

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



**Université Saad Dahlab BLIDA1**

**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**

**Recherche des bactéries lactiques sécrétrices des substances antimicrobiennes (bactériocine) à partir du lait cru.**

**Soutenu le : 17/09/2020**

**Présenté par :**

**M<sup>lle</sup>. FARES Asma. M<sup>lle</sup>. CHAHMI Manal Hala. M<sup>lle</sup>. EL-AICHI Ihssene.**

**Devant le jury :**

<b>M<sup>me</sup> BOUJEMAA N.</b>	<b>MCA</b>	<b>USDB</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup> BENHOUNA I.</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>me</sup> AIT SAADI N.</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB</b>	<b>Promotrice</b>

**Année universitaire :**

**2019-2020**

## *Remerciements*

*« Louange à Dieu qui nous a donné l'esprit, la volonté, le courage et le savoir ».*

*Suite à l'achèvement de ce modeste travail, on tient tout particulièrement à remercier notre promotrice M<sup>me</sup> Ait Saadi .N pour nous avoir proposé ce sujet si intéressant et nous acceptés d'encadrer et consacré autant de temps pour nous, pour sa bienveillance, ses conseils et ses orientations.*

*A M<sup>me</sup> Boujmhaa .N, nous adressons nos remerciements les plus sincères pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider ce jury.*

*A M<sup>me</sup> Benhouma .J, qui nous a fait l'honneur de bien vouloir accepter de juger ce travail.*

*Nos vifs et sincères remerciements vont également à M<sup>me</sup> Meklat .A, qui nous a accueilli avec une grande sympathie et bienveillance, Son aide été précieux et ses remarques constructives malgré ses nombreuses obligations.*

*Nos remerciements vont également au chef de laboratoire d'hygiène, de BLIDA, a monsieur Teffahi .D pour ces conseils judicieux mais aussi et surtout pour sa qualité humaine.*

*A M<sup>me</sup> Benzitouni. A, et monsieur Rachid responsable de laboratoire de microbiologie de l'Institut Pasteur à leurs précieux aides lors de l'entretien des souches bactériennes et pour leurs astuces pratiques, les plus performantes.*

*A tous les personnes de la fromagerie Rifi, Boufarik pour nous accueilli et avoir fourni les moyens nécessaires pour mener à bien cette étude. Plus particulièrement M<sup>me</sup> bouabísa .N.*

*A M<sup>me</sup> ourak .S responsable de laboratoire de microbiologie Saïdal (Beraki, Oued Samar) pour son précieux aide*

*Aux personnes de la ferme Saadi de Maramene, soumaa et bouarfa pour leur aide et le fournissement des échantillons nécessaire à l'étude.*

*Nous remercions tous ceux qui nous ont rendu service et qui nous ont soutenus de près ou de loin pour réaliser ce travail. .*

## *Dédicaces*

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

*Mes très chers parents (Nourddine et Faïza)*

*Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers votre encouragement que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisé. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés à moi. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie.*

*Mes très chers sœurs Nour el-îmène, Roumaïssa et Hayet et cher frères Adem et Mohamed abd el-illah à qui je souhaite une vie pleine de bonheur, de santé et de réussites.*

*Toutes mes amies et surtout ma chère amie Ouassila Moussaoui et toute sa famille.*

*Toutes ma famille petits et grands, cousins et cousines et surtout mes grandes mères Nadjia et Fatiha.*

*Mon trinômes et amies Manal et ihssene et à toute la promo 2020 de microbiologie à qui je souhaite tout le bonheur et la réussite du monde.*

*Tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin*

*Asma*



## *Dédicaces*

*Avant tout je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la force, la volonté et le courage de mener à bien ce modeste travail*

*Je dédie ce modeste travail :*

*Aux deux personnes qui comptent le plus pour moi, à ceux qui m'ont soutenu tout le long de ma vie et de mes études, à mes chers parents (**Ahmed et Benarfa Ratiba**), grâce à leur amour, leurs encouragements, leur soutien inconditionnel, leurs disponibilités, leur patience, leurs conseils qui m'ont été très précieux. Que ce modeste travail soit l'exaucement de leurs vœux tant formulés, le fruit de leurs innombrables sacrifices,*

*Ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude. Que Dieu vous bénisse et vous protège.*

*A ma chère sœur : **Houria** pour son aide précieux.*

*A mes chers frères **Mohammed et Khaled**.*

*A toute ma famille, Ma grand-mère, mes tantes maternelles et paternelles et mes cousins et cousines.*

*A mon trinôme **Ihsene et Asma** et à toute la promo 2020 de microbiologie.*

*A ma chère **Siham** pour son aide*

*A **M<sup>me</sup> Amel** et monsieur **Rachid** responsable de laboratoire de microbiologie de l'Institut Pasteur.*

*A mes amies **Imane et Feriel**, A **M<sup>lle</sup> Malika** pour son aide*

*A tous mes proches et tous ceux qui m'aiment. Avec qui j'ai partagé des moments très agréables*

*À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

*Manal*



## *Dédicaces*

*Chaque jour qui passe je remercie Allah, et je le pris tout le temps de me donner la force de suivre le chemin qu'il m'a tracé afin de mener à bien le destin qu'il m'a prévu*

*Que je dédie ce travail à :*

*Mes très chers parents (Kamel et Cherifa) : les prunelles de mes yeux. Mes meilleurs amis, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur.*

*Merci pour vos soutien moral, vos sacrifices qui m'ont toujours donné la force pour persévérer et pour prospérer dans la vie, je n'arriverais jamais à vous exprimer mon sincère amour, que dieu vous donne la santé et longue vie.*

*A mes chères sœurs Ryma, Asmaa et Chourouk que dieu vous protège et vous préserve.*

*A la mémoire de mes grands -parents paternels et maternels que DIEU garde leurs âmes dans son vaste paradis.*

*A toute ma famille.*

*A mes amies en particulier Alim Nawel.*

*A tous les personnes que j'aime et à tous les gens qui m'ont aidé de loin et de près, qui n'ont jamais cessés de me soutenir et de me donner de l'amour et de la vivacité.*

*A mon trinôme Manal et Asma et à la promo 2<sup>ème</sup> année master microbiologie 2020.*

*Ihssene*



## ملخص

تحتوي البكتيريا الحمضية اللاكتيرية على خصائص تمنحهم دوراً مهماً في صناعة الأغذية الزراعية، لا سيما من خلال مشاركتها في التخمر وحفظ الطعام.

خلال هذه الدراسة تم عزل 13 سلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك وتنقيتها على الوسط MRS و M17 من حليب الماعز والأبقار الخام من ثلاث مناطق تقع في ولاية البلية. تم التعرف على أربع عزلات منها واختبار قوتهم العدائية.

خصصت العزلات للجنس العصيات اللبنية بناءً على نتائج صبغة جرام واختبار الكاتلاز والاختبارات البيوكيميائية والفسولوجية (النمو عند درجات حرارة مختلفة: 15 درجة مئوية، 30 درجة مئوية، 45 درجة مئوية، النمو عند 2%، 4%، 6.5% من كلوريد الصوديوم و عند درجات الحموضة 4 و 9.6 ونوع التخمر من الجلوكوز

اختبار تخمير الكربوهيدرات باستخدام معارض API 20A و API 50 CH كان قادراً على تحديد جميع العزلات الأربعة. تنتمي هذه العزلات إلى ثلاثة أنواع بكتيرية: *Lactobacillus plantarum* (S1 , S2) ، *Lactobacillus rhamnosus* (S3) و *Lactobacillus acidophilus* (S4) .

دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا ضد مسببات الأمراض (موجبة الجرام وسلبية الجرام) عن طريق الاتصال المباشر بين السلالات المنتجة وسلالات المؤشر بكتيريا المكورات القولونية، العنقودية الذهبية و *Pseudomonas sp* في حين ان البحث عن البكتيريوسين تم اثباته بواسطة طريقة انتشار البئر، يتم اختبار النشاط الاخير من اجل الطاف ومعلقات السلالات المدروسة

أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات أن بكتيريا حمض اللاكتيك الأربعة التي تنتمي إلى جنس العصيات اللبنية تنتج وتفرز في وسط المزرعة مواد مثبطة قادرة على تثبيط نمو المكورات القولونية العنقودية الذهبية و

*Pseudomonas sp* مع مناطق تثبيط يتراوح قطرها بين 8 الى 30 ملم.

من ناحية أخرى، أعطى البحث عن البكتيريوسين بطريقة الانتشار نتيجة سلبية لجميع السلالات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: الحليب الخام، بكتيريا حمض اللاكتيك، العصيات اللبنية، النشاط المضاد للبكتيريا، البكتيريوسين

## Résumé :

Les bactéries lactiques possèdent des propriétés qui leur confèrent un rôle important dans l'industrie agroalimentaire, notamment par leur participation à la fermentation et la conservation des aliments.

Au cours de cette étude, 13 souches de bactéries lactiques ont été isolées et purifiées sur milieu MRS et M17 à partir du lait cru de chèvre et de vache provenant de trois régions situées dans la wilaya de BLIDA dont quatre isolats ont été identifiées et testées pour leur pouvoir antagoniste.

Les isolats ont été rattachés au genre *Lactobacillus* sur la base des résultats de la coloration de Gram, le test de la catalase et les tests biochimiques et physiologiques (croissance à différentes températures : 15°C, 30°C et 45°C, croissance à 2%, 4%, 6,5% de Na Cl et à pH 4 et 9.6 et le type fermentaire à partir du glucose)

Le test de la fermentation des hydrates de carbone en utilisant les galeries API 20A et API 50CH a permis d'identifier les quatre isolats. Ces isolats ont été affiliés à trois espèces bactériennes : *Lactobacillus plantarum* (S1 et S2), *Lactobacillus rhamnosus* (S3) et *Lactobacillus acidophilus* (S4).

L'étude de l'activité antibactérienne vis-à-vis des germes pathogènes (à Gram positif et à Gram négatif) est réalisée par contact direct entre les souches productrices et les souches indicatrices (*E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas* sp) tandis que la recherche des bactériocines a été démontrée par la méthode de diffusion en puits, cette dernière activité est testée pour les surnageants et les suspensions des souches étudiées.

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont révélé que les quatre bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* produisent et excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas* sp. avec des zones d'inhibition variant entre 8 à 30 mm de diamètre.

Par contre la recherche de la bactériocine par la méthode de diffusion en puits a donné un résultat négatif pour toutes les souches étudiées.

**Mots clés :** lait cru, bactéries lactiques, *Lactobacillus*, activité antibactérienne, bactériocine.

## Abstract:

Lactic acid bacteria have properties that give them an important role in the agri-food industry, notably through their participation in fermentation and food preservation.

In the course of this study, 13 strains of lactic bacteria were isolated and purified on SRM and M17 media from raw goat and cow milk from three regions located in the wilaya of BLIDA of which four isolates were identified and tested for their antagonistic power.

The isolates were assigned to the genus *Lactobacillus* on the basis of the results of the Gram stain, the catalase test and the biochemical and physiological tests (growth at different temperatures: 15 ° C, 30 ° C and 45 ° C, growth at 2%, 4%, 6.5% Na Cl and at pH 4 and 9.6 and the fermentation type from glucose) .

The test of carbohydrate fermentation using API 20A galleries and API 50CH identified the four isolates. These isolates were affiliated to three species bacterial: *Lactobacillus plantarum* (S1 and S2), *Lactobacillus rhamnosus* (S3) and *Lactobacillus acidophilus* (S4).

The study of the antibacterial activity in relation to pathogenic germs (Gram positive and Gram negative) is carried out by direct contact between the producing strains and the indicator strains (*E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* sp) while that the search for bacteriocins has been demonstrated by the well diffusion method, the latter activity is tested for the supernatants and suspensions of the strains studied.

The results of the antimicrobial activity revealed that the four lactic acid bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* produce and excrete in the culture medium inhibitory substances capable of inhibiting the growth of *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* sp. with zones of inhibition varying between 8 to 30 mm in diameter.

On the other hand, the search for bacteriocin by the diffusion method then gave a negative result for all the strains studied.

**Key words:** raw milk, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, antibacterial activity, bacteriocin.

## Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique.

**API** ®: Analytical Profile Index.

**ARN** : Acide Ribonucléique.

**ATCC**: American Type Culture Collection.

**BEA** : Bile esculin agar.

*E* : *Escherichia*.

**Ech** : Echantillon.

**FAO**: Food and Agriculture Organization.

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

**GRAS** : Generally Regarded As Safe (généralement considérées comme sûres)

**HCL** : Acide Chlorhydrique.

**LAB** : Acid Lactic Bactéria.

*Lb*: *Lactobacillus*.

**M17** : Milieu de Terzaghi et Sandine.

**MRS**: de Man- Rogosa et Sharp.

**NaCL** : Chlorure de Sodium.

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.

**ONPG** : Ortho nitrophénil- $\beta$ -galactopyranoside

**PCR** : Polymerase Chain Reaction.

**pH**: Potentiel d'Hydrogène.

*S*: *staphylococcus*.

*sp*: *species*.

*ssp*: *Sub-species*.(Sous-espèce).

**UFC** : Unité Formant Colonie.

**VP** : Vosgues –Proskauer.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Bactéries lactique sous microscope électronique ( <b>Maghnia , 2011</b> ) .....	7
<b>Figure 2 :</b> aperçu schématique de la phylogénie des bactéries lactiques en avril 2017 ( <b>Sauer et al.,2017</b> ) .....	8
<b>Figure 3 :</b> Fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie homofermentaire et voie hétérofermentaire ( <b>Moumene, 2016</b> ).....	12
<b>Figure 4 :</b> Système protéolytique des bactéries lactiques ( <b>Boulouf, 2016</b> ).....	12
<b>Figure 5:</b> Principales voies de la lipolyse ( <b>Boulouf, 2016</b> ) .....	13
<b>Figure 6 :</b> Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries Gram positif. Schéma proposé par <b>Fernandez, (2014)</b> .....	21
<b>Figure 7 :</b> les souches pathogènes utilisées pour tester l'activité antibactériennes. ....	25
<b>Figure 8 :</b> Prélèvement des échantillons de lait de chèvre. ....	26
<b>Figure 9 :</b> prélèvement des échantillons à lait de vache. ....	
<b>Figure 10 :</b> prélèvement des échantillons partir de la collecte. ....	26
<b>Figure 11:</b> les dilutions décimales .....	27
<b>Figure 12:</b> conservation à courte terme (A), conservation à longue terme (B).....	28
<b>Figure 13 :</b> Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées. ....	29
<b>Figure 14 :</b> schéma de conservation à longue durée des bactéries lactiques purifiées. ....	29
<b>Figure 15 :</b> Protocole d'isolement des souches lactiques. ....	30
<b>Figure 16 :</b> Test d'effet de Na Cl sur les souches S1, S2, S3, S4 a différentes concentrations. ....	32
<b>Figure 17:</b> Ajustement de milieu MRS liquide a un pH=4 (A) et a un pH=9,6 (B).....	33
<b>Figure 18:</b> Réalisation de test de fermentation des hydrates de carbones : récupération de culot (A), l'inoculum (B), séries des tubes ensemençé par l'inoculum de la souche testé ainsi le sucres testé (C). ....	36
<b>Figure 19 :</b> Inoculation de la galerie Api 20A avec la suspension bactérienne des souches S2 (en haut) et S3 (en bas). ....	37
<b>Figure 20 :</b> inoculation de la galerie Api 50CH avec la suspension bactérienne de la souche S3 et S4.....	39
<b>Figure 21:</b> Test de l'activité protéolytique des bactéries lactiques .....	40
<b>Figure 22:</b> Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots sur agar.	41

<b>Figure 23:</b> les étapes de la préparation de l'extrait bactériocinique : centrifugation et récupération du surnageant (A), neutralisation du surnageant a un PH=7 (B), filtration du surnageant (C).....	42
<b>Figure 24:</b> cultures des isolats (S1, S2, S3, S4, S5 et S13) en milieu liquide MRS (A) ou M17 (B) après 24h d'incubation.....	44
<b>Figure 25 :</b> Aspect macroscopique des colonies cultivées sur milieu solide MRS (A) et M17 (B).....	45
<b>Figure 26 :</b> aspect des colonies des isolats S1, S2, S3, S4 isolées sur milieu MRS après purification.....	46
<b>Figure 27:</b> les formes obtenues observées au microscope optique au grossissement (G×1250) avec légendes A, B, C.....	47
<b>Figure 28 :</b> Résultats de test de catalase .....	48
<b>Figure 29 :</b> Résultats de croissance à différents concentration de ph : (A) : pH 4, (B) : pH 9,6 .....	50
<b>Figure 30 :</b> Résultats de Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl (A) :2%, (B) :4% (C) : 6.5% pour les quatre isolats comparant à un tube témoin non ensemencé.....	50
<b>Figure 31:</b> Résultats de croissance à différentes températures (15°C ,30°C et 45 °C) de quatre souches comparant à un tube témoin non ensemencé. ....	51
<b>Figure 32 :</b> Résultats de test de thermorésistance.....	52
<b>Figure 33 :</b> Résultats de la fermentation des hydrates de carbones à partir de la galerie Api 20A. ....	55
<b>Figure 34:</b> résultats de l'activité protéolytique.....	57
<b>Figure 35:</b> activité antimicrobienne des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes. {E.coli (A) , S.aureus (B) , Pseudomonas sp (C)} .....	58
<b>Figure 36 :</b> l'activité antibactérienne des quatre souches lactiques vis-à-vis E.coli. ....	58
<b>Figure 37:</b> l'activité antibactérienne des quatre souches vis-à-vis Staphylococcus aureus.....	59
<b>Figure 38:</b> l'activité antibactérienne des quatre souches vis-à-vis Pseudomonas sp. ....	59
<b>Figure 39:</b> résultats de la recherche des bactériocines.....	60
<b>Figure 40 :</b> Résultat du profil fermentaire de la souche : Lactobacillus rhamnosus (S3) et Lactobacillus acidophilus (S4) sur la galerie AP 50 CHL après 48 h d'incubation.....	63

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : composants du lait de différentes espèces ( <b>Ainouche et Bouslah, 2015</b> ) .....	3
<b>Tableau II</b> : les différentes races du caprin présent en Algérie .....	4
<b>Tableau III</b> : flore indigène de lait cru ( <b>Michel et al., 2002</b> ).....	5
<b>Tableau IV</b> : les genres de bactéries lactiques utilisées en biotechnologie alimentaire et leurs caractéristiques différentielles ( <b>Lahtinen et al., 2012</b> ).....	10
<b>Tableau V</b> : métabolites antimicrobiens de faible masse molaire sécrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines ( <b>Leonard, 2013</b> ).....	16
<b>Tableau VI</b> : Les quatre bactériocines de la classe III ( <b>Moll et al., 1999</b> ).....	19
<b>Tableau VII</b> : Caractéristiques des échantillons du lait.....	24
Tableau VIII: les souches pathogènes utilisées.....	25
<b>Tableau IX</b> : caractères macroscopiques des colonies isolées.....	45
<b>Tableau X</b> : Caractères microscopique des isolats. ....	48
<b>Tableau XI</b> : caractérisation physiologiques des isolats. ....	49
<b>Tableau XII</b> : Les résultats des tests biochimiques.....	52
<b>Tableau XIII</b> : Résultats de la fermentation des hydrates de carbones par les souches testées. ....	54
<b>Tableau XIV</b> : Récapitulatif des résultats d'identification des souches isolées .....	56
<b>Tableau XV</b> : Activité protéolytique des souches lactique isolées à partir du lait cru.....	57
<b>Tableau XVI</b> : profils fermentaires des 2 souches lactiques par les galeries AP 50 CHL. ....	61

Table des matières	
Remerciements	
Dédicaces	
الملخص	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Table des matières	
Introduction.....	<b>1</b>

## **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

<b>I.1 Lait.....</b>	<b>3</b>
I.1.1 Définition du lait.....	3
I.1.2 Les composants du lait de différents espèces.....	3
I.1.3 Lait de vache.....	4
I.1.4 Lait de chèvre.....	4
I.1.4.1 Généralités sur le caprin.....	4
I.1.4.2 Définition de lait de chèvre.....	5
I.1.4.3 Caractérisation microbiologique de lait de chèvre.....	5
<b>I.2 Les bactéries lactiques.....</b>	<b>6</b>
I.2.1 découverte des bactéries lactiques.....	6
I.2.2 Définition et caractéristiques.....	7
I.2.3.1 les caractéristiques des quelques principaux genres des bactéries lactiques.....	9
I.2.4 Métabolisme des bactéries lactiques.....	11
I.2.4.1 La glycolyse.....	11
I.2.4.2 la protéolyse.....	12
I.2.4.3 La lipolyse.....	13
I.2.5 Rôle et intérêt des bactéries lactiques.....	13
I.2.5.1 domaine agro-alimentaire.....	13
I.2.5.2 domaine de santé.....	14
<b>I.3 Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....</b>	<b>14</b>
I.3.1 Les acides organiques.....	15
I.3.2 Le peroxyde d'hydrogène.....	15
I.3.3 Le dioxyde de carbone.....	15
I.3.4 Le diacétyl.....	15
I.3.5 La reutérine.....	15

I.3.6 Les bactériocines .....	16
I.3.6.1 Introduction.....	16
I.3.6.2 Définition des bactériocines.....	17
I.3.6.3 Caractérisations des bactériocines.....	17
I.3.6.4 Classification des bactériocines .....	17
I.3.6.5 Mode d'action .....	19
I.3.6.6 La production des bactériocines.....	21
I.3.6.7 Applications des bactériocines.....	22

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

II.1 Matériel .....	24
II.1.1 Matériel non biologique.....	24
II.1.2 Matériel biologique.....	24
II.2 Méthodes .....	25
II.2.1 Prélèvement des échantillons .....	25
II.2.2 Isolement des bactéries lactiques.....	26
II.2.3 Purification des isolats des bactéries lactiques.....	27
II.2.4 Conservation des isolats.....	28
II.2.5 Pré identification des bactéries lactiques .....	31
II.2.5.1 Critère morphologique .....	31
II.2.5.2 Critères physiologique : .....	32
II.2.5.3 Critères biochimiques : .....	33
II.2.6 Caractéristiques technologiques des isolats .....	39
II.2.6.1 Etude de l'activité protéolytique des souches.....	39
II.2.6.2 Etude de l'activité antibactérienne des souches.....	40
II.2.6.3 Recherche de bactériocine (méthode indirecte).....	42

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1 Résultats et interprétations .....	44
III.1.1 Isolement et pré identification des bactéries lactiques .....	44
III.1.2 Caractéristiques technologique .....	57
III.1.2.1 Résultats de l'activité protéolytique.....	57
III.1.2.2 Résultats de l'activité antibactérienne des souches .....	58
III.2 Discussion .....	63
Conclusion et perspectives.....	72

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

# **Introduction**

# Introduction

---

## Introduction

L'Algérie est un pays de tradition laitière. Le lait et les produits laitiers qui occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, ils apportent la plus grosse part de protéines d'origine animale. En regard de son contenu en énergie métabolisable, le lait présente une forte concentration en nutriments (**Ubi, 2010**).

La microflore microbienne du lait cru, composée essentiellement de bactéries lactiques, participe de façon importante à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés (lait fermenté et fromage) (**Boulouf, 2016**). Sur le plan hygiénique, elles freinent le développement de la flore indésirable et améliorent la conservation de l'aliment, par la production de l'acide lactique et d'autres métabolites antimicrobiens, qui sont utiles comme substituts naturels pour les conservateurs chimiques dans le cadre du contrôle biologique de la croissance des agents pathogènes et des bactéries d'altération (**De Vuyst and Vandamme, 1994 ; Gálvez et al. 2007, Perin et al., 2013**).

Depuis une dizaine d'année, un intérêt considérable est associé à l'utilisation des bactéries lactiques à effet bénéfique pour la santé ou « probiotique » (**Hadef, 2012**). Ce sont des micro-organismes très répandus dans la nature. On les trouve dans le sol (**Chen et al., 2005**), sur les végétaux (**Ekundayo, 2014**). Elles constituent aussi une fraction majeure de notre flore intestinale (**Hove et al., 1999**) et tapissent les muqueuses buccales (**Van et al., 1972**) et vaginales (**Voravuthikunchai et al., 2006**), contribuant ainsi à nous protéger contre l'invasion des germes pathogènes.

Les bactéries lactiques colonisent naturellement plusieurs matrices alimentaires. Elles sont depuis des siècles associés à l'alimentation humaine et animale. Ces microorganismes sont tolérés par l'homme et les animaux, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) (**Klaenhammer et al., 2005**).

L'industrie alimentaire est très préoccupée par la possibilité que des micro-organismes pathogènes soient transmis aux consommateurs par les aliments qu'elle produit et tente par tous les moyens d'empêcher cette propagation (**Tahiri, 2007**). Les règles d'hygiène strictes et les normes sévères associées à la transformation saine des aliments font partie de la culture de plusieurs entreprises du domaine alimentaire. Cependant, il est difficile de contenir entièrement tous les agents pathogènes. De plus, la grande disponibilité d'aliments prêts à consommer avec une longue durée de conservation augmente les risques de contamination en procurant une plus

## Introduction

---

longue période de croissance des micro-organismes contenus dans ces aliments (**Dortu, 2008 ; Huss et al., 2000**).

Les moyens de lutte employés contre ces agents pathogènes font le plus souvent appel aux barrières traditionnelles telles que le sel, les nitrates et les sorbates. Cependant, les nouvelles tendances du marché montrent une réticence des consommateurs pour les additifs chimiques et le sel. De plus le consommateur favorise de plus en plus le recours aux produits naturels. Ainsi, des investigations récentes se sont orientées vers la lutte biologique qui consiste à valoriser les produits issus du métabolisme des bactéries lactiques ayant une activité antimicrobienne (**Naghmouchi, 2007**), tels que les acides organiques (acide lactique, acide acétique....), le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le diacétyl, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (**De Vuyst and Vandamme, 1994; Gálvez et al. 2007 ; Hammi, 2016**).

L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes (**Ababsa, 2012**).

Dans ce contexte, les objectifs assignés à notre travail consistent à réaliser :

- ✓ L'isolement, la purification et la caractérisation phénotypique des bactéries lactiques à partir d'un lait cru de chèvre et de vache de la région de Blida.
- ✓ La mise en évidence de pouvoir antimicrobien dans le but de sélectionner des souches inhibitrices possédant un pouvoir inhibiteur contre les germes pathogènes.
- ✓ Recherche de substances antimicrobiennes "type bactériocine" et la détermination de leurs spectre d'activité vis -à- vis ces bactéries pathogènes.

# **Synthèse bibliographique**

## I.1 Lait

### I.1.1 Définition du lait

Le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femme et par celles des mammifères femelles pour la nutrition des jeunes (**Aboutayeb, 2009**).

Le lait cru est un lait qui n'a subi aucun traitement de conservation sauf la réfrigération à la ferme. Il doit être conservé au réfrigérateur et consommé dans les 24h. **Fredot (2006) et Jeante et al., (2008)**, rapportent que le lait doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires. Il peut être commercialisé en l'état mais le plus souvent après avoir subi des traitements des tyndallisations lipidiques et d'épuration microbienne pour limiter les risques hygiéniques et assurer une plus longue conservation.

### I.1.2 Les composants du lait de différents espèces

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

**Tableau I** : composants du lait de différentes espèces (**Ainouche et Bouslah, 2015**)

Eléments en g/L	Vache	Chèvre	brebis	Chamelle
<b>Eau</b>	900-910	900	860	902
<b>Extrait sec total (EST)</b>	125-135	140	190	140
<b>Matières grasses</b>	35-45	45-50	70-75	46
<b>Matières protéiques</b>	30-36	35-40	55-60	36
<b>Caséines</b>	27-30	30-35	45-50	28
<b>Protéines solubles</b>	4-5	6-8	8-10	8
<b>Matières minérales</b>	7.5-8.2	8-10	10-12	7.2
<b>lactose</b>	40-50	40-45	45-50	50

En règle générale, l'eau est le constituant principal du lait. La proportion des autres constituants varie selon les espèces : Chez toutes les espèces, le lait apparaît comme un aliment

riche en calcium et en phosphore, en lactose, en matières grasses et en protéines. Parmi ces laits, le lait de vache est un lait relativement pauvre en matière grasse, moyennement riche en lactose et en protéines et assez riche en calcium et en phosphore.

Le lait de brebis est particulièrement riche en lipides et en protéines, ce qui explique son utilisation majoritairement dans la fabrication fromagère, alors que la composition du lait de chèvre s'apparente plus à celle du lait de vache. (Florence, 2010)

### I.1.3 Lait de vache

Le lait de vache est un liquide opaque de couleur blanche, plus au moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en beta carotène .Sa saveur est douce et son odeur faible.

Le lait de vache de part sa richesse en matière azotée, en calcium et en vitamine offre un intérêt alimentaire exceptionnel. Ce lait est de tous le plus connu et les données qui le caractérisent sont sans doute les plus exactes. Il est logiquement aussi le produit laitier le plus consommé et étudié en nutrition humaine. (FAO, 1995).

### I.1.4 Lait de chèvre

#### I.1.4.1 Généralités sur le caprin

L'espèce Capra Hircus se présente en Algérie sous la forme d'une mosaïque de populations très variées appartenant toutes à des populations traditionnelles (Tableau II).

**Tableau II:** les différentes races du caprin présent en Algérie

Races	région	description	importance	référence
<b>Arbia</b>	Laghouat	Couleur brun foncé dépourvue de cornes.	bonnes aptitudes de reproduction.	<b>Mami, 2013</b>
<b>Makatia</b>	hauts plateaux et le Nord de l'Algérie	grande taille et de couleurs variées	la production de lait et de viande, appréciée aussi pour sa peau	<b>Mami, 2013</b>

#### Suite de tableau II

Races	région	description	importance	référence
-------	--------	-------------	------------	-----------

<b>La chèvre du M' Zab</b>	surtout dans le sud	taille moyenne tête est fine et cornée sa robe présente trois couleurs, le chamois le blanc et le noir	une bonne laitière et très fertile	<b>Abdelguerfi ,2003</b>
<b>Kabyle</b>	montagneux de la Kabylie et de l'Aurès	naine. couleur noirâtre ou blanchâtre avec de longs poils	Mauvaise laitière qui est appréciée pour sa viande	<b>Felaichi ,2003</b>

**I.1.4.2 Définition de lait de chèvre**

Le lait de chèvre est blanc mat due à l'absence de  $\beta$ -carotène. Contrairement au lait de vache, il a une odeur assez neutre. Le lait de chèvre a un goût légèrement sucré. Il est caractérisés par une flaveur particulière et un goût plus relevé que le lait de vache (**Zeller 2005 ; Jouyandah et Abroumand, 2010**).

**I.1.4.3 Caractérisation microbiologique de lait de chèvre**

Les microorganismes de lait se répartissent selon leurs importances, en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore contaminant .Cette dernière est subdivisée en deux sous classes : la flore d'altération et la flore pathogène (**Michel et al., 2002**) .

➤ **Flore indigène ou originelle** : C'est l'ensemble des microorganismes dans le lait à la sortie du pis. Le lait devrait contenir moins de 5.10<sup>3</sup> UFC/mL. Les germes dominants sont principalement des microorganismes mésophiles (tableau III).

**Tableau III:** flore indigène de lait cru (**Michel et al., 2002**)

<b>Microorganismes</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<i>Micrococcus</i> sp	30 - 90
<i>Lactobacillus</i>	10 - 30
<i>Streptococcus</i> ou <i>Lactococcus</i>	<10
Gram négatif	<10

➤ **Flore Contaminant** : C'est l'ensemble des microorganismes ajouté au lait, de la

récolte à la consommation. Elle peut se composer de :

- **La flore d'altération** : cause des défauts sensoriels ou réduire la durée de conservation du produit. Les principaux genres identifiés sont *Pseudomonas* sp. *Proteus* sp., les coliformes (*Escherichia* et *Enterobacter*) et les sporulées tel que *Bacillus* sp et *Clostridium* sp., et certaines levures et moisissures .
- **La flore pathogène** : peut avoir trois sources : l'animal, l'environnement et l'homme. Les principaux germes sont : *salmonella* sp, *staphylococcus aureus*, *clostridium botulinum*, *clostridium perfringens*, *bacillus cereus*, *yersinia enterocolitica*, *listeria monocytogenes*, *escherichia coli*, *campylobacter jejuni*, *shigella sonnei* et certaines moisissures.

Le lait et les produits laitiers constituent un grand groupe reconnu d'une alimentation saine. Ces recommandations reposent surtout sur le fait ces produits constituent une excellente source de certains nutriments pour le maintien en santé et la prévention des maladies à tout âge de la vie vu de la présence de la microflore microbienne du lait cru, composée essentiellement de bactéries lactiques, participe n'ont seulement de façon importante à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques des (production de l'acide lactique , production d'arôme , activité protéolytique ) et leurs rôles caractéristiques fonctionnelles (activité antibactérienne , résistance au passage gastro-intestinal. (Molin, 2008).

## I.2 Les bactéries lactiques

### I.2.1 découverte des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2.75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie. De plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (Quiberoni et al., 2001 ; Guetarni, 2013).

Le terme bactéries lactiques est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal. La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873.

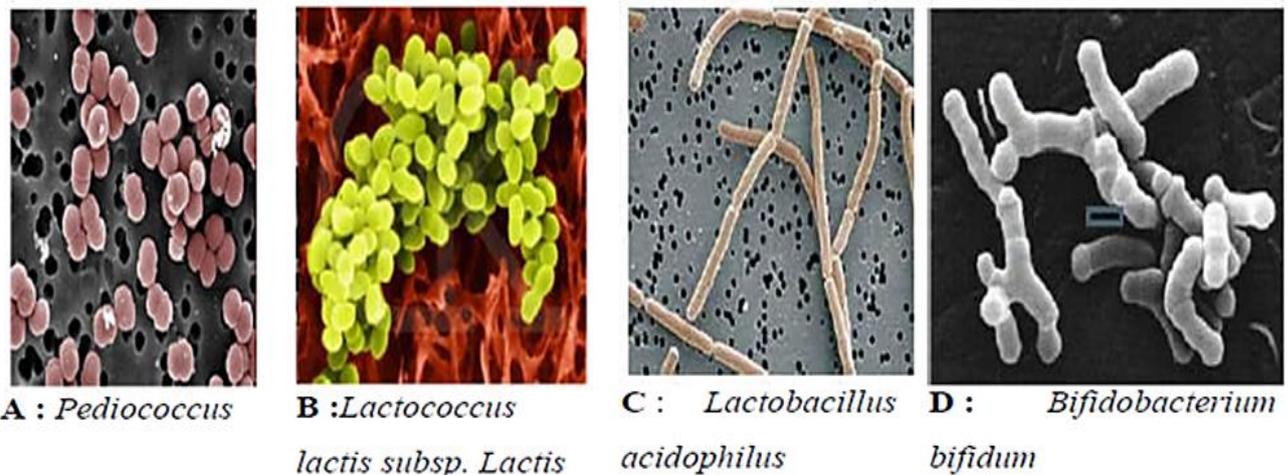
La monographie d'Orla-Jensen (1919) a constitué la base de la classification des bactéries lactiques, les critères utilisés ( morphologie cellulaire, types fermentaire, les températures de croissance et l'utilisation des sucres), bien que l'avènement d'outils taxonomiques plus modernes, les méthodes biologiques en particulier moléculaires, ont

considérablement augmenté le nombre de genres de bactéries lactiques à partir des quatre genres : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* (Lahtinen et al., 2012).

les genres ci-après : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* sont considérés comme les principales bactéries lactiques du point de vue technologique (Hothi., 2008).

### I.2.2 Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont définies comme une famille de microbes hétérogènes et ubiquistes qui peuvent fermenter plusieurs nutriments en acide lactique principalement (Liu et al., 2014). Ces dernières forment un groupe de cocci ou de bâtonnets (figure 1), étant donné que de nombreuses espèces de bactéries lactiques et d'autres bactéries ont longtemps été associées aux aliments, elles sont généralement considérées comme des bactéries sans danger (GRAS) (Wedajo, 2015).



**Figure 1:** Bactéries lactique sous microscope électronique (Maghnia , 2011)

Ce sont des bactéries à Gram positif et exigeantes, oxydase catalase négative, généralement nitrate réductase négative ; dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, apigmentées, aéro anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C avec une tolérance élevée pour un faible pH (Mokoena , 2017). Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme (Salminens et al., 2004; Konig et Frohlich, 2009 ; Pringsulaka et al., 2011).

I.2.3 Classification des bactéries lactiques

La systématique est en évolution permanente. Il n’y a jamais eu de règles unanimement reconnues sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. Par exemple, quelles caractéristiques sont importantes dans la définition de sous-espèces, des espèces et du genre ? La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l’Union internationale de sociétés Microbiologiques (Sneath, 2001).

La classification des bactéries lactiques a été constituée sur la base du travail d’oral et al en 1919, une monographie basée sur les critères morphologiques et physiologiques des bactéries. Bien que ces critères restent très importants pour l’identification des bactéries, en 1977 la taxonomie des BL a été révolutionnée par (Woese et Fox, 1977) qui ont introduit la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques qui a conduit à une reclassification majeure de certaines espèces et sous-espèces. D’autres méthodes génotypiques, basées sur les acides nucléiques sont aussi utilisées en classification comme le pourcentage en GC ou l’hybridation ADN –ADN (Salminen et Von Wright, 2004).

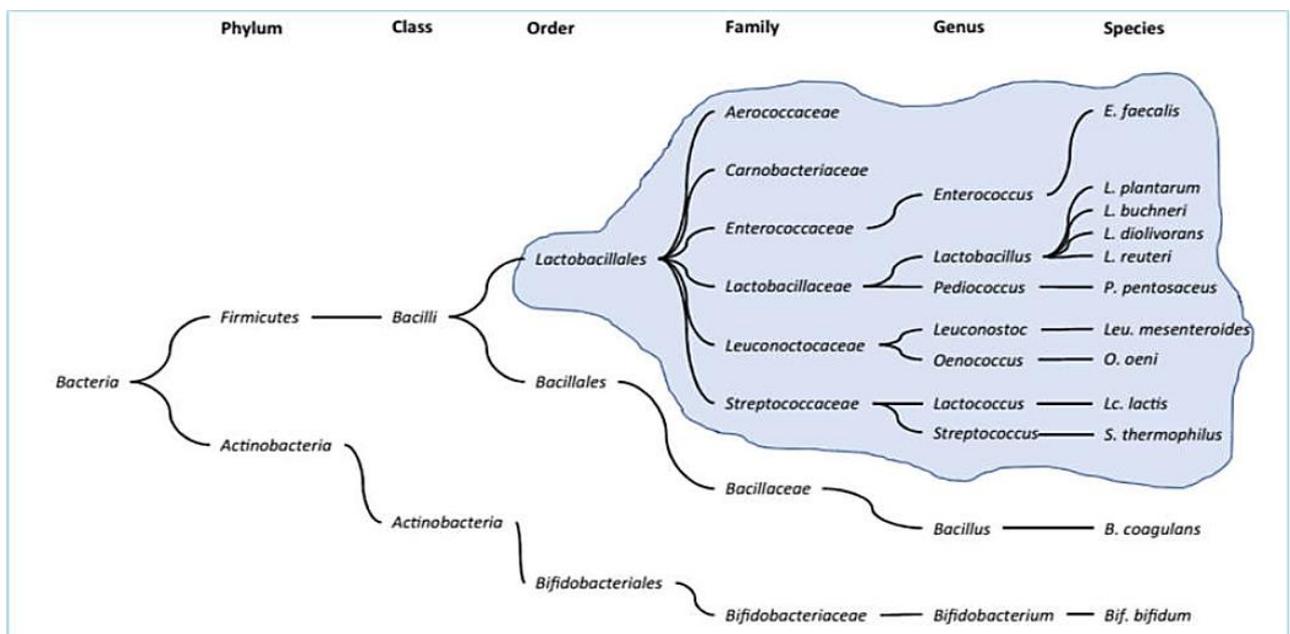


Figure 2 : aperçu schématique de la phylogénie des bactéries lactiques en avril 2017 (Sauer et al.,2017)

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Firmicutes*, la classe I des *Bacilli* et l’ordre II des *Lactobacillales* (Field et al.,2015). Il existe plus de 500 espèces de bactéries lactiques classées sous forme de genres répartis en six grandes familles qui sont toutes représentées

chaque famille se compose de divers genres dont seules les plus connus sont montrés. Seule une sélection d'espèces est illustrée. (Sauer et al.,2017) (Figure 2).

### I.2.3.1 les caractéristiques des quelques principaux genres des bactéries lactiques

**A/ *Lactobacillus*** : le genre *Lactobacillus* et le genre principal et de loin le plus grand et le plus diversifié de la famille des *Lactobacillaceae* (Zhang et Cai, 2014). Les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°. (Moumene, 2016). **Orla-Jensen en 1919** a subdivisé le genre de *Lactobacillus* en trois groupes selon la morphologie et la température de croissance en : *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, et *Betabacterium* (Guiraud, 2003).

- **Le groupe *Thermobacterium*** : comprend les lactobacilles homofermentaires obligatoires, thermophiles qui se développent à 45°C et non à 15°C. Fermentent le glucose et le gluconate sans production de CO<sub>2</sub>. Les espèces les plus fréquentes sont *L.bulgaricus*, *L.lactis*, *L.acidophilus*, *L.leichamni*, *L.delbrueckii*, , *L.mali*
- **Le groupe *Streptobacterium*** : regroupe les lactobacilles homofermentaires mais qui peuvent être hétérofermentaires facultatives en fonction du substrat, mésophiles qui se développent à 15°C, le CO<sub>2</sub> est dégagé lors de la fermentation de gluconate et non produit lors de la fermentation du glucose. Il comporte les espèces *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *L. graminis* *L. rhamnosus*...
- **Le groupe *Betabacterium*** comprend les lactobacilles hétérofermentaires stricts qui sont *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. viridiscens*, *L. kefir*,

**B/ *Leuconostoc*** : ce genre comprend 14 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, les cellules sont ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6.5. Néanmoins, certains *Leuconostocs* peuvent croître même à un pH de 4,5. La température optimale est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut aussi avoir lieu même à 5°C. Les *Leuconostocs* sont des hétérofermentaires obligatoires. Sur un milieu concentré en saccharose, certaines souches produisent des dextrans extracellulaires. (Ababsa, 2012)

**C/ *Pediococcus* :** Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, leur faible activité protéolytique et le plus souvent leur incapacité à utiliser le lactose, ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et croissent à pH : 5 mais pas à pH : 9,6 la température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C, Ce genre est parfois utilisé comme levain lactique pour les charcuteries (**Guiraud, 1998**). *P. pentosaceus* peut jouer un rôle dans la fermentation et la maturation du fromage (**Callon et al., 2004**).

Un certain nombre de bactériocines (pediocines) a été décrit pour *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* (**Todorov et Dicks, 2005**).

**D/ *Streptococcus* :** Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (**Scheilfer, 1987**). La seule espèce de streptocoques qui est utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (**bouricha ,2018**).

Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH: 9.6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes (**Hamar, 2018**).

Le tableau IV présente les principaux genres de bactéries lactiques utilisées en biotechnologie alimentaires et leurs caractéristiques.

**Tableau IV :** les genres de bactéries lactiques utilisées en biotechnologie alimentaire et leurs caractéristiques différentielles (**Lahtinen et al., 2012**)

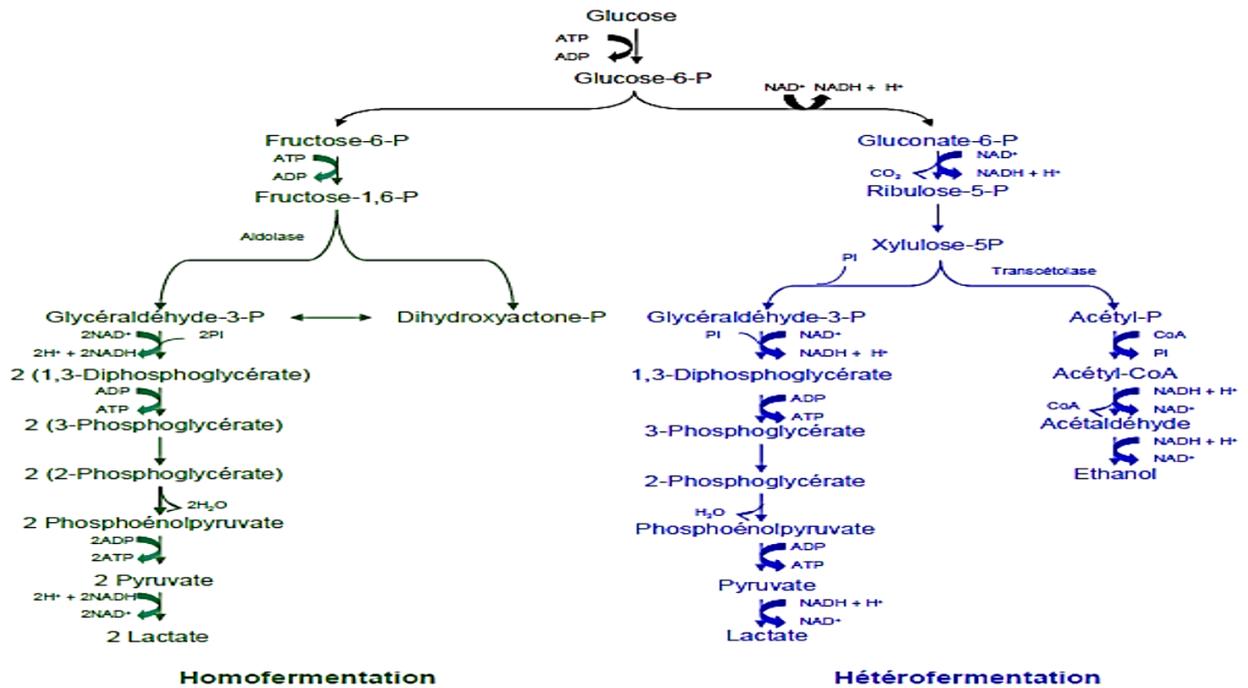
famille	genre	forme	caractéristiques							
			Co2 (Glucose)	10°	45°	6,5% Nacl	18% Nacl	pH 4,4	pH 9,6	Acide lactique
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	cocci	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	bâtonnet	-	+	-	ND	-	ND	-	L
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	cocci	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	cocci	-	+	-	+	+	V	+	L
	<i>Vagococcus</i>	cocci	-	+	-	-	-	-	-	L
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	bâtonnet	V	V	V	V	-	V	-	D,L,DL
	<i>Pediococcus</i>	cocci	-	V	V	V	-	+	-	L,DL
<i>leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	cocci	+	+	-	V	-	V	-	D
	<i>Oenococcus</i>	cocci	+	+	-	V	-	V	-	D
	<i>Weissella</i>	cocci	+	+	-	V	-	V	-	D,DL
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	cocci	-	+	-	-	-	V	-	L
	<i>Streptococcus</i>	cocci	-	-	V	-	-	-	-	L

### I.2.4 Métabolisme des bactéries lactiques

#### I.2.4.1 La glycolyse

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On les distingue en deux groupes biochimiques : les homofermentaires (Voie d'Embden-Meyerhofet) les hétérofermentaires (Voie de Dickens-Horecker) (figure 3).

- **Homofermentaires** : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose
- **Hétérofermentation** : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autre composés : éthanol, CO<sub>2</sub>, acide acétique et autre acide organique( Priyanka et Prakash ; 2009, Hadeif, 2012).

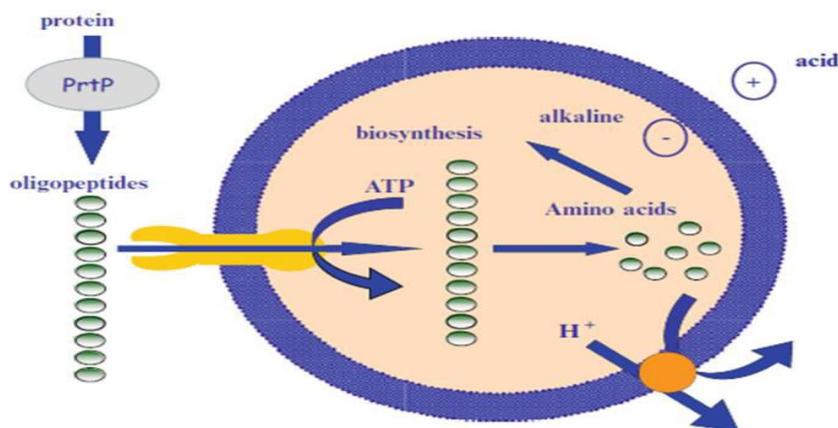


**Figure 3** : Fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie homofermentaire et voie hétérofermentaire (Moumene, 2016)

**I.2.4.2 la protéolyse**

L'incapacité des bactéries lactiques a synthétisé les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote. Le système protéolytique est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalyse l'hydrolyse de protéines (Maghnia, 2011) (Figure 4).

Certaines souches de *L. lactis* subsp. *Lactis* sont capables de synthétiser la plupart des acides aminés dont elles ont besoin (Leonard, 2013).



**Figure 4** : Système protéolytique des bactéries lactiques (Boulouf, 2016)

### I.2.4.3 La lipolyse

Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et di glycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la flaveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de méthylcétones, alcools, lactones et esters (Boulouf, 2016) (Figure 5).

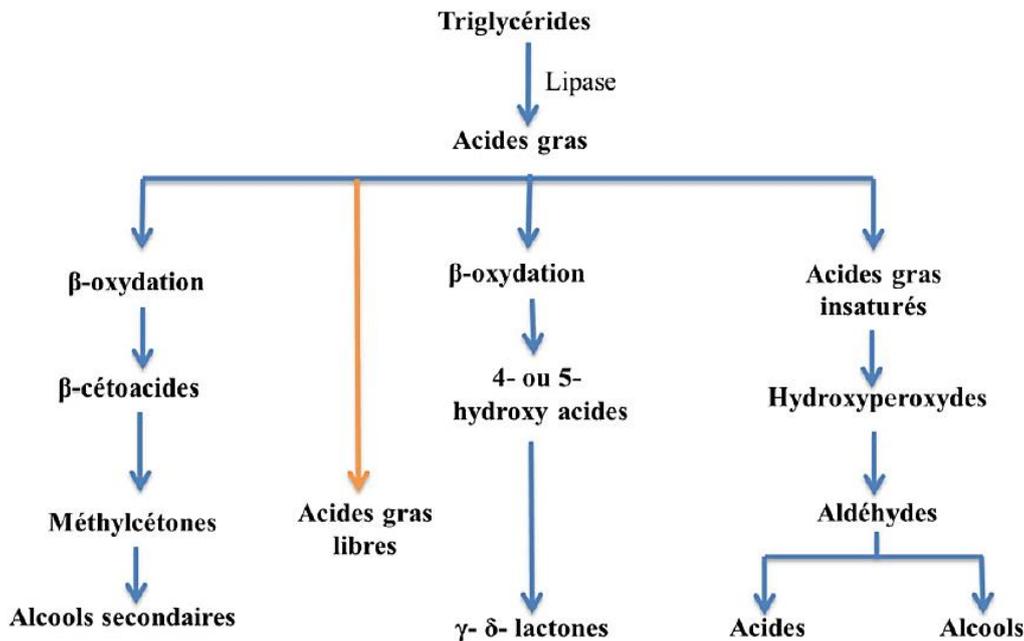


Figure 5: Principales voies de la lipolyse (Boulouf, 2016)

### I.2.5 Rôle et intérêt des bactéries lactiques

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

#### I.2.5.1 domaine agro-alimentaire

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

- ✓ Absence de pathogénicité ou activité toxique ;
- ✓ capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques ;
- ✓ capacité de dominance ;
- ✓ facilité de culture et de conservation et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Ababsa, 2012).

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 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.2.5.2 domaine de santé**

L'action des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques (**Boumediene, 2013**). En 2001 un comité d'experts de l'Organisation des Nations pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'organisation Mondiale de la Santé (OMS définissait les probiotique comme des micro- organismes vivants qui lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (**Shehata et al., 2016**).

Dans des études récentes, les bactéries lactiques ont démontré leur potentiel à promouvoir la santé cutanée et à exercer une réponse immunitaire cellulaire nécessaire à la défense cutanée (**Yanyan et al, 2014**). Ensuite les utiliser dans un procédé semi industriel pour obtenir d'autres produits fermentés avec une meilleure qualité hygiénique et à caractère thérapeutique très poussé, surtout que ces dernières années ; des recherches se sont accentuées pour trouver des voies de thérapies à base des probiotiques pour le traitement de diverses maladies chroniques (**Lairini et al., 2014**).

### **I.3 Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques**

Les propriétés anti microbiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques (**Chentouf, 2015**). Elles synthétisent des molécules à actions bactéricides et ou bactériostatiques (**Bouzaid et al., 2016**) telles que des acides

organiques, notamment l'acide lactique, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines (Tableau VI).

## I.3.1 Les acides organiques

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation. Les principaux acides produits sont : l'acide lactique, l'acide acétique et propionique. L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules (**Mami, 2013**).

## I.3.2 Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes en particulier celle des lactobacilles par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (**Dorti, 2008**).

## I.3.3 Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est produit principalement par les BAL hétérofermentaires. Le mécanisme précis de ses propriétés antimicrobiennes est encore inconnu. Cependant, le CO<sub>2</sub> peut jouer un rôle en créant un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique, et l'accumulation de CO<sub>2</sub> dans la bicouche lipidique de la membrane peuvent provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Bellil, 2013**).

## I.3.4 Le diacétyl

Le diacétyl (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un produit du métabolisme de citrate qui est responsable de l'arôme "beurre" de produits laitiers. Le diacétyl inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine. Il est rarement présent dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante (**Hansal, 2015**).

## I.3.5 La reutérine

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldéhyde HPA) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du

glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques (Dorti, 2008). Leur mode d'action n'est pas complètement compris (Samot, 2012).

La reutérine a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes (Gram positif ou Gram-négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires (Dorti, 2008).

**Tableau V:** métabolites antimicrobiens de faible masse molaire sécrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines (Leonard, 2013)

Composés antibactériens	Souches productrices	Spectre antimicrobien
Acide lactique	toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries a Gram+/-
Acide acétique	Bactéries lactiques hétérofermentaires	Levures Bactéries a Gram+/-
diacétyl	<i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> <i>,lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>	Levures Bactéries a Gram+/-
Peroxyde d'hydrogène	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries a Gram+/-
Dioxyde de carbone	Bactéries lactiques hétérofermentaires	La plupart des groupes taxonomiques de microorganismes

### I.3.6 Les bactériocines

#### I.3.6.1 Introduction

Les bactériocines sont des composés protéiniques produits par diverses bactéries Gram Positif et Gram négatif (Sidhu et Nehra, 2017) avec un mode d'action bactéricide ou bactériostatique contre des espèces étroitement apparentées (Jaya et Siva, 2018). Ils sont produits et sécrétés à l'extérieure de la cellule productrice.

La colicine est la première bactériocine produite à partir d'*Escherichia coli* V et présente une activité inhibitrice contre *E.coli* S (Bharti et al., 2015).

Elles ont une activité antagoniste dirigée particulièrement contre des espèces a gram positif génétiquement apparentées mais aussi contre certaines bactéries a gram négatif y

compris des bactéries pathogènes et/ ou altération alimentaire (**Gong et al., 2010 ; Ghodhbane et al., 2014 ; Pieniz et al., 2014 ; Verma et al., 2014**) .

La nisine découverte en 1928 chez *Lactococcus lactis* est la première bactériocine utilisée dans le système alimentaire comme bio conservateur depuis les années 50 (**Verma et al., 2014**) .

### I.3.6.2 Définition des bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens de synthèse ribosomale, de faible poids moléculaire avec une longueur inférieure à 10 acides aminés ou jusqu'à 688 résidus sécrétés par diverses bactéries Gram positif et Gram négatif (**Sidhu et Nehra, 2017**), mais peu d'entre eux sont largement étudiés.

Les bactériocines présentent une activité inhibitrice contre des bactéries taxonomiquement proches de la souche productrice (**Moumene, 2016**), et contre certains pathogènes tels que *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum*. Leur activité peut être bactéricide ou bactériostatique.

### I.3.6.3 Caractérisations des bactériocines

Il a été suggéré un composé antimicrobien ne doit être considéré comme une bactériocine que lorsqu'il satisfait aux critères suivants (**Moumene, 2016**) :

1. L'activité des bactériocines doit disparaître sous l'action des protéases.
2. Un spectre d'inhibition étroit dirigé contre les espèces apparentées à la souche productrice.
3. La présence d'une fraction protéique biologiquement active.
4. Un mode d'action bactéricide.
5. Un site d'attachement (récepteur) spécifique sur les cellules sensibles.
6. La bactérie productrice synthétise une molécule qui l'a protège contre sa propre bactériocine.
7. Les bactériocines sont codées par des plasmides.
8. Stables dans des zones de pH de 3 à 8.
9. N'ont pas d'effet négatif sur la qualité organoleptique du produit.

### I.3.6.4 Classification des bactériocines

Les bactériocines de LAB ont été classées par **Klaenhammer (1993)** en quatre classes sur la base de caractéristiques communes, principalement structurales (**Batdorj et al., 2005**). Depuis le premier système de classification des bactériocines LAB, de nombreux schémas modifiés ont été proposés (**Wan, 2017**).

La classification la plus récente des bactériocines produites par LAB a été proposée par

**Alvarez et al., (2016)** qui englobe trois classes essentielles, et ceci sur la base de mécanisme de biosynthèse ainsi que l'activité biologique

## ➤ Classe I

Les bactériocines sont des lantibiotiques, c'est-à-dire de petits peptides cationiques, hydrophobes et thermostables qui contiennent des acides aminés inhabituels (thioéther aminoacides lanthionine et / ou méthyl lanthionine) qui sont formés post-traductionnellement (**Elayaraja et al., 2004**).

Protéines de poids moléculaire inférieur à 10 kDa avec modifications post-traductionnelles. Cette classe comprend les protéines susceptibles de subir certaines modifications par leur biosynthèse, en raison de la présence d'une séquence de peptides signaux cela permettra la reconnaissance, le transport et le maintien du peptide inactif (**Gonzalez et al., 2018**). Cette classe a été divisée en six groupes. (**Mcauliffe et al., 2001 ; Towmey et al., 2002**) :

**A/Groupe nisine** : Des lantibiotiques de type linéaires ; cationique structurées en hélice  $\alpha$  amphiphiles et de masse moléculaire comprise entre 2,1 et 3,5 KDa.

**B/Groupe lacticine 481** : Ont une masse moléculaire comprise entre 2,3 et 3,5 KDa et présentent une structure linéaire en position N-terminale et globulaire dans la partie C terminal.

**C/Groupe Mersacidine** : Ces lantibiotiques ont une masse moléculaire comprise entre 1,8 et 2,0 KDa et possèdent une forme globulaire

**D/Groupe cinnamycine** : Ce groupe comprend des lantibiotiques ayant une masse moléculaire comprise entre 1,9 et 2,0 KDa et sont secrétés par des bactéries appartenant au genre *Streptomyces*.

**E/Groupe lactocine** : Un lantibiotique de 37 A.A avec une masse moléculaire de 3,7 KDa, produit par *Lb.sakei*.a lactocine S présente structure linéaire avec deux anneaux localisés en position C-terminal.

**F/Groupe à deux composants** : Ce groupe correspond aux lantibiotiques possédant deux composés peptidiques. La masse moléculaire de ces peptides est comprise entre 2,6 et 4,2 KDa. Les deux peptides ont un effet synergique sur les cellules cibles.

## ➤ Classe II

La bactériocine sont des petits peptides cationiques, hydrophobes et thermostables (**Elayaraja et al., 2004**).

Protéines de poids moléculaire inférieur à 10 kDa sans modifications post-traductionnelles. Cette classe est constituée de protéines qui n'ont pas de modifications inhabituelles et ne nécessitent aucun effecteur pour le transport. Semblables à la classe I (**Gonzalez et al., 2018**).

Cette classe a un grand nombre de bactériocines et a été divisée en trois sous classe (**Dridier et al ; Calvez et al ; Carine et al.,2009**) :

**A/Sous classe IIa:** Sont des peptides composés de 36 à 48 acides aminés . Les bactériocines de cette classe sont actives contre les bactéries des genres *Listeria*, *Enterococcus*, *Lactococcus*.

**B/Sous classe IIb :** La sous classe II b représente les bactériocines à deux composants peptidiques qui y a un nombre d'acides aminés compris entre 30 et 40.

**C/Sous classe IIc :** Contient les bactériocines telle que la lactococine B. La classification actuelle définit les bactériocines de la sous classe IIc comme étant les bactériocines n'ayant pas toutes les caractéristiques de sous-classes IIa et II b.

### ➤ Classe III

Protéines de poids moléculaire supérieur à 10 kDa sans modifications post-traductionnelles. Ceux-ci peuvent exercer un mécanisme d'action lytique et non-lytique. Contrairement aux bactériocines de classe I et II, celles de classe III sont thermolabiles (**Gonzalez et al., 2018**). Cette classe ne contient que quatre bactériocines (tableau VII) (**Nigotova et al., 2007**)

**Tableau VI:** Les quatre bactériocines de la classe III (**Moll et al., 1999**)

Bactériocines	Espèces producteurs
Helveticin	<i>Lactobacillus helveticus A</i>
Enterolysine A	<i>Enterococcus faecium</i>
Zoocin A	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>
Millericin B	<i>Streptococcus milleri</i>

### I.3.6.5 Mode d'action

Le mécanisme d'action spécifique des bactériocines n'est pas clair. En général, de nombreux bactériocines sont supposés interagir avec la surface de la membrane bactérienne de leur hôte cible, principalement par des forces électrostatiques (figure 6) (**Kyriakou et al., 2016**).

D'une manière générale, ces bactériocines sont présumées provoquer la mort cellulaire par perméabilisation membranaire et formation de pores, en raison de leurs caractéristiques cationiques et amphipathiques. Certaines bactériocines sont capables d'altérer la formation de la paroi cellulaire, compromettre la résistance de l'enveloppe cellulaire (**Bastos, 2015**).

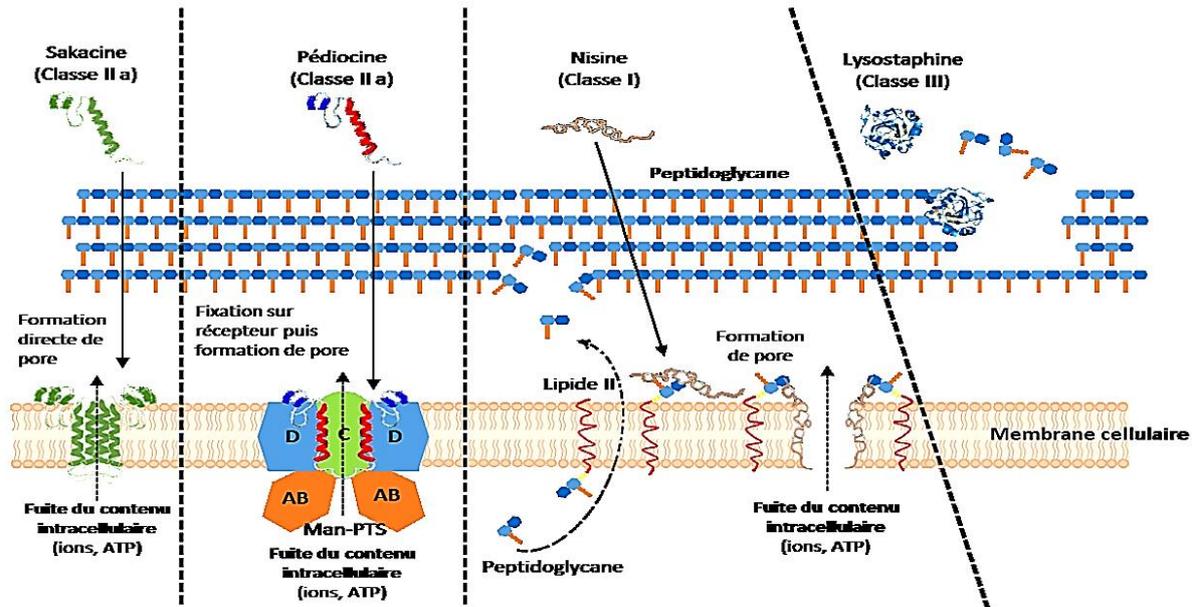
Ils se lient au récepteur de la cellule cible et leur mode d'action comprend la formation de pores, la dégradation de l'ADN cellulaire, la rupture par un clivage spécifique de l'ARNr 16S et l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane. Les bactériocines étant des agents protéiniques différents de la plupart des antibiotiques parce qu'elles sont rapidement digérées par des protéases dans le tube digestif (**Tenea et Yépez , 2016**).

Le mode d'action biologique connu des bactériocines est lié à leur capacité à se lier rapidement aux liposomes anioniques. Après que les bactériocines interagissent avec les lipides anioniques, elles forment des pores dans la membrane lipidique en interagissant avec le lipide II du précurseur du peptidoglycane, empêchant ainsi la biosynthèse du peptidoglycane et perturbant l'organisation de la couche lipidique de la membrane (**Hanafya et al., 2016**).

Ils provoquent ainsi une fuite membranaire de substances de faible poids moléculaire telles que des protons, des ions potassium et des ions phosphate, conduisant à une perturbation du potentiel membranaire, à l'arrêt de la synthèse de l'ATP et à la mort cellulaire (**Sharon et al., 2017**). Une fois à l'intérieur des cellules cibles, ces molécules peuvent se lier aux acides nucléiques pour empêcher l'expression des gènes et interrompre la biosynthèse cellulaire (**González et al., 2018**).

Les représentants des bactéries lactiques sont capables de synthétiser une large gamme de bactériocines mais deux groupes peuvent être distingués. Le premier groupe provoque la mort d'organismes proches de l'organisme producteur. Le second groupe comprend de telles bactériocines qui inhibent le développement de la plupart des types de micro-organismes gram-positifs (**Alexander et al., 2017**).

Les bactéries à Gram négatif sont intrinsèquement résistantes aux bactériocines peptidiques produites par des organismes Gram-positifs en raison du rôle protecteur de leur membrane externe qui empêche l'atteinte de leur cible, c'est-à-dire la membrane plasmique (**González et al., 2018**).



**Figure 6** : Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries Gram positif. Schéma proposé par **Fernandez, (2014)**

### I.3.6.6 La production des bactériocines

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice (**Savijoki et al., 2006**) ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée.

Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (**Verluyten et al., 2004**). Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux pour la croissance.

La composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et azote, affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines (**Aasen et al., 2000 ; Nel et al., 2001; Mataragas et al., 2004; Todorov et al., 2004; Verluyten et al., 2004**).

### I.3.6.7 Applications des bactériocines

#### ➤ Dans le secteur alimentaire

Les bactériocines peuvent être utilisées comme additifs alimentaires, actuellement, La nisine est un agent de conservation, dans lequel il est utilisé dans une variété de produits, y compris le fromage, les aliments en conserve et la viande salée (**Duhan et al., 2013**). La production de bactériocines améliore la capacité du LAB à contrôler la croissance des bactéries pathogènes et des bactéries alimentaires dans les produits alimentaires et les rend particulièrement intéressantes pour l'industrie alimentaire, offrant des alternatives naturelles aux additifs chimiques pour améliorer la sécurité et la qualité des produits alimentaires (**Kondrotiene et al., 2018**).

Il a été trouvé que la poudre LAB lyophilisée contenant de la bactériocine inhibe la *Listeria* chez les hotdogs (**Wan, 2017**).

#### ➤ Dans le secteur sanitaire

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle alternatifs aux antibiotiques (**Smaoui, 2010**). Suite à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance manifesté par plusieurs bactéries pathogènes (parmi lesquelles certaines sont résistantes à plusieurs antibiotiques à la fois) qui menace la santé publique, les études sont actuellement orientées vers la recherche de nouvelles substances antibiotiques naturelles pouvant résoudre ce problème (**Mkrtchyan et al., 2010**).

Les bactériocines de la classe IIa présentent un groupe important de peptides antimicrobiens qui peuvent être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme des agents antiviraux. Ces molécules ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif nuisibles et pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (**Dridner et al., 2006**).

#### ➤ Limites d'utilisation des bactériocines

L'application des bactériocines constitue certes une méthode « naturelle » de conservation des aliments, mais sa mise en œuvre n'est pas aisée. En effet, les nombreuses propriétés des bactériocines favorisant leur utilisation dans le domaine agroalimentaire et/ ou médical n'empêchent pas l'existence de contraintes relatives à leur utilisation.

- Le coût élevé de préparations de bactériocines pures prêtes à l'emploi entraîne de loin la limite la plus importante. D'où l'utilisation plus commune des souches productrices plutôt que des bactériocines isolées.
- La composition de l'aliment représente le premiers facteur pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité inhibitrice de la bactériocine en raison de son adsorption sur des composants du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ ou un pH inapproprié.
- Les traitements appliqués aux produits constituent un facteur pouvant limiter l'effet antimicrobien de la bactériocine dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines bien que la majorité d'entre elles soient résistantes à la chaleur (**Carine et al ., 2009 ; Gálvez et al., 2007**).
- Le dernier facteur limitant l'activité des bactériocines est la présence de bactéries résistantes et de microorganismes qui dégradent les bactériocines par l'effet de protéases qu'elles produisent à l'état physiologique. De plus, dans les produits solides, les bactéries forment des biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (**Schöbitz et al., 2003**).
- D'autre part, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine sur la flore résidente. La sensibilité de la flore a la bactériocine entraine un déséquilibre qui peut conduire à la croissance et la prolifération de microorganismes pathogènes résistants aux bactériocine (**Carine et al., 2009**).

# **Matériel et méthodes**

Notre étude qui a porté sur la recherche des bactéries lactiques sécrétrices des substances antimicrobiennes (bactériocines), a été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène de Blida et l'industrie fromagère RIFI (Boufarik) sur une durée de deux mois (mars et juillet 2020).

## II.1 Matériel

### II.1.1 Matériel non biologique

Le matériel non biologique représenté par, la verrerie, l'appareillage et les milieux de culture est consigné en annexes VI et VII.

### II.1.2 Matériel biologique

Le lait utilisé dans notre étude est le lait cru de vache et de chèvre. Les divers échantillons du lait cru ont été collectés à partir des élevages de différentes régions (Tableau VII) de Blida durant le mois de Mars 2020.

Six échantillons sont prélevés directement à partir de mamelle et six échantillons à partir de la collecte. Chaque échantillon est répété 3 fois. Au total, 12 échantillons ont été prélevés de 3 régions de Blida.

**Tableau VII:** Caractéristiques des échantillons du lait.

		Heure de prélèvement	Région	couleur	Race	Age (ans)	La quantité prélevée (ml)
Caprin 1	Ech 1	9 : 07	Bouarfa	Blanc	Arabia	3	30-50 (mamelle)
	Ech 2	9 : 10					
	Ech 3	9 : 12					
Caprin 2	Ech 1	10 : 05	Maramene	Blanc et marron	Arabia	1	30-40 (collecte)
	Ech 2	10 : 07					
	Ech 3	10 : 09					
Bovin 1	Ech 1	9 : 03	Maramene	Blanc et noir	Holshtein	2	75-100 (collecte)
	Ech 2	9 : 05					
	Ech 3	9 : 09					
Bovin 2	Ech 1	8 :00	Soumaa	Blanc et rouge	Montebelairde	2	25-40 (mamelle)
	Ech 2	8 :02					
	Ech 3	8 :04					

### ➤ Souches pathogènes

Pour les tests d'activité anti bactérienne, nous avons choisi 3 souches pathogènes. Ces dernières ont été fournies par laboratoire d'hygiène, Blida (Tableau IX, figure 7).

Tableau VIII: les souches pathogènes utilisées

Souches pathogènes	Milieu d'isolement
<i>Pseudomonas sp.</i>	GN
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman
<i>Escherichia coli.</i>	GN

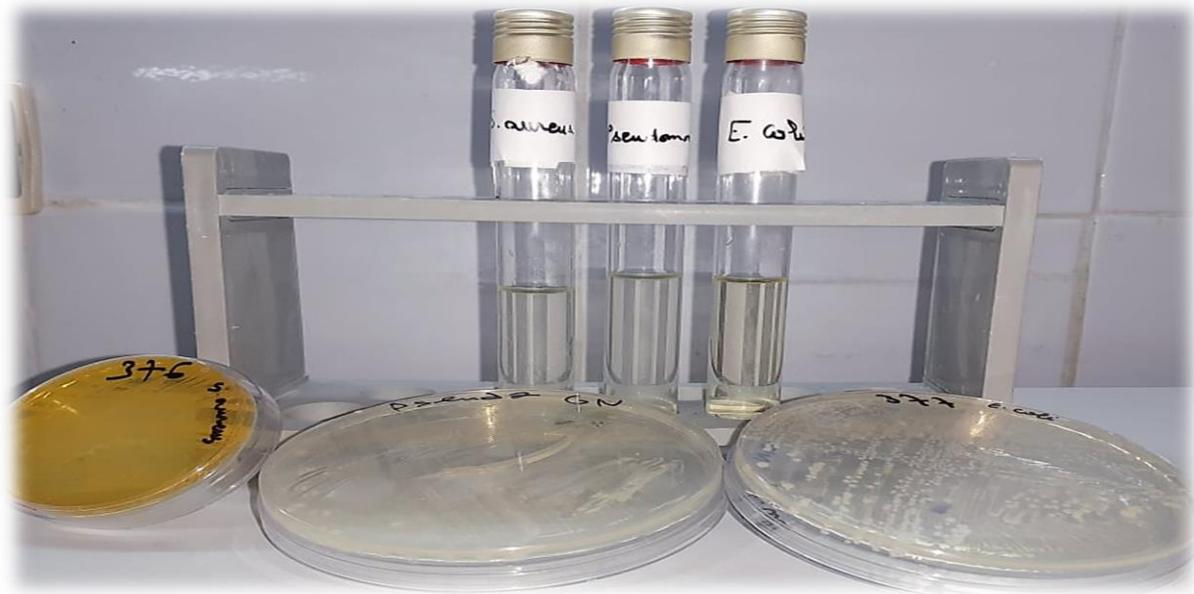


Figure 7 : les souches pathogènes utilisées pour tester l'activité antibactériennes.

## II.2 Méthodes

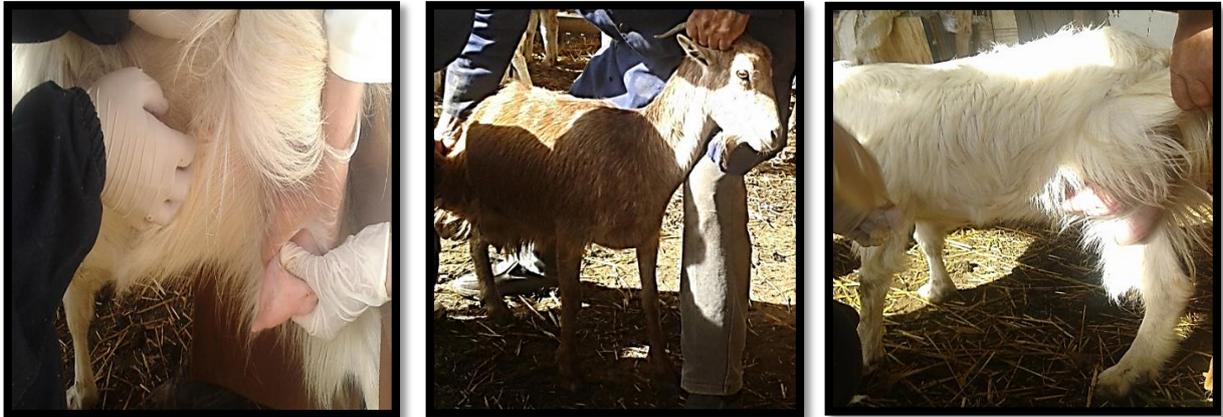
### II.2.1 Prélèvement des échantillons

- Les échantillons ont été prélevés aseptiquement :

Les conditions de prélèvements de lait réalisent directement à partir de la mamelle Sont comme suit :

- Un nettoyage préalable de l'extérieur de la mamelle à l'aide d'un linge préalablement trempé dans une solution désinfectante, la mamelle doit ensuite être séchée. (Figure 8 et 9)
- Les premiers jets de lait sont éliminés (toujours plus fortement chargés en germes).
- Se laver soigneusement et se sécher les mains avant la traite.

- Les échantillons sont recueillis dans des flacons stériles de 250 ml et acheminés dans une glacière au laboratoire dans le plus bref délai afin d'éviter toute contamination et déstabilisation de la microflore naturelle de ces derniers (**Bekhouche, 2006**).



**Figure 8** : Prélèvement des échantillons de lait de chèvre.



**Figure 9** : prélèvement des échantillons à lait de vache.



**Figure 10** : prélèvement des échantillons partir de la collecte.

### II.2.2 Isolement des bactéries lactiques

- L'isolement des bactéries lactiques est fait après incubation de lait cru à 37°C et 45°C pendant 4h pour une éventuelle coagulation pour permettre une présélection des bactéries lactiques.
- **Préparation des dilutions décimales**

La dilution est un processus qui consiste à réduire la concentration d'une substance dans une solution. Dans ce but : 1ml d'échantillon est placé dans un tube contenant 9ml de milieu

TSE stérile ( $10^{-1}$ ). Le mélange est ensuite agité au vortex et des dilutions décimales sont réalisées en cascade jusqu'à la dilution  $10^{-6}$  (Begloul, 2012).

Les ensemencements sont réalisés en masse sur milieu M17 (Terzaghi et sandine ,1975) et MRS (pH 6,5) (Deman et al.,1960) ,en utilisant les dernières dilutions décimales ( $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ ) obtenues à partir de la suspension mère de l'échantillon initial (figure 11).



**Figure 11:** les dilutions décimales

- **Mise en culture**

La méthode consiste à verser un volume de 1ml de dilution dans chaque boîte de Pétri (6 boîtes par dilution) puis couler le milieu en surfusion et homogénéiser en effectuant des mouvements en 8. Après solidification des milieux (Badis et al., 2005) :

- 3 boîtes de Pétri de chaque série sont incubées à 37°C pendant 48-72h en anaérobiose sur milieu MRS (jarre d'anaérobiose) pour l'isolement des lactobacilles.
- 3 boîtes de Pétri de chaque série sont incubées à 45°C pendant 24- 48 h en aérobie sur milieu M17 et à l'obscurité pour l'isolement des Streptocoques lactiques.

### II.2.3 Purification des isolats des bactéries lactiques

Afin de purifier les bactéries lactiques, des repiquages successifs sont effectuées sur les bouillons et gélose (MRS ou M17). La purification des souches consiste à les ensemencer en stries sur des boîtes de Pétri coulées avec les mêmes milieux gélosés (MRS et M17).

25 colonies typiques par leurs apparences macroscopiques (aspect de la colonie, forme, taille, pigmentation, contour, viscosité et odeur) sont isolées à partir des échantillons analysés.

L'ensemble des isolats obtenus ont fait l'objet d'une coloration de Gram, observation de la présence de spores et une recherche de catalase (voir les détails paragraphe **II.2.5** ci-après).

Les bactéries Gram +, catalase – et non sporulées sont retenues et repiquées sur bouillons MRS et M17. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (**Balows et al., 1992; Curk et al., 1996 et Haleni et al., 2006**).

#### II.2.4 Conservation des isolats

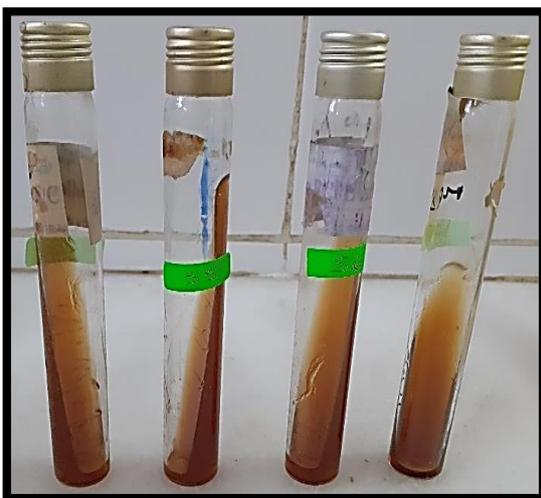
Tous les isolats présumés comme bactéries lactiques (Gram positif et catalase négatif et non sporulées) sont conservés. Deux méthodes de conservation sont utilisées :

- **Conservation à courte durée**

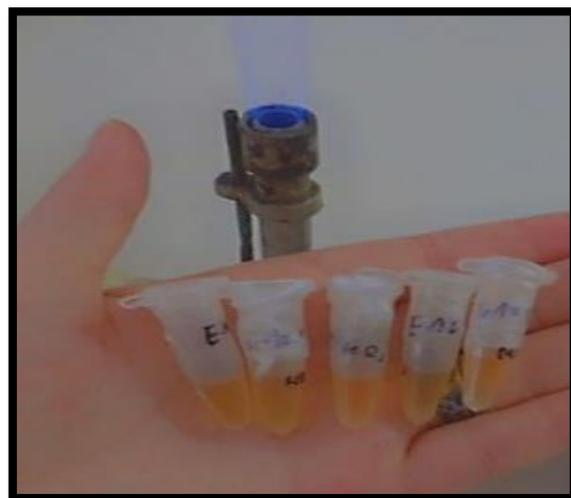
La conservation des bactéries a été réalisée dans des tubes de gélose MRS inclinée. Après incubation à 37 °C pendant 48h, les tubes sont conservés à +4 °C (2 semaine à un mois) (**Bennai et Temine, 2017**) (figures 12 A et 13).

- **Conservation à longue durée**

La conservation des souches à long terme est réalisée sur milieu à base de glycérol (glycérol stock). Une culture de la souche à conserver est effectuée en milieu liquide MRS/ M17. Après croissance des bactéries, un volume de glycérol stérile est ajouté à trois volumes de la culture, la suspension bactérienne à 25 % de glycérol est ensuite répartie dans des éppendorffs (à raison de 1ml) puis congelée à -20 °C (**Nancib, 2007**) (figure 12 B et 14).

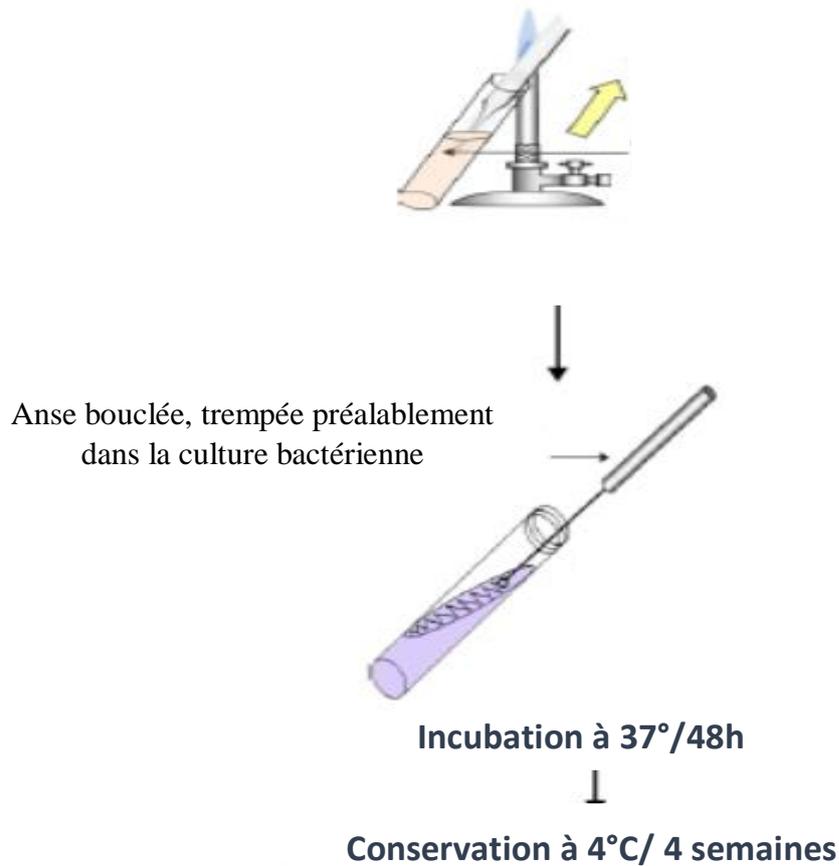


(A)

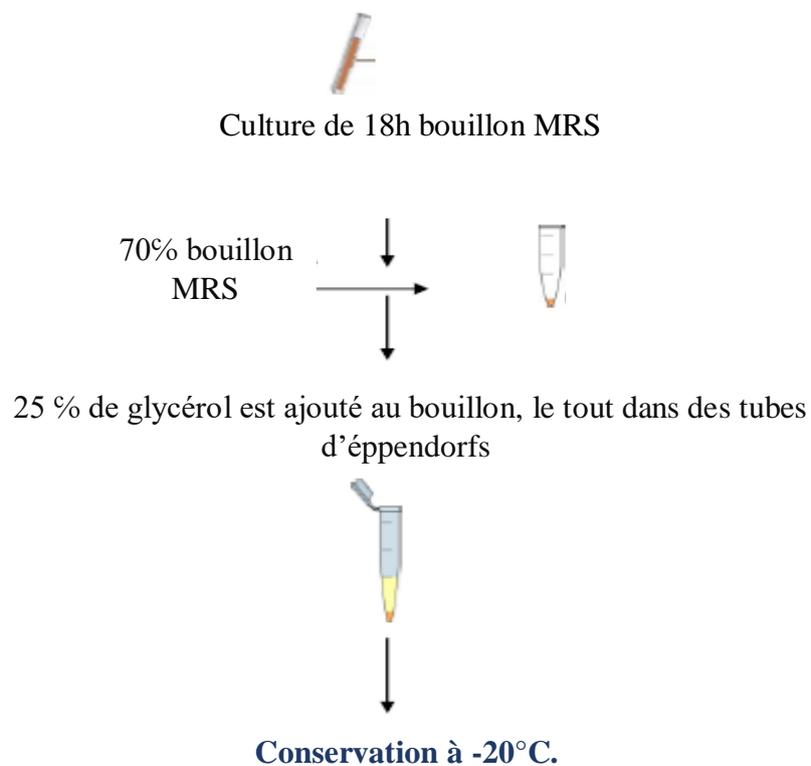


(B)

**Figure 12:** conservation à courte terme (A), conservation à longue terme (B).



**Figure 13 :** Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées.



**Figure 14 :** schéma de conservation à longue durée des bactéries lactiques purifiées.

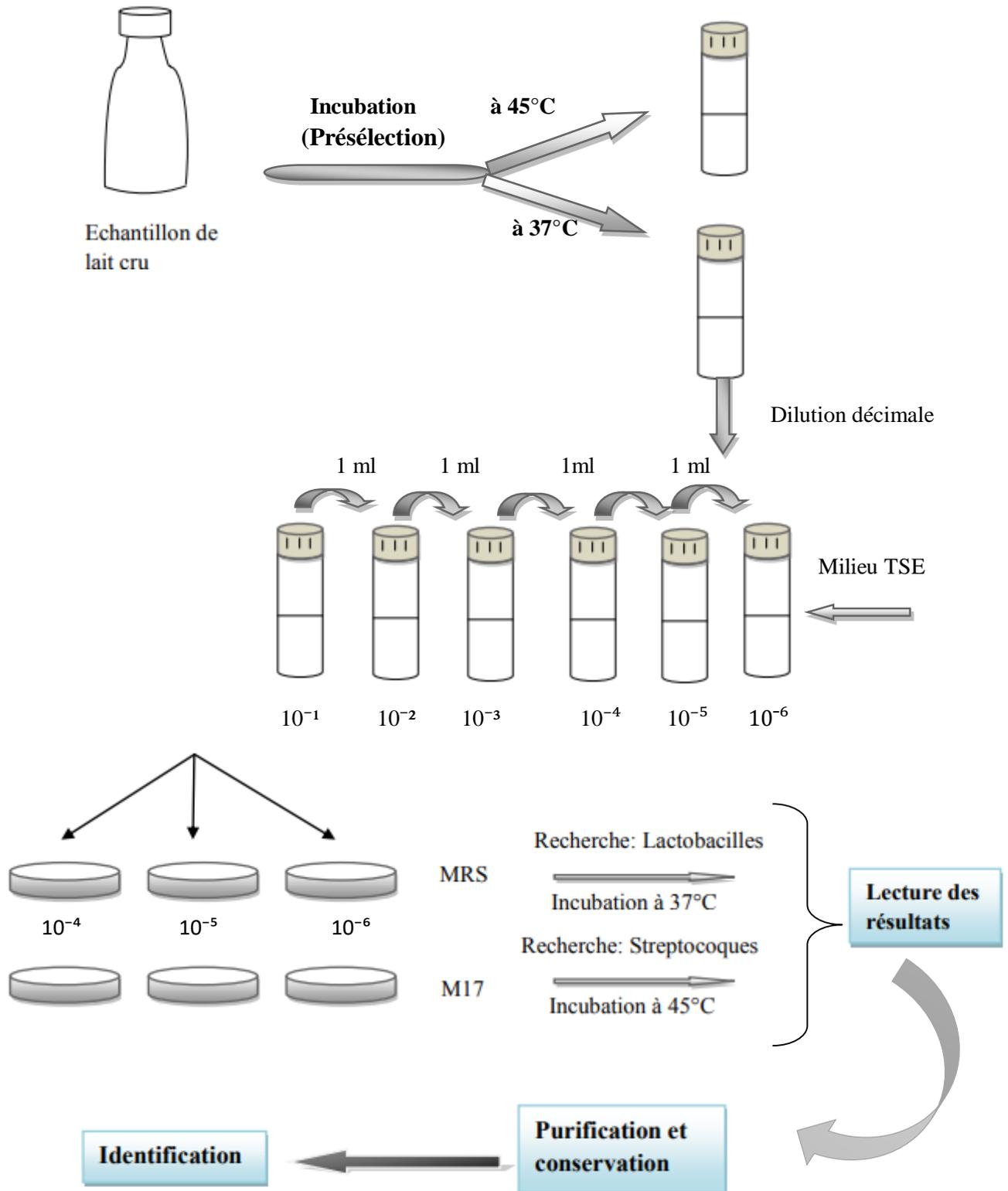


Figure 15 : Protocole d'isolement des souches lactiques.

## II.2.5 Pré identification des bactéries lactiques

La pré identification des souches purifiées est établie pour les bactéries lactiques en se basant sur des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques (forme, coloration de Gram, catalase, croissance à différentes température, sensibilité au Na Cl, fermentation des sucres, production de CO<sub>2</sub> (Lairini *et al.*, 2011).

### II.2.5.1 Critère morphologique

- **Examen macroscopique** : Consiste à étudier la forme, l'aspect, le contour, la surface, la couleur des colonies sur les milieux M17 et MRS.
- **Etude microscopique** : L'observation microscopique permet de définir certains caractères morphologiques et organisationnels des bactéries : coques ou bacilles, organisées en chaînettes ou isolés, bactéries Gram-positif ou négatif et observation de la spore (Singleton, 1999). Ces caractères sont déterminés selon la méthode de coloration de Gram qui consiste à :

- ✓ **Préparation d'un frottis**

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique puis prélever à l'aide d'une pipette Pasteur une fraction d'une colonie isolée.
- Réaliser le frottis de façon à obtenir un étalement mince et homogène.
- Sécher à l'air libre puis fixer le frottis par 3 passages rapides et brefs de la lame au-dessus d'une flamme d'un Bec Bunsen (frottis situé sur le dessus).

- ✓ **Etapes de la coloration différentielle de Gram**

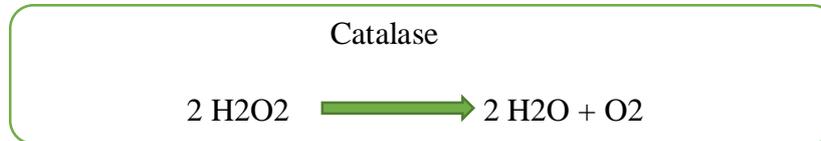
- Recouvrir la lame de violet de gentiane pendant 1 minute.
- Rejeter le violet de gentiane et recouvrir de lugol pendant 1 minute.
- Rejeter le lugol, décolorer à l'alcool 95° pendant 5 secondes et rincer immédiatement à l'eau.
- Recouvrir la lame de fuchsine diluée 1/10 pendant 1 minute puis rincer.
- Sécher à la chaleur et examiner à l'immersion (Denis *et al.*, 2011).

La lecture se fait au grossissement x 100 avec une goutte d'huile à immersion (x1000).

- ✓ La présence de la spore est vérifiée par la recherche des corps qui apparaissent comme des espaces vides à l'intérieur des bactéries coloré en violet (Gram positif).

- **Test de catalase**

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase, celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



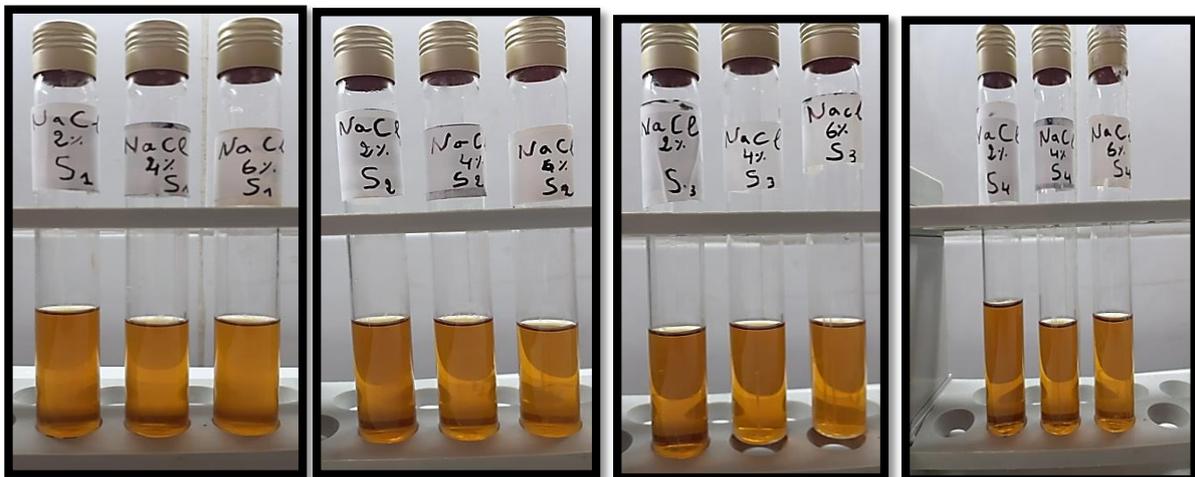
La méthode de recherche de la catalase consiste à mettre en contact une colonie de la bactérie à tester en présence d'une goutte d'eau oxygénée. Un dégagement gazeux abondant (dû à un dégagement de dioxygène) sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (**Belyagoubi, 2014 ; Kassar, 2017**).

### II.2.5.2 Critères physiologique :

- ❖ **Effet de Na Cl :**

Ce test permet de déterminer la résistance des souches au stress salin. (**Larpen et al., 1990 ; Samelis et al., 1994**). Pour chaque souche, quatre tubes stériles contenant 5 ml de bouillon MRS à 2%, 4%, 6,5% de Na Cl ont étéensemencées par une colonie de bactéries lactiques et incubées à 37 °C pendant 48h. (Figure 16).

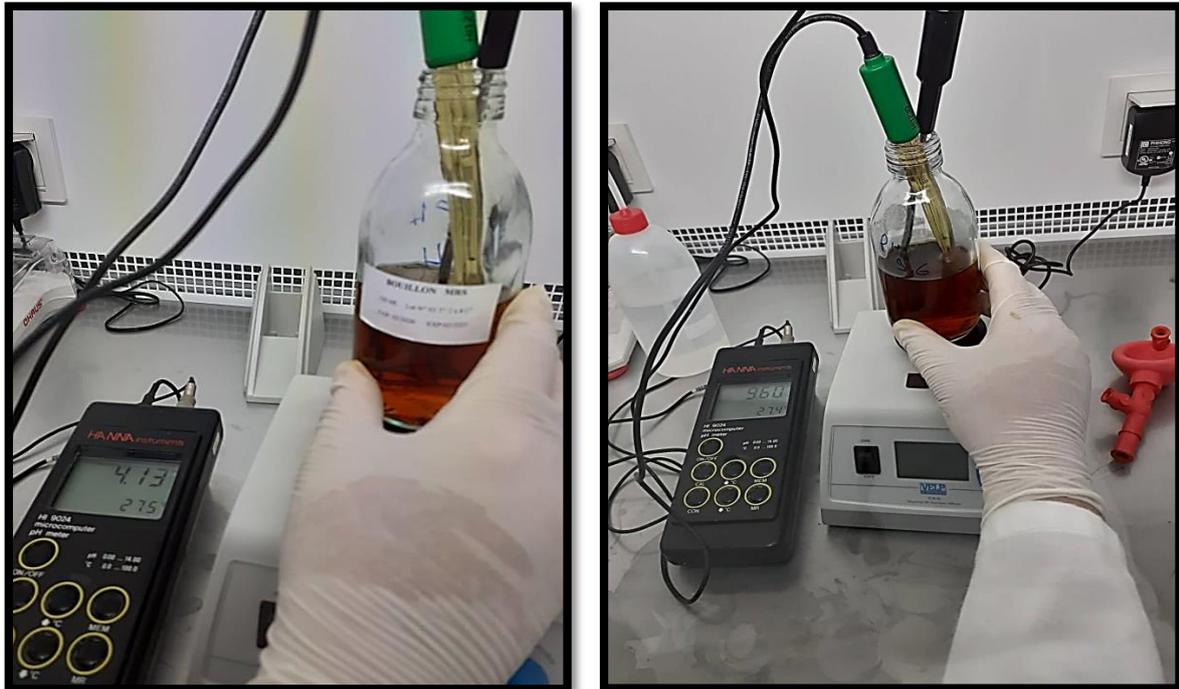
La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin nonensemencé (**Guiraud, 2003**).



**Figure 16 :** Test d'effet de Na Cl sur les souches S1, S2, S3, S4 a différentes concentrations.

- ❖ **Effet de PH :**

Une série d'essais a été réalisée sur le milieu MRS liquide avec un pH de 4 et 9,6 avec incubation à 37°C pendant 24 heures (figure 17). Après le temps d'incubation, l'observation d'un trouble signifié la croissance bactérienne (**Badis et al., 2005**).



(A)

(B)

**Figure 17:** Ajustement de milieu MRS liquide a un pH=4 (A) et a un pH=9,6 (B)

#### ❖ Test des températures de croissance

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactique thermophiles .Après inoculation de bouillon MRS par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 48h aux températures : 15°C 30°C et 45°C. Au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries thermophiles poussent à 45°C alors que les bactéries mésophiles ne développent pas (**Bouricha, 2018**).

#### ❖ Test de thermo résistance :

Des tubes contenant du bouillon MRS sont inoculés par les souches isolées, puis les tube sont déposés dans un bain marie à 60°C pendant 10 min, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 37°C pendant 48 à 72h. Un résultat positif se traduit par un trouble (**Boudjaibe, 2013**).

### II.2.5.3 Critères biochimiques :

#### ❖ Production de l'acétoïne (Acétyle-Méthyle-Carbinol) :

La production d'acétoïne est recherché sur le milieu Clark et Lubs. Après l'ensemencement de chaque isolat dans 10 ml de ce milieu suivi d'une incubation à 30 °C pendant deux jours, on effectue la réaction de Voges Proskawer, en ajoutant 0,5 ml d'une

solution alcoolique  $\alpha$ -naphthol (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O) à 6 % dans l'alcool absolu (VPI) et 0,5 ml d'une solution de soude (NaOH) à 16 % dans l'eau distillée (VPII). Les tubes sont ensuite chauffés et agités par un agitateur de type Vortex. Laissent les tubes sur la paillasse à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu (Guétouache et al., 2014).

❖ **Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) :**

Une culture de 24 h a été ensemencée dans le milieu Möeller à l'arginine. Le milieu ainsi ensemencé est couvert par une couche de l'huile de vaseline stérile (1 ml) pour favoriser les conditions d'anaérobiose.

La lecture s'effectue après 1 à 2 jours à 37°C.

L'arginine décarboxylase est mis en évidence par l'apparition du trouble et le changement de la couleur du milieu du violet vers le jaune au bout de quelques heures (8-10 h) qui s'explique par l'acidification du milieu par les bactéries lactiques en utilisant le glucose comme source de carbone et d'énergie, puis un virage vers le violet (après 24 h) qu'est due à la formation d'ammoniaque (ré alcalinisation du milieu). Le tube témoin vire au jaune et garde la couleur, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive (Moller., 1955).

❖ **Utilisation des citrates comme seule source de carbone :**

Une culture jeune a été ensemencée dans le milieu Citrate de Simmons. Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone : le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu.

La pente du milieu est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubé à 30°C  $\pm$  1°C pendant 5 jours. (Abid, 2015).

- ✓ Citrate-positif : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
- ✓ Citrate-négatif : pas de culture (coloration verte de milieu inchangée).

(Marchal et al., 1991).

❖ **Hydrolyse de l'esculine :**

Ce test a été réalisé sur le milieu gélosé contenant la bile à esculine. Après incubation de la culture à 30°C pendant 24 heures, l'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une couleur noire au milieu de culture (De vos et al., 2009).

❖ **Recherche de la  $\beta$ -galactosidase (test ONPG) :**

Selon Delarras., (2007), le test est pratiqué en réalisant une suspension dense de la bactérie testée dans l'eau physiologique puis à l'aide d'une pince flambée et refroidie nous avons ajouté

un disque imprégné d'orthonitrophénil- $\beta$ -galactopyranoside (ONPG) et nous avons mis les tubes dans l'étuve à 37°C pendant 24 h.

La présence d'une bêta-galactosidase se traduit par la libération de l'orthophényle soluble de couleur jaune qui apparaît après la durée d'incubation.

#### ❖ Type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (CO<sub>2</sub>). (**Hassaine, 2013**).

De jeunes souches préalablement préparées sont ensemencées dans des tubes contenant du bouillon MRS, avec une cloche de Durham. Après incubation à 37°C pendant 24–48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (**Hariri et al., 2009**).

Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO<sub>2</sub>, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO<sub>2</sub> a proportions égales (**Carr et al., 2002**).

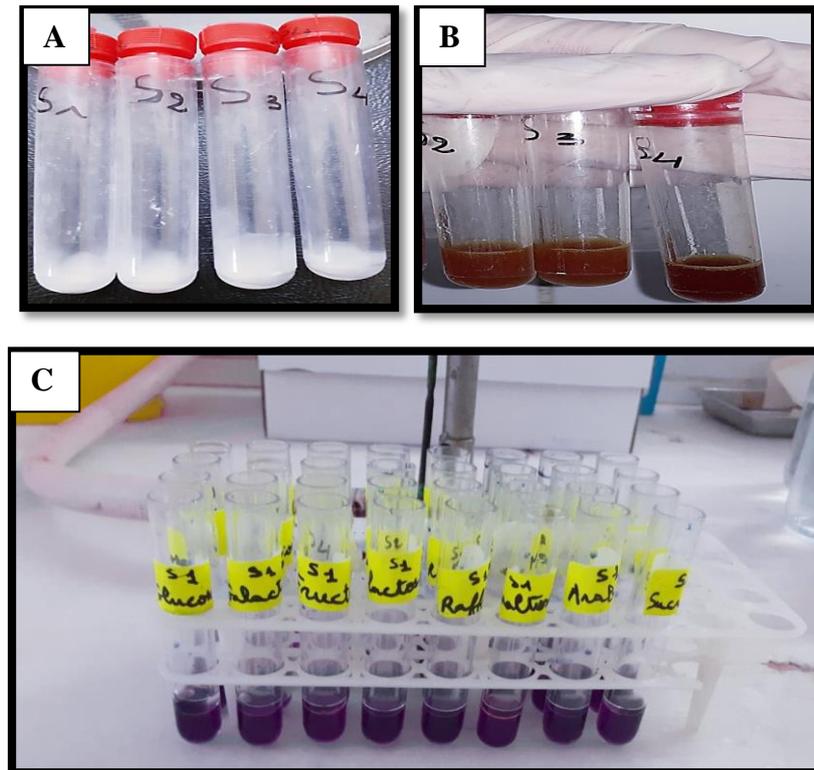
#### ❖ Fermentation des hydrates de carbone (sucres)

L'étude de la fermentation des 8 sucres (glucose, galactose, fructose, lactose, raffinose, maltose, arabinose, saccharose) a été effectuée ;,

La suspension bactérienne est obtenue à partir d'une pré-culture sur milieu MRS qui est incubée à 30°C pendant 18h, 2ml de la culture jeune est centrifugé à 4000 t/min pendant 10min.

Le culot contenant les cellules bactériennes est ensuite lavé deux fois avec de l'eau physiologique pour éliminer les traces du milieu de culture. Ensuite, 2 ml de MRS BCP (milieu MRS sans sucre avec un indicateur de pH : le pourpre de bromocrésol) sont ajoutés au culot ce qui représente l'inoculum. 8 carbohydrates sont répartis séparément dans des tubes à hémolyse a raison de 100  $\mu$ l (avec une concentration finale de 2%) de sucre dans 1 ml de MRS BCP, auxquels on ajoute 100  $\mu$ l de l'inoculum (**Mannu et al., 2002 et Guessas et Kihal, 2004**).

Les conditions d'anaérobiose sont assurées par ajout d'une couche d'huile de paraffine à la surface et l'incubation se fait dans des conditions optimale 30°C, pendant 48h (figure 18). (**Guessas et Kihal, 2004**). Le trouble du milieu accompagne le virage au jaune de l'indicateur de pH dû à l'acidification du milieu, traduit la fermentation du sucre test. Ainsi, le profil fermentaire d'une souche donnée est comparé aux profils-types donnés par la littérature, ce qui permet l'identification de la bactérie selon (**Carr et al., 2002 et Klein et al., 2004**).



**Figure 18:** Réalisation de test de fermentation des hydrates de carbones : récupération de culot (A), l'inoculum (B), séries des tubes ensemencé par l'inoculum de la souche testée ainsi le sucres testé (C).

#### ❖ galerie API 20 A

Afin de compléter l'identification des bactéries lactiques isolées et de caractériser les espèces, la galerie Api 20 A a été utilisée pour établir le profil fermentaire (fermentation de certains hydrates de carbone) des souches lactiques (figure 19).

La galerie API 20 A (bioMérieux®, 20 300, France) permet de rechercher rapidement et facilement 21 caractères pour l'identification biochimique des bactéries anaérobies.

#### ✓ Principe :

La galerie API 20 A comporte 20 micros tubes contenant des substrats déshydratés. Les micros tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (BioMérieux®, 2006).



**Figure 19 :** Inoculation de la galerie Api 20A avec la suspension bactérienne des souches S2 (en haut) et S3 (en bas).

#### ❖ Identification des bactéries lactiques par la galerie API 50 CH :

Les bactéries lactiques qui ont montré une activité antimicrobienne élevée ont été sélectionnées pour une identification par la galerie AP 50 CH (figure 20).

API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettent une identification des microorganismes au niveau de l'espèce et même parfois de la sous espèce sur la base de l'étude du métabolisme des hydrates de carbones et dérivées (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Les tests de fermentation dans notre étude sont inoculés avec API 50 CHL Medium qui réhydrate les substrats.

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le microtube, dû à une production d'acides en anaérobiose révélée par l'indicateur du pH du milieu choisi. Le premier tube sans principe actif sert de témoin négatif.

#### ✓ Préparation des galeries :

Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.

- Préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle).
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles du fond Pour créer une atmosphère humide.
- Sortir les bandes de leur emballage, séparer en deux les bandes 0-19 et 20-39 et les

Déposer dans le fond de la boîte d'incubation.

- Compléter la galerie avec la bande 40- 49.

✓ **Préparation de l'inoculum :**

- Cultiver les bactéries sur un milieu adapté à sa croissance.
- Après 24 h d'incubation, la culture est récupérée par écouvillonnage d'un milieu solide.
- Préparer l'inoculum dans le milieu de l'API 50 CHL Medium (MRS-BCP).
- Exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.
- Retirer l'ampoule du protège-ampoule et conserver le protège-ampoule pour une utilisation ultérieure.
- Enlever délicatement le bouchon.
- A l'aide d'un écouvillon, prélever toutes les colonies obtenues sur gélose MRS en anaérobiose. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures). Bien vérifier la pureté de la souche. Tenir l'ampoule verticalement et émulsifier les germes en frottant l'écouvillon par rotations contre la paroi de l'ampoule tout en restant dans le milieu de suspension. L'opacité finale doit être supérieure ou égale à celle de l'étalon 2 de Mc Farland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

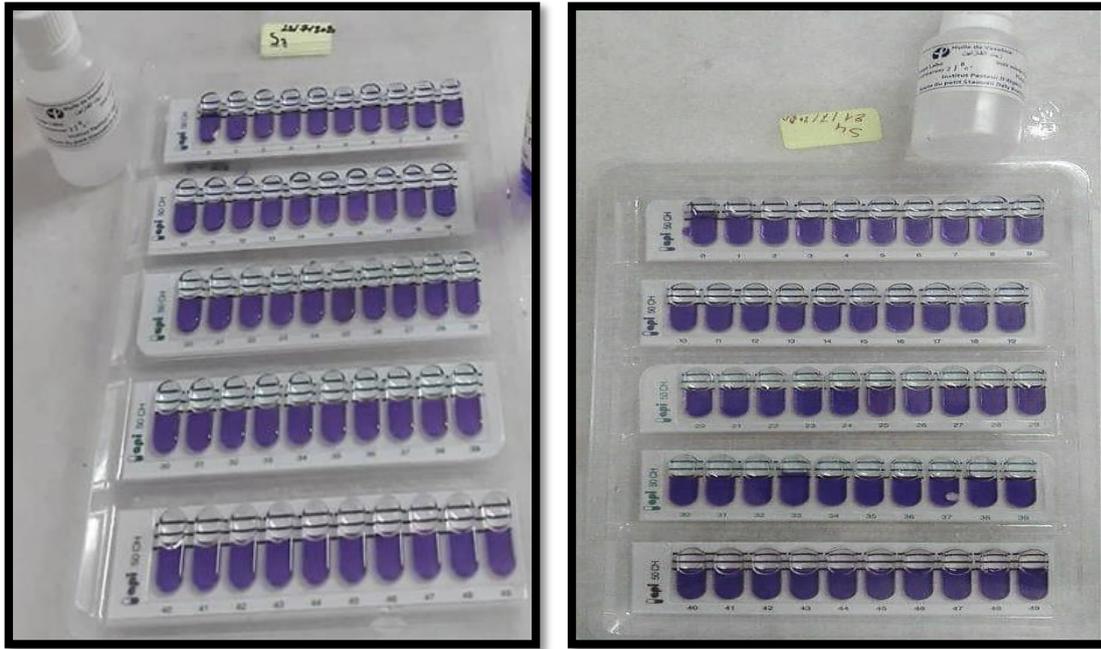
✓ **Inoculation des galeries :**

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :

- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.
- Éviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.
- Lorsque les tubes doivent être inoculés, les cupules sont remplies avec de l'huile de paraffine stérile.
- Incuber les galeries à la température optimum de croissance de bactéries étudiées.

Durant la période d'incubation, la fermentation des sucres est indiquée par une couleur jaune exceptée pour l'esculine (brun foncé). Les résultats sont lus à 24 h et vérifiés après 48 h d'incubation.

Les résultats ont été interprétés avec le logiciel PIBWin (Probabiliste Identification of Bacteria For Windows) (Trevor, 2010).



**Figure 20** : inoculation de la galerie Api 50CH avec la suspension bactérienne de la souche S3 et S4

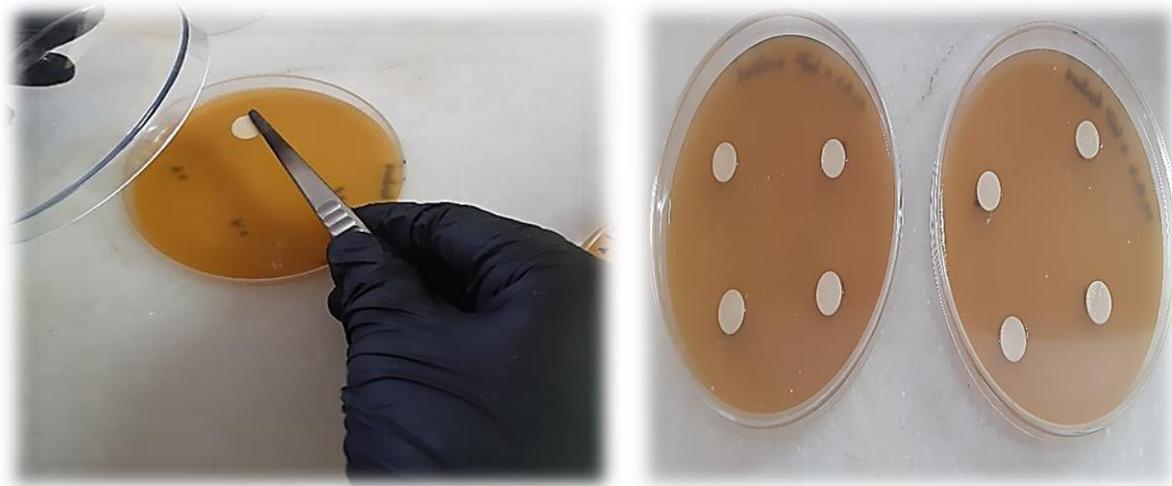
## II.2.6 Caractéristiques technologiques des isolats

### II.2.6.1 Etude de l'activité protéolytique des souches

La protéolyse est l'un des processus biochimiques les plus importants impliqués dans la fabrication de beaucoup de produits laitiers fermentés. La capacité de produire des protéinases extracellulaires est une caractéristique très importante des bactéries lactiques. Ces enzymes hydrolysent les protéines du lait, en fournissant les acides aminés essentiels pour la croissance. Il est connu que le système protéolytique des bactéries lactiques dégrade les

les protéines et par conséquent, change la texture, le goût et les arômes des produits fermentés (**El-Ghaish et al., 2011**).

Pour déterminer l'activité protéolytique des bactéries lactiques, la gélose MRS additionnée de lait écrémé à 10% a été coulée, solidifiée et séchée puis des disques de papier wattman stérile ont été déposés en surface de la gélose. Chaque disque reçoit un volume de 20  $\mu$ l d'une culture jeune (figure 21). Après une incubation à 37°C pendant 24h, la protéolyse est révélée par des zones claires autour des disques (**Boulouf, 2016**).



**Figure 21:** Test de l'activité protéolytique des bactéries lactiques

### II.2.6.2 Etude de l'activité antibactérienne des souches

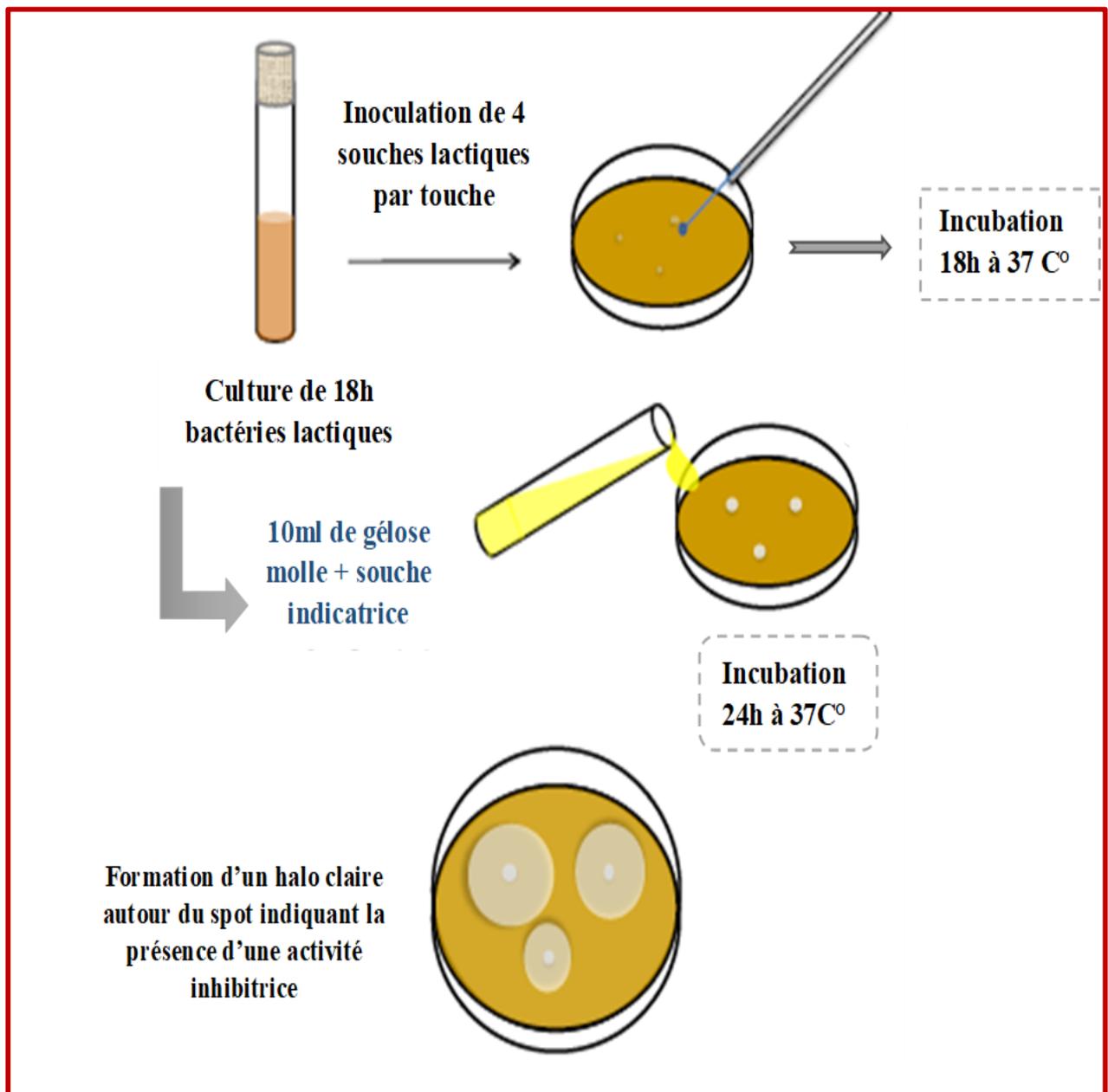
Les souches de bactéries lactiques isolées sont testées pour leur pouvoir antibactérien à partir des cultures jeunes en phase de croissance (phase exponentielle), contre trois bactéries pathogènes de références (*Pseudomonas* sp, *Staphylococcus aureus* et *E.coli*).

La recherche d'éventuelle production de substance inhibitrice par les bactéries lactiques isolées est réalisée selon deux méthodes

#### A. Méthode direct (spot agar test) Fleming et al., (1975)

Ce test d'antagonisme est réalisé dans le but de révéler la production ou non de produits antibactériens par les souches de bactéries lactiques ; par contre pour connaître la nature exacte de la substance un autre test peut être réalisé qui est le test des puits. A partir des pré-cultures de souches lactiques sélectionnées obtenues après 18 heures d'incubation à 37°C, 5 µl ont été ensemencées sous forme de spots sur gélose MRS sécher devant bec bunsen à moitié ouverte de façon à obtenir quatre spots par boîte de même taille et identiques. Ces boîtes sont laissées séchées près de bec bunsen pendant 30minute. L'incubation se fait en anaérobiose à 37°C durant 24 heures. Après incubation, les boîtes ont été ensuite recouvertes par 10 ml de gélose nutritive molle (0.75% d'agar) inoculée par 1 ml d'une pré-culture de 18 h de chaque souche pathogène (*E.coli*, *S.aureus* et *Pseudomonas* sp).

Après 24 h d'incubation à 37°C des souches inhibitrices (souches lactiques) et indicatrices (souches pathogènes), les boîtes ont été examinées en vue de détecter les zones d'inhibition autour des spots et le diamètre de zone d'inhibition est mesuré (figure 23).



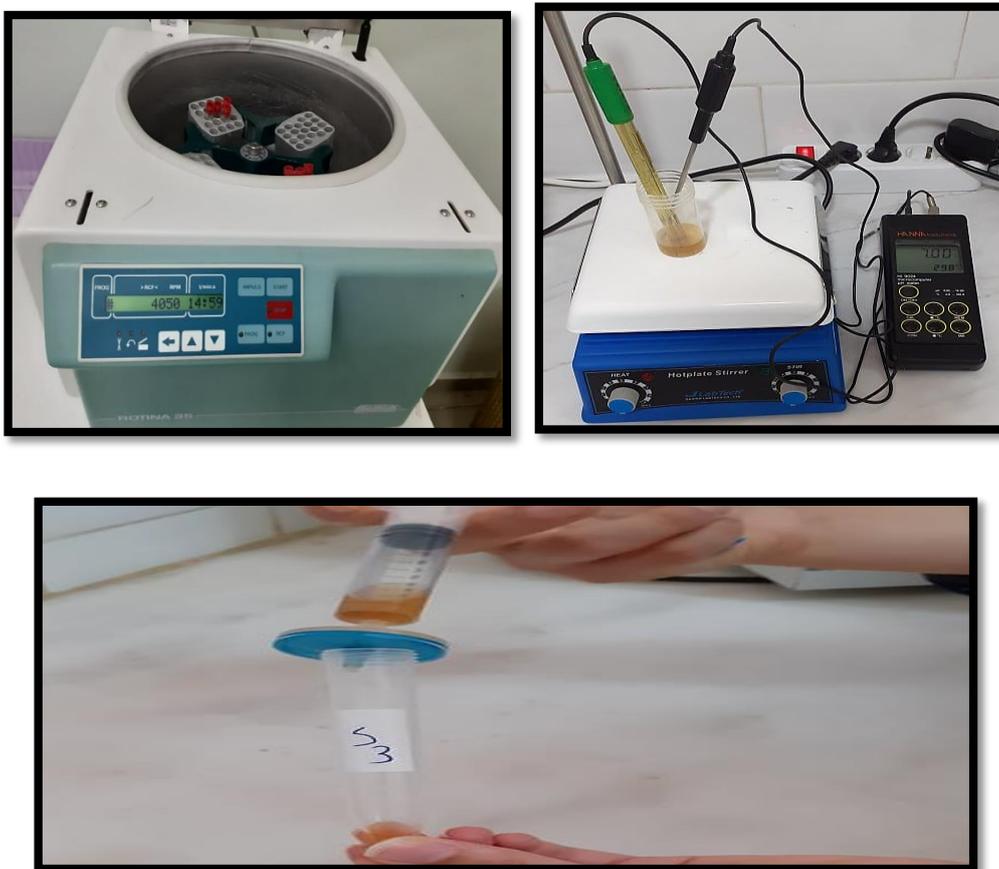
**Figure 22:** Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots sur agar

**Fleming et al ., (1975).**

### II.2.6.3 Recherche de bactériocine (méthode indirecte)

#### A. Préparation de l'extrait bactériocinique

Une culture de bactéries lactiques a été effectuée dans le milieu MRS à pH 6,8 et incubée à 37°C, dans une jarre d'anaérobiose. Le surnageant contenant l'extrait brut bactériocinique est récupéré par centrifugation est ajusté à pH neutre 6,5 à 7 avec du NaOH 10 M. La neutralisation de l'extrait bactériocinique permet d'éliminer l'effet des acides organiques. L'extrait est ensuite filtré sur filtres Millipore stériles de diamètre 0,22 µm et l'activité anti-microbienne est déterminée pour chaque souche sélectionnée (figure 23) (Allouche *et al.*, 2010).



**Figure 23:** les étapes de la préparation de l'extrait bactériocinique : centrifugation et récupération du surnageant (A), neutralisation du surnageant a un PH=7 (B), filtration du surnageant (C)

#### B. Essai de l'activité bactériocinogénique

Afin de minimiser l'influence de l'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène ; les boîtes de Pétri sont ensemencées avec le germe cible en profondeur et en double couche dans la gélose nutritive selon la technique de diffusion des puits préconisée par Tagg et Mc Given en 1961

puis repris et modifiée par plusieurs auteurs (**Schillinger et Lucke 1989; Ten brink et al.,1994 ; Jin et al.,1996**). 20 ml de milieu gélosé, sont recouvertes avec 5 ml de milieu semi-solide (0,7 % d'agar) préalablement ensemencé avec 1 ml de la suspension de souche. Sur les boîtes de Pétri inoculées par les germes cibles préparées préalablement, on réalise des puits (diamètre de 4 mm) qui sont remplis par la suite par 50 µl de l'extrait bactériocinique brut. Les boîtes de Pétri ainsi préparées sont pré-incubées pendant 2 à 4 heures à + 4 °C, afin de permettre la diffusion radiale de l'agent inhibiteur ensuite suivit par une incubation 18 à 24 heures, à 37 °C en anaérobiose, afin d'éviter la présence de l'air nécessaire à la production de peroxyde d'hydrogène. En fin d'incubation, on observe les zones d'inhibition autour des puits, pour les différentes souches sélectionnées vis-à-vis des germes cibles testés (**Allouche et al.,2010**).

# **Résultats et discussion**

### III.1 Résultats et interprétations

#### III.1.1 Isolement et pré identification des bactéries lactiques

Nos isolats lactiques ont été isolés et purifiés sur milieu MRS (**De Man, Rogosa et Sharpe, 1960**) et M17 (**Terzaghi et Sandine 1975**). Ce sont des milieux très adaptés à la recherche spécifique des bactéries lactiques.

Les colonies suspectes ont été prélevées puis cultivées en milieu liquide MRS ou M17 selon leur provenance pour les enrichir suivi par un repiquage plusieurs fois sur les mêmes milieux mais solide pour la purification.

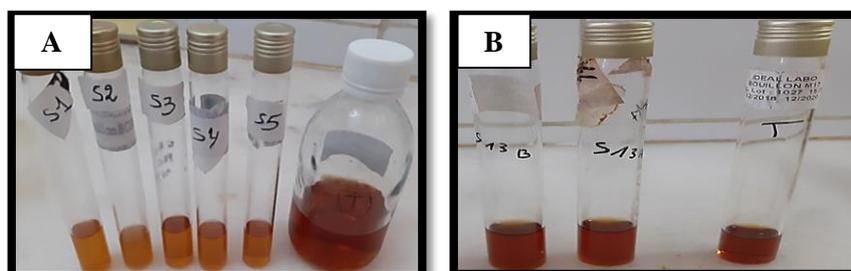
L'identification des isolats lactiques au stade genre a été conduite en utilisant des tests portant sur les caractéristiques culturales, morphologiques (macroscopique et microscopique), physiologiques et biochimiques sur des cultures pures.

#### A. Caractères morphologiques

La morphologie des bactéries lactiques est un critère important pour leur identification dont les dimensions, le contour, la couleur, la viscosité, la pigmentation, l'opacité sont des caractères précieux qui permettent une première approche vers l'identification (**Laursen et al., 2006**). Après la purification des isolats, parmi les 25 isolats suspectés comme bactéries lactiques 13 isolats (9 isolats à partir de lait de vache et 4 isolats à partir de lait de chèvre) sont catalase négative et Gram positif et sont considéré, d'une manière présomptive, en tant que des bactéries lactiques. Ces 13 isolats ont subis par la suite un examen macro-microscopique.

#### ➤ Examen macroscopique

L'observation macroscopique des cultures en milieux liquide a permis de constater que tous les isolats possèdent un trouble homogène indiquant une bonne croissance après 24 h d'incubation (Figure 24).



**Figure 24:** cultures des isolats (S1, S2, S3, S4, S5 et S13) en milieu liquide MRS (A) ou M17 (B) après 24h d'incubation

Sur milieux solides (tableau XI), l'observation a révélé plusieurs aspects morphologiques des colonies à savoir :

- Petites Colonies arrondis, bombées et lisses, de couleur crémeuse ou blanchâtre, ayant un contour régulier.
- Grosses colonies, bombées, lisses de couleur blanchâtre, ayant un contour distinct.
- Colonies moyennes arrondis, de couleur blanchâtre à contour distinct (figures 25, 26).

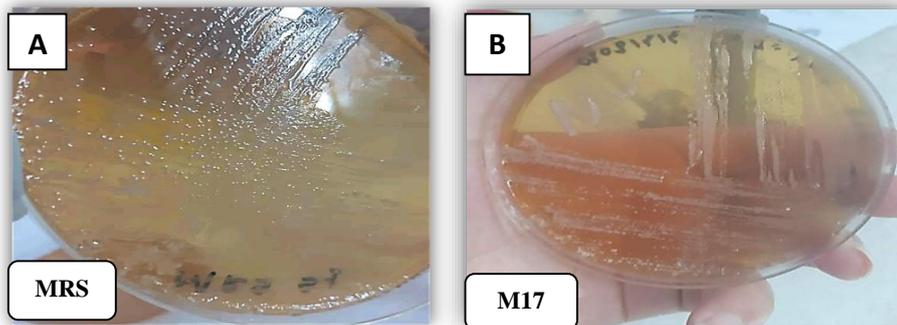
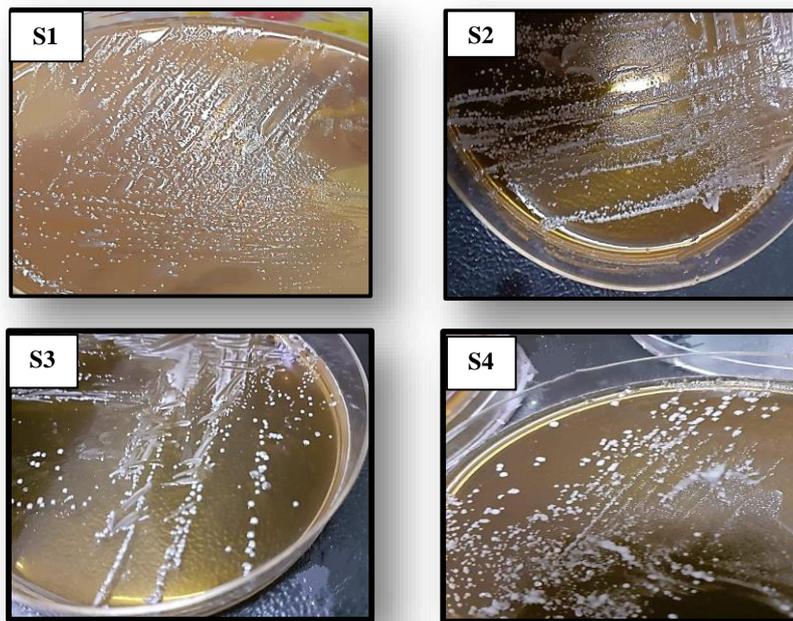


Figure 25 : Aspect macroscopique des colonies cultivées sur milieu solide MRS (A) et M17 (B)

Tableau IX: caractères macroscopiques des colonies isolées.

	La souche	Origine	La forme	La couleur	l'aspect	La taille
Isolement sur milieu MRS	S1	vache	Arrondis	Crémeuse	Lisse	Petite
	S2	vache	Arrondis	Crémeuse	Lisse	Petite
	S3	vache	Arrondis	Blanchâtre	Lisse	Moyenne
	S4	chèvre	Allongée	Blanchâtre	Bombé	Grosse
	S5	vache	Arrondis	Blanchâtre	Bombé	Petite
	S6	vache	Allongée	Blanchâtre	Lisse	Grosse
	S7	chèvre	Arrondis	Blanchâtre	Lisse	Petite
	S8	vache	Arrondis	Blanchâtre	Bombé	Moyenne
	S9	chèvre	Arrondis	Blanchâtre	Bombé	Petite
	S10	vache	Arrondis	blanchâtre	Bombé	Petite
Isolement sur milieu M17	S 11	vache	Arrondis	crémeuse	Bombé	Petite
	S12	vache	Arrondis	Blanchâtre	Bombé	Petite
	S 13	chèvre	Arrondis	Blanchâtre	Lisse	Petite



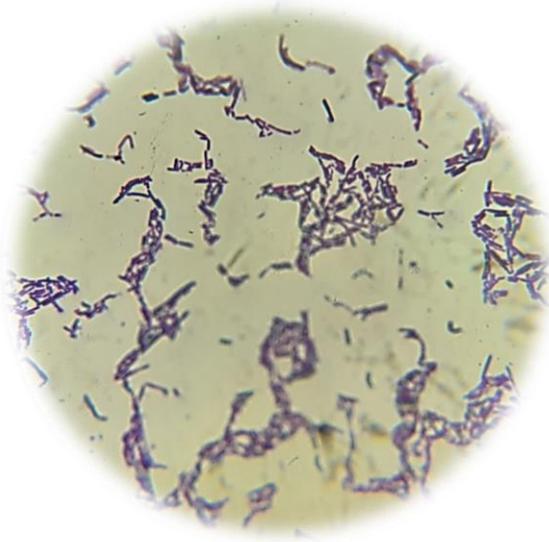
**Figure 26** : aspect des colonies des isolats S1, S2, S3, S4 isolées sur milieu MRS après purification.

➤ **Examen microscopique après coloration de Gram**

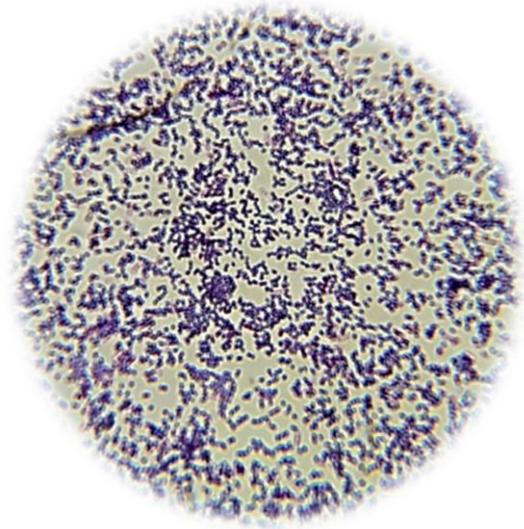
Après la coloration de Gram, nous avons passé à l'observation microscopique aux (Gx40) et (Gx1250) avec l'huile à immersion, où à partir de 25 isolats, toutes les isolats Gram- sont éliminées, seules les 13 isolats à Gram + sont retenues et conservées pour la suite de l'étude. Ces bactéries apparaissent sous différentes formes avec différents modes d'associations. Ces cellules se sont distinguées par différents formes (Figure 27) :

- En bâtonnets longs, isolés, en amas
- En coques disposés en tétrade, groupés en amas et parfois en courtes chaînes.
- En coccobacilles disposés en chaînettes ou isolées.

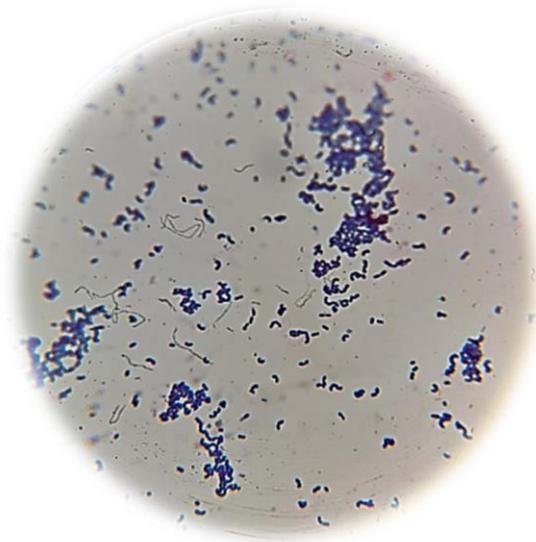
Les résultats du caractère microscopique des treize souches isolées sont résumés dans le tableau X



A : Forme bacille



B : Forme coque



C : Forme coccobacille

**Figure 27:** les formes obtenues observées au microscope optique au grossissement ( $G \times 1250$ ) avec légendes A, B, C

Tableau X: Caractères microscopique des isolats.

Isolats	Forme	Mode de regroupement
S1	Bâtonnet	Long isolée /en amas
S2	Bâtonnet	En amas
S3	Bâtonnet	en chaînette
S4	Bâtonnet	En amas
S5	Cocci	isolée
S6	Cocci	en amas
S7	Cocci	En diplocoque
S8	Coccobacille	En chaînette
S9	Coccobacille	Isolée
S10	Cocci	En Chaînette
S 11	Cocci	En diplocoque
S12	Cocci	En tétrade
S 13	Cocci	Diplocoque

#### ➤ Test de catalase

Sur les 25 isolats, **13** seulement ont été retenues pour la recherche de la catalase. Elles étaient positives à la coloration de Gram. Ces derniers ne représentaient pas d'effervescence lors de l'ajout d'une goutte de  $H_2O_2$ , ce qui s'explique par le fait que ces bactéries ne possèdent pas d'activité catalasique (Figure 28).

Ces caractéristiques (Gram +, Catalase -) permettent leur classification au groupe des bactéries lactiques.

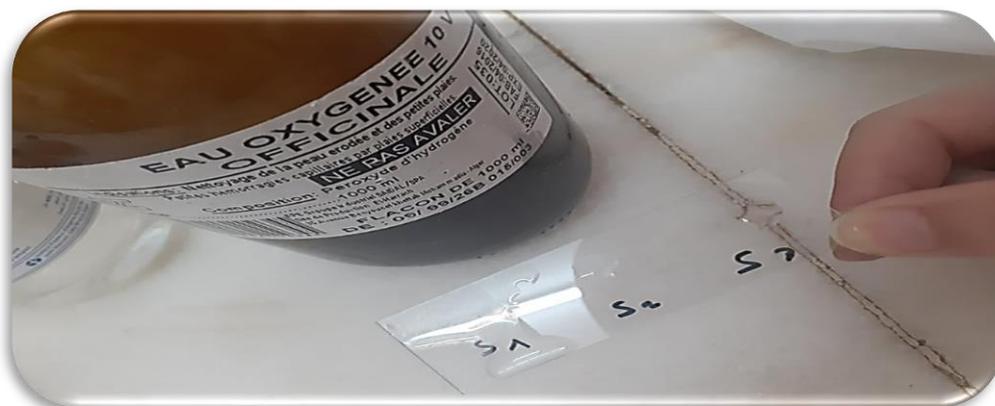


Figure 28 : Résultats de test de catalase

**Remarque**

Suite aux conditions de la pandémie de COVID-19, la suite de notre travail a été limitée à 4 souches uniquement parmi les 13 souches rattachées aux bactéries lactiques. Les 4 souches ont été identifiées physiologiquement et biochimiquement en utilisant la galerie API 20 A pour la détermination de l'espèce et ont fait l'objet de l'évaluation de leur pouvoir antagoniste. Par la suite, les deux meilleures souches de point de vue de l'intensité de l'activité ont été sélectionnées pour la vérification de leur position taxonomique d'une manière plus approfondie en utilisant la galerie API 50 CH.

**B. Caractères physiologiques**

Une étude physiologique est menée à l'aide de différents tests : l'aptitude de croissance à pH (4 et 9,6), à différentes concentrations de Na Cl, à différentes températures et le test de la thermo résistance. Les résultats relatifs à ces tests sont résumés dans le tableau XI.

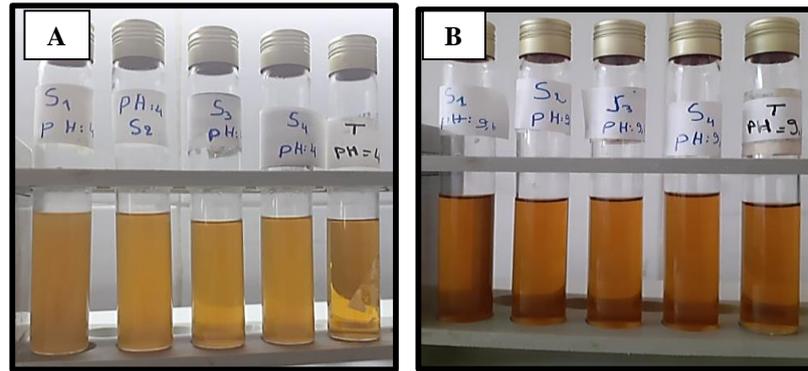
**Tableau XI** : caractérisation physiologiques des isolats.

isolats	Température °C				Thermorésistance (60°C, 10 min)	pH		Concentrations de NaCl (%)		
	15	30	37	45		4	9.6	2%	4%	6%
<b>S1</b>	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
<b>S2</b>	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-/+
<b>S3</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	-/+	-
<b>S4</b>	-	+	+	+	+	+	-	+	-/+	-

+ : réaction positive ; - : réaction négative ; +/- : faible croissance.

**❖ Effet de PH**

Ce test est réalisé dans des bouillons hyperalcalins (pH =9.6) et hyper acide dont le pH est ajusté à pH=4. Après une incubation à 37°C pendant 24 à 72 heures, une croissance de quatre isolats a été notée sur le milieu MRS à Ph 4 par présence de trouble. Concernant le pH de 9,6, aucune croissance n'a été enregistrée par les quatre isolats (figure 29).

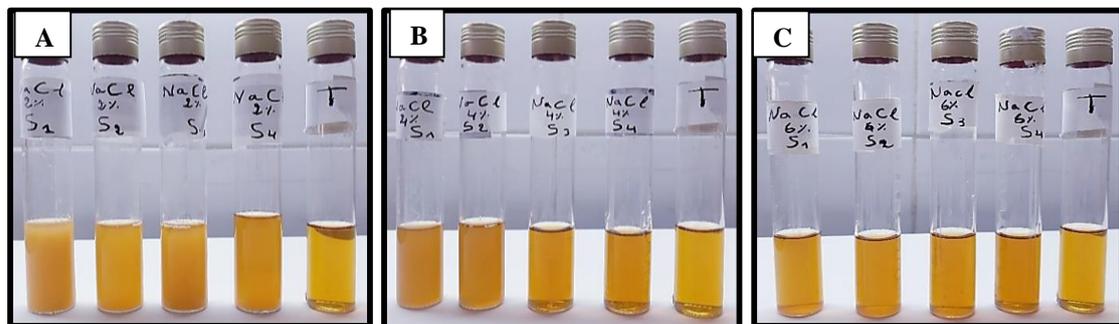


**Figure 29** : Résultats de croissance à différentes concentrations de pH : (A) : pH 4, (B) : pH 9,6

#### ❖ Effet de Na Cl

La mise en culture des souches en présence de 2% ; 4% et 6 % de Na Cl, nous a permis d'évaluer leurs aptitudes à croître en présence de ces différentes concentrations.

Les résultats enregistrés montrent que tous les isolats étudiés présentent une très bonne croissance en présence de 2% de Na Cl. Cependant, en présence de 4% de Na Cl, seules deux isolats S1 et S2 présentent une bonne croissance, alors que les isolats S3 et S4 présentent une faible croissance. Finalement, une faible croissance a été notée pour la souche S2 à une concentration de 6% de NaCl tandis que le reste des souches ne présente aucune croissance à ce taux de NaCl (figure 30)



**Figure 30** : Résultats de Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl

(A) :2%, (B) :4% (C) : 6.5% pour les quatre isolats comparant à un tube témoin non ensemencé

#### ❖ Croissance à différentes températures

L'emploi de ce test permet de diviser les isolats en deux groupes : groupe des souches mésophiles et le groupe des souches thermophiles. Ce test est réalisé en bouillon MRS, la

croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 h à 48 heures à 15°C, 30°C et 45°C en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

Dans cette études les isolats S1 et S2 sont notées mésophiles, elles poussent bien à 15, 30, 37 °C et incapable à se développer à 45°C.

Les isolats S3 et S4 sont considérées thermophiles : les deux isolats poussent à 45 °C, la souche S3 capable de se développer à 15 °C contrairement à la souche S4 qui est incapable de pousser à cette température (figure 31).



**Figure 31:** Résultats de croissance à différentes températures (15°C ,30°C et 45 °C) de quatre souches comparant à un tube témoin non ensemencé.

### ❖ Test de thermo résistance

La thermo résistance est un caractère physiologique permettant de distinguer entre les isolats pouvant tolérer une température de 60 °C pendant 10 min de celles qui en sont incapables.

Après exposition à une température de 60 °C pendant 10 min suivie d'une incubation de 48h, uniquement les deux isolats (S3, S4) ont révélé un résultat positif (figure 32).

Seuls les isolats thermophiles poussent, contrairement aux isolats mésophiles qui sont incapables de se développer.

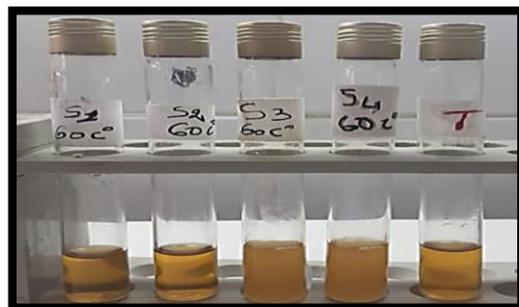


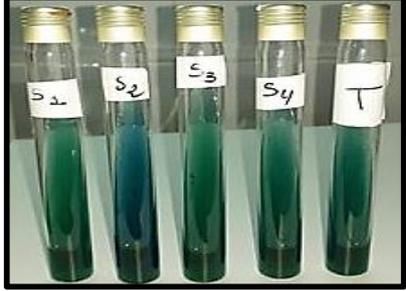
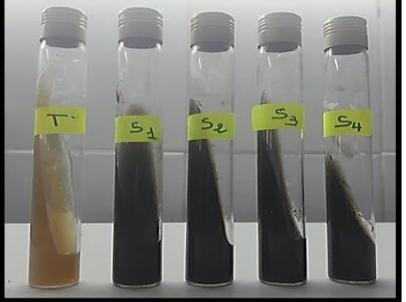
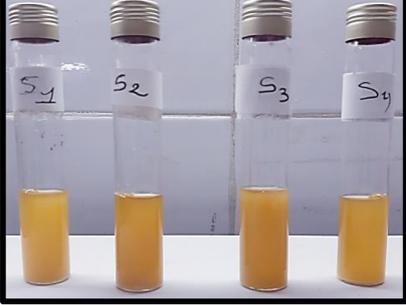
Figure 32 : Résultats de test de thermorésistance.

C. Caractères biochimiques

L'identification phénotypique sur le plan biochimique est réalisée par l'hydrolyse de l'arginine, la production de l'acétoïne, l'utilisation des citrates et l'hydrolyse de l'esculine, la détermination du type fermentaire par production de gaz (CO<sub>2</sub>) et enfin, l'identification est complétée par la production des acides à partir des hydrates de carbone. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII: Les résultats des tests biochimiques.

tests	Résultats	Figures
Hydrolyse de l'arginine dihydrolase	On observe un trouble et un virage au jaune après 24h d'incubation. Le virage du violet au jaune de milieu provient de la fermentation du glucose par les bactéries en entraînant une acidification du milieu, ce qui traduit un résultat négatif c'est-à-dire que toutes les bactéries testées n'ont pas la capacité à hydrolyser l'arginine.	
Production de l'acétoïne	Les bactéries qui produisent de l'acétoïne sont caractérisées au début par la présence des troubles dans le milieu et ensuite par la formation d'un anneau rouge sur la surface du milieu après l'ajoute des deux réactifs VPI et VPII. Tous les isolats testés ne produisent pas de l'acétoïne (l'absence d'un anneau rose en surface), à l'exception de l'isolat S4.	

<p><b>Recherche de citrate</b></p>	<p>S1, S3, S4 : le milieu reste vert, résultat négatifs, pas d'alcalisation du milieu</p> <p>S2 : un changement de couleur vers le bleu de milieu plus au moins, alors on a constaté qu'il y a une faible fermentation de citrate.</p>	
<p><b>Hydrolyse de l'esculine</b></p>	<p>L'hydrolyse de l'esculine se traduit par un noircissement sur milieu à esculine gélosé. Ce noircissement est observé chez les 4 isolats étudiés.</p>	
<p><b>Recherche de la β-galactosidase (ONPG)</b></p>	<p>Le test ONPG est utilisé pour étudier l'existence d'une beta-galactosidase (et donc la possibilité d'acidifier la lactose),</p> <p>Les quatre souches testées sont pourvues de la β-Galactosidase, elles ont donné un résultat positif c'est-à-dire ONPG(+) ou le milieu utilisé devient jaune.</p>	
<p><b>Recherche de type fermentaire</b></p>	<p>Le développement d'une souche homofermentaire conduit à l'apparition d'un trouble sans production de gaz.</p> <p>Aucune production du gaz (CO2) à partir du glucose n'a été observée chez les quatre isolats, elles sont considérées comme homofermentaires.</p>	

- Globalement, les caractères phénotypiques (culturels, physiologiques et biochimiques) ont permis de rattacher nos 4 isolats au genre *Lactobacillus*.

➤ **Fermentation des hydrates de carbone**

L'étude de la fermentation des carbohydrates permet de compléter les caractérisations physiologiques et biochimiques réalisées et permet de nous diriger vers la détermination de l'espèce bactérienne présumée.

La détermination des espèces bactériennes se base essentiellement sur leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques. Les résultats du profil fermentaire révèlent une diversité métabolique des carbohydrates chez les isolats retenus.

Dans notre étude pour établir le profile fermentaire (fermentation de certains hydrate de carbone) on a utilisés la galerie Api 20A qui contient 17 sucres .Les résultats relatifs à ce test sont présentés dans le tableau XIII et illustrés dans la figure 33.

**Tableau XIII :** Résultats de la fermentation des hydrates de carbones par les souches testées.

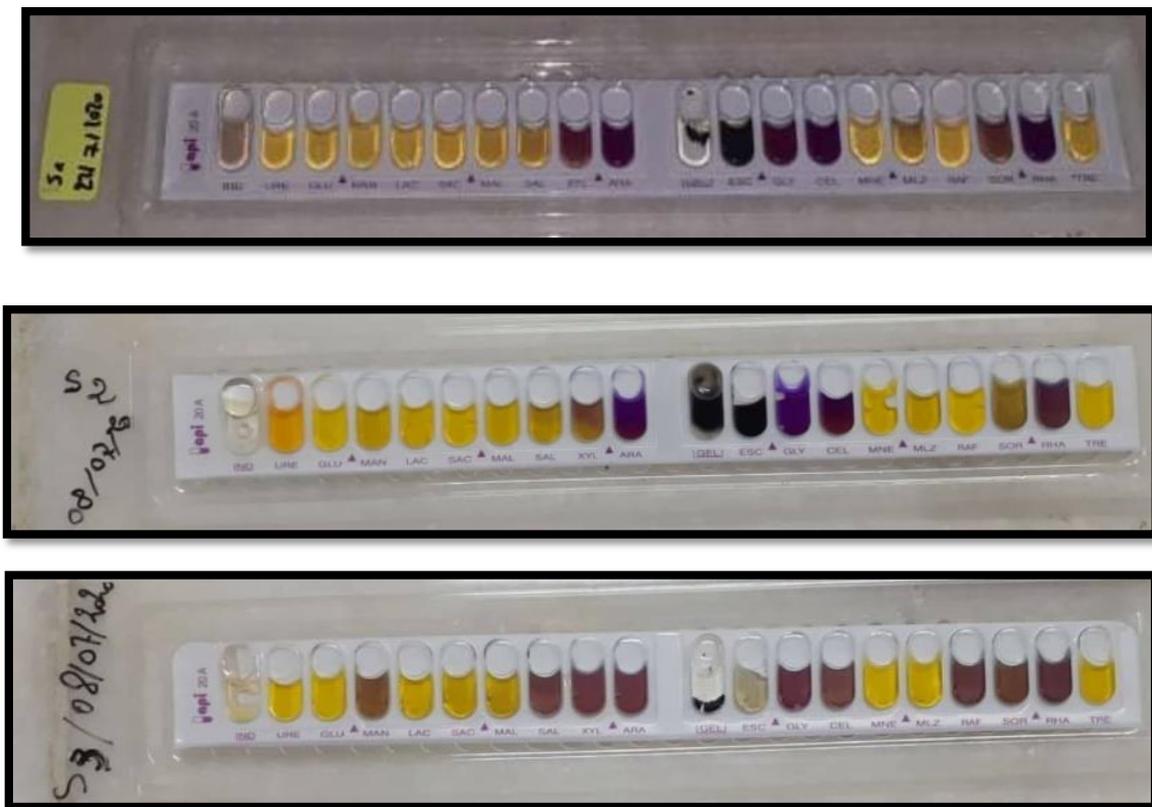
Souches \ Sucres	S1	S2	S3	S4
D-glucose	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+/-	-
D-lactose	+	+	+	+/-
D-saccharose	+	+	+	+/-
D-maltose	-	+	+	-
Salicine	+	+	-	+/-
D-xylose	-	+/-	-	-
Esculine	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	-	-
glycérol	-	-	-	-
D-cellobiose	-	-	-	+
D-mannose	+	+	+	+
D-mélézitose	+	+	+	+
D-raffinose	+	+	-	-
D-sorbitol	+/-	+	+/-	-
L-rhamnose	-	-	-	-
D-tréhalose	+	+	+	+

L'identification de l'espèce repose sur la comparaison de divers caractères phénotypiques de la souche à étudier vis-à-vis de ceux d'une souche de référence (**Roissard et Luquet, 1994 ; Carr et al., 2002; Guiraud, 2003**) (Annexe II). L'identification des souches isolées est basée sur leurs profils fermentaire, elles sont classées comme suit :

S1 et S2: *Lactobacillus plantarum*.

S3: *Lactobacillus rhamnosus*.

S4 : *Lactobacillus acidophilus*.



**Figure 33** : Résultats de la fermentation des hydrates de carbones à partir de la galerie Api 20A.

- L'identification des espèces de lactobacilles peut être difficile à réaliser par les méthodes biochimiques classiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Elle repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres. La galerie API 50 CH est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (**Bahfir et Belguidoum, 2017**).

Tableau XIV : Récapitulatif des résultats d'identification des souches isolées

Isolats		S1	S2	S3	S4
<b>Caractéristiques</b>					
<b>Température C°</b>	15	+	+	+	-
	30	+	+	+	+
	37	+	+	+	+
	45	-	-	+	+
<b>thermorésistance</b>		-	-	+	+
<b>PH</b>	4	+	+	+	+
	9.6	-	-	-	-
<b>Concentration de NaCl (%)</b>	2	+	+	+	+
	4	+	+	+/-	+/-
	6	-	+/-	-	-
<b>ADH</b>		-	-	-	-
<b>ACT</b>		-	-	-	+/-
<b>CTR</b>		-	+	-	-
<b>Mobilité</b>		-	-	-	-
<b>ONPG</b>		+	+	+	+
<b>Type fermentaire</b>	Gaz	-	-	-	-
	Homo/Hétéro	Homo	Homo	Homo	Homo
<b>Les sucres :</b>					
<b>D-glucose</b>		+	+	+	+
<b>D-mannitol</b>		+	+	+/-	-
<b>D-lactose</b>		+	+	+	+/-
<b>D-saccharose</b>		+	+	+	+/-
<b>D-maltose</b>		-	+	+	-
<b>Salicine</b>		+	+	-	+/-
<b>D-xylose</b>		-	+/-	-	-
<b>Esculine</b>		+	+	+	+
<b>L-arabinose</b>		-	-	-	-
<b>glycérol</b>		-	-	-	-
<b>D-cellobiose</b>		-	-	-	+
<b>D-mannose</b>		+	+	+	+
<b>D-mélézitose</b>		+	+	+	+
<b>D-raffinose</b>		+	+	-	-
<b>D-sorbitol</b>		+/-	+	+/-	-
<b>L-rhamnose</b>		-	-	-	-
<b>D-tréhalose</b>		+	+	+	+

+ : réaction positif - : réaction négatif S1 : *Lb plantarum* S2 : *Lb plantrum* S3 : *Lb rhamnosus*  
S4 : *Lb acidophilus*

### III.1.2 Caractéristiques technologique

#### III.1.2.1 Résultats de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique des souches isolées a été traduite par la présence d'un halo claire autour des disques imbibé par les cultures de ces souches sur boîte de MRS solide additionnée de lait écrémé à une concentration de 10%.

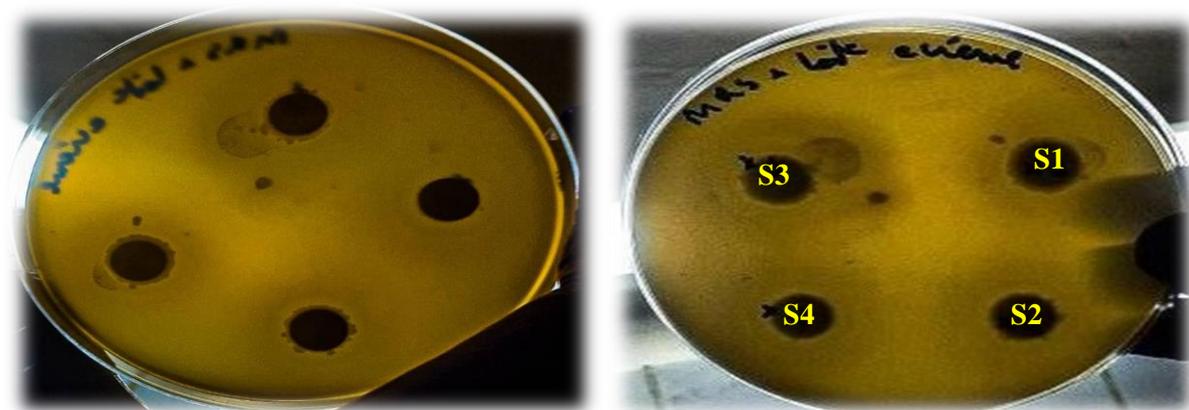
Les résultats de l'activité protéolytique pour les quatre isolats étudiés sont résumés dans le tableau XV. Il en ressort du tableau que les quatre isolats testés présentent une activité protéolytique (figure 34).

**Tableau XV :** Activité protéolytique des souches lactique isolées à partir du lait cru.

Souches	Activité protéolytique	Diamètre de zone (mm)
S1	+	11
S2	+	8
S3	+	16
S4	+	10

D'après les résultats obtenus, les bactéries isolées possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en acides aminés.

Nos souches se sont révélées protéolytiques dont les diamètres des zones de protéolyse étaient compris entre 8 et 16mm. Il apparaît clairement que S3 est fortement protéolytique comparativement aux autres souches avec une moyenne de 16 mm de diamètre, suivi par S1 avec des zones d'hydrolyse de 11 mm. S2 et S4 ont montré des diamètres de 8mm, et 10 mm respectivement.



**Figure 34:** résultats de l'activité protéolytique.

III.1.2.2 Résultats de l'activité antibactérienne des souches

Dans cette partie nous avons testé le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques à l'égard d'une souche pathogène Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et des deux souches à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas* sp).

L'inhibition se traduit par la formation de zones claires, autour des souches ensemencées par touche.

Nos résultats montrent que toutes les souches de *Lactobacillus* isolées ont démontré un net effet inhibiteur vis-à-vis des trois souches pathogènes représenté par des zones claires avec bordures bien distinctes (figure 35).

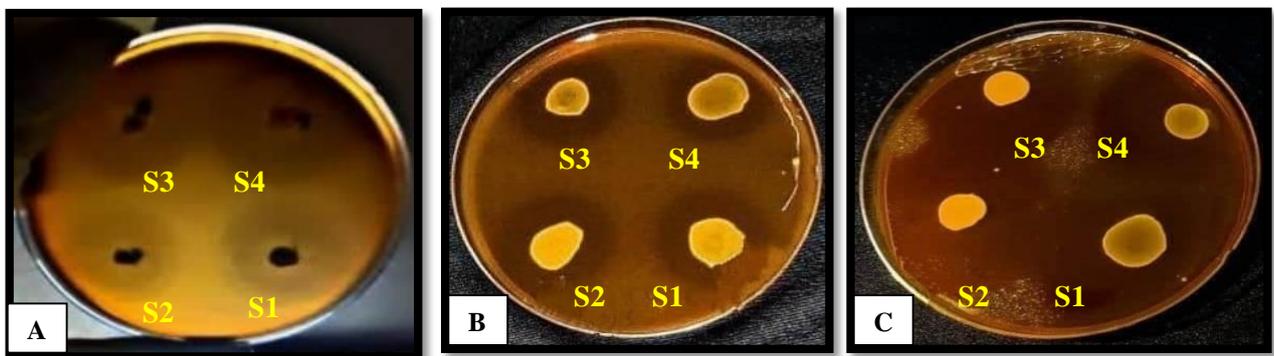


Figure 35: activité antimicrobienne des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes. {*E.coli* (A) , *S.aureus* (B) , *Pseudomonas* sp (C)}

Cependant, certaines souches présentent des activités antibactériennes plus importantes que d'autres souches.

✓ Vis-à-vis *E. coli*

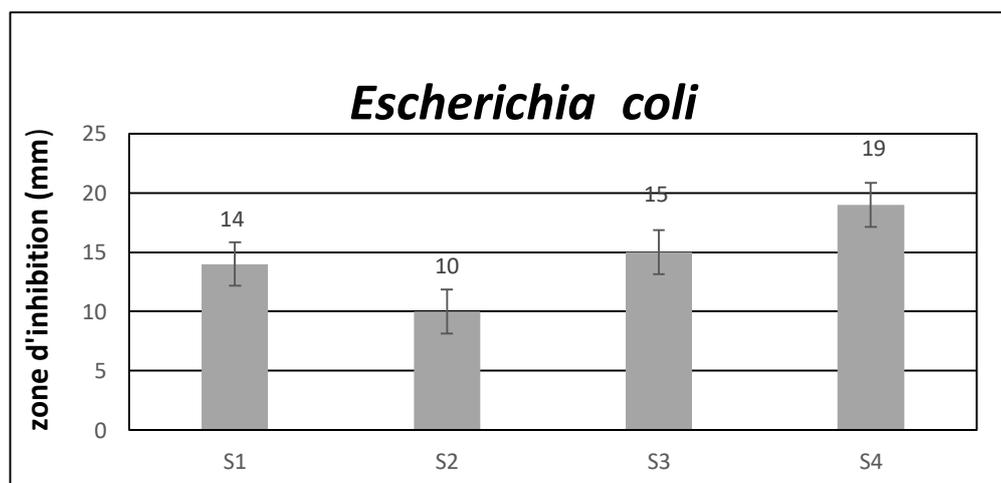
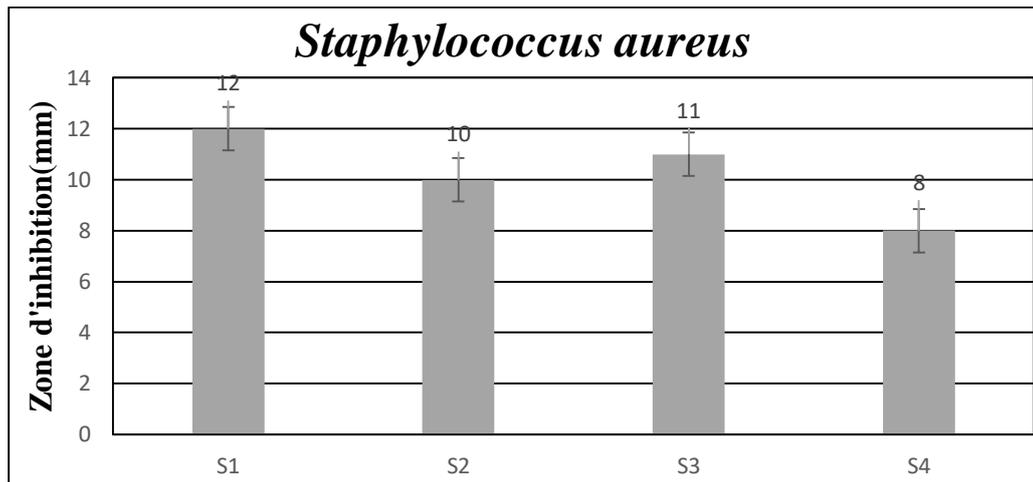


Figure 36 : l'activité antibactérienne des quatre souches lactiques vis-à-vis *E.coli*.

La figure 36 montre une inhibition considérable de la souche d'*E.coli* par les souches lactiques avec des diamètres d'inhibition variant entre 10 à 19 mm. Il apparaît que S4 a une bonne activité antimicrobienne comparativement aux autres espèces avec une moyenne de 19 mm de diamètre, suivi par S3 avec une zone de 15 mm.

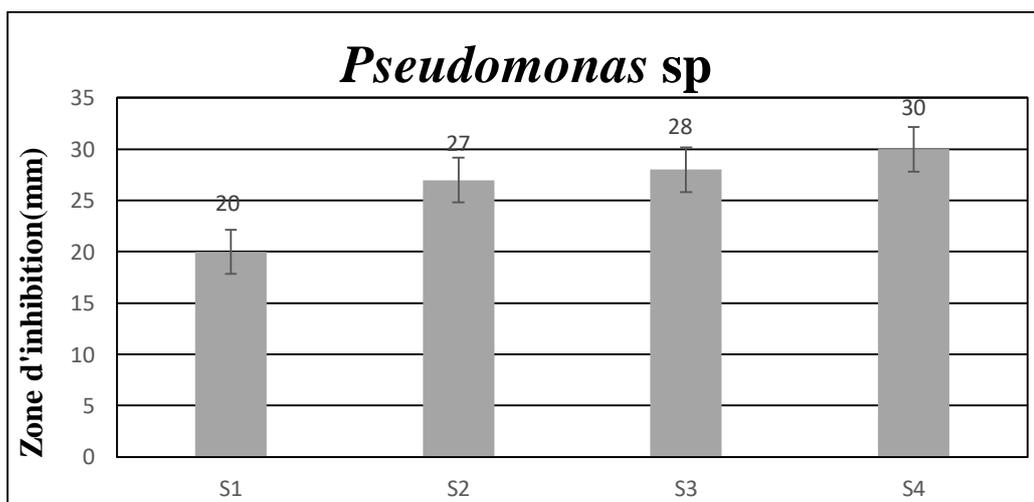
✓ **Vis-à-vis *Staphylococcus aureus***



**Figure 37:** l'activité antibactérienne des quatre souches vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.

D'après les résultats des zones d'inhibition (figure 37) nous remarquons que la souche De *Staphylococcus aureus* a été inhibée par les quatre souches de *Lactobacillus* avec une intensité de l'activité très proche, Le diamètre de zone d'inhibition varie entre 8 à 12 mm.

✓ **Vis-à-vis *Pseudomonas sp***



**Figure 38:** l'activité antibactérienne des quatre souches vis-à-vis *Pseudomonas sp*.

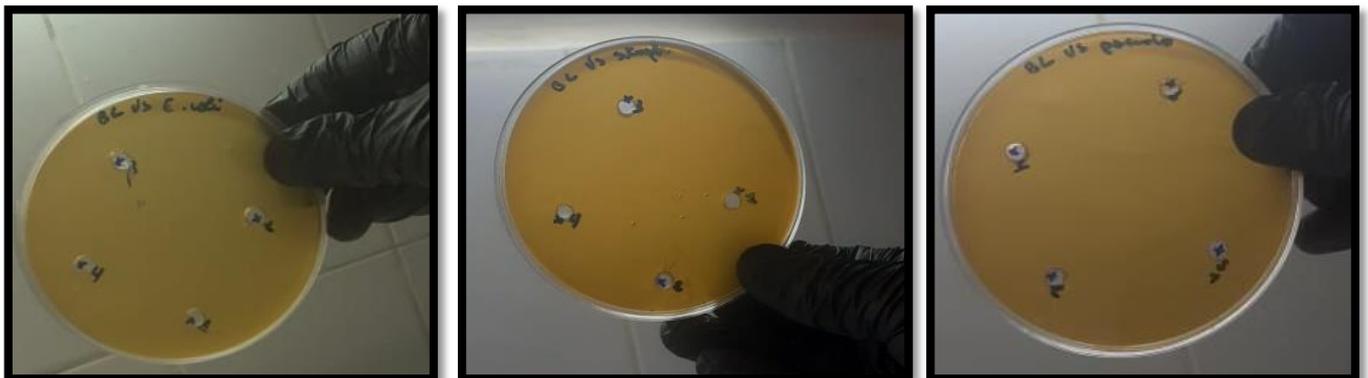
Selon la figure 38 nous remarquons que toutes les souches étudiées présentent des zones d'inhibition intéressantes qui oscillent entre 20 et 30 mm. La souche S4 possède le plus grand diamètre de zone d'inhibition qu'est de 30 mm.

- D'après ces résultats on note que les souches S3 et S4 ont un spectre d'activité antimicrobienne plus important que S1 et S2.

#### ❖ Mise en évidence de la production de bactériocines

Dans ce test, on a testé les quatre souches lactiques qui ont une activité antimicrobienne pour éprouver leurs pouvoirs de sécréter des substances de natures protéiques (bactériocine) contre les souches pathogènes testées.

Aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des puits après élimination de l'effet des acides organiques du surnageant des quatre souches malgré de nombreuses répétition, les résultats obtenus sont présentés dans la figure 39.



**Figure 39:** résultats de la recherche des bactériocines.

#### ➤ Identification des bactéries lactiques par la galerie API 50 CH

Parmi les quatre souches, deux souches S3 et S4 ont été choisies selon leur profil antimicrobienne élevé vis-à-vis des germes pathogènes utilisés, pour une identification approfondie avec les galeries API 50 CH.

Les profils biochimiques et numériques ont été interprétés à l'aide des tableaux des catalogues analytiques. Cette dernière permet d'identifier les souches au niveau de l'espèce d'une manière plus fiable. Les résultats des galeries API50 CH relatives aux tests biochimiques ont été générés par le logiciel PIB Win.

Les résultats d'identification de ces deux souches par les galeries API 50CHL sont représentés dans le tableau XVI.

Tableau XVI : profils fermentaires des 2 souches lactiques par les galeries AP 50 CHL.

Sucres \ Souches lactiques	S3		S4	
	24 h	48 h	24 h	48h
0	-	-	-	-
GLY	-	-	+/-	-
ERY	-	-	-	-
DARA	-	-	+	+
LARA	-	-	-	-
RIB	+	+	-	-
DXYL	-	-	-	-
LXYL	+/-	+/-	-	-
ADO	+/-	+/-	+/-	+/-
MDX	+/-	+/-	-	-
GAL	+	+	-	-
GLU	+	+	+/-	+
FRU	+	+	+	+
MNE	+	+	+/-	+/-
SBE	+	+	-	-
RHA	+/-	+	-	-
DUL	-	-	-	-
INO	-	-	-	-
MAN	+	+	-	-
SOR	-	-	-	-
MDM	-	-	-	-
MDG	-	-	-	-
NAG	+	+	+	+
AMY	-	+	-	-
ARB	+	+	-	-
ESC	+	+	+	+
SAL	+	+	+/-	+/-
CEL	-	-	+/-	+
MAL	+/-	+	+/-	+
LAC	+	+	+/-	+
MEL	-	-	+	+

Suite de tableau XVI

Souches lactiques Sucres	S3		S4	
	24 h	48 h	24 h	48h
SAC	-	-	+	+
TRE	+	+	+	+
INU	-	-	+	+
MLZ	+	+	+	+
RAF	-	-	-	-
AMD	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-
XLT	-	-	+/-	+
GEN	-	-	+/-	+
TUR	+	+	-	-
LYX	-	-	-	-
TAG	+	+	+	+
DFUC	-	-	-	-
LFUC	-	-	-	-
DARL	-	-	-	-
LARL	-	-	+/-	+
GNT	-	-	-	-
2KG	-	-	-	-
5KG	-	-	+/-	+
Espèce présumé	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1	

0: Témoin, GLY: Glycérol, ERY: Erythritol, DARA: D-Arabinose, LARA: L-Arabinose, RIB: D-Ribose, DXYL: D-Xylose, LXYL: L-Xylose, ADO: D-Adonitol, MDX: Méthyl-Bd Xylopyranoside, GAL: D-Galactose, GLU: D-Glucose, FRU: D-Fructose, MNE: D-Mannose, SBE: L-Sorbose, RHA: L-Rhamnose, DUL: Dulcitol, INO: Inositol, MAN: D-Mannitol, SOR: D-Sorbitol, MDM: Méthyl- $\alpha$ D- Mannopyranoside, MDG: Méthyl- $\alpha$ D-Glucopyranoside, NAG: N-AcétyleGlucosamine, AMY: Amygdaline, ARB: Arbutine, ESC: Esculine, SAL: Salicine, CEL: D-Cellobiose, MAL: D-Maltose, LAC: D-Lactose, MEL: D-Mélibiose, SAC: D-Saccharose, TRE: D-Trehalose, INU: Inuline, MLZ: D-Mélizitose, RAF: D-Raffinose, AMD: Amidon, GLYG: Glycogène, XLT: Xylitol, GEN: Gentiobiose, TUR: D-Turanose, LYX: D-Lyxose, TAG: D-Tagatose, DFUC: D-Fucose, LFUC: L-Fucose, DARL: D-Arabitol, LARL: L-Arabitol, GNT: Gluconate, 2KG: 2-CétoGluconate, 5KG: 5CétoGluconate.

Après 48 h d'incubation l'identification par les galeries Api 50 CHL, est faite en confirmant les profils obtenus avec les résultats des profils fermentaire de la galerie classique, et en comparant avec les données de la littérature.

La souche S3 hydrolyse l'esculine, fermente le mannitol, le lactose et le maltose, ne fermente pas l'arabinose et le xylose propriétés trouvées chez *Lactobacillus rhamnosus*.

La souche S4 capable de dégrader la majorité des sucres utilisés fermente le lactose, le maltose et le saccharose, ne fermente pas le mannitol et le xylose, elle est affiliée à l'espèce *Lactobacillus acidophilus*. (Figure 40).



**Figure 40** : Résultat du profil fermentaire de la souche : *Lactobacillus rhamnosus* (S3) et *Lactobacillus acidophilus* (S4) sur la galerie AP 50 CHL après 48 h d'incubation.

### III.2 Discussion

Le lait est un écosystème naturel des bactéries lactiques. Il est l'un des produits laitiers le plus consommable en raison de son importance nutritionnelle (Paci Kora, 2004 ; Kiemptore, 2013). C'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. Certains auteurs ont conclu que la présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème (De Roissart et Luquet, 1994).

Notre étude consiste à isoler, purifier et identifier des souches lactiques à partir de 3 échantillons du lait cru de vache et chèvre sur les milieux MRS et M17, afin de vérifier leur activité antagoniste vis-à-vis certaines bactéries pathogènes.

Les bactéries lactiques ont la réputation d'avoir des exigences nutritionnelles nombreuses et complexes rendant parfois leur culture fastidieuse en laboratoire. De fait, de leurs exigences nutritionnelles les milieux de culture doivent être riches en sucre, en matières azotées et surtout en facteurs de croissance (Pilet *et al.*, 2005). Bien que le milieu MRS soit sélectif pour les lactobacilles qui sont caractérisés par une forme bâtonnet (Patton *et al.*, 2005) dans notre étude des souches de formes cocciques ont été obtenues sur ce milieu. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bahiri (2014), qui a constaté que quelques espèces de BL appartenant au genre *Leuconostoc* et *Pediococcus* peuvent s'y développer sur le milieu MRS par ailleurs, il ne permet pas la culture des autres bactéries lactiques à cause de la présence de l'acétate comme *Carnobacterium* et les *Bifidobactéries* qui nécessitent l'addition de la cystéine au milieu de culture.

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. (Hogg, 2005).

Les résultats d'examen macro-microscopique de cette étude ont été préliminaires pour différencier entre bactéries lactiques et d'autres bactéries, vu que les bactéries lactiques sont des Gram + et catalase négative. L'examen microscopique des isolats nous a permis d'éliminer toutes les souches à Gram – et catalase + à partir de 25 souches seules 13 souches sont retenues.

Les résultats microscopiques de notre étude révèlent la présence de différentes formes cocciques, bâtonnets et coccobacilles avec une présence majoritaire de coque (53,84%) par rapport au bâtonnet (30,76%). Nos résultats se rapprochent de ceux cités par plusieurs études menées dans le même contexte que le nôtre et réalisées sur des produits laitiers tels que les laits crus et les fromages (Badis *et al.*, 2005 ; Hammi, 2016 ; Benhouna, 2019), contrairement aux résultats trouvés par Tahlaïti (2019) qui a noté une prédominance des bâtonnets par rapport aux coques. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les espèces de bactéries lactiques détectées dépendent essentiellement de la nature du lait cru et des conditions d'analyse (Saidi *et al.*, 2002).

**Schillinger et Lucke (1989)** ont été les premiers à proposer une clef d'identification des bactéries lactiques basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques et biochimiques typiques des différentes espèces. Néanmoins cette clef permettait uniquement d'orienter l'identification et non une identification précise.

Dans notre étude on s'est basé uniquement sur quatre souches bâtonnet. L'identification du genre a été réalisée en suivant les recommandations de **Carr et al (2002)**, **Axelsson (2004)** et **Hammes et Hertel (2006)**

L'orientation de l'identification est basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (2% ; 4% ; 6,5%), la tolérance aux pH acides, alcalins, le type fermentaire, l'hydrolyse de l'arginine et la formation d'acétoïne (**König et Fröhlich, 2009**).

Les quatre souches de cette étude sont des bâtonnets, homofermentaires ne produisent pas de gaz. Les souches S1 et S2 sont mésophiles capables de développer à 30 °C et incapables de se développer à 45°C alors que les souches S3 et S4 sont thermophiles poussent à 45 °C, Tous les isolats peuvent croître à une concentration de NaCl 2% par contre à 6% de NaCl seulement S4 présente une faible croissance, les quatre isolats tolèrent des pH acides et ne peuvent pas croître à pH basique.

L'acidophile des souches isolées traduit leur capacité de développement à des pH bas dans les milieux qu'elles acidifient par la production d'acide lactique ; ce qui accroît la durée de vie du produit en limitant sa contamination par les microorganismes d'altération ou pathogènes, et il lui confère des caractéristiques organoleptiques particulières (**Montel et al., 2005**).

Trois genres associés aux aliments ont en commun une morphologie caractéristique en bâtonnet ; il s'agit de : *Lactobacillus*, *Carnobacterium* et certaines espèces de *Weissella*. Les souches isolées dans notre étude sont identifiées comme *Lactobacillus*. Elles sont séparées du genre *Weissella* par leur caractère homofermentaire et des *Carnobacteria* par leur acidophilie (**Dworkin et al., 2006**).

À l'origine, les souches de genre *Lactobacillus* ont été regroupées en fonction de leur température de croissance et par la suite en fonction de leur potentiel homo ou hétérofermentaire qui constitue une clé d'identification des bactéries lactiques. Le CO<sub>2</sub> produit par la souche sera capté par la cloche de Durham (**Benhoua, 2019**). La différence entre ces deux groupes (homo /

hétéro) est détectable par dégagement de CO<sub>2</sub>. Certaines bactéries lactiques homofermentaires, sous certaines conditions, c'est-à-dire dans les milieux pauvres en hexoses, peuvent fermenter les pentoses pour produire de l'acide lactique et de l'acide acétique comme produits finaux. Ces bactéries sont qualifiées d'hétérofermentaires facultatives (**Salminen et al., 2004, Doguiet Koffi- Denis, 2010**). La température de croissance est comprise entre 2 et 53°C, avec un optimum entre 30 et 40°C (**De Vos et al., 2009**), Le pH de croissance est compris entre 3 et 8 avec un optimum habituellement allant de 6,2 (**Zhang et Cai, 2014**).

La différenciation entre les différentes espèces du genre *Lactobacillus* repose essentiellement sur leur faculté de fermenter différemment les carbohydrates, les profils fermentaires enregistrés sont comparés avec celui des souches de référence (**Vanden Berg et al, 1993; Carr et al, 2002; Parada et al, 2007**) et nous a amené à définir les différentes espèces.

D'après les résultats de profil fermentaire qui étaient mené par la galerie API 20A, nos souches S1 et S2 sont rattachées à l'espèce *Lactobacillus plantarum* n'hydrolyse pas l'arginine, hydrolyse l'esculine et capable de dégrader le lactose et mannose, ne fermentent pas le xylose et l'arabinose. Cette identification est renforcée par la comparaison avec le profil de fermentaire de la souche *Lb. Plantarum ATCC 14917* (obtenu à partir de la base des données de **Biomérieux**). Le pourcentage de similitude était de 81,25 % pour les deux souches.

Les anciennes études indiquent que l'espèce *Lb. plantarum* ne pousse pas à 45°C (**Axelsson, 2004 ; Hammes et Hortel, 2006**). Mais **Carr et al, (2002)** ne considère pas cette caractéristique comme clef d'identification dans son diagramme dichotomique, il exige (seulement : la croissance à 15°C, ADH (-), Ribose (+), Raffinose (+) et mannitol (+).

La souche S3 n'hydrolyse pas l'arginine, hydrolyse l'esculine, fermentent le mannitol, le lactose et le maltose, ne fermentent pas l'arabinose et le xylose. Selon les critères définis par **Roissard et Luquet, (1994)**, cette dernière est affiliée à l'espèce *Lactobacillus rhamnosus*. Par contre la souche S4 est identifiée comme *Lactobacillus acidophilus*, capable de dégrader la majorité des sucres utilisés (**Rogosa et al, 1953 et Johnson et al, 1980**). D'après **Guiraud, (2003)** *Lactobacillus acidophilus* se distingue aisément de *Lactobacillus plantarum* parce qu'elle ne fermentent pas le mannitol.

Les bases générales de la classification des bactéries lactiques aux différents genres demeurent largement inchangées depuis le travail **d'Orla-Jensen 1919**. Cependant, il est

devenu plus difficile d'utiliser les tests classiques de classification pour une identification fiables du genre.

D'après **Franz et Holzapfel (2004)**, l'utilisation de l'identification phénotypique traditionnelle pour caractériser les espèces devient extrêmement difficile, si pas impossible car elle utilise un faible nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie qui est une clé caractéristique discutable dans la taxonomie bactérienne, elle est néanmoins importante dans la courante description des bactéries lactiques qui permet de différencier entre les genres, la forme bâtonnet pour ( les *Lactobacillus* et *Carnobacterium* ), et la forme cocci pour ( les *Streptococcus* ), ainsi que la mise en évidence des caractères biochimiques et physiologiques (**Axelsson ,2004**). Comme été mentionné l'applicabilité de la méthode repose sur la robustesse des renseignements retrouvés dans les bases de données de référence. En conséquence, les résultats obtenus des méthodes phénotypiques requièrent l'appui de données provenant d'autres méthodes afin d'identifier avec précision un micro-organisme. Plusieurs systèmes commerciaux miniaturisés et automatisés sont actuellement offerts et sont assortis de procédures de contrôle de la qualité bien définies qui permettent l'identification rapide des micro-organismes tel que le système API50CHL (Biomérieux, France) qui permet une identification plus fiable des espèce de bactéries lactiques par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates (**Curk et al., 1993**). Les galeries révolutionnent le domaine de la bactériologie car l'identification devient plus simple, rapide et fiable avec de tests biochimiques, exploitables avec des bases de données d'identification complètes (à l'aide du logiciel APIweb) et pour cela dans notre étude nous avons confirmé l'identification des deux souches S3 et S4 sélectionnées selon leur pouvoir antibactériennes par la galerie API50CHL. Les résultats montrent que nos souches sont identifiées en tant que *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus acidophilus* respectivement.

Etant donné que le système API ne donne pas une identification précise, ainsi l'identification d'un microorganisme est retardée des heures et même plusieurs jours après sa croissance dans le milieu de culture, il est donc souhaitable d'utiliser simultanément à l'approche conventionnelle, des méthodes moléculaires directe basée sur la PCR pour donner une identification précise des espèces ( **Moumene, 2016**).

**Selon Yelnetty et al., (2014)** ,les bactéries a pouvoir protéolytique sont répartie en trois groupes : Les souches dont le diamètre est supérieur à 20 mm sont qualifiées comme souches fortement protéolytiques , les souches avec un diamètre qui varié entre 10 à 15 mm sont

moyennement protéolytiques cependant le groupe des souches faiblement protéolytique leurs diamètre est inférieur à 10mm . Selon cette classification, nos souches sont qualifiées : Souches moyennement protéolytique (S1, S3, S4) et S2 comme souche faiblement protéolytique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Idoui et Karam (2008)**, **Hadef (2012)**, qui ont trouvé que les bactéries lactiques, isolées à partir du beurre de vache traditionnel de la région de Jijel et du beurre de chèvre, présentent un caractère protéolytique.

Selon **Castberg et Morris (1976)**, les lactobacilles produisent généralement des protéinases neutres actives sur le  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\kappa$ - caséine mais l'intensité de leur activité est extrêmement variable d'une espèce à une autre. Chez de nombreuses bactéries lactiques utilisées en industrie laitière, une protéase de paroi est retrouvée. Cette protéase permet à ces différentes espèces d'hydrolyser les lacto-protéines et de se développer dans le lait. Certaines souches de bactéries lactiques ne possèdent pas de protéase de paroi et se développent mal ou dépendent de la protéase de paroi présente chez l'autre espèce qui se développe en symbiose dans le lait (**Savijoki et al., 2006**). Nos 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, 1992, Sanni et al., 2002**).

L'activité des enzymes protéolytique est fondamentale, car elle complète l'action de la présure restant dans le caillet. La protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des précurseurs pour de nombreux produits d'arômes (**Desmazeaud, 1992, Sanni et al., 2002**). Les bactéries lactiques protéolytiques participent donc à l'amélioration de la qualité organoleptique du produit fini.

La deuxième étape de notre étude a permis de recenser des souches possédant une activité antimicrobienne. Le pouvoir antagonique des bactéries lactiques envers les bactéries à potentiel pathogène, notamment celles qui existent aux environnements laitiers, est un caractère très recherché autant qu'un caractère crucial dans la bio-conservation alimentaire. l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes montre une activité antagonisme, qui se manifeste par l'apparition des halots d'inhibition (**Fleming et al.,1975**). Toute souche présentent un diamètre d'inhibition supérieur à 6 mm est considéré comme positif vis-à-vis de la souche test (**Dembelle et al.,1998**).

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques résulte de leurs activités fermentaires associées à la production de divers composés antimicrobiens dans le but d'inhiber la prolifération des microorganismes (**Rodrigues et al., 2002 et Mansour et al., 2004**). En effet,

nos résultats ont révélé des zones d'inhibitions vis-à-vis de toutes les souches pathogènes testées de Gram - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp) et Gram + (*Staphylococcus aureus*) avec un spectre d'activité qui varie entre 8mm et 30mm sans compter le diamètre des spots. Les souches productrices *Lactobacillus rhamnosus* (S3) et *Lactobacillus acidophilus* (S4) ont un large spectre d'activité contre toutes les souches indicatrices utilisées. Les meilleures zones d'inhibition ont été notées contre *Pseudomonas* sp. , elles varient entre 20 et 30 mm, la souche *Lactobacillus acidophilus* (S4) possède le plus large pouvoir inhibiteur contre *Pseudomonas* sp. avec un diamètre de 30mm. En revanche les zones d'inhibition les plus restreintes sont observée contre *Staphylococcus aureus* avec des zones minimales de 8 à 12 mm, la meilleur zone d'inhibition est de *Lactobacillus plantarum* (S2) avec 12 mm et le spectre d'action le plus réduit de 8 mm pour *Lactobacillus acidophilus*.

Les études de **Makras et al., (2006)**, ont déjà confirmé l'activité antagoniste des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli* ainsi les travaux de **Savadogo et al., (2004)**, ont reporté que les diamètres des zones d'inhibitions des bactéries lactiques isolées du lait fermenté sont de l'ordre de 9 mm à 10 mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et entre 8 mm et 9 mm de diamètre vis-à-vis *Escherichia coli* . L'effet antagoniste des lactobacilles sur *Pseudomonas* sp été déjà montré par **Djedir et Nasri, (2018)** avec des diamètres d'inhibition qui varie entre 12-22mm.

**Mameche (2008) ; Boudersa et Nekaa (2017)**, ont constaté que les lactobacilles ont une activité inhibitrice sur les bactéries à Gram négatif nettement supérieure à celle observée contre les pathogènes à Gram positif, par contre **Yateem et al., (2008)** ont isolé des souches lactiques à partir du lait de chamelle au Kuwait dont l'effet antagoniste s'était exercé uniquement sur les bactéries à Gram négatif (*Salmonella* ssp et *E. coli*), mais aucun effet n'a été détecté sur *Staphylococcus aureus*. Au contraire, **Ammor et al., (2006)** ont isolés des souches lactiques dont l'effet antagoniste était restreint aux bactéries à Gram positif, celles à Gram négatif étant résistantes.

Nous avons observé dans cette étude, que les diamètres des zones d'inhibitions de nos souches contre les Gram négatifs sont plus larges que les zones d'inhibition des Gram positifs. En effet, les bactéries à Gram négatif sont connues pour leurs intolérances aux acides (**Sorrels et Speck ,1970 ; Gilliland et speck ,1977** ). Il a été rapporté que certaines bactéries pathogènes sont sensibles aux pH bas, comme le cas de l'espèce *E.coli* qui est incapable de croître dans un milieu dont le pH est compris entre 3,6 à 4,6 (**Poppi et al.,2015**). L'utilisation de bactéries

productrices d'acide organique tel que les bactéries lactiques, est l'une des anciennes méthodes utilisées pour le contrôle de la croissance des bactéries à Gram négatif (**Helander et al., 1997**).

Les deux souches de l'espèce *Lactobacillus plantarum* (S1) et (S2) de la présente étude ne présentent pas le même spectre d'action cela peut être est due à une faible homologie de leurs acides nucléiques responsables des caractères héréditaires (**Sutra et al., 1998**).

Sur la base de nos résultats, l'activité antimicrobienne de nos souches possèdent un pouvoir d'inhibition intéressant sur les germes pathogènes testés, cette activité peut être liées à différents mécanismes comme la compétition nutritionnelle (**Mechai, 2009**) et la synthèse de plusieurs agents antibactériens : L'inhibition de ce type de bactéries pouvant probablement être due au pouvoir acidifiant élevé des bactéries lactiques. Aussi ces souches produisent d'autre type des acides organiques (l'effet du diacétyl) qui vont diffuser vers le cytoplasme et modifier son pH donc la mort de la cellule cible (**Gaamouche et al., 2014**). Ainsi L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libéré par les souches lactiques inhibe les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif (la catalase, par exemple) (**Menad, 2017**). Plusieurs études ont montré l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes suite à la libération des substances de nature protéique, (les bactériocine).

Il serait donc utile d'identifier la nature (bactériocine ou autre) et le nombre de molécules bioactives responsables de cette activité, afin d'étudier les possibilités de leur utilisation dans la bio-préservation des aliments. De ce fait lors de cette étude, nous avons entamé la recherche des bactériocine par la méthode de diffusion (puis).

En travaillant dans les conditions expérimentales permettant d'éliminer l'influence des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène, l'activité d'inhibition due aux molécules bioactives de surnageant des quatre souches de appartenant à trois espèces *Lactobacillus plantarum* (S1, S2), *Lactobacillus acidophilus* (S3) et *Lactobacillus rhamnosus* (S4) n'a révélé aucune activité contre les trois souches pathogènes testés. Les résultats obtenus ont montré que nos souches ne sont pas des producteurs de bactériocines. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par **Belarbi (2011) et Ababsa (2012)**, ou aucune production de bactériocines n'a été détectée. Ainsi **Luo et al., (2011)** ont démontré que seulement cinq souches sur un total de 256 souches de bactéries lactiques testées ont produit des bactériocines.

L'absence d'activité antibactérienne suite au test des puits pourrait s'expliquer par : La perte d'activité a pH neutre. En effet d'après **Allouche et al, (2010)**, les bactériocines exercent

leur effet antibactérien lorsqu'elles sont stables et cette stabilité n'est généralement maintenue que sur une gamme de pH comprise entre 5 à 6 avec un pH optimum estimé à 5. Ainsi l'incapacité des bactéries lactiques de produire les bactériocines dans le milieu de culture liquide a été déjà signalée par **Barefoot et Klaenhammer (1983)**, qui ont suggéré que celle-ci peut être probablement attribuée à l'inactivation des bactériocines par les enzymes protéolytiques sous les conditions de croissance. Une autre hypothèse suggère qu'il se peut que les bactériocines soient adsorbées à la membrane filtrante lors du processus de la filtration. (**Ababsa, 2012**).

L'estimation de l'activité d'une bactériocine par la méthode de diffusion est relative, car la sensibilité de la bactérie cible, le milieu de croissance utilisé, la concentration d'agar du milieu test, ainsi que la concentration en bactériocine sont tous des facteurs pouvant affecter les résultats (**Meghrous et al., 1999**).

# Conclusion

# Conclusion

---

## Conclusion et perspectives

Les bactéries lactiques (ou ferments lactiques) représentent un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme un produit principal du métabolisme, sont parmi les bactéries à Gram-positif les plus étudiées, en particulier à cause de leur importance dans l'industrie agro-alimentaire, en produisant des composés antibactériens leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes mais aussi d'être utilisées en tant que bio-conservateurs.

La présente étude a été conduite dans le but d'isoler, identifier et tester les propriétés technologiques (activité protéolytique, pouvoir antibactérien) de la population lactique présente dans le lait de chèvre et de vache provenant des trois régions situées dans la wilaya de BLIDA (BOUAARFA, MARAMENE, SOUMAA).

Sur la base de la coloration de Gram et la catalase 13 isolats ont été sélectionnés et pré-identifier comme des bactéries lactiques et seulement quatre ont subi des tests physiologiques et biochimiques pour l'identification de l'espèce. Les quatre souches ont été rattachées à *Lactobacillus plantarum* (S1 et S2), *Lactobacillus rhamnosus* (S3) et *Lactobacillus acidophilus* (S4).

L'étude des aptitudes technologiques a montré que le pouvoir protéolytique est important pour l'ensemble des lactobacilles étudiés. D'après le test d'antagonisme nous avons trouvé que les quatre souches lactique étaient productrices des substances inhibitrices dont l'activité la plus importante est obtenue par la souche (S4) vis-à-vis *Pseudomonas* sp. (30 mm). Cette activité ne provient pas de la production de bactériocine mais probablement elle résulte de la synergie entre les différents métabolites : les acides organiques, le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène.

Les résultats obtenus par la présente étude restent préliminaire, ils doivent être complétés par une série d'autres tests à savoir :

- Application du génie génétique pour l'identification des souches lactiques isolées.
- Etudier d'autres propriétés technologiques tel que : le pouvoir acidifiant, aromatisant, texturant, épaississant ....
- Élargir la gamme des bactéries cibles de l'activité antibactérienne (Gram positif et Gram négatif).

## Conclusion

---

- Il serait intéressant de tester la résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques et aux bactériophages.
- Des tests sur les bactériocines pure pour confirmer les résultats, contre les Gram positif.
- Rechercher la nature des facteurs inhibiteurs à l'égard des souches.

# **Références bibliographiques**

## A

- **Aasen, I. (2000).** Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *L. sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 159-166.
- **Ababsa, A. (2012).** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait, Mémoire magister Génie microbiologique non publiée, Université de Sétif, Sétif.
- **Abdelguerfi, A. (2003).** Study on range and livestock development in North Africa (Algeria, Morocco, and Tunisia).
- **Abid, Z. (2015).** Étude de l'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées d'un produit laitier traditionnel Algérien «Jben», Master en Biologie sciences des aliments, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, Tlemcen.
- **Aboutayeb, R. (2009).** Technologie du lait et dérivés laitiers, microorganismes d'importance alimentaire.
- **Ainouche, Y., Bouslah, L. (2015).** Etude de la qualité du lait cru de vache issu de différents élevages de la wilaya de Bouira et de Boumerdes, Mémoire en Agro-alimentaire, Contrôle de qualité et Nutrition, Université boumerdes, boumerdes.
- **Alexander, Y., Prosekov, O., Babich, S., et Milenteva, I. (2017).** Development of recombinant peptide technology with antimicrobial properties of a broad action spectrum. *Science Evolution*, 2(2), 4-15.
- **Allouche, F A, Hellal, A., Laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière, *Nat. Technol.* 3:13-20.
- **Alvarez, P., Montalban, M., Mu, D., et Kuipers, O. (2016).** Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939–2951.
- **Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat

small-scale facility 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds, Food Control,17:454-461

- **Axelsson, L.T. (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, In Lactic Acid Bacteria, Microbiology and functional aspects. Edited by S, Salminen, A.v. Wright et A.Ouwehand. Marcel Dekker, Inc.1-66.

## **B**

- **Badis, A., Laouabdia, S., Guetarni, D., Kihal, M., et Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et kabyle". Sciences and Technologie, 23, 30-37.
- **Bahiri, F. (2014).** Isolement et caractérisation des souches de lactobacilles à caractères probiotiques à partir de selles d'enfants, thèse de doctorat en science microbiologique, université Constantine I, Constantine.
- **Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., et Schleifer K.H. (1992).** The prokaryotes and Ed. vol 11. Springer Verlage, New York.
- **Barefoot, S.F. et Klaenhammer, T. K. (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1808-1815.
- **Bastos, M., Coelho, M., et Santos, O. (2015).** Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Microbiology, 161, 683–700.
- **Batdorj, B., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Pedrohe, J., Metro, F., Prevost, H., Chobert, M., et Haertle, T. (2005).** Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian air. Journal of Applied Microbiology, 101(4), 837–848.
- **Begloul L. (2012).** Application des analyse physico chimique et microbiologique au niveau des laboratoires de laiterie de sidi saada en Algérie, 42p.
- **Belarbi, F. (2011).** Isolement et selection des souches de bacteries lactiques productrices des metabolites anti bacteriennes. Mémoire de Magister, Université d'Oran, Faculté des sciences Es senia.
- **Bellil, Y. (2013).** Evaluation de l'effet des substances antimicrobiennes produite par *Leuconostoc mesenteroides* du lait cru de chamelle sur *Listeria* spp.. Thèse magister microbiologie non publiée, Université d'Oran, Oran.

- **Belyagoubi, L. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens, thèse de doctorat université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Tlemcen.
- **Benhoua, I. (2019).** Recherche et exploitation des exo polysaccharides produits par les bactéries lactiques et leur application, thèse de doctorat en microbiologie, université Ahmad Ben Bella 1, Oran.
- **Bennai, T et Temine, S. (2017).** Isolement de souches de lactobacilles performantes, Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER, Option : Microbiologie Alimentaire Santé. Université A. MIRA Bejaia.
- **Bharti, V., Mehta, A., Singh, S., Jain, N., Ahirwal, I. et Mehta, S. (2015).** Bacteriocin: A novel approach for preservation of food, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 7(9), 20-29.
- **Bouadjaib, S. (2013).** Etude physico-chimique du produit laitier traditionnel du Sud algérien « Jben », recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques, Master en biologie, Université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- **Boudersa, W. et Nekkaa, R. (2017).** Étude de l'activité antibactérienne de bactéries lactiques isolées à partir d'un produit laitier fermenté, le yaourt brassé, mémoire de master, Université des Frères Mentouri Constantine. 43-42p.
- **Boulouf, A. (2016).** Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel "Bouhezza", mémoire de magister en science alimentaire, université des frères mentouri Constantine, Constantine.
- **Bouricha, H. (2018).** Caractérisation du lait cru de la ferme expérimentale de Hassi-Mamèche : Précisement la flore thermophile et mésophile, master en biologie, université de Mostaganem, Mostaganem.
- **Bouzaid, M., Chatoui, R., Latrache, H., Hasib, A. (2016).** Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache (Maroc), Microbiologie Industrielle, Santé et Environnement, 10(1), 112.

## C

- **Cactberg, H.B., et Morris, H.A. (1976).** Degradation of milk proteins by enzymes from lactic acid bacteria used in cheese-making, A review. Milchwissenschaft 31: 85-90.
- **Callon, C., Millet, L., Montel, MC. (2004).** Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers Cheese, J.Dairy Res. 71(2): 231-44.

- **Carine, D., Tonart. P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires, base. volume 13.
- **Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002).** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, *Critical Reviews in microbiology*, 28(4) :281-370.
- **Chen, Y. S., Yanagida, F, and Shinohara, T. (2005).** Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure, *Letters in applied microbiology*, 40(3), 195-200.
- **Chentouf, H. (2015).** Effet des substances antimicrobiennes produites par *Leuconostoc mesenteroides* isolées à partir du lait de chamelle Algérien sur *Listeria spp.* dans les produits alimentaires, Thèse doctorat microbiologie non publiée, Université d'Oran, Oran
- **Curk, D. et MacPhail, A. (1996).** Précision des mesures de vitesse de croissance des streptocoques lactiques dans le lait basées sur la méthode de dénombrement microbien par formation de colonies, Étude de référence avec *Lactococcus lactis*. *Lait*. 1989. 69: 433-447.
- **Curk, M.C., Peladnan, F., Hubert J.C. (1993).**Caractérisation biochimique des lactobacilles brassicoles, *Lait*. 73. p 215-231.

## **D**

- **De Man, J. C., Rogosa, M.,et Sharpe, M. E. (1960).** A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J.appl. bacteriol*, 23, 130-135.
- **De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994).** Les bactéries lactiques, riage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286.
- **De Vos, P. (2009).** Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In, *Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes* ,Vol 3. Springer éd. New York.pp.19-511.
- **De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (1994).** Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, pp. 91–142. London: Blackie Academic and Professional.
- **Dembelle, T., Obdarzalek, V. et Voltava, M. (1998).** Inhibition of bacterial pathogens by *Lactobacilli*, *Zent. Bl. Bacterial*, 288, p395-401.
- **Desmazeaud M.J. (1992).** Les bacteries lactiques, INRA station de recherche laitière 78350 Jouy en Joas.
- **Denis, F., Poly, M. C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. (2011).** *Bacteriologie medical Techniques usuelles* Ed. Elsevier Masson, Paris 75 p.

- **Djadouni, F. (2013).** Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats de bactéries lactiques et détermination du spectre d'action de leurs bio peptides vis-à-vis des germes d'altération, Thèse doctorat microbiologie non publiée, université Es-senia Oran, Oran.
- **Djerdir Z., Nasri Kh. (2018).** Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activités antimicrobiennes, Mémoire de Master en Microbiologie Moléculaire et médical, 35p.
- **Dorti, C. (2008).** Isolement des bactéries lactiques produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires, Thèse doctorat en Sciences agronomiques non publiée, Université de Gembloux, Belgique.
- **Dortu, C., Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires, 13, 143-154. Fernandez B. 2014. Activité biologique et impact sur le microbiote intestinal des bactéries lactiques bactériocinogènes. PhD thesis, Université Laval, Québec, p. 143.
- **Drider, D. (2011).** Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications, Drider D, Rebuffat S (Ed). Springer: New York; 171-195
- **Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., Mc Mullen, L. M., Prévost, H. (2006).** The continuing story of class IIa bacteriocins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2: 564-582.E.
- **Duhan, J., Nehra, K., Gahlawt, S., Saharan, P., et Surekha, D. (2013).** Bacteriocins from lactic acid bacteria, Biotechnology: Prospects and Applications, 1, 127-142.
- **Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (2006).** The prokaryotes third edition A handbook on the Biology of bacteria: Firmicutes, *Cyanobacteria*. Springer, Singapore, Médical. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université A. MIRA - Bejaia.
- **Doguiet Koffi-Denis, D. (2010).** Bio contrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs, thèse de doctorat, université Bordeaux 1, 185.

## ***E***

- **Ekundayo, F. O. (2014).** Isolation and identification of lactic acid bacteria from rhizosphere soils of three fruit trees, fish and ogi. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(11), 991-998.

- **Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P., et Balasubramanian, T. (2014).** Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1),305-311.
- **El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El Mecherfi, K.E., Bazukyane, I., Choiset, Y., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y.G., A. Kuliev, A., Mozzi, F., Chobert, J.M. et Haertlé, T.(2011).** Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods, *Tre. Food Sci. Technol.* 1-8.

## *F*

- **FAO, T. W. H. O. (2001)** .Probiotic definition de Roissart H.B. (1986). Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers, Luquet F. M., 3, Ed. Techniques et Documentations Lavoisier, Paris, pp : 343-407.
- **FAO. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO. Alimentation et nutrition n°28.
- **FAO/OMS. (2002).** Guidelines for the evaluation of probiotics in foods: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002
- **Feliachi, k. (2003)** .Rapport National sur les Ressources Génétiques Animales, Algérie commission nationale ANGR, 2003.
- **Field, D., Cotter, P.D., Ross, R.P.et Hill, C. (2015).** Bioengineering of the model lantibiotic nisin, *Bioengineered* 6:187-192.
- **Fleming, H.P, et chells, J. L, et Costilow. R. N. (1975).** Microbiol Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from Brines. *Applied Microbiology*.vol. 30, N°. 6. p. 10401042.
- **Florence, C L. (2010).**Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras voies d'amélioration par l'alimentation, thèse de doctorat en sciences vétérinaires, école nationale d'alfort, France.
- **Franz, M.A.P. et Holzapfel, H. (2004).** The Genus *Enterococcus*: Biotechnological and Safety Issues In Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A.3e Ed., Marcel Dekker, pp: 199-230.
- **Fredot, E. (2006).** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier, 25 397 p.

## G

- **Gaamouche, S., Bakkali, M., Laglaoui. A. (2014).** Antimicrobial activity of lactic acidbacteria and bacteriocins isolated from a traditional brine table olives against pathogenic bacteria, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*,3(11), 657-666.
- **Gálvez A., Abriouel H., Lucas-López, RL and Omar NB .(2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology* 120 51–70
- **Ghodbhane, H., Elaidi, S., Sabatier, J .M., Achour, S., Benhmida, J . et Regaya ,I . (2014).** Bacteriocins Active against Multi-resistant Gram Negative Bacteria Implicated in Nosocomial infections, *Infections disorders Drugs Targets*, 1871-5265.
- **Gilliland, S E., Speck., M L. (1977).** Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative culture, *Journal Food Protection*. 40(12): 820-823.
- **Gong, H .S., Meng, X.C. et Wang, H. (2010)** .Plantaricin MG active against Gram – negative bacteria produced by *lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from jiaoke , a traditional fermented cream from china, *food control* .2:89-96 .
- **Gonzalez, C., Aispuro, E., Vargas, I., et Martinez, M. (2018).** Induction of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria, a Strategy to Improve the Safety of Fresh Fruits and Vegetables, *Agricultural Research and Technology: Open Access Journal*, 14(4), 1,5.
- **Guessas, B., Kihal M. (2004).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk, *African J. Biotechnol.* 3(6) : 339-342.
- **Guetarni, H. (2013).** Effets antibactériens des bactéries lactiques isolées à partir des laits crus Algériens sur la croissance de *Helicobacter pylori*, Thèse de doctorat, Université d’Oran Es-Senia, 276p.
- **Guetouache, M, Guessas, B, Medjekal, S, Toumatia, O, (2014).** Technological and Biochemical characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from Algerian Traditional Dairy Products, *World Applied Sciences Journal* 33 (2) : 234-241.
- **Guiraud, J.P. (2003).** *Microbiologie alimentaire*, Ed. Dunod, Paris: 91, 92,292 p.
- **Guiraud, J.P. (1998).** *Microbiologie Alimentaire*, Ed. Dunod, Paris, 136-144p.

## H

- **Hadef, S. (2012).** Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales, Mémoire de Magister de microbiologie appliquée, Université Kasdi Merbah Ouargla, Ouargla.
- **Hamar, H. (2018).** Potentialité technologique des lactocoques isolées du lait cru de chevremaster en biologie, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.
- **Hammes, W. P. et Hertel, C. (2006).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap.1.2.10. In prokaryotes. 4: 320-403.
- **Hammi, I. (2016).** Isolement et caractérisation de bactériocine produite par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et des différentes variétés de fromage français, thèse en science chimique, université de Strasbourg, France.
- **Hanafya, A., Al-Mutairib, A., Al-Reedyc, R., et Al-Garniba, S. (2016).** Phylogenetic affiliations of *Bacillus amylolique* faciens isolates produced by a bacteriocin- like substance in goat milk souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Journal of Taibah University for Science, 10, 631-641.
- **Hansal, N. (2015).** Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *leuconostoc mesenteroides* isolé à partir du lait cru de chèvre et de chamelle, Thèse magister microbiologie non publiée, Université d'Oran, Oran.
- **Hariri, A., Ouis, N., Sahnouni, F. et Bouhadi D. (2009).** Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, Rev.Microbiol. Ind. San et Environn. P : 37-55.
- **Hassaine, O. (2013).** caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien, thèse de doctorat en boitechnologie, université d'oran Es-senia, Oran.
- **Heleni, S., Lefki, P., Nikolaos, T et Evanthia L.T. (2006).** Populations, types and biochemical activities of aerobic bacteria and lactic acid bacteria from the air of cheese factories, Int. J. Dairy Technol. vol. 59, no3, pp. 200-208.
- **Ho Thi, NT. (2008).** Étude de la flore lactique du Nem Chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit, Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments et Nutrition, Université Bordeaux 1, France.
- **Hogg, T. (2005).** Essential microbiology, John Wiley ET Sons, Ltd, 188-190.
- **Hove, H., Nørgaard, H, and Mortensen, P. B. (1999).** Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract, European Journal of Clinical Nutrition, 53(5), 339-350.

- **Huss, H.H., Jorgensen L.V. et Vogel, B.F. (2000).** Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int. Food. Microbiol.* 62: 267-274.

## *J*

- **Idoui, T. et Karam, N.E. (2008).** Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits, *Grasas. Y, Aceites.* 59(4): 361-367.

## *J*

- **Jayachitra, J., and Sivakumar, K. (2018).** Antimicrobial activity of bacteriocin from lactic acid bacteria against food borne bacterial pathogens. *International Journal of Current Research in Life Sciences*, 7(4),1528-1532 .
- **Jeante, T R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P et Brule, G. (2008).** Les produits laitiers ,2ème édition, Tec et Doc, Lavoisier: 1-3-13-14-17 (185 pages).
- **Jin, W., Hoy, N., Abdullah, S., Jaialudin. (1996).** Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken, *Lett. Appl. Microbiol.*,67–71.
- **Jooyandeh, H. et Abroumand, A. (2010).** Physico-chemical, nutritional, heat treatment effects and Dairy product aspects of goat and sheeps milks, *World Applied Science Journal*, 11 (11), 1316-1322.

## *K*

- **Kassas, Z. (2017).** Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié université de badji mokhtar–Annaba, 158.
- **Kiemptore, I.H.A. (2013).** Evolution de la qualité d'un yaourt industriel produit localement et commercialisé sur le marché d'Ouagadougou, Master, Produit d'origine animale, Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaires, Université de Dakar.
- **Klaemhammer T. R Barrangou R., Buck B.L., A zcarate-Perin M.A., Altermann E., (2005).** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health, *FEMS Microbiology Reviews.*, 29 : 393-409
- **Klaenhammer, T R. (1988).** les bacteriocines des bacteries lactiques, caracteristiques et interets pour la conservation des produits alimentaires, Base.VOL 13.
- **Klein, S., Kush, G. (2004).** Diffusion in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped growing lactic acid bacteria, *Biotechnol. Bioeng.* 38:1041.

- **Kondrotiene, K., Kasnauskite, N., Serniene, L., Golz, C., Alter, T., Kaskoniene, V., Maruska, A. et Malakauskas, M. (2018).** Characterization and application of newly isolated nisin producing *Lactococcus lactis* strains for control of *Listeria monocytogenes* growth in fresh cheese, *Food Science and Technology*, 87, 507-514.
- **König, H. et Fröhlich, J. (2009).** *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- **Kyriakou, P., Ekblad, B., Kristiansen, B., et Kaznessis, Y. (2016).** Interactions of a class IIb bacteriocin with a model lipid bilayer investigated through molecular dynamics simulations, *Biochimica et Biophysica Acta*, 824-835.

## $\mathcal{L}$

- **Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Wright A.V. (2012).** *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and functional aspects* Fourth edition Taylor et Francis Group. Boca Raton London New York.
- **Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamti, R., Belkhou, R., Zerrouq, F. (2014).** Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir, *Afrique SCIENCE*, 10(4), 267-277.
- **Lamontagne, M., Claud, P., Joelle, R A., Moineau, S., Gardner, N., Lamoureux, M., Jean, J., Fliss, I. (2002).** *Microbiologie de lait. Science et technologie de lait*, Ecole polytechnique de Montréal, France.
- **Larpent, J. P. et Larpent, G. M. (1990).** *Mémento technique de microbiologie* 2eme Ed. technique et documentaire Lavoisier, P : 417.
- **Laursen, B. G., Leisner, J. J. and Dalgaard, P. (2006).** Carnobacterium species : effect of metabolic activity and interaction with *Brochetrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3604-3611.
- **Leonard, I. (2013).** Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries Lactiques confinées dans une matrice polymérique, Thèse doctorat Sciences de l'Alimentation non publiée, Université de Bourgogne, France.
- **Liu, W., Zheng, Y., Kwok, L.-Y., Sun, Z., Zhang, J., Guo, Z., Hou, Q., Menhe B., Zhang, H., (2014).** High through put sequencing for the detection of the bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented cow's milk in Russia, *BMC Microbiology* 15 (1), 45.

## M

- **Maghnia, D. (2011).** Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels algériens ,mémoire de magister en microbiologie alimentaire, université Es-senia oran , Oran.
- **Makras, E. et De Vuyst, L. (2006).** The in vitro inhibition of Gram-négatif Pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids International Dairy Journal 16, 1049-1057.
- **Mameche, A. (2008).** Purification et caractérisation de bactériocine produite par des bactéries lactiques autochtones isolées, Thèse : sciences alimentaires, institut national agronomique, Algérie, 14p.
- **Mami, A. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices des 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, 77.
- **Mannu, L., Paba, A., Pes, M., Scintu, M.F. (2002).** Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Lactococci* isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. J. Appl. Microbiol. 89:191-197.
- **Mansour, N., Ouyed, L., Sadeg, S. (2010).** Détermination de l'activité antibactérienne de quelques huiles essentielles et leur application sur deux types de viande de dinde : commerciale et domestique. Thèse d'ingénieur. Université Mouloud Mammeri. Tizi Ouzou. 88.
- **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.
- **Mataragas, M., Drosinos, E H., Tsakalidou, E. et Metaxopoulos, J. (2004).** Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. Antonie van Leeuwenhoek, 85, 191-198.
- **Mc Auliffe, (2001).** In Bacteriocins: biological tools for bio preservation and shelf-life extension. International Dairy Journal .2006.
- **Mechai, A. (2009).** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques, Thèse : Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar-Annaba, Algérie, p 05, 12, 13, 92-95.

- **Meghrous, J., Huot, M., Quittelier, M., Petitdemange, H. (1992).** Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, Res Microbiol 143 : 879±890.
- **Menad, N. (2017).** Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp. Thèse doctorat Microbiologie non publiée, Université de Mostaganem, Mostaganem.
- **Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J-F. (2001).** La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production, Lait, 81: 575-592.
- **Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010).** Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. Int,J, Antimicrobial Agents, 35: 255-260.
- **Mokoena, M.P (2017).** Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens, *Molecules* 22:1255.
- **Molin, G. (2008).** *Lactobacillus plantarum* the Role in Foods sand in Health, In the Handbook of Fermented Functional Foods, Second Edition edited By Edward R. Farn worth, CRC.
- **Moll. G. N., Konings. W. N., Driessen. J. M. (1999)** .Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation, Antonie Van Leeuwenhoek 76: p 182.
- **Moëller, V. (1955).** Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. Acta, Pathol, Microbiol, Scand, 36: 158-172.
- **Montel, M. C., Béranger, C., Bonnemaire, J. (2005).** Les fermentations au service des produits de terroir, INRA, Paris.
- **Moumene, M. (2016).** Isolement et identification des bactéries lactiques et étude de l'effet antagoniste vis-à-vis des germes pathogènes, thèse de doctorat santé, eau et environnement université 8 Mai 1945-Guelma, Guelma.

## N

- **Naghmouchi, K. (2007).** Divergicin M35, une nouvelle bactériocine produite par *Carnobacterium divergens* M35 : Caractérisation moléculaire du mécanisme d'action antimicrobien et du phénomène de résistance, Thèse de doctorat en Sciences et Technologie des aliments, la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, Québec.

- **Nancib Djidel, A. (2007).** Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* sur jus de datte : cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues. Thèse de doctorat, institut national polytechnique de lorraine, 219.
- **Nel, H. A., Bauer, R., Vandamme, E. J. et Dicks, L. M. (2001).** Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1, *J, Appl. Microbiol.*, 91, 1131-1138.
- **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), 311-340.
- **Nigotova, K. (2007).** In Les bacteriocines des bacteries lactiques caracteristiques et interets pour la bioconservation des produits alimentaires, Base. VOL 13.

## *P*

- **Paci Kora, E. (2004).** Interactions physicochimiques et sensorielles dans le yaourt brassé aromatisé: quels impacts respectifs sur la perception de la texture et de la flaveur, thèse: science des aliments, institut national agronomique, Paris, France, p17.
- **Parada, J. L., Caron C. R., Medeiros A. B. P. and Soccol C. R. (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Braz, Arch, Biol. Tech.* 50:512–542.
- **Patton, G.C. and Van Der, Donk, W.A. (2005).** New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action, *Curr, Opin. Microbiol.*, 8, 543-551.
- **Perin, L, Miranda, R, Camargo, A, Colombo, M, Carvalho, A, Nero, L. (2013).** Antimicrobial activity of the Nisin Z producer *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* Lc 08 against, *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 65(5):1554–1560.
- **Pieniz, S., Andrezza, R., Anghinoni, T., Camargo, F. et Brandelli, A. (2014).** Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s, *Food control*, 37: 251-256.
- **Pilet, M.F., Magras C., Federigh M. (2005).** Bactéries lactiques, In: bactériologie alimentaire (Federighi M.), 2e Ed., Economica, Paris. 219-240.
- **Poppi, L.B., Rivaldi, J.D., Coutinho, T.S., Astolfi, C.S., Ferreira, A.J.P. et Mancilha, I.M. (2015).** Effect of *Lactobacillus* sp. isolates supernatant on *Escherichia coli* O157:H7

enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control, *Pesqui Vet Bras.* 35 :353 -359.

- **Pringsulaka, O., Thongnam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A. (2011).** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products, *Food Control*, **23**: 547-551.

## Q

- **Quiberoni, A., Rezaiki, L., El Karoui, M., Biswas, I., Tailliez, P. and Gruss, A. (2001).** Distinctive features of homologous recombination in an « old » microorganism, *Lactococcus lactis*, *Research Microbiology*, 152 : 131-139.

## R

- **Rangsiruji, A. (2011).** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products, *Food Control*, 23: 547-551.
- **Rodríguez, J. M., Martínez, M. and IKok, J. (2002)** Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 42: 91-121.
- **Rogosa, M., Wiseman, R.F., Mitchel J.A., Disraely M.N. et Beaman A.J. (1953).** Species differentiation of Oral *Lactobacilli* from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *L. cellobiosus* nov spec. *J. Bacteriol.* 65: 681-699.

## S

- **Saidi, N., Guessas, B., Bensalah F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D. E., Prevost, H. et Kihal, M. (2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides, *J. Aleg. Reg. Arides.* 1: 1-11.
- **Salminen, S. et Von Wright, A. (2004).** Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects, CRC Press, 798, USA.
- **Samelis, J. Maurogenakis, F et Metaxopoulos, J. (1994).** Characterization of lactic acide bacteria isolated from naturally fermented Greck dry salami, *int Food Microbiol* 23, 179-196
- **Samot, J. (2012).** Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux, Thèse doctorat Microbiologie-Immunologie non publiée, Université de Bordeaux 2 ,Bordeaux .

- **Sanni, A. I., Morlon-Guyot, J. et Guyot, J.P. (2002).** New efficient amylase producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L.fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods, *International Journal of Food Microbiology*, 72,53-62
- **Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C.K., Marx, H. (2017).** The Efficient Clade : Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production, *Trends in Biotechnology* 35 : 756–769.
- **Savadogo, A., et Traore, A. S. (2011).** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(5): 2057-20 *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, Burkina Faso.
- **Savijoki, K., Ingmer, H. et Varmanen, P. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria, *Appl. Microbiol, Biotechnol*, 71, 394-406.
- **Schillinger, U., Lücke, F. K. (1987).** Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products, *Food Microbiology*, 4: 199-208.
- **Schöbitz, R., Suazo, V., Costa, M. et Ciampi, L. (2003).** Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiol.*, 84, 237-244.
- **Sharon, G., Sumayyah, S., Fakhri, S., Muhamed, S., Nichola, H., and Amarila, M. (2017).** Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) activity of *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 and its synergistic action in combination with antibiotics, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(12), 1140-1145.
- **Shehata, M., El Sohaimy, S., El-Sahn, M. and Youssef M. (2016).** Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity, *Annals of Agricultural Science*, 61(1), 65–75.
- **Sidhu, P., Nehra, N. (2017).** Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins, *Journal of King Saud University Science*, 3, 1-10.
- **Singleton, P. (1999).** *Bactériologie*, 4eme Edition, Dunod, Paris. 317 pages.
- **Smaoui, S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés, *Thèse de Doctorat*, Université de Toulouse.
- **Sneath, P.H.A. (2001).** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria – Bacterial Nomenclatur, In *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W. 2e ED., 721, 83 - 88

- **Sorrels, K. M., Speck, M.L. (1970).** Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*, Journal of dairy science. 59(2): 338-343.
- **Sutra, L., Federighi, M., Jouve, J.L. (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire, Ed : Polytechnica, Paris, 308(6) : 31-249.

## *T*

- **Tahiri, I. (2007).** Isolement, caractérisation et étude de la divergicine M35, pour la bioconservation des produits marins prêts à consommer, Thèse doctorat en sciences et technologie des aliments, la Faculté des études supérieures de l'Université Laval.
- **Tahlaiti, H. (2019).** Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté, Thèse en science agronomiques, Université Abdelhamid Ibn badis Mostaganem, Mostaganem.
- **Tenea, G., and Yépez, L. (2016).** Bioactive Compounds of Lactic Acid Bacteria. Case Study: Evaluation of Antimicrobial Activity of Bacteriocin producing Lactobacilli Isolated from Native Ecological Niches of Ecuador. Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health, 149-167.
- **Ten Brink, M. Minekus, J.M. Vander Vossen, R J. et Huis Veld, J.H.J. ( 1994).** Antimicrobial activity of Lactobacilli: preliminary characterisation and optimisation of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. J..Appl. Bacteriol, 77 140–148.
- **Terzaghi, B. E. and Sandine W. E. (1975).** Improved Medium for *Lactic Streptococci* and Their bacteriophages, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 29, No.6 .pp.
- **Todorov, S.D. et Dicks L.M. (2004).** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. J. Basic Microbiol.44, 305-316.
- **Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B. et Hill, C. (2002).** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: Structure, function, and applications, Antonie Van Leeuwenhoek, 82: 165-185.

## *U*

- **UBI. (2010).** Transaction d'algerie [online], Available: <http://transactiondalgerie.com/>.

## *V*

- **Van Den Berg, J. C., Smits, A., Pot, B., Zedeboer, M., Kersters, K., Verbakel, J. M. A. et Verrips, C. T. (1993).** Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation process and culture collections. *Food Biotechnol* 7, 189-205.
- **Van Houte, J., Gibbons, R. J, and Pulkkinen, A. J. (1972).** Ecology of human oral *Lactobacilli*, *Infection and Immunity*, 6(5), 723-729.
- **Verluyten, J., Leroy, F. et De Vuyst, L. (2004).** Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin a production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174, *Appl. Environ, Microbiol.*, 70, 5081-5088.
- **Verma, A., Banerjee, R., Dwivedi, H, et Juneja, V. (2014).** Bacteriocins, In: C, Batt and M. Tortorello , ed .Encyclopedia of Food Microbiology , 2nd ed , Bedford Park , IL , USA :U.S .Food and Drug Administration .
- **Voravuthikunchai, S. P., Bilasoi, S, and Supamala, O. (2006).** Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal *Lactobacilli*, *Anaerobe*, 12(5-6), 221-226.

## W

- **Wan, X. (2017).** *Leuconostoc* bacteriocins and their application in genome editing, Academic Dissertation in Microbiology,1-53.
- **Wedajo, B. (2015).** Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food.
- **Woese, C. R. et Fox, G. E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5088-5090.

## Y

- **Yan yan, H., Mintez, L. (2014).** Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*, *Dermatologica Sinica*, 32,141-147.
- **Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008).** Isolation of lactic acidbacteria with probiotic potential from camel milk, *Int. J, Dairy Sci.*, 3:194-199.
- **Yelnetty, A., Purnomo, H., Purwadi, M., Mirah, A. (2014).** Biochemical characteristics of lactic acid bacteria with proteolytic activity and capability as starter culture isolated from spontaneous fermented local goat milk, *Journal of natural sciences*.4(10). 137-147.

## Z

- **Zeller B. (2005).** Le fromage de chèvre : Spécificités technologiques et économiques, Thèse de Doctorat de l'Université Paul-Sabatier, Toulouse, France.
- **Zhang, H. et Cai, Y. (2014).** Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, P : 535.

# **Annexes**

# Annexes

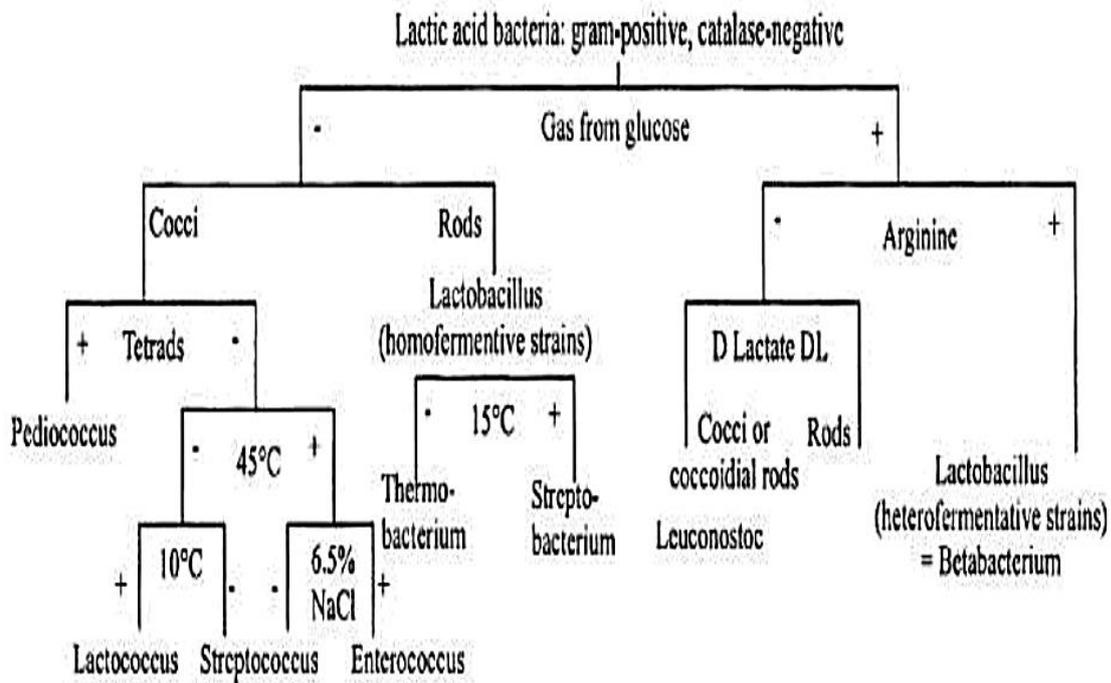
## Annexe I :

**Tableau I :** les résultats de l'activité antimicrobienne des bactéries lactique vis-à-vis les souches pathogènes

Souches pathogènes	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
Souches lactiques	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition (mm)
S1	14	12	20
S2	10	10	27
S3	15	11	28
S4	19	8	30

## Annexe II : Clef d'identification des bactéries lactiques

### I. Identification des bactéries lactiques par (Carr et al., 2002)



**Figure 1 :** schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carr et al., 2002)



## Annexes

Espèces	Hydrolyse de l'esculine	Production d'acide par fermentation de :									
		Amygdaline	Arabinose	Cellobiose	Fructose	Galactose	lactose	maltose	Mannitol	Saccharose	Xylose
<i>Lb.acidophilus</i>	+	+	-	+	V	+	+	+	-	+	-
<i>Lb.delbrueckii ssp.bulgaricus</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Lb.delbrueckii ssp.delbrueckii</i>	-	-	-	V	+	-	-	V	-	+	-
<i>Lb.delbrueckii ssp.lactis</i>	-	+	-	V	+	V	+	+	-	+	-
<i>Lb.gasseri</i>	+	+	-	+	+	+	V	V	-	+	-
<i>Lb.kefiranofaciens</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-

**Tableau VI :** caractéristiques physiologiques du genre *Lactobacillus* du groupe II

Espèces	Mobilité	Croissance a / (dans)						Température Optimale de croissance	Température Maximale de croissance
		15°C	45°C	PH 3,3	PH 7	4% NaCl	10% NaCl		
<i>Lb.casie</i>	-	+	V					30-37°C	<45°C
<i>Lb.paracasia ssp.paracasia</i>	-	+	V						
<i>Lb.paracasia ssp.tolerans</i>	-	+	-						<40°C
<i>Lb.plantarum</i>	-	+	-					30-37°C	<45°C
<i>Lb.rhamnosus</i>	-	+	+						
<i>Lb.sake</i>	-	+	-					30-37°C	<45°C

**Tableau V:** profil fermentaire du genre *Lactobacillus* du groupe II

Espèces	Hydrolyse de	Production d'acide par fermentation de :									
		Amygdaline	Arabinose	Cellobiose	Fructose	Galactose	lactose	maltose	Mannitol	Saccharose	Xylose
<i>Lb.casie</i>	+	+	-	+	+	+	-	V	+	-	
<i>Lb.paracasia ssp.paracasia</i>	+	+	V(-)	+	+	+	V(+)	+	+	V(+)	-
<i>Lb.paracasia ssp.tolerans</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lb.plantarum</i>	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	V(-)
<i>Lb.rhamnosus</i>	+	+		+	+	+	+	+	+		-
<i>Lb.sake</i>	+	V	V	+	+	+	+	+	-	+	-

## Annexes

### III. Table d'identification de (Guiraud, 2003)

**Tableau VI :** table d'identification des espèces de *Lactobacillus* (Guiraud, 2003)

Groupe	Betabacterium										Streptobacterium				Thermobacterium							
	<i>L. brevis</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fructivorans</i> *	<i>L. hilgardii</i> **	<i>L. kefir</i>	<i>L. sanfrancisco</i>	<i>L. viridiscens</i>	<i>L. casei</i> ***	<i>L. casei/pseudoplantarum</i>	<i>L. casei/rhamnosus</i> ****	<i>L. casei/tolerans</i> °	<i>L. curvatus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. delbrueckii/bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii/delbrueckii</i> °°	<i>L. delbrueckii/lactis</i>	<i>L. helveticus</i> °°°	<i>L. salivarius</i>
CO <sub>2</sub> sur glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	-
Culture à 15 °C	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Culture à 45 °C	-	-	+	+	-	-	-	v	-	-	-	+	-	-	v	.	+	+	+	+	+	+
Arginine (NH <sub>2</sub> )	+	+	+	+	+	v	+	-	-	-	-	-	-	-	.	-	-	v	v	-	-	-
Amygdaline	-	-	v	-	-	-	-	.	-	+	+	+	-	-	+	+	+	v	-	+	-	v
Esculine	v	v	+	-	-	-	-	v	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	v	-	v
Culture teepol 0,4 %	+	+	+	-	.	.	.	.	+	-	-	-	-	.	+	.	.	.	.	.	.	.
Arabinose	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	v	-	-	v	+	-	-	.	.	.	.
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	v	v	-	-
Gluconate	v	v	v	v	v	v	v	v	v	+	v	+	v	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lactose	v	v	v	+	-	v	v	.	-	v	+	+	+	v	+	-	+	+	-	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	v	+	-	-	-	-	-	+
Mélezitose	-	+	+	.	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	v	v	.	.	.	.	.	.
Mélibiose	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	v	-	-	-	-	+
Raffinose	v	v	+	+	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	v	-	-	-	-	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	v	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Saccharose	v	v	+	+	v	v	-	-	v	+	+	+	-	v	+	+	+	-	+	+	-	+
Tréhalose	-	-	+	v	-	-	-	-	v	+	+	+	-	-	+	.	v	-	v	+	v	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	v	+	-	-	-	-	-	+
Acide lactique (type)	DL	.	.	DL	DL	DL	.	.	.	L	D	L	.	DL	DL	DL	DL	D	D	D	DL	L
Sérotype	E	E	F	F	.	.	.	.	.	BC	.	C	-	.	D	.	.	E	E	E	A	G
% acide sur lait	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,3	.	1,3	-	.	0,3	.	0,3	1,5	0	1,5	2,7	0,9
Auxotrophies	F	R	-	-	.	.	.	.	R	PF	.	PF	.	.	-	.	RFB	R	RT	RB	RP	RF

V : variable, R : riboflavine, P : pyridoxal, F : acide folique , B : vitamine B12 , T : thymidine  
 . : Non déterminé

# Annexes

---

## ❖ Solution de NaOH 1N :

Eau distillé .....	1000ml
NaOH .....	40g

## ❖ Solution de HCL 1N :

Eau distillé .....	100ml
HCL.....	4ml

## ❖ Solution de sucre :

Eau distillé.....	100ml
Sucre .....	2g

Stérilisation à 60 °C pendant 30min



**Figure 3 :** Les solutions de titrage et de sucres

## Annexe IV : Composition des diluants (g/l)

### ❖ Eau physiologie 9 /ml :

Na Cl .....	9g
Eau distillée .....	1000 ml

### ❖ Eau physiologique peptonée :

Peptone .....	1g
Chlorure de sodium .....	8,5g
Eau distillée .....	1000 ml

## Annexe V : Composition des milieux de cultures (g/l)

## Annexes

---

### ❖ Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure .....	5g
Extrait de viande .....	5g
Peptone .....	10g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium .....	2g
Glucose .....	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.1 g
MnSO <sub>4</sub> .....	0.05 g
Agar .....	12g
Tween80 .....	1ml
Eau distillée q.s.p .....	1000 ml
PH= 6.5±0.2 à 37°C	
Autoclavage : 121°C /15min.	

### ❖ Milieu M17 (Terzaghi et Sandine,1975)

Peptone de casiene .....	10g
Peptone pepsique de viande.....	2.5g
Peptone papaine de soja .....	5g
Extrait de levure .....	2.5g
Extrait de viande .....	5g
B-Glycérophosphate .....	19g
Mgso <sub>4</sub> .....	0.25g
Lactose .....	5g
Acide ascorbique .....	0.5g
Agar-agar .....	20g
Eau distille .....	1000ml
PH=7,2	
Autoclavage : 120°C pendant 20min.	

### ❖ Gélose nutritif (GN) :

Peptone.....	5g
--------------	----

## Annexes

---

Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2g
NaCl.....	5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

Ph 7

Autoclavage durant 15 min à 121 °C

### ❖ Milieu Esculine

Peptone:.....	10g
Esculine: .....	1g
Citrate de fer ammoniacal .....	1g
Agar:.....	20g

PH=6.5±0.2 à 37°C

Autoclavage : 121°C /15min.

### ❖ MRS -Bouillon

Peptone .....	10g
Extrait de viande .....	8g
Extrait de levure .....	4g
Glucose .....	20g
Acétate de sodium trihydraté .....	5,0g
Citrate d'ammonium .....	2,0g
Tween 80 .....	1,0ml
Hydrogénophosphate de potassium .....	2,0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté .....	0,2g
Sulfate de manganèse tétra hydraté .....	0,05g

pH = 6.2±0.2

### ❖ Bouillon M17

Tryptone .....	2,5 g.
Peptone pepsique de viande.....	2,5 g.

## Annexes

---

Peptone papainique de soja.....	5,0 g.
Extrait de viande.....	5,0 g.
Extrait auto lytique de levure.....	2,5 g.
Acide ascorbique.....	0,5 g.
Glycérophosphate de sodium.....	19,0 g.
Sulfate de magnésium .....	0,25 g.

pH = 6.2±0.2

### ❖ Clark ET Lubs

Peptone tryptique ou poly peptone .....	5-7g
Glucose .....	5g
Phosphate di potassique .....	5g
Eau distillée .....	1000ml

pH =7±0.2

### ❖ Milieu Môeller à l'arginine (pH 6,8)

Peptone pepsique de viande .....	5 g
Extrait de viande .....	5 g
Pourpre de bromocrésol .....	0,01 g
Rouge de crésol .....	0,005 g
Glucose .....	0,50 g
Pyridoxal .....	0,005 g
Arginine .....	10 g
Eau distillée qsp .....	1000 mL

Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 15 minutes.

### ❖ Bouillon nutritif

Peptone A.....	10 g
Extrait de bœuf.....	10 g
Chlorure de sodium.....	5 g

## Annexes

---

Eau distillée .....1000ml

Stérilisation a l'autoclave ,120°C pendant 15 minutes.

### ❖ Milieu MRS BCP

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre

1000 ml Bromocrésol pourpre 0,025 mg

PH 7.0 Autoclavage 120°C/ 20 minute

### ❖ Lait écrémé

Lait en poudre 10 g

Extrait de levure 0,8 g

Eau distillée 100 ml

Autoclavage 110°C pendant 10 minutes

## Annexe VI : La composition des réactifs et colorants utilisés

### ❖ Réactif de vogues prosateur (VPI et VPII)

VPI : Solution de soude Na OH à 16% dans l'eau distillée.

VPII : Alpha -naphtol à 6%dans l'alcool à 95%.

### ❖ Colorants utilisés

#### ✓ Violet de gentiane au cristal :

Violet de gentiane .....10g (ou 5g)

Phénol .....20g

Ethanol à 0.95 .....100 cm<sup>3</sup>

Eau distillée ..... 1 dm<sup>3</sup>

Les 3 premiers composants sont dans un premier temps dissous ensemble d'eau est  
Ajoutée ensuite.

#### ✓ Lugol :

Iode ..... 5g

IO dure de potassium .....10g

## Annexes

---

Eau distillée qsp ..... 1g

Flacon brun

✓ **Fuchsine de Ziehl :**

Fuchsine basique ..... 10g

Phénol .....50g

Ethanol à 0.5 .....10cm<sup>3</sup>

Eau distillée .....1dm<sup>3</sup>

# Annexes

## Annexe VI : Le catalogue et les résultats d'identification par les galeries

REF 50 300

**api® 50 CH**

Carbohydrates

### INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. API 50 CH est utilisé en combinaison avec API 50 CHL Medium pour l'identification des Bacilles et apparentés, des *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae* (à l'exception des bactéries qui ont des besoins nutritionnels particuliers) et ce système est présenté dans le Tableau d'identification en fin de notice des milieux associés.

### PRINCIPE

La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrats appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (détrodes, polyols, acides uriques). Les tests de fermentation sont indiqués avec API 50 CHL Medium ou API 50 CHBE Medium qui rehydrate les substrats.

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif.

**NOTE :** La galerie API 50 CH peut être utilisée pour étudier deux autres voies :

- l'oxydation se traduisant par un changement de couleur dans la capsule, dû à une production d'acide en aérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.
- l'assimilation se traduisant par une croissance du microorganisme dans la capsule quand le substrat est utilisé comme seule source de carbone présente.

Dans ce cas, le milieu employé pour l'incubation des galeries doit être choisi en fonction du métabolisme et des exigences du groupe microbien étudié (voir paragraphe bibliographique).

### CONTENU (Coffret de 10 tests)

- 10 galeries API 50 CH
- 10 feuilles d'incubation
- 10 fiches de résultats
- 1 notice

### COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie API 50 CH est reportée dans la liste des tests ci-dessous :

#### Bande 0 - 9

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
0	GLY	GLYCÉROL	1,0
1	ERY	ERYTHRITOL	1,64
2	DARA	D-ARABINOSE	1,4
3	LARA	L-ARABINOSE	1,4
4	TRB	D-TRIOSE	1,4
5	DXYL	D-XYLOSE	1,4
6	LXYL	L-XYLOSE	1,4
7	ADU	D-ADONIS	1,36
8	ADU	D-ADONIS	1,36
9	MXE	MÉTHYL- $\beta$ -D-XYLOPENTOSIDE	1,29

#### Bande 10 - 19

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
10	GAL	D-GALACTOSE	1,4
11	GLU	D-GLUCOSE	1,56
12	FRLU	D-FRUCTOSE	1,4
13	MME	D-MANNITOL	1,4
14	SBE	L-SORBITOL	1,4
15	RHA	L-RHAMNITOL	1,36
16	DUL	DULCITOL	1,36
17	IND	INOSITOL	1,4
18	MAN	D-MANNITOL	1,36
19	SCR	D-SORBITOL	1,36

#### Bande 20 - 29

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
20	MEM	Méthyl- $\alpha$ -D-Mannopyranoside	1,29
21	MDG	Méthyl- $\alpha$ -D-Galactopyranoside	1,29
22	NAG	N-Acétyleucosamine	1,29
23	AMY	AMYLGLUCOSAMINE	1,08
24	ARB	ARABINITE	1,08
25	ESC	ESCOLENE	1,94
26	SAL	SALICINE	0,152
27	CEL	D-CELLULOSE	1,04
28	MAL	D-MALTOSE	1,32
29	LAC	D-LACTOSE (origine bovine)	1,4

#### Bande 30 - 39

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
30	MEL	D-MÉLITULOSE	1,32
31	SAC	D-SACCHAROSE	1,32
32	TRE	D-TREHALOSE	1,32
33	INU	INULINE	1,28
34	MEZ	D-MALACTULOSE	1,32
35	AMF	D-AMFIBIOSE	1,56
36	AMD	AMIDON	1,08
37	OLYG	OLYGOGLUCOSE	1,28
38	MAL	MALTOSE	1,32
39	GEN	GENTIOBIOSE	0,5

#### Bande 40 - 49

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
40	TUR	D-TURANOSE	1,32
41	LXK	D-LXKULOSE	1,4
42	TAG	D-TAGULOSE	1,4
43	FUC	D-FUCULOSE	1,28
44	LAFUC	L-FUCULOSE	1,28
45	DARL	D-ARABITOL	1,4
46	LARL	L-ARABITOL	1,4
47	INF	INOSITOL	1,94
48	2KC	potassium 2- <i>O</i> -Cétylhexanoate	2,12
49	1KC	potassium 1- <i>O</i> -Cétylhexanoate	1,6

Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des litres des milieux primaires.

07849F - FR - 2002/11

IVD

api® 50 CH

### REACTIONS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

**Reacts :**

- Milieu d'incubation : API 50 CHL Medium (Ref. 50 410) API 50 CHBE Medium (Ref. 50 420) (+ produits mentionnés dans les notices de ces milieux) ou autre milieu adapté
- Huile de paraffine (Ref. 70 100)
- McFarland Standard (Ref. 70 900) ou DENSI-MAT (Ref. 99 234) ou Densitomètre ATB®
- Logiciel d'identification (consulter bioMérieux)

### Matériel :

- Pipettes ou PSipettes
- Porteur pour ampoules
- Protège-ampoules
- Ecouvillons
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

### PRECAUTIONS D'UTILISATION

• Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.

• Pour usage professionnel uniquement.

• Ce coffret contient des composants d'origine animale. La matière de Forjans et/ou de fétat sanitaire des produits ne peuvent garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible. Il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler).

• Les prélèvements, cultures bactériennes et produits osmométriques doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée par un personnel compétent et averti. Les déchets doivent être traités de façon appropriée.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

• Les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler) doivent être prises.

07849F - FR - 2002/11

IVD

### ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 50 CH ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autre. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

### MODE OPERATOIRE

**Selon le milieu utilisé, API 50 CHL Medium ou API 50 CHBE Medium, lire attentivement la notice correspondante.**

**Préparation des galeries**

Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.

• Préparer une belle incubation (fond et couvercle).

• Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être défectueux lors de la manipulation.)

• Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée (ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de fond pour créer une atmosphère humide).

• Sortir les bandes de leur emballage, séparer en deux les bandes 0-19 et 20-39 et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation.

• Compléter la galerie avec la bande 40-49.

**Préparation de l'Inoculum**

• Cultiver le microorganisme sur un milieu adapté à sa croissance.

• Vérifier la pureté de la souche.

• Récupérer cette culture par écouvillonnage d'un milieu solide, ou par centrifugation d'un milieu liquide.

• Préparer l'inoculum dans le milieu approprié (voir notices API 50 CHL Medium et API 50 CHBE Medium).

• Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

**Inoculation des galeries**

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :

• Incuber légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.

• Éviter la formation de bulles en posant le point de la pipette sur le côté de la capsule.

• Lorsque le tube sera tout à fait inoculé, ne pas dépasser la limite supérieure du tube afin de conserver une bonne anaérobiose.

• Lorsque le tube et la capsule doivent être complètement remplis, éviter la formation d'un ménisque concave ou convexe.

• Incuber les galeries à la température optimum de croissance du groupe de microorganismes étudiés : 30°C, 37°C, 55°C.

REF 50 300

**api® 50 CH**

Carbohydrates

07849F - FR - 2002/11

07849F - FR - 2002/11

IVD

### SUMMARY AND EXPLANATION

The API 50 CH carbohydrate system, consisting of 50 individual tests for the study of the carbohydrate metabolism of microorganisms. API 50 CH is used in combination with API 50 CHL Medium for the identification of Bacilli and related genera and with API 50 CHBE Medium for the identification of *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae* (with the exception of bacteria which have special nutritional requirements) and this system is presented in the Table of identification at the end of the package insert of the respective media.

### PRINCIPE

The API 50 CH carbohydrate system, consisting of 50 individual tests for the study of the carbohydrate metabolism of microorganisms. API 50 CH is used in combination with API 50 CHL Medium for the identification of Bacilli and related genera and with API 50 CHBE Medium for the identification of *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae* (with the exception of bacteria which have special nutritional requirements) and this system is presented in the Table of identification at the end of the package insert of the respective media.

The fermentation tests are indicated with API 50 CHL Medium or API 50 CHBE Medium, which rehydrate the substrates.

During incubation, fermentation is revealed by a color change in the tube, caused by the anaerobic production of acid and revealed by the pH indicator present in the chosen medium. The first tube, which does not contain any active ingredients, is used as a negative control.

**NOTE :** The API 50 CH may only be used to test a few test other patterns.

assimilation which is revealed by a color change in the capsule, due to the aerobic production of acid and revealed by the pH indicator present in the chosen medium.

assimilation which is revealed by a color change in the capsule, due to the aerobic production of acid and revealed by the pH indicator present in the chosen medium.



# Annexes

## Annexe VII : Matériel non biologique

		
Bec bunsen	Vortex	Bain marie
		
Etuve à 15°C	Etuve à 37°C	Etuve à 30°C
		
Etuve à 45°C	Centrifugeuse	Autoclave

## Annexes

		
PH mètre (HANNA)	Balance électronique	Microscope photonique
		
Jarre d'anaérobiose	Membrane millipore 0,22 $\mu$ m	disques de papier watman

### 2 : Verrerie et accessoires :

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