

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE
& BIOCHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE
FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES
OPTION : MIROBIOLOGIE APPLIQUE

N° :

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par :

Ayachi Ali, Benziane Oussama, Benlaiter Ahmed

Isolement et identification des nouvelles souches
lactiques productrices de bactériocines à partir d'un
produit laitier traditionnel (Leben) à la région de M'sila.

Intitulé

Soutenu devant le jury composé de :

GUETOUACHE. M	Dr. Université de M'sila	Promoteur
Rahali. A	Dr. Université de M'sila	Président
Ariech. M	Dr. Université de M'sila	Examinatrice

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Dieu soit loué pour la conclusion de ce mémoire, avec bonté et bénédiction, et pour l'impact de ce succès, nous tenons à remercier chacun de nos encadreurs, le Dr Geutouache Murad, pour son soutien et ses conseils continus.

Nous remercions également nos professeurs du département de microbiologie de nous avoir poussés vers le succès et le progrès dans la recherche scientifique et le cheminement universitaire.

Merci à toutes les personnes qui nous ont encouragés et ont contribué à notre succès

Merci à notre famille et nos proches pour leur présence constante

Merci pour les circonstances qui nous ont renforcés et nous ont rendus responsables de notre travail

إهداء

الحمد لله حمدا كثيرا طيبا مباركا فيه الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي، اود ان اعبر
عن شكري وامتناني لأستاذنا الذي رافقتنا في هذا العمل وجميع أساتذتي الأفاضل في كلية
العلوم الطبيعية والحياة.

وأیضا شكرا لأصدقائي وأحبتي الذين كانوا الرفیق الأنیس فیہ وإلی زملائي جميعا كل
باسمه وفقكم الله، وأود أن أختص بهذا عبد الرحمن حنة وعبد الرحمان بودراف وصدیقي
الذي غادر هذه الدنيا خليفة شلالي تغمده الله بواسع رحمته، مصطفى بداي وسعد عزوق،
وجميع اخوتي واخواتي مهما عبرنا لن نوفيهم حقهم ومقامهم

وإلى أبي الجبل الذي كان رواسي قلبي وداعمي في كل هذا المشوار وإلى حبيبتي أمي التي
جعلتني أرى الحياة بعينيها اسأل المولى عز وجل أن يرفعكم درجة ويرزقكم الجنة
الفردوس.

أحمد بن العيطر.

Dédicace

Avec l'aide d'Allah

J'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

L'étoile de ma vie Ma mère qui m'a entouré d'amour, d'affection et qui fait tout pour ma réussite, Qu'Allah l'a guérie et la garde.

Mon père qui m'a aidé à devenir ce que je suis aujourd'hui, que Allah le garde et le protège

Ma chère sœur Saida et sa petite famille pour leur soutien, leurs conseils et leur amour, merci d'avoir toujours soutenue.

Mon chère frère Mohamed pour l'encouragement et le soutien

Mes sœurs et mes frères.

Qu'Allah vous protège.

A ma famille et toutes les personnes que j'aime.

A mes chères binôme Ali et Ahmed, je leur souhaite la réussite et le bonheur dans sa vie.

A Tous Mes Amies

Bilal, Saad, Ibrahim, Nasreddin, Sofiane, Mohamed, Fahim,

pour tous les moments qu'on a passés ensemble, à tous nos souvenirs ! Je vous souhaite à tous longue vie pleine de bonheur et de prospérité.

A Tous Mes Collègues

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit réalisé je vous dis merci.

OUSSAMA BENZIANE

Dédicace

Avec l'aide d'Allah :

Je dédie ce modeste travail À : mes chères parents qu'Allah les garde, pour tout l'amour et l'affection dont vous m'avez toujours comblé et les sacrifices infinis que vous n'avez jamais cessé de consentir.

A ma sœur, pour l'encouragement et le soutien, je souhaite que vous soyez heureuse et en bonne santé pendant toute la vie

A mes chères binôme Oussama et Ahmed, merci pour le beau temps qu'on a passé ensemble durant ses années, et pendant la réalisation de ce travail, je te souhaite beaucoup de réussite dans tout ce que tu entreprends et plein de bonheur dans la vie.

A mes amies : mohamed nadir, soufiane, mohamed taleb, pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, pour votre soutien.

Tous les membres de ma famille plus élargie, mes amies. A ceux qui ont aidé, encouragé et soutenu dans les moments les plus difficiles et ceux à qui je dois tant, je vous dis merci.

ALI AYACHI

Table des matières

Remerciements.....	I
إهداء.....	II
Dédicace.....	III
Dédicace.....	IV
المخلص.....	VIII
Résumer.....	IX
Summary.....	X
Liste des abréviations.....	XI
Liste des Figures.....	XII
Liste des Tableaux.....	XIII
INTRODUCTION.....	1
1. Produits laitiers traditionnels.....	3
2. Leben.....	4
3. Variation de la composition du lait.....	4
4. Les caractéristiques physico-chimiques du lait.....	5
4.1. La densité.....	5
4.2. Le point de congélation.....	6
4.3. L'acidité.....	6
4.4. Le pH.....	6
4.5. Le point d'ébullition.....	6
5. Composition chimique de lait.....	7
5.1. Les lipides.....	7
5.2. Les glucides.....	7
5.3. Les protéines.....	8
6. Fermentation lactique.....	8
1. Les bactéries lactiques.....	10
2. Caractères bactériologiques.....	10
3. Habitat.....	10
4. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement.....	11
5. Culture des bactéries lactiques.....	11
6. Taxonomie des bactéries lactiques.....	11
7. Caractères biochimiques.....	12

8. Identification	13
1. Domaine médical	15
2. Domaine alimentaire	15
3. Les Aptitudes des bactéries lactiques	15
3.1. Acidifiante	16
3.2. Protéolytique	16
3.3. Aromatisant	17
3.4. Texturante	17
3.5. Lipolytique	17
3.6. Antimicrobienne	18
4. Les Bactériocines	18
4.1 La classification des bactériocines	19
Matériels et Produits	22
Matériel	22
1.Leben	22
2.Les souches indicatrices	22
3.Milieus de culture	22
4.Produits chimiques et réactifs	22
5.Appareillage	22
Méthodes	23
I.Échantillonnage	23
II.Analyse microbiologique	23
1.Recherche de flore mésophile aérobie totale	23
III.Isolement	23
1.Dénombrement des bactéries lactique	23
1.1Dans MRS solide	23
1.2Dans MRS liquide	24
2.Vérification De La Pureté	24
IV.Analyse préliminaire des isolats	24
1.Examen macroscopique	24
1.1.Préparation des solutions bactériennes	24
1.2.Ensemencement des bactéries	24
1.3.Repiquage	25

2.Observation macroscopique	25
3.Examen microscopique	25
3.1.Coloration de Gram de bactérie	25
3.2.Observation microscopique	25
4.Test biochimique	25
4.1.Test catalase	25
5.Etude physiologies et biochimique	26
5.1.Physiologies	26
5.1.1.Croissance à différentes températures	26
5.1.2.Culture Sur Milieu Hypersalé	26
5.1.3.Culture sur milieu deferent PH	26
5.2.Biochimique	26
5.2.1.Type de fermentaire	26
6.L'activité antimicrobienne des isolats LAB contre les agents pathogènes d'origine alimentaire	26
1. Préparation de souche pathogène à tester	26
1.1.Préparation de standard de turbidité McFarland	27
2.Test d'interaction entre <i>Lactobacillus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	27
I.Analyse microbiologique	30
1.Recherche de flore totale mésophile aérobie.....	30
I.Examen macroscopies et microscopies.....	30
Catalase	32
II.Caractérisations physiologiques et biochimiques:.....	32
Ces tests ont permis d'identifier les souches de toutes les races.....	32
Croissance à différentes températures:	32
Effet de NaCl et du pH :.....	33
Type de fermentation	33
L'activité antimicrobienne des isolats LAB contre <i>S. aureus</i> 22923ATCC	35
Conclusion.....	36
Références bibliographiques.....	36
Annexes.....	36

الملخص

بكتريا حمض اللبن هي جزء طبيعي من بيئتنا وغذائنا، نعلم منذ قديم الزمن أن هذه البكتريا لها خصائص بيوتكنولوجية متنوعة من بينها خاصية إنتاج مواد مضادة للميكروبات فهي تستخدم في التخمير وحفظ الأغذية.

إن البحث عن سلالات بكتيرية منتجة للمواد المضادة للميكروبات قد تم على مستوى اللبن التقليدي. عزل بكتريا حمض اللبن من اللبن التقليدي قد سمح لنا بالحصول على 10 سلالة (موجبة الصبغ لجرام ، سالبة الكاتالاز) التي تم تنقيتها وتخزينها . دراسة الخصائص المظهرية البيوكيميائية والفيزيولوجية (نوع التخمير ، النمو في وسط يحتوي على كلوريد الصوديوم بتركيز : 4 % و 8 % ، النمو pH=6 و pH=9 ، واختبارات نمو في درجات حرارة مختلفة 15 و 45 درجة مئوية ، اختبار الكاتالاز مكننا من تحديد *Lactobacillus*.

10 سلالة اختبرت بسبب تأثيرها المضاد للبكتيريا ضد *Staphylococcus aureus* 22923 ATCC. التفاعل بين سلالاتنا والبكتيريا المسببة للأمراض، أعطى نتائج سلبية لجميع السلالات الملحوظة ما عدا السلالتين S07 و S10 فقد كانت نتائجهم ايجابية. في وسط مختلط، السلالتين S10 و S07 أخفضتا نمو *Staphylococcus aureus* بعد 18 ساعة من الحضانة.

الكلمات المفتاحية: بكتريا حمض اللبن، *Lactobacillus* ، *Staphylococcus aureus* ، النشاط المضاد للبكتيريا ، اللبن التقليدي ، المواد المضادة للميكروبات .

Résumer

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et notre alimentation. On reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques les propriétés biotechnologiques, parmi ceux-ci la propriété de produire des substances antimicrobiennes et sont utilisées dans la fermentation et la bio préservation des aliments.

La recherche de souches bactériennes lactiques productrices des substances antimicrobiennes a été entreprise à partir de leben traditionnel. L'isolement des bactéries lactiques à partir de leben traditionnel nous a permis d'obtenir 10 souches (Gram positif, catalase négatif) qui ont purifiés et conservées. L'étude des caractéristiques phénotypiques ; biochimiques et physiologiques (type Fermentaire, croissance en présence de NaCl : 4% et 8%, croissance à pH 6 et 9, tests de croissance des différentes températures : 15°C et 45°C, test de catalase, a permis d'identifier : *Lactobacillus*.

Les 10 souches ont été testées pour leur effet antibactérien à l'encontre de *Staphylococcus aureus* ATCC 22923. L'interaction de nos souches lactiques et la bactérie pathogène a donné des résultats négatifs pour toutes les souches sauf les deux souches S07 et S10, observés par des zones d'inhibition. En culture mixte, les deux souches lactiques S07 et S10 diminuent considérablement la croissance de *Staphylococcus aureus* après 18 heures d'incubation.

Mots clés : Bactéries lactiques, *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, activité antimicrobiennes, leben traditionnel, substances antimicrobiennes.

Summary

Lactic acid bacteria are a natural part of our environment and our diet. Lactic acid bacteria have long been recognized for their biotechnological properties, among them the property of producing antimicrobial substances and are used in fermentation and bio-preservation of food.

The search for lactic acid bacterial strains producing antimicrobial substances was undertaken from traditional leben. Isolation of lactic acid bacteria from traditional leben allowed us to obtain 10souches (Gram positive, catalase negative) which purified and preserved. The study of phenotypic; biochemical and physiological characteristics (Fermentative type, growth in the presence of NaCl: 4% and 8%, growth at pH 6 and 9, growth tests of different temperatures: 15 ° C and 45 ° C, catalase test, made it possible to identify: *Lactobacillus*.

The 10 strains were tested for their antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 22923. The interaction of our lactic acid strains and the pathogenic bacterium gave negative results for all strains except the two strains S07 and S10, observed by inhibition zones. In mixed culture, the two lactic strains S07 and S10 significantly decrease the growth of *Staphylococcus aureus* after 18 hours of incubation.

Keywords: lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, antibacterial activity, antimicrobial substances.

Liste des abréviations

MRS: Man-Rogosa et Sharp

MH: Mueller-Hinton

PCA: plate count agar

S : Souche

S. aureus : Staphylococcus aureus

LAB : Lactobacillus

Liste des Figures

Figure 1. Les différents Produits laitier traditionnel

Figure 2. CHEKWA (altahrironline Algerians)

Figure 3. Structure moléculaire du lactose.

Figure 4. Comparaison de McFarland 0,5 avec la suspension de l'inoculum.

Figure 5. Mise en évidence du pouvoir antibactérien des LAB par la technique de diffusion en puits de TAGG et MC GIVEN (1971)

Figure 6. Isolement des bactéries lactique sur gélose solide par dilution 10^{-3} – 10^{-4} – 10^{-5}

Figure 7. Isolement des bactéries lactique sur gélose MRS solide par dilution 10^{-3} – 10^{-4} – 10^{-5}

Figure 8. Observation microscopique des clones prélevés de gélose MRS

Figure 9. Les résultats de test de catalase (catalase négatif)

Figure 10. Trouble des lactobacillus sur MRS Liquide à 45°C et 15°C

Figure 11. La culture des souches Lactobacillus à des pH de 6,6, 8,3 et de différentes concentrations de NaCl 4% et 8%

Figure 12. La culture des souches de Lactobacillus dans des tubes contenant le milieu MRS bouillon et la cloche de Durham

Figure 13. Résultats de l'activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis de *S. aureus* 22923ATCC

Liste des Tableaux

Tableau01 : composition du 100g de lait de diffèrent élevages laitiers

Tableau02 : Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache

Tableau. 3 Composants du MRS.

Tableau. 4 Quelques genres de bactéries lactiques

Tableau. 5. Listes des plus importantes bactériocines produites par les Lactobacilles

Tableau. 06. Les caractéristiques des nouvelle souches identifient

Tableau 07 : Diamètres des zones d'inhibition des surnageants natifs des bactéries lactiques testées vis-à-vis de souche pathogène (en mm)

INTRODUCTION

L'aliment est toute substance consommée pour apporter un soutien nutritionnel à une personne. Ce sont généralement d'origine végétale ou animale et contiennent des nutriments essentiels, tels que des glucides, des lipides, des protéines, des vitamines, des minéraux et même des micro-organismes, tels que le lait. Il est occupé une place stratégique dans l'alimentation quotidienne de l'homme, de par ses composants nobles (protéines, glucides et lipides) et sa richesse en vitamines et en minéraux, notamment en calcium alimentaire.

De nos jours le besoin en lait est de plus en plus important car ce produit peut être consommé frais, mais aussi pasteurisé, stérilisé ou transformé en dérivés. Différents produits laitiers sont obtenus par fermentation et ceci en semant du lait cru ou stérilisé avec des ferments lactiques capables de bioconvertir ses différents éléments en nouvelles molécules, conférant au lait de nouvelles propriétés organoleptiques, hygiéniques voire sanitaires.

Il est également considéré comme l'un des aliments qui possèdent des types de micro-organismes qui ont des rôles différents selon leurs caractéristiques métaboliques et structurelles (bactéries lactiques).

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes très courants dans la nature ; présents dans le sol, sur les plantes, ils jouent un rôle important dans notre santé car ils constituent une fraction importante de notre flore intestinale et recouvrent les muqueuses nasales, buccales et vaginales, contribuant ainsi à nous protéger de l'invasion de germes pathogènes. Et d'autre part utiliser pour fermenter les aliments, elles sont présentées un grand intérêt biotechnologique.

Chapitre 01

Le lait et les Produits laitiers traditionnels

1. Produits laitiers traditionnels :

Les produits laitiers traditionnels subissent une fermentation lactique qui assure une sécurité alimentaire par acidification et production de bactériocines antagonistes la croissance des bactéries pathogènes et qui améliore la qualité finale des produits laitiers par production de composés aromatiques, pour qu'aujourd'hui ex : Leben.

La consommation de produits laitiers fermentés existe depuis l'Antiquité. En plus de l'effet de la présure, la flore microbienne du lait permettra la production d'une gamme très diversifiée de produits fermentés. (Hicham *et al*, 2009)

En Algérie, la consommation de produits laitiers est une tradition ancienne liée à l'élevage, puisque les produits laitiers sont fabriqués selon des méthodes artisanales anciennes, à partir de lait ou de mélanges de lait de différents types. Il existe une grande variété de produits laitiers artisanaux produits ("Terroir" en français), d'où leur nom car leur processus de production diffère d'une région à l'autre à d'autres Ces produits sont également différents (Choubaila *et al*. 2019)

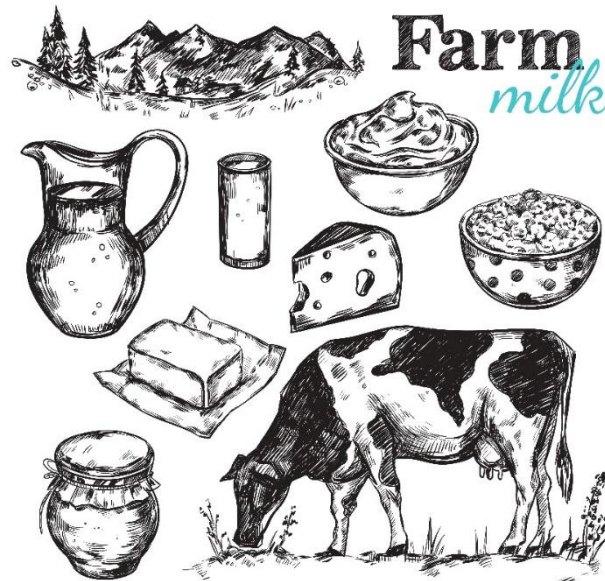


Figure01 : les différents Produits laitier traditionnel.

2. Leben :

Leben est l'un des produits les surtout connus du lait artisanal en traitement ; il est patienté queue au barattage du « Raib » et absence du beurre. Le barattage permet de recevoir la plupart de sa section bouffie en deçà pointure de beurre appelé "Zebda". L'achèvement abri ou familiale du « Leben » est simple : le lait est laissé à ce dernier parmi une Monde cuite « CHEKWA » pot jusqu'à ce qu'il coagule. Cela se histoire en renforcement durée et inhumaine 24 à 72 h. (Choubaila L et *al.* 2019).



Figure 02 : Chekwa

3. Variation de la composition du lait :

Suivant les espèces animales et les races au sein d'une même espèce ; la composition du lait varie également chez une même laitière en fonction de la période de la lactation et de l'alimentation. C'est pour cette raison qu'on ne peut parler que de compositions moyennes. Donnons la composition moyenne du lait des principales femelles laitières (pour 100 g). (Tableau .1)

Tableau 01 : Composition du 100g de lait de différents élevages laitiers.

	Eau	Protéines	Graisse	Lactose	cender
Vache	87.2	3.5	3.7	4.9	0.72
Chèvre	86.5	3.64	5.1		0.82
Brebie	82.7	5.5	6.4	4.7	0.92
Chamelle	87.7	3.5	3.4	4.8	0.71

4. Les caractéristiques physico-chimiques du lait :

Les propriétés physiques et chimiques de base utilisées dans l'industrie laitière sont le volume, la densité, le point de congélation, le point d'opacité et l'acidité. (Tableau 2)

Tableau02 : Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache

Densité a 15°C	1032
Chaleur spécifique	0,93
Point de congélation	-0,55°C
PH 20°C	6,7
Acidité (degré Dornic)	15-18
Indice de réfraction	1,35

4.1. La densité :

La densité du lait pour un type particulier n'est pas une valeur fixe, elle varie d'un type d'autre part, proportionnellement à la concentration des éléments dissous et en suspension et D'autre

part, avec le pourcentage de matières grasses. La densité du lait de vache est incluse Entre 1030 et 1033 à une température de 20°C, à différentes températures, il faut faire révision. La densité est mesurée avec un densitomètre lacto-thermique. En ce qui concerne Vignola, (2002), La densité du lait augmente avec le grattage et diminue avec la miction.

4.2. Le point de congélation :

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur au point de congélation de l'eau car La présence de solides dissous abaisse le point de congélation. Elle peut varier de -0,530°C à -0,575°C avec une moyenne de -0,555°C. Point de congélation supérieur - 0,530°C Il est suggéré d'ajouter de l'eau au lait. Le point de congélation du lait est vérifié à par cryoscopie.

4.3. L'acidité :

L'acidité du lait est un concept important pour l'industrie laitière. Il est permis de juger de l'état de conservation du lait. Un titrage consistant à ajouter le volume nécessaire de solution alcaline titrée au lait pour atteindre le point final des résultats de l'indicateur, généralement de la phénophtaléine. Il est exprimé en « degré de Dornic » (degré d), ce dernier exprimant la teneur en acide lactique : 1 degré d = 0,1 g d'acide lactique. L'acidité du titrage varie de 15°D à 18°D. Entre 0,13 et 0,17% équivalent acide lactique

4.4. Le pH :

Le pH du lait varie d'une espèce à l'autre, compte tenu des différences de composition chimique, notamment en caséine et en phosphate, ainsi qu'en fonction des conditions environnementales. Le pH du lait de vache varie de 6,5 à 6,7.

4.5. Le point d'ébullition :

Le point d'ébullition est défini comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur d'une substance ou d'une solution est égale à la pression appliquée. Ainsi, pour le point de congélation, le point d'ébullition est affecté par la présence de solides dissous. Il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100,5°C. Cette propriété physique diminue avec la pression. Ce principe est appliqué dans les procédés de concentration du lait. (Mekroud, 2011).

5. Composition chimique de lait :

5.1. Les lipides :

Les lipides sont constitués d'un mélange d'acides gras en suspension dans le lait sous forme de gouttelettes, ils forment une émulsion. Ils constituent la partie la plus variable du lait ; la concentration varie de 10 à 500 g/l suivant les espèces. Ils sont constitués à 99 % de triglycérides.

5.2. Les glucides :

Ils sont représentés à 97 % par le lactose, disaccharide composé d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose reliées entre elles par une liaison osidique b (1! 4) (Fig. 1). Son pouvoir sucrant est faible. Le lactose est dégradé dans le tube digestif par la lactase qui l'hydrolyse en glucose et galactose, ensuite absorbés séparément. Chez les personnes intolérantes au lactose, la production d'enzyme disparaît et le lactose reste dans le tube digestif entraînant des troubles lors de la consommation du lait. Le lactose non digéré est alors métabolisé par certaines bactéries intestinales qui produisent de l'hydrogène entraînant ballonnements et diarrhées. Chez l'adulte, l'activité de la lactase diminue, entraînant des troubles digestifs lors de la consommation de lait, mais pas lors de la consommation de produits laitiers. En effet, en plus de son rôle nutritionnel, le lactose joue un rôle technologie dans les produits laitiers en tant que substrat de fermentation pour les bactéries lactiques qui l'hydrolysent en glucose et galactose, puis transforment ces hexoses en acide lactique. La teneur en lactose des produits laitiers est donc plus faible. L'industrie agro-alimentaire développe ce créneau en commercialisant des laits « faciles à digérer » contenant de la lactase et diminuant ainsi la teneur en lactose du produit fini.

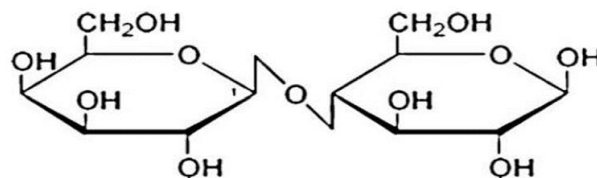


Figure. 3 Structure moléculaire du lactose.

5.3. Les protéines :

Tous les laits de mammifères ont la même composition protéique de base et il y a de fortes homologues de structure entre les protéines de lait des différentes espèces : 85 % entre lait de vache et lait de brebis ou le lait de chèvre, 97 % entre le lait de brebis et le lait de chèvre. Plus les espèces sont proches, plus les homologues sont importantes, ce qui explique les réactivités croisées entre les laits de différentes espèces.

6. Fermentation lactique :

L'acide lactique découvert par SCHEELE dans le yaourt est un déchet de la dégradation des glucides et Des substances azotées se retrouvent également dans les sécrétions Cellules vivantes, dans le suc gastrique, les sucs intestinaux, dans. La viande musculaire comme terme transitoire La détérioration des aliments qu'un organisme détruit d'une manière ou d'une autre rapidement Comme indiqué dans la fermentation alcoolique, certains Les scientifiques admettent qu'il s'agissait d'une étape intermédiaire entre les sucres Substances fermentées et alcool. Vers 1807, Pasteur montra que la fermentation lactique

Elle était due au développement de certaines bactéries et elle a été identifiée Bientôt sous ce nom toute une série de microbes producteurs d'acide Acide lactique en plus ou moins grande quantité. Lister, en 1878, a étudié un diplocoque appelé bactérie lactique. Groeneveld découvre un modèle similaire un an plus tard et le lui offre Nom de *Streptococcus acidii lactici*. Vers l'an t88, l'HUEPPE isole une bactérie lactobacille qui se déplace vers Le label est sous le nom de Bac. acidii lactici qui est pour ce monde Le rôle principal dans la coagulation spontanée du lait est attribué. Ce n'était pas le vrai rôle de Cette bactérie a été connue grâce aux recherches menées par LEICHMANN sur un part et part de GUNTHER et THIÉRI-ELDER, d'autre part ; Ces scientifiques ont montré qu'il produit de l'acide lactique rectal. La fermentation lactique a fait l'objet de nombreuses recherches ; Ce n'est pas seulement important en théorie, mais Il joue un rôle très important dans la pratique. (Kayser, 1921).

Chapitre 02

Les bactéries lactique

1. Les bactéries lactiques :

Sont l'un des groupes de micro-organismes les plus couramment utilisés dans la production de divers types d'aliments fermentés. Le groupe des bactéries lactiques est un groupe très diversifié de micro-organismes caractérisés par la formation d'acide lactique en tant que métabolite primaire du métabolisme du sucre (Amandine, 2017).

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans l'alimentation. Ils sont responsables de la fermentation des aliments à base de lait, de viande et de légumes. Leurs diverses propriétés et propriétés diverses sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire (Dortu *et al*, 2009).

2. Caractères bactériologiques :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitat, Ce sont des bactéries à Gram positif, asporulées, anaérobies, catalase négative, oxydase négative. La teneur en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, les classant comme des bactéries à faible GC. Ils ont un métabolisme chimio organographique, ce qui signifie qu'ils utilisent des hydrocarbures tels que les sucres, les alcools et les acides organiques comme source d'énergie (Sébastien, 2008).

3. Habitat :

Les bactéries lactiques existent dans l'environnement à l'état libre ou vivent dans l'environnement Relations avec des hôtes tels que les humains et les animaux dans les écosystèmes bactériens suivants Appareil gastro-intestinal ou reproducteur de mammifère (Kahina, 2012) Les espèces du genre *Lactobacillus* sont présentes dans plusieurs milieux différents : dans le lait et les fromages (*Lb. casei subsp. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. brevis*), dans les laits fermentés (*Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. fermentum*), dans les produits végétaux fermentés, les marinades, l'ensilage, le vin et les viandes fraîches ou fermentées (*Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. buchneri* et *Lb. san francisco*) (Demazeaud, 1996).

Les espèces du genre *Lactococcus* sont isolées du lait ou des végétaux qui sont les réservoirs naturels de la plupart de ses espèces. L'espèce *Lactococcus lactis subsp. lactis* est

isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (Bekhouche, 2006).

4. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement :

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont généralement du lait ou Ses dérivés (lait fermenté, fromage, etc.). Différentes espèces de lactobacille, Le lactocoque, que l'on trouve le plus souvent dans les produits laitiers, est largement utilisé dans l'industrie alimentaire comme produit fermenté pour la production laitière. La fermentation fait référence aux micro-organismes, bactéries ou champignons qui provoquent la fermentation. Les bactéries lactiques sont également une cause de fermentation (Kahina, 2012)

5. Culture des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont besoin d'un milieu riche en nutriments pour cela. En croissance (sucre, acides aminés, acides gras, sels, vitamines), pauvre en oxygène Hertel, 2006). Elles sont essentiellement cultivées sur milieu Man Rogosa Sharpe (MRS). Le MRS est un milieu riche qui fournit une variété de sources de carbone et d'azote telles que la peptone, le glucose et le Tween80 pour les bactéries difficiles à cultiver. Le Tween 80 était à l'origine utilisé comme émulsifiant dans la préparation des milieux avant d'être considéré comme une source de carbone pour les bactéries. (Kahina, 2012).

6. Taxonomie des bactéries lactiques :

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques : morphologie, type de fermentation du glucose, croissance à différentes températures, isomère d'acide lactique produit et fermentation de différents glucides. Les 6 études basées sur la comparaison des séquences d'ARN ribosomique 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne sont pas cohérents avec les relations phylogénétiques proposées. Par conséquent, certaines espèces ne peuvent pas être facilement distinguées en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques. (Boumediene, 2013).

Tableau. 4 Quelques genres de bactéries lactiques (Bekhouche, 2006).

Genres	cellules		fermentation	ADN G+C (%)	Références
	forme	Arrangements			
Lactobacillus	Bacilles	Chaines	Homolactiques et hétérolactiques	32-53	KANDLER et WEISS 1986
Leuconostoc	Coques	Chaines	hétérolactiques	36-43	FARROW et al, 1989
Pediococcus	Coques	Tétrades	Homolactiques	34-42	SCHLEIFER, 1986

Aujourd'hui le genre *Lactobacillus* comprend 56 espèces dont 5 contiennent au moins deux sous-espèces. Ces dernières années, 9 espèces de *Lactobacillus* ont été transférées à d'autres espèces de *Lactobacillus* et au moins 14 espèces à des genres nouveaux ou existants. Ces réattributions taxonomiques étaient basées presque exclusivement sur les résultats du séquençage d'ARNr ou des hybridations d'ADNr. Le grand nombre de révisions de nomenclature est une indication frappante des écarts entre les résultats des anciens tests phénotypiques traditionnels (taxonomie classique) et les connaissances phylogénétiques actuelles acquises grâce au séquençage des ARNr (taxonomie moléculaire) (Vandamme *et al*, 1996).

7. Caractères biochimiques

Les lactobacilles sont catalase négative, certains ont la pseudocatalase. Ils sont exempts de bcytochromes. Généralement négatif à la nitrate réductase, négatif à la gélatinase et microaérophiles ou anaérobie. Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire. La figure 2 résume les voies métaboliques des lactobacilles. Selon la classification OrlaJensen révisée par Kandler et Weiss, les lactobacilles sont divisés en trois groupes selon leur type de fermentation (Bahri, 2014).

Groupe I : comprend les espèces obligatoirement homofermentaires, c'est-à-dire qu'elles ne produisent que d'acide lactique à partir du glucose et sont incapables de fermenter de pentoses ou de gluconate. Ils ont la fructose 1,6 diphosphate aldolase et la phosphofructokinase. Ce groupe se compose principalement de espèces trouvées chez les

nhumains et les animaux qui contribuent à l'équilibre de la microflore de l'organisme. Exemple : *L. acidophilus* et *L.gasseri*

Le groupe II : comprend les espèces à métabolisme hétérofermentaire facultatif. Ces espèces utilisent la voie homofermentaire, mais sous certaines conditions capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration de glucose limitée. Elles ont un fructose 1,6-diphosphate aldolase et une 6-phosphogluconate déshydrogénase. Exemple : *L. casei*, *L. sake*, *L. curvatus* et *L.plantarum*.

Groupe III : comprend les espèces hétérofermentaires obligatoires produisant quantités équimolaires de CO₂, d'acide lactique, d'acide acétique et/ou d'éthanol. Les pentoses sont fermentés en acide lactique et acétique via la voie de la phosphocétolase car ces bactéries ont une phosphocétolase mais pas d'aldolase. Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif humain et contribuent à l'équilibre de la flore intestinale. Exemple : *L. brevis* et *L.fermentum*.

8. Identification :

L'identification des espèces de *Lactobacillus* peut être difficile à réaliser par des méthodes biochimiques en raison du grand nombre d'espèces qui existent. Il est essentiellement basé sur des tests de fermentation de sucres. La galerie API 50 CH utilisant le milieu spécifique pour les *Lactobacillus* est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable. L'utilisation d'outils de taxonomie moléculaire tels que l'hybridation quantitative ADN/ADN et le séquençage du gène ADNr 16S a permis de lever les ambiguïtés et d'inscrire les espèces de lactobacilles d'intérêt pour la santé et la nutrition humaines parmi la centaine à nommer exactement les espèces de lactobacilles actuellement décrit (Bahri, 2014)

Chapitre 02

Les bactéries lactique

Les bactéries lactiques jouent un rôle très important à l'échelle industrielle que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique (médical et pharmaceutique).

1. Domaine médical :

Les lactobacilles, présents dans de nombreux produits alimentaires, colonisent l'intestin de la plupart des animaux et exercent un effet sur leur système immunitaire, souvent en tant que probiotique pour améliorer certaines fonctions biologiques de leur hôte. Les bactéries lactiques participent à la lutte contre les infections intestinales comme la prévention des diarrhées en introduisant une nouvelle flore intestinale qui agit sur les entérobactéries responsables de ces maladies intestinales. Ils sont également connus pour produire des agents antimicrobiens, ce qui évite l'utilisation d'antibiotiques. Certaines études ont également montré l'implication des bactéries lactiques dans l'amélioration de la digestion du lactose, la régulation du taux de cholestérol sanguin et la lutte contre certains types de cancer, car elles agissent comme des agents anti tumoraux (Mermouri, 2018).

2. Domaine alimentaire :

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries qui ont le "statut GRAS", qui autorise officiellement leur utilisation dans les applications alimentaires et certifie leur innocuité irréprochable. Ils sont particulièrement utilisés dans les produits laitiers fermentés tels que le yaourt, le fromage, le beurre, le babeurre, le kéfir et le koumis. Le lait ne pouvant être conservé longtemps, ses valeurs nutritionnelles sont gardées sous la forme d'un fromage. L'immense variété des fromages est en partie relative à une grande variété de souches employée dans leurs fabrications, modifiant également le goût et la texture de ces produits. C'est le cas, par exemple, de l'acétaldéhyde, qui donne au yaourt son arôme caractéristique, ou du diacétyl, qui donne aux autres produits laitiers fermentés un goût crémeux. Les bactéries lactiques jouent un rôle fondamental dans l'inhibition de la flore non laitière dont certaines sont pathogènes ou nuisibles à la qualité des fromages ou autres produits laitiers (Hassaine, 2013).

3. Les Aptitudes des bactéries lactiques :

3.1. Acidifiante

La fonction acidifiante est la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production des métabolites qui améliorent la conservation des produits alimentaires en diffusant à travers les couches lipidiques de la membrane bactérienne, ils provoquent un abaissement de pH interne par libération de protons, déstabilisant, ainsi le fonctionnement de la cellule bactérienne. Parmi ces métabolites, on cite par exemple le peroxyde d'hydrogène, produit en présence d'oxygène, s'accumule en l'absence de catalase ; son pouvoir oxydatif provoque l'oxydation des lipides et la libération des acides nucléiques. Aussi l'acide lactique produisant à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne. Il est utilisé comme acidulant, aromatisant, un très bon conservateur et un inhibiteur de l'altération bactérienne dans une grande variété d'aliments transformés. *L. lactis subsp. lactis*, *ssp. cremoris* et *biovar. diacetylactis*, sont les trois bactéries les plus fréquemment citées pour leurs rôles majeurs différents, respectivement pour l'aptitude acidifiante (Chemlal, 2013 ; Boullouf, 2016)

3.2. Protéolytique :

Les bactéries lactiques dépendent principalement de l'activité fonctionnelle du système protéolytique dans les environnements où les protéines sont la principale source d'azote en raison de leur incapacité à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines. Le système protéolytique des bactéries lactiques est constitué de protéases liées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse des protéines en peptides contenant de 7 à 16 acides aminés. Ces peptides sont ensuite hydrolysés par l'endopeptidase ou les exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides. Des études comparatives de la protéolyse du fromage cheddar fabriqué avec ou sans levure lactique ont montré l'efficacité de ces bactéries dans la libération de petits peptides et d'acides aminés libres lors de l'affinage du fromage. Les lactobacilles présentent en général une activité protéique plus prononcée que les lactobacilles (Boullouf, 2016).

3.3. Aromatisant :

La production de composés aromatiques est associée à une activité microbienne. Diverses espèces de bactéries lactiques telles que *L. lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* et *L.mesenteroides ssp. cremoris* sont capables de synthétiser divers composés, notamment à partir de citrate, comme le diacétyle, l'acétoïne, l'acétate, principaux composants responsables de l'arôme des produits laitiers fermentés. D'autres études ont trouvé que certaines bactéries lactiques sont capables de transformer des acides aminés en molécules aromatisantes, permettant de diversifier les saveurs des produits dans lesquels ces bactéries se développent (Hammi ,2016).

3.4. Texturante :

Les bactéries lactiques Grâce à leur capacité de synthétiser des exo polysaccharides (EPS) joue un rôle important dans la consistance et la rhéologie des produits transformés. Ces macromolécules sont généralement considérées comme des épaississants naturels dans l'industrie alimentaire. Les *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* producteur d'EPS sont utilisés comme starters fonctionnels dans la fabrication de yaourts pour améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation d'EPS obtenu à partir de *Lactococcus lactis ssp. Crémoirs* est très prometteur pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Boullouf, 2016)

3.5. Lipolytique :

Les enzymes produites par les bactéries lactiques sont d'une grande importance dans l'industrie alimentaire. La lipolyse joue un rôle important dans le vieillissement du fromage car les acides gras sont convertis en méthylcétones, lactones et thioesters qui, avec les acides gras, contribuent à la saveur du produit fermenté. Bien que les bactéries lactiques possèdent une variété d'enzymes lipolytiques capables d'hydrolyser de nombreux esters d'acides gras et les substrats tri-,di-et monoacylglycérols, elles sont généralement considérées comme faiblement lipolytiques par rapport aux autres microorganismes. Tels que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium* et *Candida*. La lipase de *Pseudomonas* et *Bacillus* qui sont extracellulaires, par contre les bactéries lactiques produisent une lipase intracellulaire. Les enzymes lipolytiques sont produites pendant la phase exponentielle de croissance, et la production est fortement influencée par les conditions de croissance (Belhamra, 2017).

3.6. Antimicrobienne :

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la conservation biologique des aliments. Les acides organiques, tels que l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, qui sont produits lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber les levures, les moisissures et les bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains micro-organismes. Les bactéries lactiques non fermentées synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur entraîne l'apparition d'anaérobies toxiques pour certains microorganismes aérobies présents dans les aliments. Le diacétyl peut inhiber la croissance des bactéries Gram-négatives, des levures et des moisissures. Les bactéries produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Il a une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et son rayon d'action est généralement étroit. Les plus connus d'entre eux : Nisine, Dicloxaciline, Acidophiline et Bulgare. La plupart des bactéries produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane des bactéries cibles (Hadeif, 2012).

4. Les Bactériocines

La première découverte des bactériocines a été rapportée il y a près d'un siècle, lorsque Gratia (1925) a montré l'inhibition des souches *d'Escherichia coli* S par du matériel thermostable provenant de la culture *d'E. coli* V. Ces inhibiteurs étaient appelés colicines en référence à l'espèce productrice. L'inhibition de la croissance de diverses bactéries lactiques par un métabolite produit par *S. lactis*, classé aujourd'hui sous le nom de *L. lactis*, est à la base de la découverte des premières bactéries produites par des bactéries lactiques, et c'était en 1928. Whitehead l'a décrit cinq ans plus tard et en 1947, il l'a nommé nisine. En 1951, d'autres travaux ont démontré que lors de la maturation du fromage, *Clostridium* était inhibé par la nisine. Depuis cette date, il est recommandé d'utiliser des bactériocines pour lutter contre la contamination des aliments. Selon Klaenhammer (1988) et Margaret & John (2002), 99% d'une espèce bactérienne peut produire au moins un type de bactérie (Hammi, 2016).

Les bactériocines sont des substances antibactériennes produites par certains germes bactériens comme les bactéries lactiques, ces molécules sont de la nature peptidique ou

protéique, de poids moléculaire variable, à activité bactéricide, soit à spectre étroit (contre des espèces apparentées) soit à large spectre (contre différents genres). La biosynthèse de la bactérie est une caractéristique très recherchée dans les milieux industriels alimentaires et pharmaceutiques en raison de son potentiel en tant que bioconservateur et biopréservateur (Mermouri, 2018).

4.1 La classification des bactériocines :

Les bactériocines sont divisées en trois classes majeures :

Classe I : Lantibiotiques

Cette classe de peptides thermostables, de petits poids moléculaires (≤ 5 kDa), comprend à la fois des peptides polycycliques (les acides aminés thioéther lantionine ou β méthyl lantionine) ; Acides aminés insaturés (dihydroalanine et acide 2-aminobutyrique). Il est encore divisé en deux types (Mermouri, 2018) :

Type I : comprend les peptides cationiques hydrophobes allongés qui contiennent jusqu'à 34 acides aminés et ont une masse moléculaire comprise entre 2 et 4 kDa. Il agit généralement en formant des pores au niveau de la membrane cytoplasmique de l'espèce cible, provoquant l'afflux rapide de petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. La nisine et la lacticine 3147 sont les principaux représentants de ce groupe

Type Ib : comprend les peptides globulaires, chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés, avec une masse moléculaire comprise entre 2 et 3 kDa. Ce type d'antibiotique intervient par des réactions enzymatiques cellulaires, en inhibant la synthèse des peptidoglycanes ou en formant des pores dans la membrane des cellules cibles.

Classe II “ Les non-lantibiotiques”

Elles sont aussi à faible poids moléculaires (≤ 10 kDa) et relativement thermostables, subdivisées en deux sous-classes (Mermouri, 2018):

Classe IIA : pédiocine ou bactériocines actives contre *Listeria*. Cette sous-classe active contient un arrangement consensus du N-terminal (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys). Son mécanisme d'action est représenté par l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « perméabilité au mannose », formant ainsi des pores dans la membrane

cellulaire, stimulant la perméabilité membranaire ; Dispersion de la force motrice du proton et mort cellulaire

Classe IIb : Spectre d'action général qui inhibe une large gamme de bactéries Gram+. Ils forment des pores et rendent la membrane perméable à diverses petites molécules, cations ou anions monovalents, qui dissipent l'un ou les deux composants de la force motrice du proton.

Class III “ les Bactériocines” :

Comprenant des protéines de gros poids moléculaire (>30 kDas), cette troisième classe de bactéries agit par hydrolyse des liaisons peptidiques au peptidoglycane des cellules sensibles. Les bactériocines conviennent à la conservation des aliments grâce à certaines propriétés bénéfiques. Ils sont sains, inoffensifs, non actifs et non toxiques pour les cellules eucaryotes. Ils sont inhibés par l'action des protéases digestives et peuvent tolérer une large gamme de pH et de température. Ils ont un large spectre d'action antimicrobienne en agissant sur la membrane cytoplasmique. Ils ne sont pas résistants aux antibiotiques et sont généralement codés par des plasmides ; ce qui facilite la manipulation génétique. Les bactériocines les plus communes sont citées dans le tableau 05. (Mermouri, 2018)

Tableau. 5. Listes des plus importantes bactériocines produites par les Lactobacilles (Mermouri, 2018).

Bactériocines	Souches productrices
Lactacin F	<i>L. johnsonii</i> spp.
Lactocin 705	<i>L. casei</i> spp.
Lactococin G	<i>L. lactis</i> spp.
Lactococin MN	<i>Lactococcus lactis</i> var <i>cremoris</i>
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i> spp.
Leucocin H	<i>Leuconostoc</i> spp.
Plantaricin EF, Plantaricin W, Plantaricin JK, Plantaricin S	<i>L. plantarum</i> spp

Partie pratique

Matériels et Produits :

Matériel

Pour la réalisation des différentes parties expérimentales, on s'est servi du matériel suivant :

1. **Leben :**

Les échantillons de lait ont été conservés à 4°C jusqu'au moment d'utilisation. Une fois au laboratoire.

2. **Les souches indicatrices :**

Staphylococcus aureus

Cette souche a été fournie par Laboratoire Pasteur à M'sila

3. **Milieux de culture:**

- **Les géloses :** MRS (de Man-Rogosa et Sharp), Mueller-Hinton, PCA (plate count agar).
- **Les bouillons :** MRS, Bouillon hypersalé à 4% et à 8% de NaCl, nutritif.

4. **Produits chimiques et réactifs :**

5.

- **Les colorants :** Violet de Gentiane, fuschine, lugol, eau oxygénée, Alcool

6. **Appareillage :**

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Agitateur électrique
- Autoclave
- Balance
- Balance analytique
- Centrifugeuse électrique
- Compteur de colonies
- Incubateur
- Micropipettes
- Microscope optique
- pH mètre
- Réfrigérateur
- Vortex électrique
- Bec bunsen
- Agitateur magnétique

Méthodes :

I. Échantillonnage :

Les prélèvements proviennent de Lben traditionnelle à partir de shakwa de la région de El-Maader, Boussaâda de la wilaya de M'sila lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau javellisé puis séché avec une lingette stérile le bouchon de la shakwa, On commence par verser le Lben dans un Flacons stérilisé de 250 ml, et doit être transporté à 4 °C à l'obscurité jusqu'au laboratoire. Les analyses doivent être réalisées immédiatement, sinon, il faut ranger l'échantillon dans un réfrigérateur à 4 °C (Guetouache et *al*, 2021).

II. Analyse microbiologique :

1. Recherche de flore mésophile aérobie totale :

La recherche de germes aérobies à 30°C a été réalisée selon les normes, l'inoculation profonde a été réalisée en plaçant 1 ml de la dilution 10^{-1} dans une boîte de Pétri stérile vide et en répétant le même processus avec les autres dilutions décimales. Ces cuves de dilution sont recouvertes de 12 à 15 ml de milieu Plate Count Agar (PCA) Après solidification, une incubation est effectuée pendant 72 heures à 30°C (Feknous et *al*, 2018).

III. Isolement :

1. Dénombrement des bactéries lactique :

Les milieux utilisés au cours de ce travail soient des milieux liquides soit des milieux solides. Le milieu MRS à pH 6,8 a été utilisé pour la croissance de la microflore lactique totale, les lactobacilles sont énumérés sur milieu MRS acidifiée à pH 5,4. Un millilitre de la dilution (10-1) est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile et introduit dans un tube à essai contenant 09 ml d'eau physiologique (0,9 %) qui assure la survie de tous les microorganismes. On obtient ainsi la dilution 10-2 et ainsi jusqu'à la dilution 10-6 (Guetouache et *al*, 2021)

1.1 Dans MRS solide :

L'ensemencement en masse a été réalisé à partir des dilutions décimales : 10-1, 10-2 et

10-3, 10-4, 10-5 et. Chaque trois dernières dilutions a été ensemencée sur deux milieux de culture gélosés MRS. Transférer stérilement 1ml des solutions mères ou de ses dilutions décimales dans des boîtes de Pétri stériles numérotées et préparées à cet usage. Couler 15 ml de milieu gélosé MRS. Homogénéiser parfaitement le contenu, par des mouvements circulaires et de va-et-vient. Laisser solidifier le milieu de culture ensemencé sur une surface fraîche et horizontale Incuber les boites couvercles en bas à une température de 37°C et 45°C pendant 24h à 72 heure.

1.2 Dans MRS liquide :

Le dénombrement sur milieu liquide a été réalisé à partir des dilutions décimales : 10-1, 10-2 et 10-3, 10-4, 10-5 et. Chaque trois dernières dilutions a été est transféré sur 10 tubes contenant le bouillon MRS. Incuber les tubes à température 37°C et 45°C pendant 24h à 72 heure.

2. Vérification De La Pureté :

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs dans des bouillons spécifiques (selon les souches) jusqu'à l'obtention de colonies très différenciées et homogènes. La purification des souches en milieu gélosé est réalisée par la méthode des stries La pureté des souches est confirmée par des observations microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram avec recherche de catalase après chaque repiquage. Seules les bactéries gram positives (+) et catalase négatives (-) sont retenues (Ghozlane et *al*, 2012).

IV. Analyse préliminaire des isolats :

1. Examen macroscopique :

1.1. Préparation des solutions bactériennes

On met une petite colonie de bactérie lactique dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique, on mélange la bien pour obtenir une solution homogène et donc, on a préparé 10 solutions bactériennes.

1.2. Ensemencement des bactéries :

1 ml de chaque solution bactérienne est inoculé dans une boîte de Pétri contenant un milieu de culture solide de bactéries lactiques (MRS). L'inoculation est réalisée dans un endroit stérile et incubé à 37 °C pendant deux jours (Soualah et *al.*2021).

1.3. Repiquage

Une fois les bactéries incubées, des échantillons bien développés et sains de chaque bactérie sont sélectionnés pour la procédure de sous-culture, qui se fait en enlevant les taches des colonies bactériennes à l'aide d'une boucle stérile et en les mélangeant avec 9 ml de milieu liquid MRS dans un tube; Après agitation, la solution est précipitée d'une nouvelle boîte avec des mouvements d'ensemencement. La sous-culture est incubée à 37 °C pendant 24 h (Soualah et *al.*2021).

2. Observation macroscopique :

Cette étude est basée sur l'observation visuelle des troubles sur milieu de culture (MRS Liquide).

3. Examen microscopique :

3.1. Coloration de Gram de bactérie :

Il permet de distinguer les bactéries Gram (-) qui apparaissent en rose et les bactéries Gram (+) qui apparaissent en violet. Cette différence de couleur est liée à la nature de la paroi bactérienne.

3.2.Observation microscopique :

L'observation microscopique se fait aux différents grossissements en général (40X et 100 X) afin de déterminer l'aspect morphologique des colonies, le forme, la taille, le type de Gram et le mode d'association (Soualah et *al.*2021)

4. Test biochimique :

4.1. Test catalase :

L'activité catalytique permet au peroxyde d'hydrogène de se décomposer en oxygène et en eau. Ceci est démontré en émulsifiant une émulsion dans deux colonies d'isolat de souche pour le test dans une solution fraîche de peroxyde d'hydrogène à 10 vol. Le dégagement abondant de gaz sous forme de mousse traduit la décomposition du peroxyde d'hydrogène sous l'influence

de l'enzyme à tester (Guetouache.M.2021). Dans tous les cas, le dégagement gazeux reflète l'activité positive de l'enzyme catalase qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène

5. Etude physiologies et biochimique :

5.1. Physiologies :

5.1.1. Croissance à différentes températures :

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles et thermophiles. Après inoculation du MRS liquide par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 15°C et 45°C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux (sous forme de trouble) (Chrifi, 2019).

5.1.2. Culture Sur Milieu Hypersalé :

Deux milieux de MRS liquides ont été utilisés contenant différentes concentrations de NaCl : 4% de NaCl (4 g de NaCl par 100 ml de milieu), et 8%, avec un pH de 5.4. Une autre série d'essais a été réalisée sur le milieu MRS (Chrifi, 2019).

5.1.3. Culture sur milieu deferent PH :

Après avoir préparé une solution d'acidité différent par tamponé phosphate : et une solution utilisée en bactériologie pour avoir des milieux tamponés. Après l'ensemencement sur MRS liquide a pH 6.4 et pH 8.3 par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 37°C, la croissance est appréciée par examen des milieux (sous forme de trouble).

5.2. Biochimique :

5.2.1. Type de fermentaire :

Ce test a été effectué par l'ensemencement des souches dans le bouillon MRS glucosé contenant la cloche de Durham et l'incubation été faite à 37° C, pendant 24h à 48h. Le développement d'une bactérie hétérofermentaires se manifeste par l'apparition de gaz dans la cloche de Durham, qui est absente chez les bactéries homofermentaires (Chrifi, 2019).

6. L'activité antimicrobienne des isolats LAB contre les agents pathogènes d'origine alimentaire :

1. Préparation de souche pathogène à tester :

On utilise une souche pathogène à gram positif : *Staphylococcus aureus* dans cette étude. Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes (de 18 à 24 h) en phase de croissance exponentielle. Les étapes de la préparation des suspensions des souches pathogènes à partir des stocks sont les suivantes :

- Préparation de l'inoculum des souches pathogènes en prélevant 10 µl de chaque stock (conservé à -20°C dans 50% glycérol). La quantité prélevée est répartie en stries sur gélose Baird-Parker et incubée à 37°C pendant 18 h. L'obtention de colonies noires de forme identique et la coloration de Gram peuvent vérifier la pureté des souches.
- Enrichissement des souches par repiquage de 200 µl du stock dans 10 ml de bouillon nutritif suivi d'une agitation et incubation à 37°C pendant 18 h.
- La suspension bactérienne doit être préparée dans l'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune et pure sur milieu d'isolement approprié. Après les avoir bien mélangés, nous obtenons la suspension de l'inoculum.

1.1. Préparation de standard de turbidité McFarland :

Les standards de turbidité se préparent en mélangeant des produits chimiques qui précipitent pour former une solution de turbidité reproductible. Les standards McFarland sont préparés par ajout d'acide chlorure de baryum, ce qui entraîne la formation d'un précipité de sulfate de baryum en suspension. Le standard McFarland 0.5 correspond approximativement à une suspension homogène d'*Escherichia coli* de $1,5 \times 10^8$ cellules par ml.



Figure 04 : Comparaison de McFarland 0,5 avec la suspension de l'inoculum.

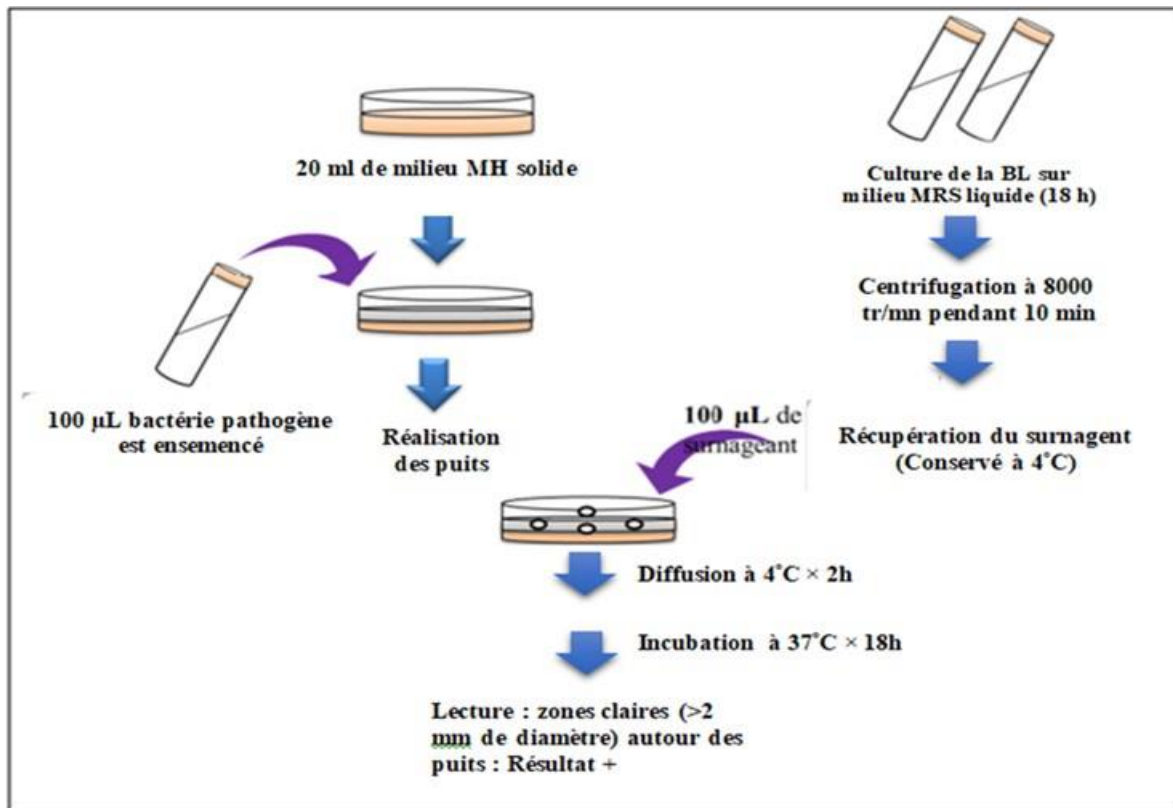
2. Test d'interaction entre *Lactobacillus* et *Staphylococcus aureus* :

Les souches sont cultivées dans le milieu MRS liquide et incubées pendant 18 h. Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/mn 10 min). Le surnageant est récupéré

soigneusement avec élimination des cellules bactériennes rassemblées en fond des tubes et conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

La méthode de diffusion en puits de TAGG et MC GIVEN (1971) a été appliquée. 20 ml de milieu MH solide sont coulés dans des boîtes de Pétri. Sur cette couche, on ensemence par 100 µL d'une culture fraîche de la souche indicatrice.

Après solidification, de petits cylindres (moules en acier inoxydable) d'un diamètre de 6 mm vont nous permettre de confectionner des puits. 100 µl de surnageant sont déposés au niveau de chaque puits. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h et incubées à 37°C pendant 18 h. La présence d'une zone claire autour des colonies, indiquant l'absence de croissance d'évidence du pouvoir antibactérien des LAB par la technique de diffusion en puits de TAGG et Mc Given (1971).



Résultats et Discussion

Les résultats de confirmation des bactéries lactiques révèlent par les examens macroscopiques et microscopiques la présence des bactéries lactique se forme spécifiques

I. Analyse microbiologique :

1. Recherche de flore totale mésophile aérobie :

Après l'incubation des boîtes de pétri, Nous obtenons les résultats indiqués comme suit :

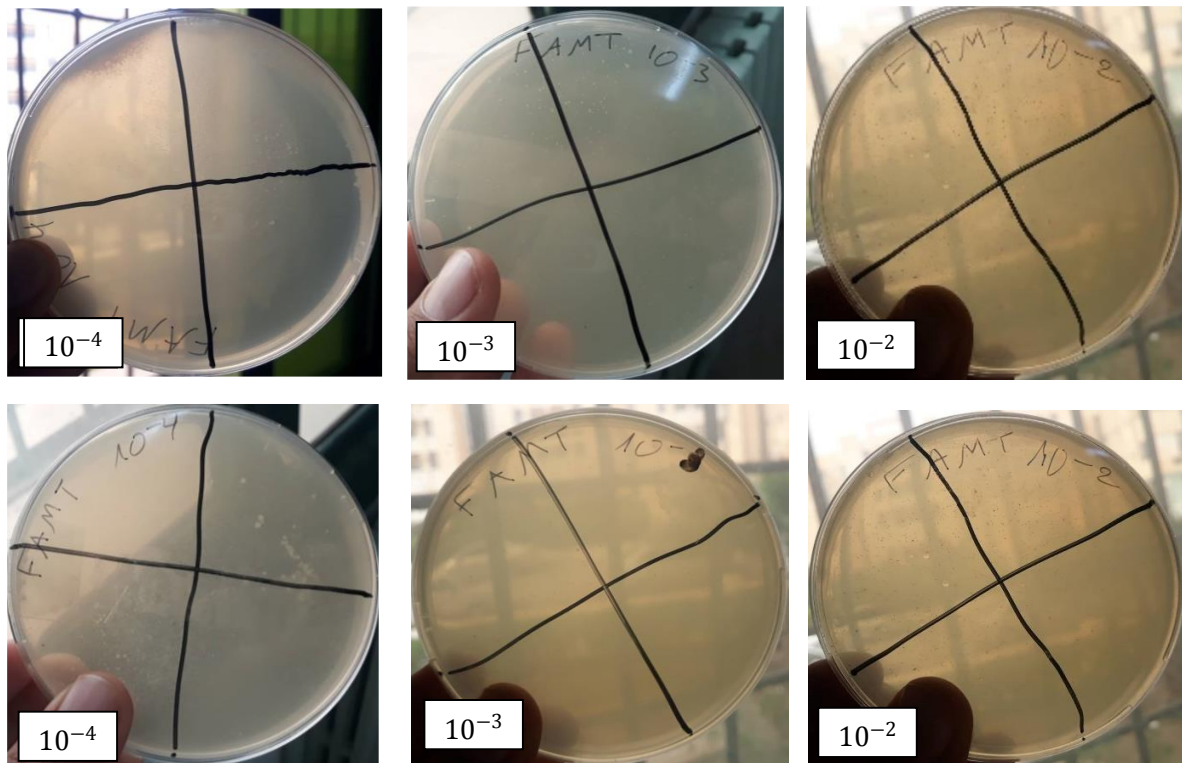


Figure 06 : Isolement des bactéries lactique sur gélose solide par dilution 10^{-3} – 10^{-4} – 10^{-5}

Le dénombrement de la flore aérobie totale est un indicateur de la qualité sanitaire globale d'un Leben.

I. Examen macroscopies et microscopies:

- a) L'aspect macroscopique permet de caractériser les colonies obtenues sur milieu solide MRS à pH = 5,6 après incubation, les comparant ainsi aux standards des colonies de bactéries lactiques. Nous avons trouvé dans de petites colonies solides moyennes d'environ 1 à 2 mm de diamètre, de forme ronde et de couleur Blanc, en revanche, l'observation macroscopique nous a permis d'être en milieu liquide d'observer un trouble assez dense comparativement au témoin, ce qui indique une croissance bactérienne au fond du tube. (Cherifi.S et al.2019).

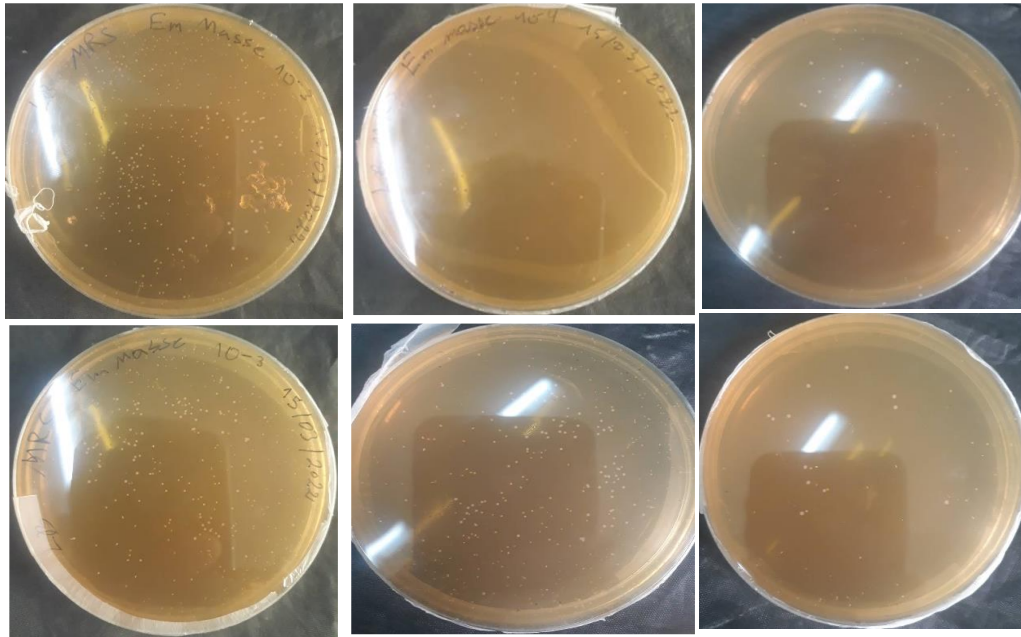


Figure 07 : Isolement des bactéries lactique sur gélose MRS solide par dilution 10^{-3} – 10^{-4} – 10^{-5} .

- b) D'après l'observation macroscopique des souches de *Lactobacillus* développées sur milieu solide MRS, on observe que les colonies sont de couleur blanche, petites et bien isolées et l'observation au microscope après coloration de Gram indique qu'il s'agit de bacilles Gram (+) bien visibles (Bey, 2009).

Les bactéries sont colorées en violette c'est-à-dire sont des gram positive, cette propriété est dû à la structure morphologique de paroi des bactéries qui contient d'une épaisse couche de

peptidoglycane qui traversée par des acides téichoïques ou lipo-téichoïques, ne laisse pas passer l'éthanol).

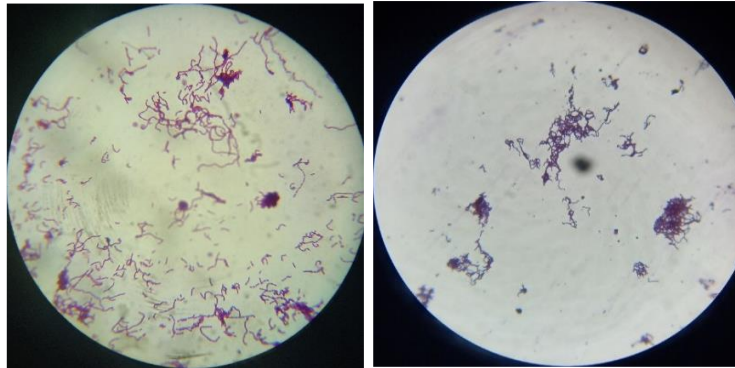


Figure 08 : Observation microscopique de clones prélevées de gélose MRS.

Catalase :

c) Les activités des enzymes catalase et oxydase ont été étudiées. Les résultats nous montrent que les souches de *Lactobacillus* sont catalase négative. (Bey, 2009).



Figure 09 : Les résultats de test de catalase (catalase négatif).

II. Caractérisations physiologiques et biochimiques:

Ces tests ont permis d'identifier les souches de toutes les races.

Croissance à différentes températures:

d) L'utilisation de ce test permet de diviser les races en deux groupes : un groupe de souches thermophiles et un groupe de souches thermophiles. La croissance des isolats a été testée à 37 et 45 °C. Dans cette étude, la majorité des souches testées ont été signalées comme étant moyennes et se développent bien à 37 °C après 48 h d'incubation. Selon Tailliez (2004), la

plupart des lactobacilles se multiplient dans une plage de température comprise entre 15°C et 45°C. (Cherifi. S et *al.*2019).

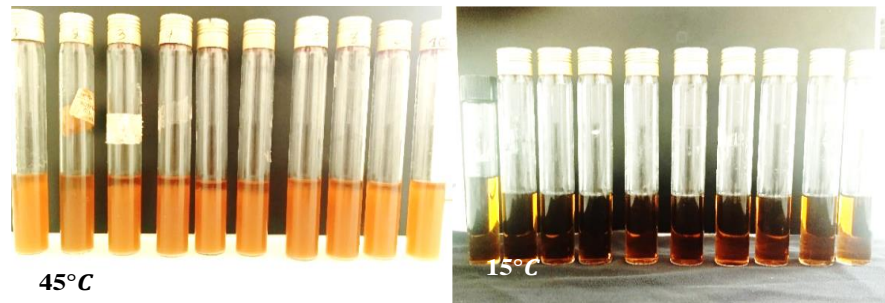


Figure 10 : Trouble des lactobacillus sur MRS Liquide à 45°C et 15°C.

Effet de NaCl et du pH :

La culture des souches à des pH de 6,4, 8,3 et 3 et en présence de différentes concentrations de NaCl 4% et 8% nous a permis d'évaluer leur potentiel de croissance. La plupart des souches isolées sont capables de croître en bouillon MRS à une concentration de 4 % de Chlorure de sodium et ne croître pas à une concentration de 8% de NaCl, les souches n'ont pas pu être cultivées. Toutes les souches isolées sont capables de se développer sur bouillon MRS à pH 6,6, et sont incapables de se développer à pH 8,3 (Cherifi. *et al.*2019).

Type de fermentation : La culture des souches de Lactobacillus dans des tubes contenant le milieu MRS bouillon et la cloche de Durham incubés à 30°C en Aero anaérobiose, n'a montré aucune production de gaz dans la cloche. Ce résultat nous démontre que ces souches fermentent le glucose sans production du CO₂ donc elles ont un métabolisme homofermentaire. (Bey F.2009).

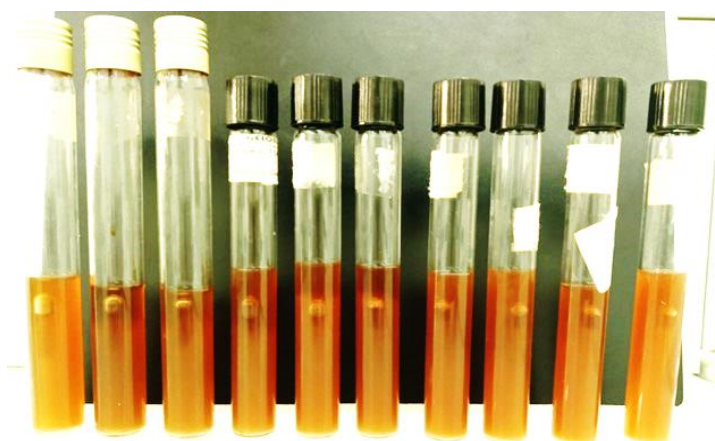


Figure 12 : La culture des souches de Lactobacillus dans des tubes contenant le milieu MRS bouillon et la cloche de Durham.

Tableau. 06. Les caractéristiques des nouvelle souches identifiées

	Lactococcus Alimentarius	Lactobacillus fermentum	Lactobacillus fermentum	Lactobacille brevis	Lactobacillus lactis	Lactobacillus lactis	Lactobacillus lactis	Lactobacillus lactis	Lactobacillus lactis	Lactobacillus lactis
GRAM +/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HYPERSALE 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HYPERSALE 8%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T°= 15C°	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T°= 45C°	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH=6.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH= 8.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type fermentaire	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO	HO

L'activité antimicrobienne des isolats LAB contre *S. aureus* 22923ATCC :

Dans ce travail, la révélation du spectre d'activité antibactérienne des isolats de bactéries lactiques a été réalisée sur une bactérie pathogène gram positif (*S. aureus* 22923ATCC). La méthode de diffusion en puits de TAGG et MC GIVEN (1971) a été utilisée pour la détection des inhibitions. L'activité inhibitrice se traduit par la formation d'un halo autour des puits, La lecture des résultats consiste à mesurer le rayon de l'halo d'inhibition. Les résultats de l'activité antibactérienne sont représentés dans la figure 13.



Figure 13 : Résultats de l'activité antibactérienne des isolats lactiques vis-à-vis de *S. aureus* 22923ATCC

D'après ces résultats, les surnageants natifs des espèces *Lab.sp* S7 et S10, ont présenté une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée sur la bactérie pathogène à tester (*S. aureus* 22923ATCC) avec des diamètres d'inhibition de 6,33 à 7 mm (Tableau 06).

Tableau 07 : Diamètres des zones d'inhibition des surnageants natifs des bactéries lactiques testées vis-à-vis de souche pathogène (en mm).

Les Souches	S. aureus 22923ATCC
S01	00
S02	00
S03	00
S04	00
S05	00
S06	00
S07	6.33
S08	00
S09	00
S10	07

Le travail de MAMI, A et al. (2010), a montré que les espèces de *Lactobacillus* peuvent jouer un rôle important dans la biotechnologie. La possibilité d'exploiter cette activité pour l'utiliser comme moyen de biopréservation des aliments pour lutter contre les espèces de *Staphylococcus aureus* impliquées dans les intoxications alimentaires observées pendant les saisons estivales en Algérie.

Conclusion

Les bactéries lactiques ont un intérêt primordial en alimentation il y a au moins quatre mille ans que l'homme sert de ces bactéries pour la fermentation des aliments, et sont connues pour leur aptitude à produire des composés antibactériens leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes mais aussi d'être utilisées en tant que bio-conservateurs. Le but de ce travail, est la mise en évidence de la production des bactériocines par les bactéries lactiques isolées à partir de Leben traditionnelle de chèvre.

Cette étude consiste à isoler et essayer d'identifier des bactéries lactiques ainsi de tester leur activité antibactérienne par la méthode de diffusion par puits, vis-à-vis de *Staphylococcus*. Parmi ces souches lactiques isolées, les tests de l'activité antibactérienne ont fait apparaître 2 souches actives ont présenté une activité anti-*Staphylococcus* marquée

Références bibliographiques

A

- **Amandine. F, (2017).** Recherche de bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydante (thèse doctorat, Université de La Réunion)
- **Altahrironline ;** <https://www.altahrironline.dz/ara/articles/266385>

B

- **Bilaladji, (2010).** Recherche Et Dénombrement de La Flore Aérobie Mésophile Totale. SCRIBD
- **BAHRI. F, (2014).** ISOLMENT ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE LACTOBACILLES A CARACTERES PROBIOTIQUES A PARTIR DE SELLES D'ENFANTS, THESE DE DOCTORAT, Université Constantine I
- **BEKHOUCHE. F, (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase, THESE DE DOCTORAT, UNIVERSITE DE MENTOURI CONSTANTINE
- **BOUMEDIENE. K (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes, mémoire Magister en biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen
- **Boullouf, A. (2016).** Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel Bouhezza, thèse de Magister. Université des frères Mentouri Constantine, institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.), 135p.
- **BELHAMRA, Z. (2017).** Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires, Thèse Doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 147p.
- **BAHRI Fathia.2014 ;** ISOLMENT ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE LACTOBACILLES A CARACTERES PROBIOTIQUES A PARTIR DE SELLES D'ENFANTS ; THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES
- **Belarbi.F.2011 ;** isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrice des métabolites antibactériennes ; MEMOIRE DE MAGISTER

C

- **Choubaila Leksir, Sofiane Boudalia , Nizar Moujahed and Mabrouk Chemmam; 2019;** Traditional dairy products in Algeria: case of Klila cheese Journal of Ethnic Foods; P6:7
- **CHEMLAL-KHERRAZ, D. (2013).** Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique , thèse de doctorat. Université d'Oran,217p.
- **CHERIFI Sabrina et CHETIOUI Yamina;2019;** Etude de l'activité antibactérienne des Lactobacillus isolées à partir du Lben traditionnel provenant de la commune de Ben Srour (M'Sila) à l'égard des quelques souches pathogènes ciblées; memoir master

D

- **DEMAZEAUD. M, (1996).** Les bactéries lactiques dans L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, 5, pp: 331-343.
- **Dortu. C, Thonart. P, (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bio-conservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy Society and Environment*,13, 143-154.

F

Feknous N et al(2018). Exploration de la qualité microbiologique de certains laits de chèvre du Nord-est algérien Université Ferhat Abbas Sétif 1, *Revue Agriculture*. 09(1) : 71 – 80,

G

- **Ghozlane et benazzouz dj (2012).** Isolement et caractérisation des bactéries lactique productrice d'aromes(diacetyte), école Nationale supérieur d'agronomie El-Harrach Alger
- **Guetouache M, Faid A,Mebarki M (2021).** Characterization and Identification of Lactobacilli from Raw Goat's Milk Came from the Rural Area of the Province of Djelfa in Algeria, *IAR Journal of Clinical & Medical Biochemistry*

H

- **Hicham LABIOUI (1), Laarousi ELMOUALDI (1), Abderrahim BENZAKOUR, Mohamed EL YACHIOUI (1), El Hassan BERNY (1), Mohammed OUHSSINE (1).(2009).**(ÉTUDE PHYSICOCHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DE LAITS CRUS .Pp :7-16

- **HAMMI, I. (2016).** Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français, thèse de doctorat.
- **Hassaine, O. (2013).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien, thèse de doctorat. Université d'Oran Esenia, 180p.

K

- **Kahina. M, (2012).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Bactériologie. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI

L

- **LOUMANI AKIL ;2018 ;** Etude Phénotypique et Génotypique de *Lactobacillus* sp et *Streptococcus* sp isolés à partir de différents laits fermentés et leurs Propriétés Technologiques ; université de oran1 AHMED BENBELA
- L'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah faculté des sciences département de Microbiologie - biologie moléculaire, 150p.

M

- **MAMI, A, HAMED, A.R, HENNI, J.E, KERFOUF, A, KIHAL, M. (2010).** Activité Anti-Bactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus*. LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE, 5,(21).
- **Mermouri, L. (2018).** Étude de l'Effet de Souches Probiotiques de Bactéries Lactiques (*Lactobacillus* spp.), Isolées e Produits Fermentés, sur la Valeur Nutritive de Fourrages Conservés par Ensilage, thèse de doctorat. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed-Boudiaf, 177p.
- **Melle Soualah Mohammed Nadjla Melle Guemari Malak Melle Ben Moussa Hadjer;2021;** Contribution à La mise En Evidence De L'effet Antagoniste Des Bactéries D'intérêt Alimentaire Sur Des Champignons Attaquants La Pomme De Terre; MEMOIRE DE FIN D'ETUDE Master Académique.
- **Mademoiselle Bey Faiza.2009 ;** Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactibacillus* sp et quelques souches d'entérobactéries ; MEMOIRE DE MAGISTER

P

- P. VANDAMME, B. POT, M. GILLIS, P. DE VOS, K. KERSTERS, AND J. SWINGS. (1996), Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, MICROBIOLOGICAL REVIEWS, p. 407–438

- Prescott I Willey Sherwood I Woolverton;2011;MICROBIOLOGIE

S

- Sébastien. M (2008). Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid (thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE NANTES)

T

- TAGG J.R. and MC GIVEN A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. Appl. Microbiol. 21: p943.

Annexes

▪ **Milieu MRS (pH 6.5)**

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80.....	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H ₂ O	0.5g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

▪ **Bouillon hypersalé (pH 7.2)**

Extrait de viande	5g
Glucose	5g
Peptone	15g
NaCl	40/65g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

▪ **Composition gélose PCA**

Ingrédients	gramme/litre
Tryptone.....	5g
Extrait de levure	2.5g
Glucose.....	1g
Agar agar bactériologique.....	12g

pH à 25 °C : 7,0 ± 0,2

Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.