1986).** Genus *Lactobacillus*. 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.1209-1220p.
- ✓ **Khalid N.M.et Marth E.H.(1990).***Lactobacillus* , their enzymes and role .In:Ripening and spoilage of cheese .Rev .Dairy Sci .73,158-167.
- ✓ **Khedid K., Faid M., Mokhtari A., Soulaymani A., Zinedine A. (2006).**Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco.Microbiol.Res.10,10-16p.
- ✓ **Kihal M. (1996).** Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostocmesentéroïdes*, élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Oran. 167p.
- ✓ **Klaenhammer T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev 12: 39–85p.
- ✓ **Kouakou P.et Thonart PH. (2011).**Action des cultures protectrices: cas des germes lactiques sur la flore alimentaire Indésirable, Biotechnol. Agron. Soc. Environ.2011 15(2), 339-348,

### **L**

- ✓ **Larpent J.P.(2000)** . Introduction à la nouvelle classification bactérienne: Les principaux groupes bactériens. Ed. Technique et Documentation, 182-212p.
- ✓ **Larpent J.P.(1997)., Roudaut H. et Lefrancq É. (2005).** Alimentation théorique. 2ème Ed- Paris : p.115gie alimentaire, techniques de laboratoire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 1073P.

## Références bibliographiques

---

- ✓ **Larpent J.P. et Bourgois C.M. (1989).** Microbiologie alimentaire. Les fermentations alimentaires. Edition Lavoisier. 168p.
  - ✓ **Larpent J.P. et Larpent M.G. (1990).** Memento technique de microbiologie. Second Ed technique et Documentaire Lavoisier. 417p.
  - ✓ **Laurent S. (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Poly technica Paris. 307 pages.
  - ✓ **Leclerc H. (2002).** Presse therm climat bacteriologie de *Pseudomonas aeruginosa*. Société française d'hydrologie et de climatologie médicales. 139: 9-13p.
  - ✓ **Leclerc H., Gaillard F.L., Simonet M. (1994).** Les grand groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. DOIN. Paris . 445p.
  - ✓ **Leveau J.Y. et Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle : les uorg d'intérêt industriel. Edition : Tec&dac-Lavoisier : 170,171-181p .
  - ✓ **Leveau J.Y. et Bouix M. (1991).** La flore lactique In Technique d'analyse et de control dans les l'industrie agroalimentaire. Bourgois C.M., Leveau.J-Y. Tec&Doc, Lavoisier, pp :152-186p.
  - ✓ **Leveau J.Y., Bouix M., De Roissart H. (1991).** La flore lactique In Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgois C.M., Leveau J-Y. *Tec & Doc*, Lavoisier. p152.
  - ✓ **Lynch C. M., Muir D.D., Banks J. M., Mc Sweeney P.L.H., Fox P. F. (1999).** Influence of Adjunct Cultures of *Lactobacillus paracasei* sp. *paracaseior* *Lactobacillus plantarum* on Cheddar Cheese Ripening. *J. Dairy Sci.*; 8-15.
- M**
- ✓ **Maghnia D. (2011).** Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentes traditionnels algériens. Mémoire de Magister. Université d'Oran-Essenia. Option Microbiologie alimentaire. 72p.
  - ✓ **Magnusson J. et Schnurer J. (2001).** *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *App. Env. Microbiol.* ; 67, 1-5p.
  - ✓ **Makhloufi K. M. (2012).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie. 9p.
  - ✓ **Makras L., Triantafyllou V., Fayol-Messaoudi D., Adriany T., Zoumpopoulou G., Tsakalidou E., Servin A., De Vuyst L. (2006).** Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic *Lactobacillus* towards *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds, *Research in Microbiology*, V.157. 241-247p.

## Références bibliographiques

---

- ✓ **Makras L., Falony G., Van der Meulen R., De Vuyst L. (2006).** Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharides and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain 'by M.T. Liong and N.P.J. APP. Microbiol. 99:783-793p.
- ✓ **Mami A. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat de l'université d'Oran. 25-77p.
- ✓ **Mami A. (2007).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat. Université d'Oran AHMED BEN BELLA. 161p.
- ✓ **Marchal N., Bourdon J.L., Richard C.L. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3<sup>ème</sup> Ed. Doin éditeurs, Paris.
- ✓ **Maouchi, Y. (2018)** sécurité alimentaire 2<sup>ème</sup> édition de la conférence des startups d'Alger, pour assurer une alimentation régulière en eau potable.
- ✓ **Mayachiew P. et Devahastin S. (2008).** Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. LWT-Food Science and Technology, 41 : 1552-1558p.
- ✓ **Molimard P., Le Quere J.L., Spinnler H.E. (1997).** Rôle des lipides dans la perception olfactive des produits laitiers. Int j foodsci tech, 30 : 105-121p.
- ✓ **Moulay M., Aggas H., Benmechrene Z., Guessas B., Henni E., Kihal E. (2006).** Cultivable Lactic Acid bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. World Journal of Dairy and Food Sciences. 1 (1). 12-18p.
- ✓ **Morere I. (2015).** Gestion d'une Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) en restauration scolaire. Acteurs et logiques d'actions. Thèse doctorat, université de Toulouse - France. 24p.

### N

- ✓ **Nanatani K. et Abe K. (2011).** Energy generation coupled with decarboxylation reaction in lactic acid bacteria. In « Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research » Sonomoto and Yokota/ Caister Academic Press éd., Norfolk. United Kingdom. 67-88p.
- ✓ **NGOZI I. (2017).** Comparative Application of Different Strategies of Bacteriocins Produced by *Carnobacterium maltaromaticum* MMF-32 for Inhibition of *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 in Cold-Smoked Haddock. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 38(2), 311-340p.

## Références bibliographiques

---

- ✓ **Nissen-Meyer J., Hauge H.H., Fimland G., Eijsink V.G.H., Nes I.E. (1997).** Ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria: their function, structure, biogenesis, and their mechanism of action. *Recent Res. Devel. Microbiol.* 167, 67–77P .

### **O**

- ✓ **Ogawa J., Kishino S., Ando A., Sugimoto S., Mihara K., Shimizu., S. (2005).** Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(4), 355-364p.
- ✓ **Otero M.C. et Nader-Macias M.E. (2006).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Anim. Reprod. Sci* 96: 35-46p.
- ✓ **Oyetayo V.O., Adetuyi F.C., Akinyosoye F.A. (2003).** Safety and oral pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 90 : 172- 179p.

### **P**

- ✓ **Pelaez S.M, et Martin O. (2009).** Bacteriocin production and sensitivity . *Folia Microbiol.* 49:172-174p.
- ✓ **Piard J., Murianal P., Desmazeaud M., Klaenhammer T. (1992).** Purification and partial characterization of lacticin 481, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis sub sp lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 58:279-284p.
- ✓ **Podolak P. K., Zayas J. F., Kastner C.L., Fung D.Y.C. (1996).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373p.
- ✓ **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D. (2003).** Microbiologie. 2eme édition française, *Groupe de Boeck. Paris*, p1163.
- ✓ **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D., Wiley J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J. (2010).** Microbiologie. 3em édition, *Groupe de Boeck s.a. Bruxelles*. 1216p.

### **R**

- ✓ **Ray B. (2001).** Indicators of bacterial pathogens (409-417). In *Fundamental Food Microbiology*, Ray B (ed). CRC Press: Boca Raton. 355p. arcía S (Eds). John Wiley and Son: New York. 294.400p.
- ✓ **Relevés Epidémiologiques Mensuels (R.E.M) (2017)** . Situation Epidémiologique sur La Base des Cas Déclarés a L' I . N. S. P . Institut National de Santé Publique Vol XXVIII, p22.
- ✓ **Requena T. et Buist G. (2000).** Applied and Environmental Microbiologie, Aug., :3174-3179p.



## Références bibliographiques

---

- ✓ **Ross R.P., Morgan S., Hill C. (2002).** Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol.*79: 3-16p.
- ✓ **Rosset R.(2001).** Etude du cas particulier de *Listeria monocytogenes*, croissance microbienne et froid.Vol 185. 287-299p.
- ✓ **Roudaut H. et Lefrancq É. (2005).** Alimentation théorique. 2ème Ed- Paris : 115p.

### S

- ✓ **Savoy De Giori G. et Hébert M.(2001).** Methods to determine proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology*, Vol. **14**: *Food Microbiol.Protocols. Humana Press.* Totowa. 197-202p.
- ✓ **Schillinger U. et Lucke F.K. (1989).**Identification of lactobacili from meat and meat products. *FoodMicrobiology.* 4: 199-208p.
- ✓ **Schved F.,Lalzar A.,Lindner P., JuvenB.J.(1994).** Interaction of the bacteriocin produced by *pediococcusacidilactici* SJ1 with the cell envelope of *lactobacillus* spp. *Cett.Appl.Microbiol.*19:281-283p.
- ✓ **Shlundt J.et Toyofuku H.(2010).**Intoxication Alimentaire : Manuel-Contrôle des Maladiestransmissible 2 p.
- ✓ **Senoussi A.(2008) .** Caractérisation de l'élevage bovin laitier dans le Sahara : Situation et perspectives de développement. In Colloque International « Développement durable des productions animales : enjeux, évaluation et perspectives », Alger, 20-21 Avril 2008.
- ✓ **Stiles M.E. etHolzapfelW.H.(1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiol*, vol. 36, p. 1-29.
- ✓ **Supuková A., Árvayová M., Supuka P., Rozumyková N.,BrandeburováA.(2010).** *International Scientific Conference on Gastro-Intestinal. Microbial. Ecol. ; 9-11.*
- ✓ **Sutra L., Federighi M., Jouve J.L. (1998).**Manuel de bactériologie alimentaire. Edition Polytechnica. 9p.

### T

- ✓ **Tabak S. etBensoltaneA.(2011).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacteriumbifidum* et *Lactobacillusbulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technologie*,06,71 – 79.
- ✓ **Tailliez P.(2004).** Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en sante humaine. *Actualités microbiologiques.* 35-41.

## Références bibliographiques

---

- ✓ **Thage B.V., Broe M.L., Petersen M.H., Petersen M.A., Bennedsen M., Ardö Y. (2004).** Aroma development in semi-hard reduced-fat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains with different aminotransferase profiles. *Int. Dairy J.*;15, 95–805.
- ✓ **Thompson J. et Gentry-Weeks C.R. (1994).** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*, Vol. I, p 239-290 (Editeurs : De Roissart H. et Luquet F.M).
- ✓ **Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Edition d'un nouveau pédagogique. Canada. 945p.

### V

- ✓ **Vardar U G., Candan F., Daferera D., Polissiou M., Kmen M. (2003).** Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. Et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural AND Food Chemistry*, 46 :4869-4873p.
- ✓ **Vinod kumar J., Somesh S., Neerjas R. (2006).** Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolates of natural lactic acid fermentation of vegetables. *Food Technol. Biotchnol.* 44. (3) : 435 – 439 p.

### W

- ✓ **W.G.O. World Gastroenterology Organisation. (2008).** Probiotiques et prébiotiques. Recommandation pratique. 13-14p.
- ✓ **Wilson M.J. et Versalovic J. (2008).** Book: Therapeutic microbiology: *Probiotics and related strategies*. 395p.
- ✓ **Wilson A.R., Sigeo D.E., Pton H.A.S. (2005).** Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1516-1522p.
- ✓ **Wong H.C. et Chen Y.L. (1988).** Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2179-2184p.

### Z

- ✓ **Zalan Z., Hudacek J., Stetina J., Chumchalova J., Halasz A. (2010).** Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *Eur. Food Res. Technol.* 230(3), 395-404p.

## Références bibliographiques

---

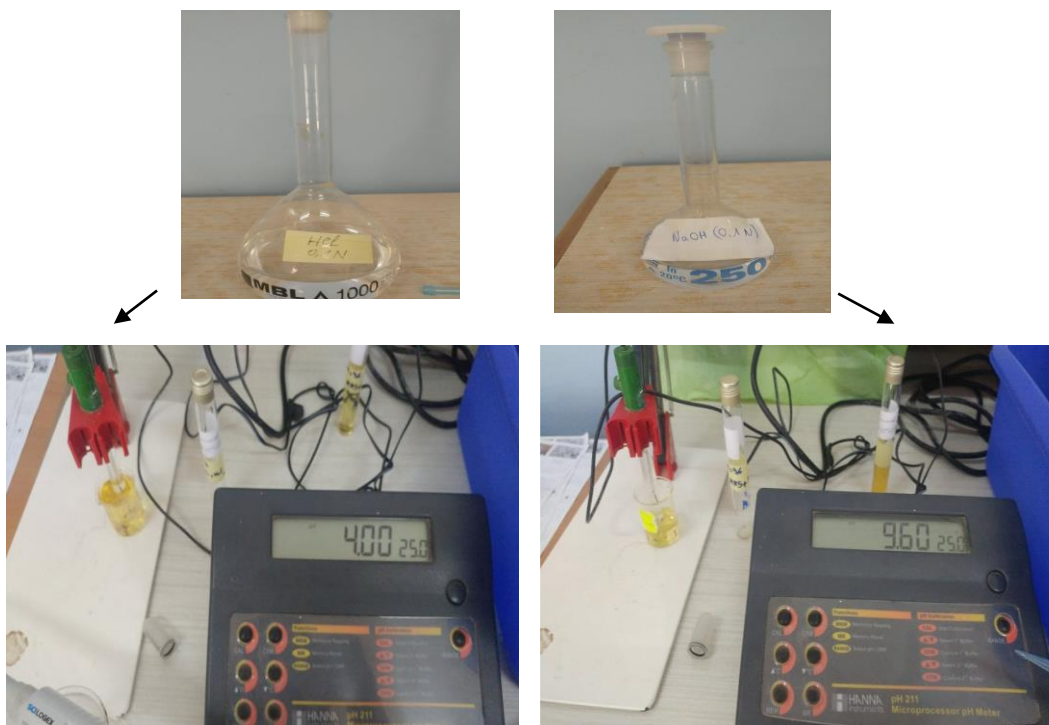
- ✓ **Ziane M. (2015).**Caractérisation, identification et étude de la thermorésistante de souches de *Bacillus cereus* isolées de semoule de couscous. Thèse de doctorat, en microbiologie:UniversitéAboubekrBelkaid, Tlemcen.3-6 p.

# **Annexe**

## Annexe I



**Figure 1 :** Préparation des dilutions décimales.



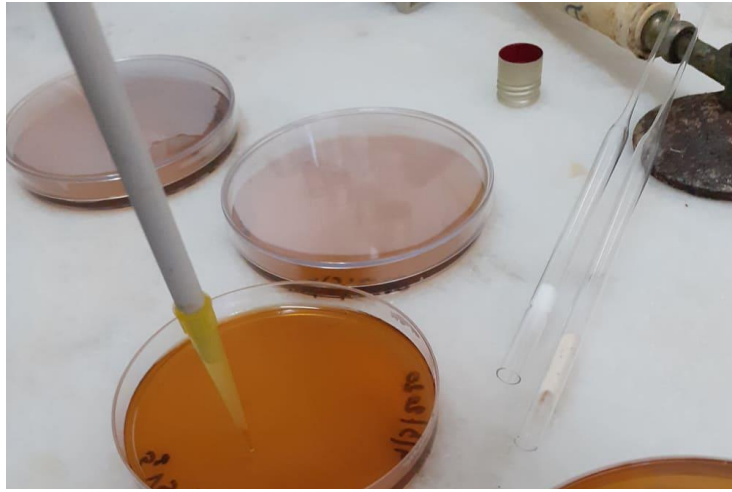
**Figure 2 :** Ajustement de pH des souches de *Lactobacillus* par NaOH et HCl .



**Figure 3 :** Réalisation de test de la résistance au tellurite de potassium.



**Figure 4 :** Revivification des souches pathogènes .



**Figure 5 :** Réalisation de test de spots par les *Lactobacillus*.

**Quelques matériels utilisés :**



**Etuve**

(Réf :2001243, J.P. SELECTA, SPAIN).



**Autoclave**

(Réf: KRB23C1441, NEWMED,  
REGGIO EMILIA, ITALY).



**Bain marie**

(Réf : 6001196, J.P.SELECTA  
,SPAIN).



## Annexe II

### Composition des milieux de culture

**Tableau 1 :** 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 |          |

✓ La composition de la **gélose nutritive** : Bouillon nutritif plus 15g d'agar.

**Tableau 2:** Composition de bouillon MRS .

| Composant                            | Quantité    |
|--------------------------------------|-------------|
| Peptone                              | 10g         |
| Extrait de viande                    | 10g         |
| Extrait de levure                    | 5g          |
| Glucose                              | 20g         |
| Tween 80                             | 1ml         |
| Phosphate bi potassique              | 2g          |
| Acétate de sodium                    | 5g          |
| Citrate d'ammonium                   | 2g          |
| Sulfate de magnésium                 | 0,2g        |
| Sulfate de manganèse                 | 0,05g       |
| Eau distillée                        | 1000ml      |
| pH final                             | 6,5 +/- 0,1 |
| Autoclave à 120°C pendant 20 minutes |             |

✓ La composition de la **gélose MRS** : Bouillon MRS plus 15g d'agar

**Tableau 3 :** Composition de gélose Hektoen

| <b>Composant</b>          | <b>Quantité</b> |
|---------------------------|-----------------|
| 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             |

**Tableau 4 :** Milieu Mueller Hinton.

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

## Composition des solutions/colorants utilisés

Tableau 5 : Eau physiologique .

| Composant          | Quantité |
|--------------------|----------|
| Chlorure de sodium | 9g       |
| Eau distillée      | 1000ml   |
| pH final           | 7,2      |

Tableau 6: Composition des colorants utilisés.

✓ Violet de gentiane au cristal

| Composant          | Quantité           |
|--------------------|--------------------|
| Violet de gentiane | 10g                |
| Phénol.            | 20g                |
| Ethanol à 0.95     | 100cm <sup>3</sup> |
| Eau distillée      | 1dm <sup>3</sup>   |

✓ Lugol

| Composant           | Quantité         |
|---------------------|------------------|
| Iode                | 5                |
| Iodure de potassium | 10               |
| Eau distillée qsp   | 1dm <sup>3</sup> |

✓ Fuchsine de Ziehl

| Composant       | Quantité           |
|-----------------|--------------------|
| Fushine basique | 10g                |
| Phénol          | 50g                |
| Ethanol         | 0,5cm <sup>3</sup> |
| Eau distillée   | 1dm <sup>3</sup>   |