

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

N°:



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique**

Par :

MIMI Wail, KHARCHI Dounia, BELFEGAS Zahra

**Intitulé**

**Recherche des bactéries lactiques sécrétrices des substances  
antibactériennes à partir du lait cru de vache de la région de  
M'sila**

Soutenu devant le jury composé de :

Pr. MEDJEKAL Samir	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Dr. ARIECH Mounira	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examinatrice
Dr. GUETOUACHE Mourad	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Mlle. NAIDJI Meriem	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Co- Rapporteur

2023 /2024

## **Remerciement**

*Au début et avant tout, le remerciement et louange à Allah le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la santé de finaliser ce travail.*

*Nous remercions vivement notre encadreur DR. Guetouache mourad pour sa confiance, son soutien, son attention, ses bons conseils et pour avoir accepté de nous encadrer, Nous vous remercions également*

*Co-promoteur Naïdji Meriem qui nous a accompagné et nous a aidé pas à pas dans notre travail et ne nous a épargné aucune information Merci beaucoup.*

*Nous remercions par ailleurs vivement les membres du jury : PRF. MEDJEKAL Samir qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous remercions Dr. ARIECH Mounira d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce modeste travail.*

*Nous tenons également à présenter nos plus vifs remerciements à tous les enseignants et ingénieurs de laboratoire d'université de Msila pour leurs disponibilité et conseils.*

*Sans oublier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin de a la réalisation de notre travail.*

## Dédicace

*Je remercie Allah Tout-Puissant pour m'avoir accordé SA guidance pour finir Ce mémoire .*

*À ma mère Samra, qui a toujours été ma source d'inspiration ET de soutien. Même si tu n'es plus physiquement avec moi, ton amour ET ta sagesse continuent à guider chaque pas de Mon chemin. Dans chaque réussite que j'accomplis aujourd'hui, je sens ta présence bienveillante ET ton encouragement éternel. Cette réussite EST dédiée à toi, ma chère mère, dont la lumière continue à briller dans Mon cœur.*

*Que Dieu ait ton âme*

*À Mon Cher père Kamal, dont la force, la sagesse et l'amour ont été les piliers de mon parcours. Ta présence bienveillante continue de m'inspirer à atteindre de nouveaux sommets, ET chaque succès que j'accomplis EST UN hommage à ton héritage.*

*Que Dieu Te protège*

*À mes chères sœurs( Djihan et son mari) ;(Aya, Anfel ET Alaa) qui ont été mes piliers, mes soutiens ET mes moitiés dans la vie Cette réussite EST aussi la vôtre, car chacune de vos encouragements a été une étincelle de motivation dans mes moments les plus difficiles, ET à Mon petit frère bien-aimé Ebd\_eldjalil.*

*À mes chers grands-parents ET À toute ma famille chacun par son nom.*

*À mon chère oncle Achref.*

*À mes binômes Dounia et Wail Pour leur soutien, leur confiance et leur comportement exemplaire tout au long de Notre collaboration ,Avec tout mon amour et mes meilleurs vœux pour votre Bonheur et votre réussite.*

*À mes chère Amies rahma, marwa, Mounia, Amira*

*À tous ceux qui m'ont soutenu ET encouragé.*

*Zahra*

## Dédicace

*Je remercie tout d'abord Allah qui m'a donné la patience, la volonté et le courage  
pour finir ce mémoire.*

*Je dédie ce modeste travail à Mes chers adorables parents Mohamed et Ghania pour  
leur soutien inconditionnel dans tout ce que J'ai pu entreprendre dans ma vie, leurs  
encouragements, leurs sacrifices. Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.  
Ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude. Que  
Dieu vous bénisse et vous protège*

*A mes chères sœurs, Amina Maryem Selsabil, et mon frère Moataz*

*À ma chère moitié, Faiza, et ma merveilleuse amie Amira,*

*À toute ma famille chacun par son nom*

*Sans oublier mes binômes : Zahra et Wail pour ses soutien moral, ses patience et ses  
compréhension tout au long de ce travaille.*

*Eux qui m'ont guidé durant toutes mes années d'étude vers chemin de la réussite*

*Dounia*

## Dédicace

*Chaque jour qui passe, je remercie Allah et je Le prie constamment de me donner la force de suivre le chemin qu'Il m'a tracé, afin de réaliser le destin qu'Il m'a réservé.*

*Je dédie ce travail à :*

*- Mes très chers parents, Farid et Noura : les prunelles de mes yeux, mes meilleurs amis, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur. Merci pour votre soutien moral et vos sacrifices qui m'ont toujours donné la force de persévérer et de réussir dans la vie. Je ne pourrai jamais exprimer pleinement tout l'amour sincère que j'ai pour vous. Que Dieu vous accorde santé et longue vie.*

*- Mon frère Mohamed et mes sœurs, Abir et Salsabil : que Dieu vous protège et vous préserve.*

*- À la mémoire de mes grands-parents paternels et maternels : que Dieu garde leurs âmes dans Son vaste paradis.*

*- Toute ma famille ; mes ami et les personnes que j'aime et toutes celles qui m'ont aidé de près ou de loin, qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'apporter amour et vitalité*

*Mes chères collègues et amies, Donia et Zahra : ensemble, nous avons formé un trinôme soudé et solidaire. Merci pour votre précieuse collaboration, votre soutien constant et les moments inoubliables partagés tout au long de cette aventure académique.*

*Que Dieu vous guide et vous soutienne dans vos vies personnelle et professionnelle.*

*Wail*

# Sommaire

Résumé .....	i
Liste des abréviations .....	ii
Liste des figures .....	iii
Liste des tableaux .....	iv
Introduction .....	1
Généralités sur le Lait .....	1
I.1.1. Lait cru .....	1
I.1.2. Composition du lait .....	1
I.1.3. Qualité organoleptique du lait .....	3
I.1.4. Viscosité .....	4
Les bactériocines des bactéries lactiques .....	4
I.2. Bactéries Lactiques .....	4
I.2.1. Définition .....	4
I.2.2. Classification des bactéries lactiques .....	5
I.2.3. . Les Caractéristiques classiques (Morphologique et physiologique) .....	6
Les Bactériocines .....	8
<b>I.3.</b> .....	8
I.3.1. Définition .....	8
I.3.2. Mode d'action .....	9
I.4. Production des bactériocines .....	10
I.4.1. Facteurs influençant la production des bactériocines .....	10
I.4.2. - Température et pH .....	10

I.5. -Composition du milieu de culture .....	11
Matériels et Méthodes .....	17
chapitreII. ....	17
II.1. Matériels .....	17
II.1.1. Matériels biologique .....	17
II.2. Échantillonnage .....	17
II.2.1. Isolement .....	17
II.2.2. Culture en Milieu de Croissance .....	18
II.2.3. Lecture et interpretation: .....	18
II.2.4. Identification des bactéries lactiques .....	20
II.2.5. Test catalase.....	20
II.2.6. Les tests spécifiques .....	20
II.2.7. Interaction bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes .....	21
II.2.8. Méthode preliminaire.....	22
chapitreIII. Résultat et discussion .....	24
III.1. Analyse microbiologique de lait cru de vache .....	24
III.2. Dénombrement les Bactéries lactique .....	24
III.2.1. Dénombrement des <i>lactobacilles</i> .....	24
III.2.2. Examen macroscopique.....	25
III.2.3. Examen microscopique .....	25
Conclusion.....	34
Références Bibliographiques.....	35
Annexes.....	1

## ملخص

يعتبر حليب الأبقار مصدرًا قيمًا للمغذيات والكائنات الحية الدقيقة المفيدة. تُعد بكتيريا حمض اللاكتيك من بين الكائنات الحية الدقيقة الأكثر شيوعًا في الحليب الخام، وتلعب دورًا حيويًا في تخميره وحفظه من خلال إنتاج البكتريوسينات، وهي ببتيدات مضادة للميكروبات. هذه البكتريوسينات لها تأثير مفيد من خلال الحد من نمو وانتشار أي بكتيريا مسببة للأمراض قد تكون موجودة. من خلال العمل بهذه الطريقة، تساعد البكتريوسينات في الحفاظ على الجودة الميكروبيولوجية للحليب الخام، وهو أمر ضروري لسلامة الأغذية. ركز هذا البحث على تحديد بكتيريا حمض اللاكتيك المفترزة لمضادات الميكروبات في حليب الأبقار الخام من منطقة المسيلة. خلال هذه الدراسة، قمنا بعزل وتنقية 24 سلالة من البكتيريا اللبنية على وسط MRS من حليب البقر الخام (منطقة المسيلة) و بعد عدة اختبارات (الكاتلاز؛ والغرام؛ ودرجة حرارة النمو؛ ونوع التخمير واختبار السكر المخمر)، أظهرت نتائجنا أن العزلات التي تم تحديدها تنتمي إلى جنس اللاكتوباسيلوس. اخترنا على وجه التحديد استهداف البكتيريا المسببة للأمراض مثل (*E. Coli*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) وذلك لتأكيد التفاعل المضاد للميكروبات لسلالات بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة، وكذلك قدرة البكتريوسينات الخاصة بها على تثبيط عمل هذه الممرضات. من بين 24 سلالة خضعت للدراسة، أظهرت 6 سلالات فقط تفاعلاً ملحوظاً مع البكتيريا المسببة للأمراض قيد الدراسة.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية، الحليب الخام، البكتيريا المسببة للأمراض، العزل، التفاعل، البكتريوسينات

## **Abstract**

Raw cow's milk, an essentially unprocessed food product, is a valuable source of nutrients and beneficial microorganisms. Lactic acid bacteria are among the most common microorganisms found in raw milk, playing a vital role in its fermentation and preservation through the production of bacteriocins, antimicrobial peptides that have a beneficial effect in limiting the growth and spread of pathogenic bacteria that may be present. By acting in this way, bacteriocins help to maintain the microbiological quality of raw milk, which is essential for its food safety. This research focused on the identification of antimicrobial-secreting lactic acid bacteria in raw cow's milk from the M'sila region. During this study, we isolated and purified 24 strains of lactic acid bacteria on MRS medium from raw cow's milk (M'sila region). After several tests (catalase; Gram; growth temperature; fermentation type and fermentative sugar test), our results show that the isolates identified belong to the lactobacillus genera. We specifically chose to target pathogenic bacteria such as *E. coli*, *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis* in order to confirm the antimicrobial interaction of our isolated lactic acid bacteria strains, as well as the ability of their bacteriocins to inhibit the action of these pathogens.

Of the 24 strains studied, only six demonstrated significant interactions with the pathogenic bacteria under investigation.

**Key words:** lactic acid bacteria, raw milk, pathogenic bacteria, isolation, interaction, bacteriocins

## Résumé

Le lait cru de vache, un produit alimentaire essentiellement non transformé, est une source précieuse de nutriments et de microorganismes bénéfiques. Les bactéries lactiques sont parmi les microorganismes les plus courants dans le lait cru, jouant un rôle vital dans sa fermentation et sa préservation à partir de sa production les bactériocines que sont des peptides antimicrobiens, ces bactériocines ont un effet bénéfique en limitant la croissance et la propagation des bactéries pathogènes qui pourraient être présentes. En agissant de cette manière, les bactériocines contribuent à maintenir la qualité microbiologique du lait cru, ce qui est essentiel pour sa sécurité alimentaire. Ce travail de recherche s'est concentré sur l'identification des bactéries lactiques sécrétrices de substances antimicrobiennes dans le lait cru de vache de la région de Msila.

Pendant cette étude, nous avons isolé et purifié 24 souches de bactéries lactiques sur milieu MRS à partir de lait cru de vache (région de Msila). Après plusieurs tests (catalase ; Gram ; température de croissance ; type de fermentation et le test des sucres fermentaire), nos résultats montrent que les isolats identifiés appartiennent aux genres lactobacilles. Nous avons spécifiquement choisi de cibler des bactéries pathogènes telles que *E. Coli*, *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis* afin de confirmer l'interaction antimicrobienne de nos souches de bactéries lactiques isolées, ainsi que la capacité de leurs bactériocines à inhiber l'action de ces pathogènes.

Sur les 24 souches étudiées, seules 6 ont démontré une interaction significative avec les bactéries pathogènes étudiées.

**Mots clés :** bactéries lactiques, lait cru, bactéries pathogène, Isolement, interaction, bactériocines

## Liste des abréviations

UFC : Unité Formant Colonie.

FAO: Food and Agriculture Organization.

*E. coli* : *Escherichia coli*.

LB : Bactéries lactique.

MG : Matière grasse.

## Liste des figures

Figure 1. Composition de la matière grasse du lait (BYLUND, 1995).....	2
Figure 2. (A) La forme cocci et (B) la forme bacille des bactéries lactiques ont été observées au Microscope électronique à transmission. (Makhloufi, 2011).....	7
Figure 3.Séquence et structure des l'antibiotique de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un l'antibiotique « deux peptides » (Lacticin 3147 A1 et A2). (Dortu et Thonart, 2009). ....	9
Figure 4.Mécanisme de production et de régulation des lantibiotiques (la nisine) (Dortu etThonart, 2009).....	11
Figure 5.Repicage des bactéries lactiques dans un MRS liquide. ....	19
Figure 6. Dénombrement des lactobacilles dans un milieu MRS à une température de 37°C.....	24
Figure 7.Aspect macroscopique des colonies de Bactérie lactique sur milieu MRS liquide. ....	25
Figure 8.: les formes obtenues observées au microscope optique au grossissement (×100). ....	26
Figure 9.: Résultats de croissance à différentes températures (15°C et 45 °C).....	27
Figure 10.Résultats de type fermentaire des souches LB (MRS). ....	28
Figure 11.interaction des bactéries lactique vis à vis des bactéries pathogènes. ....	30
Figure 12.interaction des bactériocines des bactéries lactique vis à vis des bactéries pathogène.	31

## Liste des tableaux

Tableau 1. Le dénombrement des colonies .....	18
Tableau 2. Résultats de la numération de la microflore cultivable du lait cru de vache <Milieu MRS > .....	24
Tableau 3. Résultats de croissance (test de température).....	26
Tableau 4. résultats de test de fermentation .....	28
Tableau 5. Résultat de test profil fermentaire des sucres .....	29
Tableau 6. le Diamètre de la zone d'inhibition des lactobacilles inhibitrices contre bactéries.....	32
Tableau 7. critères d'identification des isolats lactique du groupe de <i>lactobacillus</i> .....	33

# **Introduction**

## Introduction

L'Algérie est un pays de tradition laitière où le lait et les produits laitiers jouent un rôle essentiel dans l'alimentation des Algériens (Ubi, 2010). La flore microbienne du lait cru, composée principalement de bactéries lactiques, joue un rôle crucial dans la création des propriétés gustatives des produits laitiers fermentés et dans la préservation de l'aliment en produisant de l'acide lactique et d'autres métabolites antimicrobiens (Boulouf, 2016). L'intérêt pour l'utilisation des bactéries lactiques à effet bénéfique pour la santé ou « probiotique » a connu une croissance considérable ces dernières années (Hadeif, 2012).

Ces micro-organismes se trouvent dans différents environnements naturels et jouent un rôle important dans la protection contre les agents pathogènes (Ekundayo, 2014). La propagation des micro-organismes pathogènes par les aliments est une préoccupation majeure pour l'industrie alimentaire, qui s'efforce de mettre en place des règles d'hygiène rigoureuses (Tahiri, 2007). Cependant, les nouvelles tendances du marché révèlent que les consommateurs sont réticents à l'utilisation d'additifs chimiques, ce qui pousse les recherches vers des méthodes de lutte biologique exploitant les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques (Dortu, 2008).

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

- L'isolement, la purification et l'identification phénotypique des bactéries lactiques à partir d'un lait cru de vache de la région de M'sila.
- 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.

**Chapitre I :**  
**Etude bibliographique**

## Généralités sur le Lait

### I.1.1. Lait cru

Le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré (ABOUTAYEB, 2009). Le lait cru désigne le lait qui n'a subi aucun procédé de conservation autre que Réfrigération à la, ferme. La date de fin de vente est le lendemain de la date de vente traitée. Le lait cru doit être bouilli avant consommation (car il contient des germes pathogènes) (FREDOT, 2005).

### I.1.2. Composition du lait

. Le lait et les produits laitiers sont des aliments nutritifs et leur consommation permet de diversifier les régimes à base de plantes. Le lait d'origine animal peut jouer un rôle important dans l'alimentation des enfants dans les populations ne bénéficiant que d'un très faible apport en lipides et ayant un accès limité aux autres aliments d'origine animale. (FAO ; 2017).

Les principaux constituants du lait par ordre croissant selon (POUGHEON et GOURSAUD 2001) sont :

- eau, très majoritaire,
- glucides principalement représentés par le lactose,
- lipides, essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras,
- sels minéraux à l'état ionique et moléculaire,
- protéines ; caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles,
- éléments à l'état de trace mais au rôle biologique important, enzymes, vitamines et

Oligoéléments.

#### I.1.2.1. Eau

Le lait est majoritairement constitué d'eau, qui est une molécule polaire. Cette polarité permet à l'eau de dissoudre des substances polaires. Le sérum du lait contient des glucides, des minéraux et des protéines hydrophiles en solution colloïdale. Les matières grasses, étant non polaires, ne se dissolvent pas et forment une émulsion. Les micelles de caséine, solides, sont en suspension colloïdale (amiot et lapointe, 2002).

### I.1.2.2. Glucide

Les glucides représentent 4,6% à 5,1% du poids du lait (Vierling, 2008). Ils représentent près de 1/3 de la valeur énergétique du lait entier, mais ceci est insuffisant pour faire de lui un aliment équilibré. Il est à noter que le lait est riche en protéines, contient des glucides (Fredot, 2009)

### I.1.2.3. Matière grasse

Le lait contient des matières grasses sous forme d'une émulsion de globules grasses

On nomme taux butyreux (TB) la quantité de matières grasses présentes dans le lait. Elles contribuent à près de la moitié de son énergie, d'autre part, elles contribuent aux caractéristiques.

Les propriétés gustatives (désirées ou non) et les caractéristiques rhéologiques des produits laitiers (Brulé *et al.*, 2008).

### I.1.2.4. Lipides

Le lait contient environ 25 à 45 g de lipides (matières grasses MG du lait) par litre, le taux varie de 2.5-5 % (LUQUET, 1985). Elle est constituée par 98,5 % de glycérides (esters d'acide gras (AG) et de glycérol), 1% de phospholipides polaires et 0,5 % de substances liposolubles cholestérol, hydrocarbures et vitamines A, D, E, et K. (BOUTONNIER, 2008) voir (figure 01)

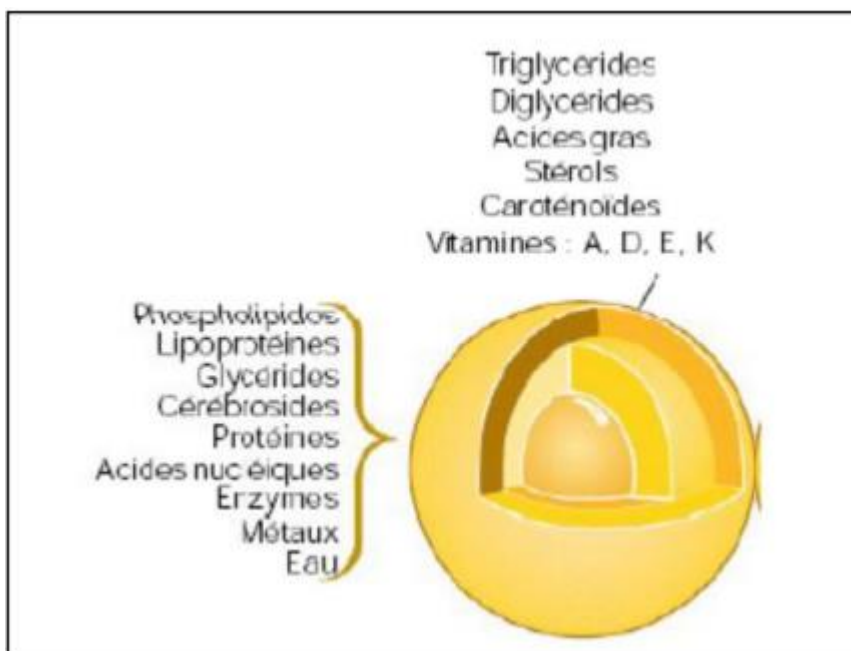


Figure 1. Composition de la matière grasse du lait (BYLUND, 1995).

### **I.1.2.5. Minéraux**

On considère que la fraction minérale est faible dans la composition du lait. Par contre, elle revêt une importance à la fois sur le plan structural, nutritionnel et technologique. La principale source de calcium et de phosphore dans la ration alimentaire est le lait et ses dérivés.

Les cations sont constitués de calcium, de magnésium, de sodium et de potassium, tandis que les anions sont constitués de phosphate, de chlorure et de citrate (Jeant et *al.*, 2007).

### **I.1.2.6. Vitamines**

Les vitamines sont des substances biologiquement indispensables à la vie puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires. L'organisme humain n'est pas capable de les synthétiser Deux types de vitamines sont présents dans le lait, en l'occurrence, les vitamines hydrosolubles (vitamine du groupe B et vitamine C) ; et les vitamines liposolubles (A, D, E et K) (Jeant et *al.*, 2008).

### **I.1.2.7. Enzymes**

Les enzymes sont des substances organiques protéiques produites par des cellules ou des organismes vivants. Agit comme un catalyseur dans les réactions biochimiques. Environ 60 enzymes principales sont répertoriées dans le lait, dont 20 sont des composants majeurs, la plupart se trouvent dans la membrane des globules gras, mais le lait contient de nombreuses cellules (leucocytes, bactéries) qui produisent des enzymes (Vignola, 2002).

## **I.1.3. Qualité organoleptique du lait**

L'apparence, l'odeur, le goût et la texture sont des paramètres sensoriels qui caractérisent la qualité du lait et sont étroitement liés aux propriétés et à la perception de la qualité par le consommateur.

### **I.1.3.1. Couleur**

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

### **I.1.3.2. Odeur**

" L'odeur typique du lait provient de la graisse qu'il contient, qui corrige les odeurs animales. Elles sont liées au milieu de traite, à l'alimentation (le silo préfère la végétation beurrée, le lait reçoit alors de la végétation odorante), au stockage (acidification du lait (par l'acide lactique) donne une odeur aigre (Vierling, 2003).

### I.1.3.3. Saveur

Le goût du lait frais ordinaire est agréable. Le lait aigre est frais et légèrement épicé. Le lait chauffé (pasteurisé, bouilli ou stérilisé) a un goût légèrement différent du lait cru. Le lait conservé et mastiqué a un goût salé plus ou moins fort. Peut donner au lait, en particulièrement, des saveurs inhabituelles. Le lait peut également développer un goût amer en raison de la croissance de certaines bactéries dérivées du lait. (Thieulin et Vuillaume, 1967).

### I.1.4. Viscosité

La viscosité du lait est une propriété complexe qui est principalement affectée par les particules colloïdales émulsionnées et dissoutes. La viscosité du lait dépend surtout de sa teneur en matières grasses et en caséine. La viscosité est une propriété importante de la qualité du lait, car il existe une relation étroite entre les propriétés rhéologiques et la perception de la qualité par le consommateur (Rheotest, 2010).

## Les bactériocines des bactéries lactiques

### I.2. Bactéries Lactiques

#### I.2.1. Définition

Le mot bactéries lactiques (lactic acid bacteria) a été employé jusqu'au vingtième siècle pour désigner les organismes du lait acidifié (milk-souring organisms). La première culture pure de ces bactéries était, en effet, celle de *Bacterium lactis*. (*Lactobacillus lactis*), découvert par Listèrent en 1873 (Boumehira, 2010). Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries très variées sur le plan phylogénétique (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*...) qui partagent principalement la capacité de générer de l'acide lactique comme produit final de la fermentation des sucres. (Mahi, 2010).

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes qui forment un groupe diversifié composé de cocci et de bacilli. Il s'agit de bactéries Gram positives qui ont une quantité inférieure à 50 % de guanine et de cytosine (G+C). Elles se trouvent là. Les esporulantes, qu'elles soient aéro-anaérobies ou micro-aérophiles, ont un métabolisme fermentaire rigoureux, sont acido-tolérantes et peuvent se développer à des températures allant de 10 à 45 °C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. En général, ces bactéries restent immobiles et se distinguent par la production d'acide lactique en tant que principal produit du métabolisme (Badi *et al.* ; 2005). Elles se disent sur un plan unique, sauf les genres *Pediococcus*, *Aerococcus* et *Tetragenococcus*. Ces bactéries sont

généralement dépourvues de catalase, de nitrate réductase, de cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches dans certaines conditions), protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux. Le glycérol ne peut pas être fermenté (Salminen *et al.* ; 2004) .

En plus de l'acide lactique et des acides organiques qui entravent le développement des microorganismes indésirables en réduisant le pH du milieu, les bactéries lactiques génèrent d'autres métabolites antimicrobiens comme le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines. (Dortu et Thonart, 2009)

Les plantes, les fruits, les produits laitiers, les eaux et les eaux usées, les jus, les cavités buccales, vaginales et intestinales de l'homme sont colonisées par les bactéries lactiques, sans pour autant lui causer de maladies, à l'exception de quelques cas causés par les streptococci et certains lactobacilli (König et Fröhlich, 2009).

Aujourd'hui, dans l'industrie agroalimentaire, les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel parmi les agents auxiliaires de production. Alors qu'elles sont principalement utilisées dans le domaine laitier , elles sont également employées dans le saumurage des légumes, les salaisons de viandes et de poissons, la boulangerie et la production de vin ( Moraes *et al.* 2010). La fermentation est indispensable pour toutes ces applications lors de la production des produits finis. Les bactéries lactiques, en tant que microorganismes d'intérêt industriel, se positionnent directement après la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Saad, 2010).

### **I.2.2. Classification des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont principalement classées en fonction de leur morphologie, de leur méthode de fermentation du glucose, de leur croissance à différentes températures, de leur capacité à se développer sous une forte concentration de sel (6,5 %, 18 %), de leur tolérance aux concentrations élevées de sel. pH à base d'acide, d'acide lactique et d'éthanol. La composition comprend l'acide issu du glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétone et ainsi de suite.

On peut également utiliser des indicateurs de classification chimique tels que la teneur en acides gras et la structure de la paroi cellulaire pour classifier (König *et al.*, 2017). Il est possible d'identifier les espèces de bactéries lactiques en analysant leur profil fermentaire des carbohydrates en utilisant le système API50 CH (Curk *et al.*, 1993).

La comparaison des séquences d'ARN ribosomal 16 S a donné lieu à des résultats.

La taxonomie des bactéries lactiques a subi des modifications significatives (Salminen *et al.*, 2004). Les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la classe des Bacilli

et l'ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles. (Bergey's manual of systematic bacteriology 2009).

Seulement douze de ces genres sont employés dans le domaine de la biotechnologie alimentaire.

Il s'agit de :

*Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et le *Tetragenococcus*.

Seuls cinq genres mentionnés (*Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) présentent les caractéristiques générales d'une bactérie lactique typique (Salminen et al. 2004).

### **I.2.3. . Les Caractéristiques classiques (Morphologique et physiologique)**

#### **I.2.3.1. Caractères morphologiques**

Les bactéries lactiques et coliformes étaient incluses dans la première définition des bactéries lactiques (*BL*), qui était fondée sur la capacité des bactéries à fermenter et coaguler le lait.

En 1901, Beijerinck constate que les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, ce qui permettra de séparer définitivement les bactéries lactiques (à Gram positif) des bactéries coliformes (Mechai, 2009). Les bactéries lactiques sont donc des bactéries Gram positives, non pigmentées, immobiles et non sporulantes. (HO et al., 2007). Les coques et les bacilles ou bâtonnets forment un groupe hétérogène (Figure 02) (Khalisanni, 2011).

Les coques (Cocci) sont des sphères ovoïdes de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre qui peuvent être divisées pour former des paires, des tétrades, des chaînettes ou des amas. Il s'agit de bactéries sans spores et qui restent immobiles.

Les bacilles se présentent sous la forme de bâtonnets qui peuvent présenter diverses formes. Contrairement aux bâtonnets droits classiques, on peut également observer des coccobacilles ou de longues chaînes de bacilles. Dans certaines situations, le bâtonnet peut se rétrécir ou se former en filaments. Ils ont un diamètre variant de 0,5 à 0,2  $\mu\text{m}$  et une longueur variant de 1,5 à environ 10  $\mu\text{m}$  (Hermier et al., 1997).

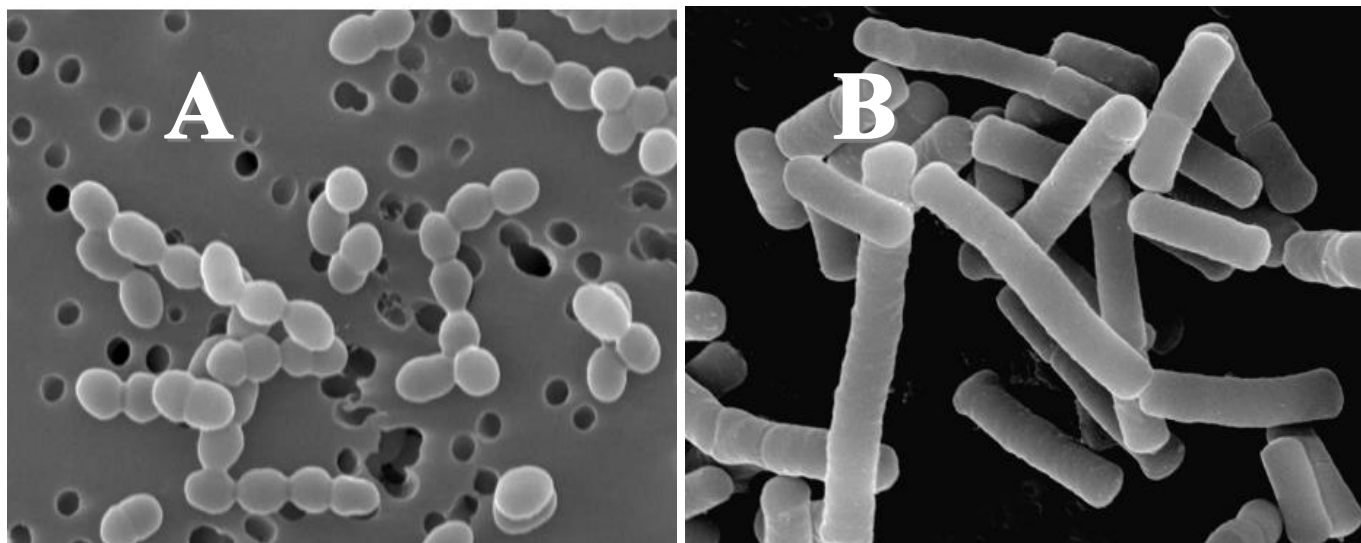


Figure 2. (A) La forme cocci et (B) la forme bacille des bactéries lactiques ont été observées au Microscope électronique à transmission. (Makhloufi, 2011).

### **I.2.3.2. Caractères physiologiques et biochimiques**

Les bactéries lactiques régénèrent le NAD<sup>+</sup> utilisé dans la glycolyse grâce à la conversion du pyruvate en acide lactique. À quelques exceptions près, elles présentent les caractéristiques suivantes : elles sont hétérotrophes et chimio-organotrophes (Badis et *al.*, 2005), elles tolèrent des pH acides, elles ne possèdent pas de catalase et elles ont un métabolisme anaérobie strict ou aérotolérant (Hardie et Whiley, 1997). La température optimale de croissance varie selon les genres, comme le *Streptococcus thermophile* qui est thermophile.

Ils ont un pourcentage de G + C de 30 à 60 % dans leur ADN (Stiles et Holzapfel, 1997) et un génome de 1,8 à 3,3 méga paires de bases (Mpb). La majorité des bactéries lactiques sont génétiquement prédisposées à avoir un métabolisme respiratoire, mais elles ne peuvent pas respirer si le lithium n'est pas présent dans leur milieu. L'hème joue un rôle crucial en tant que cofacteur au cytochrome C oxydase, qui est le dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire. La présence excessive d'oxygène peut leur causer des dommages en raison de l'absence de chaîne respiratoire. (Lechardeur, 2011).

### **I.2.3.3. Caractères immunologiques**

La sensibilité des bactéries lactiques à leurs propres substances de défense, telles que la bactériocine, peut être compensée par une protéine qui est une lipoprotéine codée par le gène LanI. Cette protéine s'attache à la surface externe de la membrane et interagit avec la bactériocine pour éviter son insertion dans la membrane et former des pores. La structure de ces protéines varie considérablement (Dortu, 2008).

---

## Les Bactériocines

### I.3.1. Définition

Les bactériocines étaient généralement définies comme des protéines ou des complexes de protéines qui ont une activité bactéricide contre les espèces étroitement liées à la souche productrice (Xie et *al.*, 2011). Toutefois, des recherches récentes ont montré qu'il en existe certaines qui sont également actives contre des bactéries Gram négatives (Gong et *al.*, 2010). Des substances protéiques biologiquement actives sont produites au niveau du ribosome et codées par des gènes, la sécrétion de ces substances dans le milieu extracellulaire est assurée par un système de transfert (Tabasco et *al.*, 2009).

Le poids moléculaire, les propriétés biochimiques, l'origine génétique, ainsi que le spectre et le mode d'action des bactériocines diffèrent (Ruiz-Barba et *al.*, 2010).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont classées en quatre catégories. Il y a quatre classes (Klaenhammer, 1993) :

**Classe I.** Les antibiotiques sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, qui sont stables à la chaleur et qui renferment des acides aminés soufrés inhabituels formés posttraductionnellement, tels que la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. On peut les classer en deux catégories : la classe Ia qui regroupe des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés, et la classe Ib qui regroupe les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (Twomey et *al.*, 2002). De plus, certains antibiotiques sont composés de deux peptides qui agissent ensemble pour avoir une activité similaire à celle de la lactocin 3147. La (figure 03) présente les séquences et les structures d'un antibiotique de chaque type.

**Classe II.** Peptides de moins de 10 kDa, qui sont stables à la chaleur et ne renferment pas d'acides aminés altérés. Ils ont des points isolélectriques allant de 8 à 10.

Il y a trois sous-classes dans cette classe. La sous-classe IIa des bactériocines renferme entre 27 et 48 acides aminés. Toutes les bactériocines possèdent une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV, ainsi qu'un pont disulfure. De plus, une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile, détermine la spécificité d'action (Richard et *al.*, 2006). Toutes ont une capacité à lutter contre *Listeria monocytogenes*. Un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminal est également présent dans certaines bactériocines de cette sous-classe, ce qui semble jouer un rôle crucial dans la stabilisation de la structure tertiaire. De plus, il semblerait qu'il leur donnerait une activité antimicrobienne améliorée, une résistance accrue à l'exposition à des températures élevées et un spectre d'action plus étendu (Richard et *al.*, 2006).



empêche la formation de la paroi cellulaire, ce qui entraîne la mort des cellules. La cellule utilise ce lipide comme un support pour s'insérer dans la membrane et créer des pores, ce qui entraîne la dégradation de la cellule en raison de la dissipation du potentiel membranaire et de l'écoulement des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc.). Les réactions enzymatiques de la cellule, telles que la synthèse de la paroi, sont perturbées par la Mersacidine (Dortu et Thonart, 2009).

La structure  $\alpha$ -hélice amphiphile permet l'insertion des bactériocines de la classe II dans la membrane, ce qui entraîne une perméabilisation de la membrane et entraîne la mort cellulaire suite à l'écoulement des molécules à faible poids moléculaire.

#### **I.4. Production des bactériocines**

Les bactériocines sont produits à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance, puis elles peuvent être dégradées par les protéases produites par la bactérie productrice (Savijoki et *al.*, 2006) ou adsorbées à sa surface, ce qui entraîne une diminution de la concentration dans le milieu de culture. Plusieurs protéines participent à la production et à la régulation des bactériocines.

Les bactériocines sont synthétisées à partir d'un prépeptide non biologiquement actif qui sera modifié après la traduction pour devenir un peptide actif. Un système de Quorum Sensing est fréquemment utilisé pour contrôler cette production, ce qui permet d'exprimer certains gènes en fonction de la densité de la population bactérienne. L'expression de gènes situés soit sur le chromosome, comme la mersacidine (Altena et *al.*, 2000), soit sur un plasmide, comme la sakacine A (Axelsson et *al.*, 1995), soit sur un transposon, comme la Nisine .

##### **I.4.1. Facteurs influençant la production des bactériocines**

L'exploitation industrielle des bactériocines requiert de grandes quantités. Il est impossible d'atteindre cet objectif sans connaître et optimiser les facteurs qui influencent leur production, tels que la température, le pH, le milieu utilisé, etc. Ces circonstances culturelles Ils ont un impact significatif sur la production de bactériocines.

##### **I.4.2. - Température et pH**

Il est essentiel de prendre en compte la température et le pH lorsqu'il s'agit de produire des bactériocines. En général, elle est idéale à des températures et des pH inférieurs à ceux qui sont optimaux pour la croissance (Sharma et *al.*, 2010). Plusieurs recherches ont étudié l'impact de ces deux facteurs. La production de bactériocine par *Leuconostoc lactis* était donc optimale à une température de 30 °C et à un pH compris entre 6,5 et 7 ; cependant, elle est considérablement réduite à une température de 37 °C et à un pH de 5,5 et 8.0 (Dhakur et Roy, 2009). La production

de pédiocine LB-B1 par *Lactobacillus plantarum* LB-B1 était optimale à une température de 37 °C et à un pH de 6 (Xie et al. 2011).

La production maximale d'*Enterococcus faecium* PC4.1 se produit à une température de 30 °C et à un pH de 6 (HadjiSfaxi et al. 2011). La production de l'acidocine 8912 par *Lactobacillus acidophilus* était optimale à une température de 30 °C (Ahmed et al. 2010).

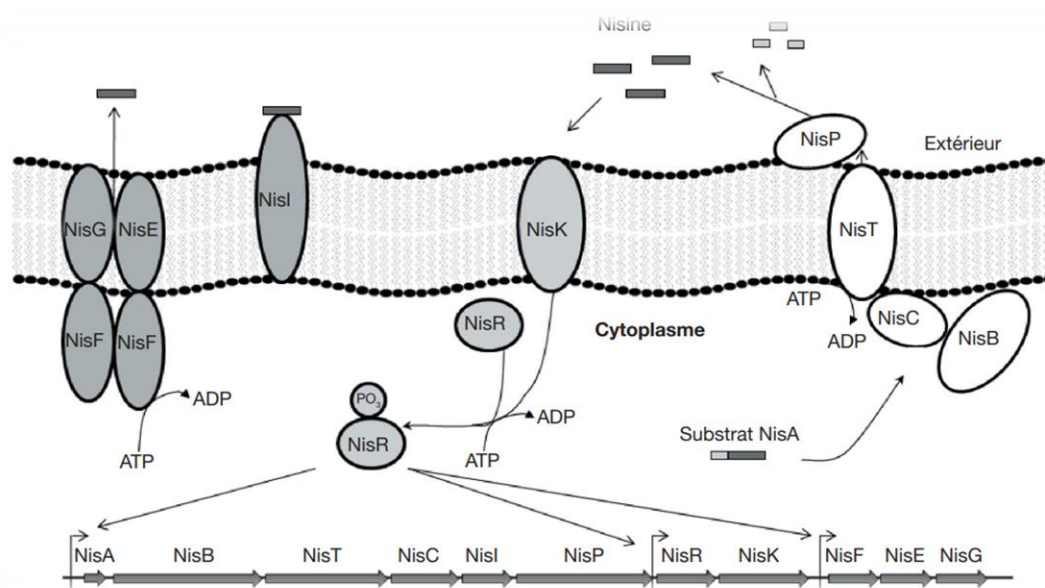


Figure 4. Mécanisme de production et de régulation des lantibiotiques (la nisine) (Dortu et Thonart, 2009).

### I.5. -Composition du milieu de culture

La production de bactériocines est fortement influencée par la composition du milieu de culture, notamment par la source et la quantité de carbone et d'azote. Les bactéries lactiques ont besoin de divers éléments nutritifs, tels que les facteurs de croissance, les peptones, l'extrait de levure, les hydrolysats de protéines et l'extrait de viande. Ces éléments ont une influence bénéfique sur la production de bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

Plusieurs milieux de culture complexes ont été employés pour isoler les bactéries lactiques bactériocinogènes, tels que le MRS (Xie et al., 2011) et le M17 (HadjiSfaxi et al., 2011). Néanmoins, l'Elliker est le meilleur environnement pour optimiser la performance des bactériocines (Thakur et al., 2009). Il a été rapporté que la production de bactériocines peut être optimisée en fortifiant le milieu de culture en ajoutant de l'extrait de levure (Elmoualdi et al., 2008).

On a observé une augmentation significative du taux de bactériocines ST461BZ et ST462BZ produites par *Lactobacillus rhamnosus* en ajoutant respectivement le K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> et le KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> au milieu (Todorv et Dicks 2005).

#### **I.5.1.1. Temps d'incubation**

Pendant la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire, les bactériocines sont synthétisées. Une baisse du taux de bactériocines a été constatée au-delà de cette période après la digestion de ces dernières par les enzymes protéolytiques libérées par l'usine de production. Ainsi, de nombreuses recherches ont été menées afin d'améliorer la durée d'incubation. La production de la plantaricine MG par *Lactobacillus plantarum* atteint son maximum après 28 heures d'incubation (Gong et ses collègues 2010). Après 16 heures d'incubation, on observe une production maximale de bacALP7 par *P. pentosaceus*, qui diminue de presque la moitié après 21 heures (Pinto *et al.*, 2009).

# **Chapitre II : partie pratique**

## Matériels et Méthodes

### II.1. Matériels

#### II.1.1. Matériels biologique

##### II.1.1.1. Le lait de vache

Les échantillons de lait de vache proviennent de la région de Msila.

Ce prélèvement a eu lieu dans 22 février 2024.

##### II.1.1.2. Les souches indicatrices pathogènes

Pour les tests d'activité antibactérienne, nous avons choisi 03 bactéries pathogènes (*Escherichia coli* ATCC2592, *Bacillus cereus* ATCC9372, *Enterococcus faecalis* ATCC25922) souches de référence. Ces dernières ont été fournies institut de pasteur d'Alger.

### II.2. Échantillonnage

Pour garantir un prélèvement aseptique des échantillons de lait directement à partir de la mamelle, certaines étapes sont essentielles :

On nettoie méticuleusement l'extérieur de la mamelle avec de l'eau et des gouttes de javel, puis avec de l'eau tiède, assécher la mamelle par une serviette propre ensuite Éliminer les premiers jets de lait, car ils sont souvent plus chargés en germes.

Avant la traite, il est impératif de se laver les mains soigneusement et de les sécher correctement. Les échantillons sont prélevés dans des flacons stériles de 50 ml, puis transportés rapidement dans une glacière à 4°C et transporté au laboratoire, nous utilisons l'échantillon le jour même. Cette procédure vise à prévenir toute contamination et altération de la microflore naturelle des échantillons.

#### II.2.1. Isolement

##### II.2.1.1. Préparation des dilutions

La dilution est une procédure visant à diminuer la concentration d'une substance dans une solution.

Pour ce faire, 1 ml d'échantillon est ajouté à un tube contenant 9 ml d'eau physiologie stérile

Après agitation au vortex, des dilutions décimales successives sont effectuées en cascade jusqu'à atteindre la dilution  $10^{-6}$  (Begloul, 2012).

À partir de l'échantillon de lait, nous avons réalisé des dilutions décimales initiales successives, couvrant les ratios de  $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$ .

### II.2.2. Culture en Milieu de Croissance

A méthode implique de verser 1 ml de dilution dans chaque boîte de Pétri (6 boîtes par dilution), suivie de la coulée de milieu en surfusion et de son homogénéisation par des mouvements en forme de 8. Une fois les milieux solidifiés (Badis et *al.*, 2005) :

Pour l'isolement des lactobacilles, 3 boîtes de Pétri de chaque série sont incubées à 37°C pendant 48 à 72 heures en anaérobiose sur milieu MRS.

Après plusieurs essais, seules les dilutions,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  sont retenues pour ensemercer le milieu de culture solide MRS ce milieu utilisé pour l'isolement du genre

*Lactobacillus* coulés en boîtes de Pétri. Ces dilutions permettent de repérer des colonies suffisamment séparées.

Le temps et la température d'incubation :

Incubation à 37°C pendant 72h pour l'isolement des espèces du genre *Lactobacillus* (Leveau et *al.*, 1991). Sur MRS

Les boîtes sont lues après 48 et 72 heures d'incubation.

### II.2.3. Lecture et interprétation:

Tableau 1. Le dénombrement des colonies

Volume de l'inoculum : 1 ml	Nombre d'UFC	
	1ère boîte	2ème boîte
Dilution $10^{-4}$	226	196
Dilution $10^{-5}$	46	54
Dilution $10^{-6}$	5	4

$$N = \frac{\sum C}{V[d_1 n_1 + d_2 n_2 + d_3 n_3 \dots]}$$

$N$  : le nombre des microorganismes d'UFC.

$\sum C$  : la sommes des colonies comptés sur les boites de pétrie.

$V$  : volume de suspension étalé en ml.

$n$  : nombre des boites exploitables (1 ou 2 dans ce cas).

$d$  : taux de dilution de la suspension étalé.

$$N = \frac{(226+196+46+54)}{1(10^{-4} \times 2 + 10^{-5} \times 2 + 10^{-6} \times 0)}$$

$$N = 2.4 \times 10^6 \text{ UFC/ml}$$

### II.2.3.1. Repicage des bactéries lactiques

Les bactéries ont été repiquées dans des tubes de bouillons MRS (Figure 5). Après 48 heures d'incubation à 37 °C, les tubes sont maintenus à +4 °C pendant une période de 2 semaines à un mois (Figure 5), (Bennai et Temine, 2017).

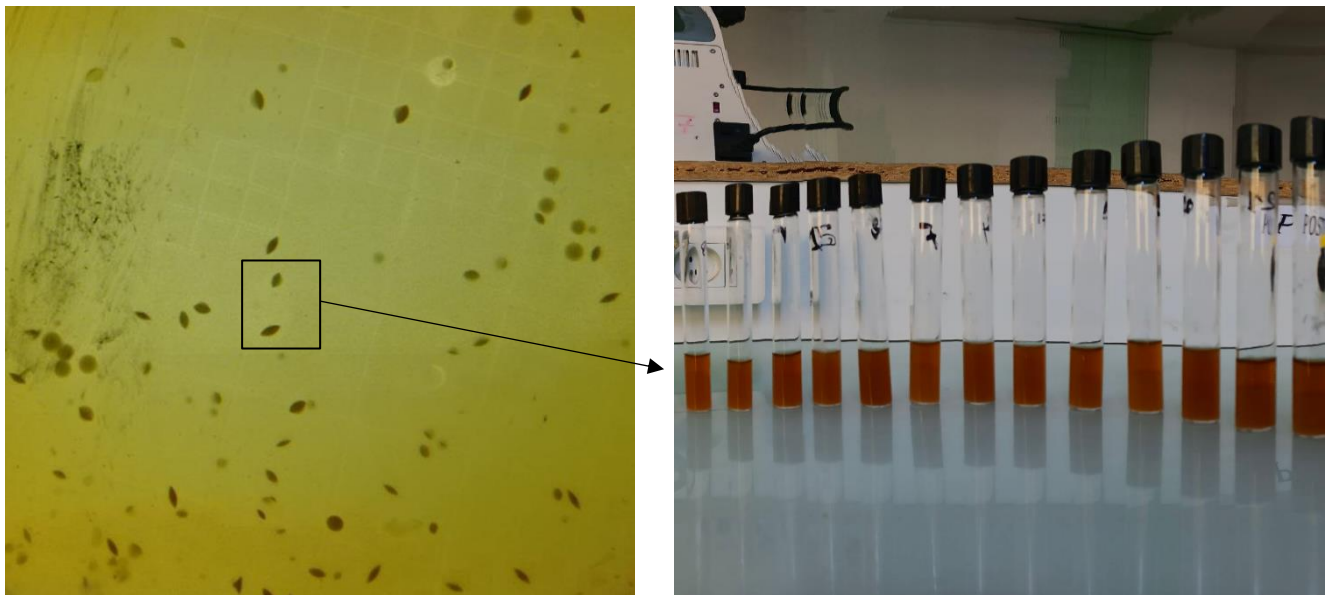


Figure 5. Repicage des bactéries lactiques dans un MRS liquide.

### II.2.4. Identification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont pré-identifiées en utilisant des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques tels que la forme, la coloration de Gram, la catalase, la croissance à différentes températures, la sensibilité au Na Cl, la fermentation des sucres et la production de CO<sub>2</sub>. (Lairini et *al.*, 2014).

#### II.2.4.1. Critère morphologique

- Analyse macroscopique : Il s'agit d'analyser la structure, l'apparence, le contour, la surface et la couleur des colonies dans les milieux et MRS.
- L'étude microscopique permet de déterminer certains traits morphologiques et organisationnels des bactéries : les coques ou les bacilles, leur organisation en chaînettes ou isolées, les bactéries Gram-positives ou négatives, ainsi que l'observation de la spore (Singleton, 1999). On détermine ces caractères en utilisant la méthode de coloration de Gram.

### II.2.5. Test catalase

Au cours de leur respiration aérobie, certaines bactéries génèrent du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), qui est extrêmement toxique. Grâce aux enzymes qu'elles produisent, telles que la catalase, certaines bactéries sont capables de le décomposer. La réaction suivante permet à cette enzyme de décomposer l'eau oxygénée :



L'objectif de ce test est d'identifier les bactéries lactiques (catalase-) et les entérobactéries (catalase+). Une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sont ajoutées à une colonie sur une lame. La réaction favorable se manifeste par la production immédiate de bulles de gaz (O<sub>2</sub>). (Marchal et *al.*, 1991).

- **Tous les isolats présumés comme bactéries lactiques (Gram positif et catalase négatif et non sporulées) sont conservés.**

### II.2.6. Les tests spécifiques

#### II.2.6.1. Températures de croissance:

L'importance de ce test réside dans sa capacité à distinguer les bactéries mésophiles de celles qui sont thermophiles. Par ailleurs, ce test offre également la possibilité de différencier les deux sous-genres homofermentaire du genre *Lactobacillus* : *Thermobacterium* et *Streptobacterium* (Lahtinen et *al.*, 2012).

Les tubes à essais, qui contiennent le milieu MRS, sontensemencés à l'aide d'une anse de platine bouclée, avec des souches présumées appartenir aux genres *Lactobacillus*. L'incubation est ensuite effectuée à des températures et des durées variables, selon les besoins expérimentaux.

Les lactobacilles 45°C\_ 15°C pendant 24 à 48 h.

#### **II.2.6.2. Type fermentaire:**

Ce test vise à distinguer les bactéries lactiques homofermentaire des hétérofermentaire en mettant en évidence la production de gaz, notamment le CO<sub>2</sub>, (Hassaine ,2013).

Onensemène de jeunes souches préalablement préparées dans des tubes contenant du bouillon MRS, avec une cloche de Durham. La présence ou l'absence de gaz dans la cloche après une incubation à 37°C pendant 24-48 heures détermine le type de fermentation (Hariri et *al.*, 2009).

#### **II.2.6.3. Profile Fermentaire Des Sucres:**

Ce test permet d'évaluer la capacité des souches à obtenir des sucres en fermentation. Afin d'accomplir cela, on utilise un bouillon MRS sans sucre qui contient du pourpre de bromocrésol (0.04 g/l) en tant qu'indicateur de pH, puis on ajoute 1% de sucres pour étudier. Ainsi, les cultures bactériennes ont étéensemencées en grande quantité dans le bouillon (Badis et *al.*, 2005). Après une incubation de 24 heures, le développement de la culture et le changement de couleur de l'indicateur indiquent la fermentation du sucre testé. Pour chaque environnement utilisé, on utilise un témoin sans sucreensemencé par les souches. On a effectué ce test sur 4 sucres en suivant les étapes suivantes :

On récupère le culot après centrifugation des milieux de culture jeun à 5000 pendant 15 min.

Les différents sucres sont ajoutés à 0,1 ml dans les tubes précédents : Maltose, Xylose, Mannitol et Saccharose (concentration de 2 %).

Les puits de microplaque précédemment rempli par MRS-BCP sont remplis de 0.1 ml de souches, puis on y ajoute une goutte d'huile de paraffine stérile pour favoriser l'anaérobiose. On incube à une température de 37 °C pendant 24 heures. (Guetouache *et al.*, 2021).

#### **II.2.7. Interaction bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes**

Nous avons opté pour la méthode de diffusion et la méthode des puits pour mettre en évidence la production de bactériocine par les bactéries lactiques. Cette méthode repose sur le principe que ces substances protéiques peuvent se diffuser dans un milieu de culture solide préalablement inoculé avec des souches pathogènes. (Oubekka, 2012).

Muller Hinton se trouve coincé dans des boîtes de pétri stériles. Une fois que le milieu est solidifié, les boîtes sontensemencées en surfaces grâce à la suspension de souches pathogènes (Tabak *et al.*, 2012).

Quatre puits sont créés par boîte de pétri avec trois répétitions à des moments différents. Ensuite, les puits sont remplis de 60 à 80 µl de surnageant obtenu après une centrifugation à 5000 tours/min, filtré et neutralisé par NaOH 0,1 N afin d'obtenir un pH de 6,5. Une incubation des boîtes à 37°C pendant 24 heures permet d'améliorer la diffusion des agents antibactériennes dans le milieu gélosé.

L'efficacité antibactériennes se manifeste par la formation de zones d'inhibition autour des puits. Les diamètres de ces zones seront évalués, et le test sera considéré comme positif si le diamètre de la zone d'inhibition dépasse de 2 mm une valeur de référence (Tabak *et al.*, 2012).

### **II.2.8. Méthode préliminaire**

Ce test d'antagonisme est réalisé pour déterminer si les souches de bactéries lactiques produisent des substances antibactériennes. Des spots de 5 µl sontensemencés sur gélose MRS et séchés partiellement sous une flamme de bec Bunsen pour obtenir quatre spots identiques par boîte. Ces boîtes sont ensuite séchées à proximité de la flamme de bec Bunsen pendant 30 minutes. L'incubation se déroule en anaérobie à 37°C pendant 24 heures. Après cette période, les boîtes sont recouvertes de 10 ml de gélose Muller Hinton inoculée avec 1 ml d'une pré-culture de 18 heures de chaque souche pathogène (*E. coli*, *Bacillus*, *Enterococcus*). Après 24 heures d'incubation à 37°C des souches inhibitrices (souches lactiques) et indicatrices (souches pathogènes), les boîtes sont examinées afin de détecter les zones d'inhibition autour des spots, et le diamètre de ces zones est mesuré (Fleming *et al.*, 1975).

# **Chapitre III : Résultats et Discussion**

## chapitreIII. **Résultat et discussion**

### III.1. Analyse microbiologique de lait cru de vache

Les résultats des analyses microbiologiques sont représentés comme suit :

### III.2. Dénombrement les Bactéries lactique

Les résultats montrent que le lait cru de vache analysé est très riches en bactéries lactiques. Ils sont exprimés en UFC/ml et en UFC/g.

#### III.2.1. Dénombrement des *lactobacilles*

On effectue les dénombrements sur une gélose MRS solide à un pH de 5,6. La synthèse des résultats de dénombrement des *lactobacilles* dans gélose MRS est présentée dans le (tableau 02) et (Figure 06).

Tableau 2. Résultats de la numération de la microflore cultivable du lait cru de vache <Milieu MRS >

<b>Flore UFC/ml <i>Lactobacilles</i></b>
<b>Résultat <math>2.4 \times 10^6</math> UFC/ml</b>
<b>Origine lait cru de vache</b>
<b>Mode d'emploi Ensemencement en profondeur</b>
<b>Incubation 37°C pendant 24H-72H</b>

Les *lactobacilles* ont la capacité de procéder à une fermentation lactique (production d'énergie anaérobie) qui, en présence de glucides, entraîne la formation d'acide lactique. Ainsi, la croissance et la reproduction des lactobacilles dans l'environnement, qui constitue pour elles un élément essentiel. Milieu riche en nutriments.

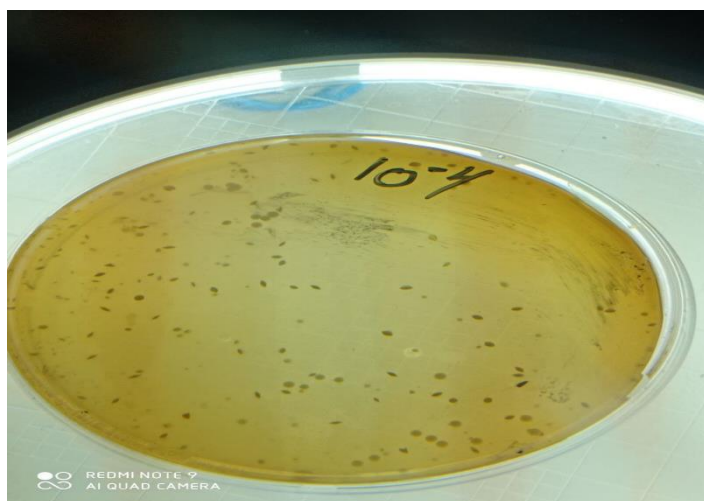


Figure 6. Dénombrement des lactobacilles dans un milieu MRS à une température de 37°C.

Dans des conditions stériles, des colonies individuelles de la souche de lactobacilles ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile. Ces colonies ont été ensemencées dans dix tubes contenant du milieu MRS stérile. Chaque colonie a été placée dans un tube distinct. Le repiquage du milieu MRS a été effectué pour permettre aux colonies de proliférer à une température de 37 °C pendant une période de 24 heures. Le résultat a la (Figure 07).



Figure 7. Aspect macroscopique des colonies de Bactérie lactique sur milieu MRS liquide.

### III.2.2. Examen macroscopique

Après 24 heures d'incubation, l'examen macroscopique des cultures en milieu liquide a révélé que tous les isolats présentaient un trouble homogène, ce qui indique une croissance satisfaisante (Figure 07).

### III.2.3. Examen microscopique

Après avoir réalisé la coloration de Gram et l'observation des cellules microscopiquement, il est constaté que les souches isolées présentent un Gram positif, avec des bâtonnets (Figure08) ou des coccobacilles disposés en chaînette plus ou moins longue.

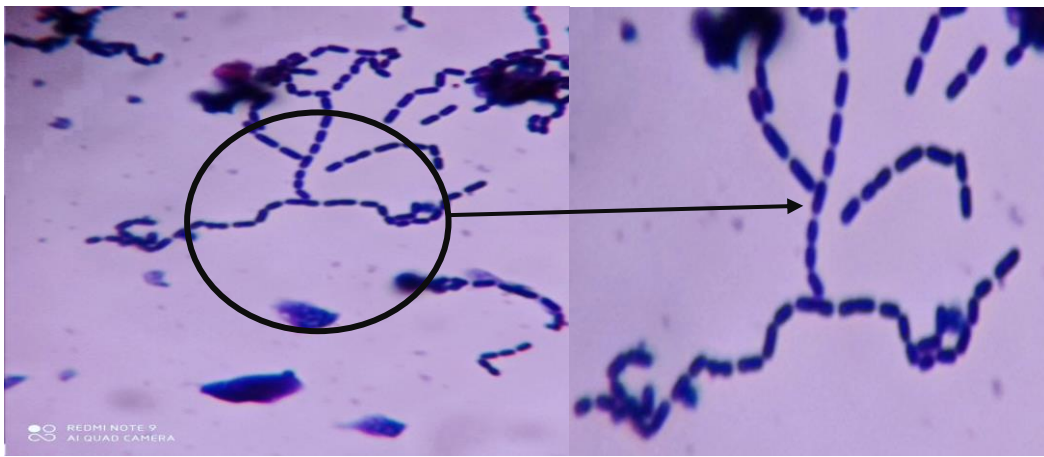


Figure 8.: les formes obtenues observées au microscope optique au grossissement ( $\times 100$ ).

### III.2.3.1. Test de catalase

Parmi les 24 isolats examinés, seuls 10 ont été sélectionnés pour l'analyse de la catalase, étant donné leur réaction positive à la coloration de Gram. Ces isolats n'ont pas produit d'effervescence lorsqu'une goutte de  $H_2O_2$  a été ajoutée, ce qui indique l'absence d'activité catalasique chez ces bactéries.

Étude de (Carr et *al.* 2002) : Cette étude a également utilisé des tests morphologiques, physiologiques, et biochimiques pour identifier des souches de bactéries lactiques. Les résultats sont en accord avec nos observations, montrant que les bactéries lactiques sont catalase négative.

### III.2.3.2. Températures de croissance

Les résultats de ce test sont mentionnés dans le (Tableau 03) comparativement à un tube témoin non ensemencé (Figure 9).

Tableau 3. Résultats de croissance (test de température)

Souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
T°										
15°C	±	-	-	±	-	-	-	-	+	-
45°C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+

(+) : fait une croissance (-) : pas de croissance (±) : faible croissance

Le test de température indiquent que certains isolats (S1, S4, S9) sont des bactéries mésophiles, tandis que d'autres (S1, S3, S4, S9, S10) sont thermophiles. Ces résultats montrent une diversité d'adaptation thermique parmi les isolats, ce qui pourrait avoir des implications pour leur utilisation

industrielle. Par exemple, les bactéries mésophiles pourraient être plus adaptées à des environnements de fermentation à basse température, alors que les thermophiles pourraient être utiles dans des processus nécessitant des températures plus élevées.

Une étude menée par (Hammes et Hertel 2009) a trouvé des résultats comparables, avec des isolats de lactobacilles montrant des adaptations thermiques variées, ce qui est important pour leurs applications industrielles. De même, l'étude de (Ricciardi et Clementi 2000) a observé une distribution similaire des mésophiles et thermophiles dans des environnements alimentaires.

. Les résultats de notre étude sont en ligne avec ces observations, indiquant une cohérence avec les données précédemment publiées.



Figure 9.: Résultats de croissance à différentes températures (15°C et 45 °C).

### III.2.3.3. Type fermentaire

Le test de fermentation a révélé que six souches de lactobacilles sont homofermentaire (absence de dégagement de gaz) et quatre sont hétérofermentaire (présence de gaz). Cette distinction est

importante pour les applications industrielles, car les souches homofermentaire sont souvent préférées pour produire des produits laitiers fermentés sans gaz, tandis que les hétérofermentaire peuvent être utilisés pour des produits où le dégagement de gaz est souhait Figure11. Les résultats de l'étude du pouvoir fermentaire sont mentionnés dans le (tableau 04) et (Figure 10).

Tableau 4.resultsats de test de fermentation

Souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Type de fermentation	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-

(+) : hétérofermentaire (-) : homofermentaire

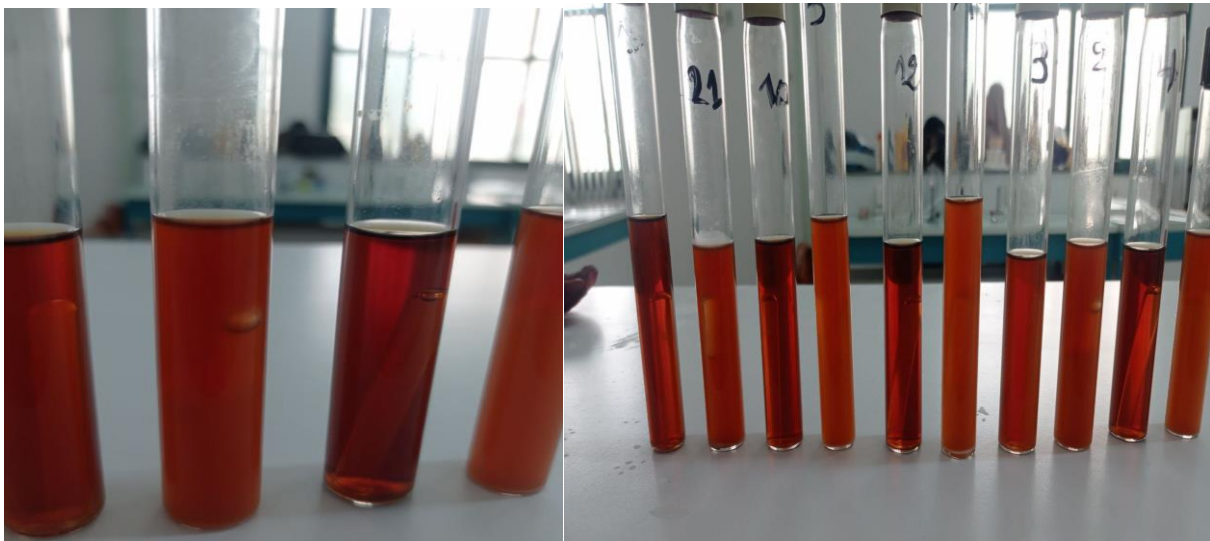


Figure 10.Résultats de type fermentaire des souches LB (MRS).

Les études montrent généralement que les lactobacilles homofermentaires sont souvent plus nombreux que les hétérofermentaires dans des échantillons provenant de produits laitiers et autres aliments fermentés. Par exemple, (Axelsson, 2004) a trouvé une majorité de souches homofermentaires dans les produits laitiers traditionnels. Les proportions observées dans Notre étude correspondent bien à celles rapportées dans ces études spécifiques, ce qui renforce la crédibilité de nos observations.

#### III.2.3.4. Profil Fermentaire Des Sucres

Ce test est réalisé sur les huit souches des *lactobacilles* par utilisation de quatre types de sucres (Maltose, Mannitol, Xylose, Saccharose), le résultat est présente dans le (tableau 05) suivant :

Tableau 5. Résultat de test profil fermentaire des sucres

<i>Souche</i>	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	<i>S5</i>	<i>S6</i>	<i>S7</i>	<i>S8</i>
<i>Mannitol</i>	+	+	+	±	+	+	±	+
<i>Xylose</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Maltose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharose</i>	+	-	+	+	+	+	±	+

(+) : Réaction positive (-) : Réaction négative (±) : Réaction intermédiaire

L'utilisation de quatre types de sucres (maltose, mannitol, xylose, saccharose) a montré une variation dans la capacité de fermentation des différentes souches. La majorité des souches ont montré une réaction positive pour le maltose et le saccharose, tandis que seules certaines ont montré une fermentation du mannitol et aucune pour la xylose. Ces résultats suggèrent que les lactobacilles ont des préférences spécifiques pour certains types de sucres, ce qui peut influencer leur application dans la production de divers produits fermentés.

De nombreuses études montrent que les lactobacilles ont une forte capacité à fermenter le maltose et le saccharose. Par exemple, (Hammes et Hertel 2009) ont trouvé que la plupart des souches de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus casei* fermentent efficacement ces sucres. De même, (Axelsson 2004) note que ces sucres sont couramment métabolisés par les lactobacilles en raison de la présence d'enzymes spécifiques qui décomposent le maltose et le saccharose.

Le mannitol est fermenté par certaines souches de lactobacilles, mais pas toutes. (Ammor et Mayo 2007) ont observé que des souches spécifiques comme *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus fermentum* peuvent fermenter le mannitol, tandis que d'autres ne le peuvent pas. Cette variation est attribuée aux différences génétiques et enzymatiques entre les souches.

La fermentation du xylose par les lactobacilles est rare. (Ricciardi et Clementi 2000) ont rapporté que très peu de souches de lactobacilles possèdent les enzymes nécessaires pour métaboliser la xylose. Par conséquent, la fermentation de la xylose est peu courante.

Nos résultats montrant que la majorité des souches fermentent le maltose et le saccharose, que seules certaines fermentent le mannitol, et qu'aucune ne fermente la xylose, sont cohérents avec les observations d'autres études similaires. Cette cohérence renforce la fiabilité et la pertinence de nos méthodes et résultats, confirmant que les lactobacilles ont des préférences spécifiques pour

certain types de sucres, influençant ainsi leur application dans la production de divers produits fermentés.

### III.2.3.5. Interaction des bactéries lactiques vis à vis des bactéries pathogène

#### V.1.3.5.1.Methode préliminaire

Nos résultats indiquent que quelques souches des *Lactobacilles* isolées a présenté un effet inhibiteur marqué envers les trois souches pathogènes, se traduisant par la formation de zones claires avec des bordures bien définies. (Figure 11).

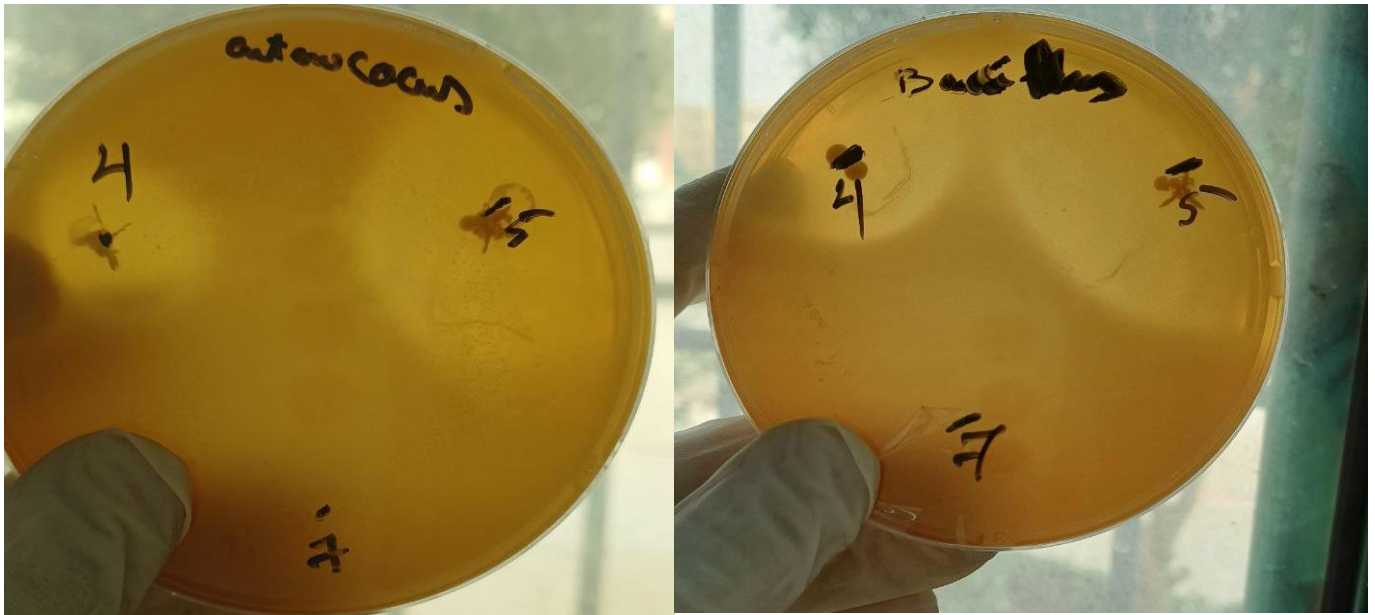


Figure 11.interaction des bactéries lactique vis à vis des bactéries pathogènes.

### III.2.3.6. Mise en évidence de la production de bactériocines

Dans cette méthode, on a testé les huit souches lactiques qui ont une activité antibactériennes pour éprouver leurs pouvoirs de sécréter des substances de natures protéiques (bactériocine) contre les souches pathogènes testées.

Les tests sur l'activité antibactériennes ont montré que les six à partir de huit souches de lactobacilles trouvées dans le lait cru traditionnel produisent des substances inhibitrices qui peuvent empêcher la croissance des trois bactéries pathogènes trouvées. L'interaction entre ces souches de lactobacilles et les germes cibles a révélé la formation de zones claires autour des souches de lactobacilles, indiquant une inhibition de la croissance des germes cibles. Le resultat est présente dans la (Figure 12).



Figure 12.interaction des bactériocines des bactéries lactique vis à vis des bactéries pathogène.

Tableau 6.le Diamètre de la zone d'inhibition des lactobacilles inhibitrices contre bactéries Pathogènes par la méthode de diffusion des puits.

diametre Souches	E.COLI	BACILLUS	ENTEROCOCUS
S2	1,1cm	0,8cm	1,4cm
S4	1,2cm	0,7cm	1,6
S5	0,8cm	0,5cm	1,8cm
S6	1,3cm	0,9cm	1,6cm
S7	0,9cm	1,6cm	1,3cm
S8	1,1cm	0,8cm	0,8cm

(Tableau 06) montre que : Toutes les souches pures du genre *Lactobacillus* ont démontré des zones d'inhibition significatives contre (*E. coli*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*), avec des diamètres compris entre 0,5± 1,8 cm. Selon ces résultats, *Lactobacillus* est capable de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne, efficaces contre les bactéries pathogènes à Gram négatif.

Plusieurs souches de *lactobacilles*, notamment *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus plantarum*, peuvent inhiber la croissance d'*E. Coli* en produisant des substances antimicrobiennes telles que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et des bactériocines (Bernbom et al., .2009).

Étude (d'Ogunbanwo et al., 2003) : Ils ont observé que les *lactobacilles* isolés de produits fermentés inhibent *E. coli* par la production de bactériocines.

*Lactobacillus* et *Lactobacillus curvatus* peuvent inhiber *Bacillus cereus* grâce à la production de bactériocines et d'acides organiques. (Pidcock et al., .2002)

Selon (Mathara et al., 2008) : Ils ont observé que des *lactobacilles* isolés de produits laitiers fermentés peuvent inhiber la croissance de *Bacillus cereus* par la production de substances antimicrobiennes. *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus acidophilus* peuvent inhiber *Enterococcus faecalis* grâce à la production de reuterine et d'autres composés antimicrobiens.

(Gänzle et al., 1999) ; (Stiles et Holzapfel 1997) Ils ont trouvé que les lactobacilles produisent des acides organiques et des peptides antibactériennes capables d'inhiber la croissance d'*Enterococcus faecalis*.

Nos résultats indiquant que certaines souches de *lactobacilles* isolées présentent un effet inhibiteur marqué envers les trois souches pathogènes (*E. coli*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) sont cohérents avec les observations d'autres études similaires. La formation de zones claires avec des bordures bien définies autour des souches pathogènes en présence des *lactobacilles* est un indicateur fiable de la production de substances antimicrobiennes par ces bactéries lactiques. Cela renforce la pertinence et la fiabilité de nos résultats, confirmant le potentiel des *lactobacilles* comme agents de biocontrôle dans des applications industrielles et alimentaires.

Tableau 7. critères d'identification des isolats lactique du groupe de *lactobacillus*

Souches Test	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Forme</b>	Bat	Bat	Bat	Bat	Bat	Bat	bat	Bat	Bat	Bat
<b>catalase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Type fermentaire</b>	homo	het	het	homo	het	homo	homo	het	homo	homo
<b>Croissance à 45°C</b>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<b>Croissance à 15°C</b>	±	-	-	±	-	-	-	-	+	-

**Bat** : Bâtonnet **Het** : Hétérofermentaire + : Résultat positif - : Résultat négatif

# **Conclusion**

## Conclusion

Les bactéries lactiques, également connues sous le nom de bactéries de l'acide lactique, sont des micro-organismes présents dans divers environnements, notamment dans le sol, les plantes, les aliments fermentés et le tractus gastro-intestinal des animaux. Ces bactéries ont la capacité de fermenter le lactose, un sucre présent dans le lait, pour produire de l'acide lactique. Elles sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire pour la production de produits fermentés, ainsi que pour la conservation des aliments.

Après une recherche approfondie sur nos souches des bactéries lactique isolée Nos analyses ont révélé que les isolats identifiés appartiennent principalement au genre des lactobacilles (bacille, Gram positive, catalase négative), Cette découverte est particulièrement prometteuse car les lactobacilles sont reconnus pour leur potentiel probiotique et leur capacité à produire des composés antibactériennes.

En outre, nos résultats de chaque test de (type fermentaire, profil fermentaire des sucres, température de croissance) suggèrent que le type des isolats identifiée est *lactobacilles*.

Nos expériences ont démontré que les souches de bactéries lactiques isolées, ainsi que les bactériocines qu'elles produisent, ont la remarquable capacité d'inhiber l'action de certains germes pathogènes, notamment (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis*) En formant des zones d'inhibition autour des spots et le diamètre de ces zones est mesuré.

En conclusion, cette étude a contribué à une meilleure compréhension de la diversité microbienne présente dans le lait cru de vache de la région de Msila et de son potentiel pour la production de substances antimicrobiennes. Ces résultats ouvrent la voie à de futures recherches visant à explorer davantage les applications potentielles de ces bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, ainsi que dans d'autres domaines connexes de la biotechnologie.

# **Références Bibliographiques**

## Références Bibliographiques

- Aboutayeb, r. (2009). Technologie du lait et derives laitiers.
- Adam, g. (2014). Les bacteries pathogenes d'origine hydrique de l'epidemiologie a la prevention : etude bibliographique.
- Aliments-technologie des produits alimentaires tec et doc, lavoisier : 17 (456 pages).
- Amiot j., fourner s., lebeuf y., paquin p., simpson r et turgeon h., (2002)
- Amiot, j., lapointe-vignola, c. (2002). Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses intl polytechnique, quebec. 600.
- Ammor m.s., mayo b. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional
- Asaduzzaman, m. S. Et sonomoto, k. (2009). Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. J. Biosci. Bioeng., 107 (05), 475-487.
- 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.
- Baafou, z. E. O., & bourdache, t. (2017). Pouvoir antimicrobien des souches lactiques thermoresistantes isolees a partir de lait de chamelle fermente vis-a-vis des bacteries pathogenes (doctoral dissertation, universite kasdi merbah ouargla).
- Badis, a., laouabdia-sellami, n., guetarni, d., kihal, m., ouzrout, r. (2005). Caracterisation phenotypique des bacteries lactiques isolees a partir de lait cru de chevre de deux populations caprines locales «arabia et kabyle». Sci. Technol., 23: 30-37.
- Badis, a.n., laouabdia-sellami, d., guetarni, m., kihal. And ouzrout, r. (2005). Caracterisation phenotypique des bacteries lactiques isolees a partir de lait cru de chevre de deux populations caprines locales «arabia et kabyle». Sci. Technol 23: 30-37.
- Bernbom, n., licht, t. R., brogren, c. H., jelle, b., johansen, a. H., badiola, i., ... & nørnung, b. (2006). Effects of lactococcus lactis on composition of intestinal microbiota: role of nisin. Applied and environmental microbiology, 72(1), 239-244.
- Bernbom, n., ng, y. Y., jørgensen, r. L., arpanaei, a., meyer, r. L., kingshott, p., ... & gram, l. (2009). Adhesion of food-borne bacteria to stainless steel is reduced by food conditioning films. Journal of applied microbiology, 106(4), 1268-1279.

- Boulouf, a. (2016). Etude du pouvoir technologique de quelques bacteries lactiques du fromage traditionnel "bouhezza", memoire de magister en science alimentaire, universite des frere mentouri constantine, constantine.
- Boumehira, a.z. (2010). Identification et caracterisation technologique et fonctionnelle des souches lactobacillus plantarum isolees du lait cru de chevre et de chamelle. Memoire de magister en microbiologie fondamentale et appliquee. Universite droran.
- Boutonnier, j.l. (2008). Matiere grasse laitiere composition, organisation et
- Brulé, d. J. (2008). Congress, presidential approval, and us dispute initiation. Foreign policy analysis, 4(4), 349-370.
- Bylund g. (1995). Dairy processing handbook-tetra pak processing systems ab s- 2218
- 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
- Curk, m.c., peladan, f., hubert, j.c. (1993). Caracterisation biochimique des lactobacilles brassicoles. Lait, 73: 215-231.
- De la dietetique, tec et doc, lavoisier : 10-14 (397 pages).
- De la dietetique, tec et doc, lavoisier : 10-14 (397 pages).
- De man, j. C., rogosa, m.,et sharpe, m. E. (1960). A medium for the cultivation of
- Dellaglio, f., deroissart, h., torriani, s., curk, m. C., janssens, d. (1994). Caracteristiques generales des bacteries lactiques. Deroissart, h. Et luquet, f. M., lorica uriage, france.
- Dorti, c. (2008). Isolement des bacteries lactiques produisant de la sakacin g et utilisation sur des matrices alimentaires, these doctorat en sciences agronomiques non publiee, universite de gembloux, belgique.
- Dortu, c. (2008). Isolement drune bacterie lactique produisant de la sakacin g et utilisation sur des matrices alimentaires wallonie-europe. Doctorat : 155.
- Dortu, c. And thonart, p. (2009). Les bacteriocines des bacteries lactiques : caracteristiques et biotechnol. Agron. Soc. Environ 13: 143-154.
- Editeurs, centre regional de la documentation pedagogique d'aquitaine : 11(270 pages).
- Edition presses internationales polytechnique, canada. Pp. 3-75.

- 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.
- Fredot, e. (2005). *Connaissance des aliments-bases alimentaires et nutritionnelles*
- Fredot, e. (2005). *Connaissance des aliments-bases alimentaires et nutritionnelles*
- 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
- Ganzle, m. G., höltzel, a., walter, j., jung, g., & hammes, w. P. (2000). Characterization of reutericyclin produced by *lactobacillus reuteri* lth2584. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4325-4333.
- Gaya, p., peirotén, á., medina, m., álvarez, i., & landete, j. M. (2018). *Bifidobacterium pseudocatenulatum* inia p815: the first bacterium able to produce urolithins a and b from ellagic acid. *Journal of functional foods*, 45, 95-99.
- Goursaud, j. (1985). *Composition et proprietes physico-chimiques. Dans laits et*
- 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.
- Guo, z. D., wang, z. Y., zhang, s. F., li, x., li, l., li, c., ... & chen, w. (2020). Aerosol and surface distribution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in hospital wards, wuhan, china, 2020. *Emerging infectious diseases*, 26(7), 1586
- Hammes, w. P. Et hertel, c. (2009).the genera *lactobacillus* and *carnobacterium*. Chap.1.2.10.in *prokaryotes*. 4: 320-403.
- Hardie, j.m. Et whiley, r.a. (1997). Classification and overview of the genera *streptococcus* and *enterococcus*. *J appl microbiol symposium supplement* 83: 1-11.
- 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). *Caracteristiques d'interets technologiques de souches de bacteries lactiques isolees de lait camelin du sud algerien, these de doctorat en boitechnologie, universite d'oran es-senia, oran.*

- Hermier, j., lenoir, j. Et weber, f. (1997). Role des bacteries lactiques dans la production des facteurs anti microbien, les groupes microbien d'interet laitier.
- Ho, t.n.t., tuan, n., deschamps, a. Et caubet, r. (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (lab) of the nem chua fermented meat product of vietnam. Int.
- Hove, h., nørsgaard, 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.
- Jeantet, r. (2007). Croguennec t., schuck p. Et brule g. Science des
- Kang, k.h., shin, h.j., park, y.h .and lee, t.s. (1989). Studies on the antibacterial substances produced by lactic acid bacteria: purification and some properties of antibacterial substance  $\gamma$ -bifilong $\gamma$  produced by *B. Longum*. Korean dairy sci 1: 204f16.
- Klein, g., pack, a., bonaparte, c. Et reuter, g. (1998).taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int j food microbiol 41: 103f125.
- König, h et fröhlich, j developpement de methodes permettant la detection et la quantification de microorganismes d'alteration du vin. - paris : universite de bourgogne de microbiologie et parasitologie, 2017. : vol. 225, pp.3-41.
- König, h. Et fröhlich, j. (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springerverlag, berlin heidelberg.
- Lactobacili. J.appl. Bacteriol, 23, 130-135.
- 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 newyork.
- Lairini, s., beqqali, n., bouslamti, r., belkhou, r., zerrouq, f.( 2014). Isolement des bacteries lactiques a partir des produits laitiers traditionnel marocains et formulation d'un lait fermenté proche du kefir, afrique science, 10(4), 267-277.
- Lechardeur, d. (2011). Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. Curr opin biotechnol 22: 143-9.
- Leveau j.y., bouix m., deroissart h. (1991). La flore lactique. In : techniques d'analyse et de controle dans les industries agroalimentaire. Vol 2. Ed .tech
- Mahi, m. (2010). Etude technologique des bacteries lactiques isolees a partir du lait de brebis. Memoire de magister. Microbiologie alimentaire. Universite droran.

- Makhloufi, k. M. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv) mc auliffe 61 et al (2001). In *bacteriocins: biological tools for bio preservation and shelf-life extension*. International dairy journal .2006.
- 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.
- Mathara, j. M., Schillinger, u., Guigas, c., Franz, c., Kutima, p. M., Mbugua, s. K., ... & Holzappel, w. H. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. From traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *International journal of food microbiology*, 126(1-2), 57-64.
- Mechai, a.b. (2009). Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques. Thèse doctorat biochimie. Université Badji-Mokhtar- Annaba. 2009.
- Moraes, m.p., Perin, l.m., Ortolani, m.b.t., Yamazi, a.k., Viçosa, g.n. And Nero, l.a. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic." *Food Sci. Technol* 43: 1320-1324.
- 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.
- Ogunbanwo, s. T., Sanni, a. I., & Onilude, a. A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* f1 and *Lactobacillus brevis* og1. *African journal of biotechnology*, 2(8), 219-227.
- Oubekka d. (2012). Dynamique réactionnelle d'antibiotique au sein des bios films de *Staphylococcus aureus* apport du microscope de fluorescence multimodale. Institut des sciences moléculaire d'Orsay (ISMO) UMR 8214 bâtiment 201 – université Paris Sud 11 - 91405 Orsay.
- 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.
- Pidcock, k., Heard, g. M., & Henriksson, a. (2002). Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International journal of food microbiology*, 76(1-2), 75-81.

- Pougheon, s., et goursaud, j. (2001). Le lait caractéristiques physicochimiques in debry g., lait, nutrition et sante, tec et doc, paris : 6(566 pages).
- 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
- Produits laitiers vache, brebis, chevre. Tome 1 : les laits de la mamelle a la laitiere. Luquet f.m. Edition tec et doc lavoisier, paris.
- Proprietes. Dans techniques de l'ingenieur, traite agroalimentaire (f 6320), paris.
- Rheotest, m. (2010). Rheometre rheotest® rn et viscosimetre a capillaire rheotest® lk –produits alimentaires et aromatisants
- Ricciardi, a., & clementi, f. (2000). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structure, production and technological applications. Italian journal of food science, 12(1), 23-45.
- Saad, n. (2010).caracterisation drentites moleculaires de surface impliquees dans la relation de la bacterie probiotique lactobacillus plantarum 299v avec lrhote : approche in vitro. These doctorat. Biologie et sante. Universite limoge.
- Salminen, s., wright, a. V., ouwehand, a. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel dekker. Inc., u.s.a.
- Salminen, s., wright, a. V., ouwehand, a. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel dekker. Inc., u.s.a.
- Singleton, p. (1999). Bacteriologie, 4eme edition, dunod, paris. 317 pages
- Soule, m. H. (1932). Identity of bacillus subtilis, cohn 1872. The journal of infectious diseases, 191-215.
- Starter cultures in dry sausage production, an update. Meat science, 76: pp138-146
- Stiles, m. E., & holzapfel, w. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International journal of food microbiology, 36(1), 1-29
- Stiles, m.e. And holzapfel, w.h. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int j food microbiol 36: 1f29.
- Tabak s., bensoltane a. (2012). L'activite antagoniste des bacteries lactiques (streptococcus thermophilus, bifidobacterium bifidum et lactobacillus bulgaricus) revue « nture & technologie » .n° 06 : pp71 -79.

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.

The Babcock Institute Publications, University of Wisconsin-Madison, 1-28.

Thieulin, G., et Vuillaume, R. (1967). *Éléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait de produits laitiers et des œufs*-revue générale des questions laitières 48 avenue, président Wilson, Paris : 71-73 (388 pages).

Ubi. (2010). Transaction d'Algérie [online], available : <http://transactiondalgerie.com/>.

Van Houte, J., Gibbons, R. J., and Pulkkinen, A. J. (1972). Ecology of human oral lactobacilli, *Infection and Immunity*, 6(5), 723-729.

Vierling, E. (2003). *Aliment et boisson-filière et produit*, 2ème édition, Doin.

*Naturalist*, 142(2), 401-409.

# **Annexes**

## Annexes

### Annexe 1 : Composition des milieux de cultures (g/l)

#### 1. Milieux solides

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

Ingrédients	Composition g/l
Peptone	10,0 g
Extrait de viande	10,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	20,0 g
Acétate de sodium	5,0 g
Citrate d'ammonium	2,0 g
Tween 80	1,0 ml
Phosphate dipotassique	2,0 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	0,05 g
Agar Agar bactériologique	15,0 g

Ph du milieu prêt à l'emploi a 25 °C : 5,7 ±0,1

Autoclavage : 121 °C pendant 20 minutes.

**Gélose nutritif (GN) :**

Ingrédients	Composition g/l
Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2G
Na Cl	5g
Agar	15G
Eau distillée	1000ml

Ph =7

**2. Milieux liquides****Eau physiologie**

Ingrédients	Composition g/l
Na Cl	09g
Eau distillée	1000ml

**Solution de NaOH**

Ingrédients	Composition g/l
Eau distillé	1000ml
NaOH 40g	40g

**Solution de HCL**

Ingrédients	Composition g/l
Eau distillé	100ml
HCL	4ml

**Eau physiologie**

Ingrédients	Composition g/l
Na Cl	9g
Eau distillée	1000 ml

**Bouillon MRS**

Ingrédients	Composition g/l
Peptone	10,0 g
extrait de levure	5,0 g
Acétate de sodium	2,0 g
Citrate d'ammonium	2,0 g
Tween 80	1,08 ml
sulfate de magnésium	0,2 g
sulfate de manganèse	00,05 g

ph du milieu prêt à l'emploi a 25 °C : 5,7 ±0,1

Autoclavage : 121 °C pendant 20 minutes .

**Bouillon MRS\_BCP :**

Ingrédients	Composition g/l
Peptone	10,0 g
Extrait de levure 5,0 g	5,0 g
Acétate de sodium	2,0 g
Citrate d'ammonium	2,0 g
Tween 80	1,08 ml
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	00,05 g
Eau distillée (q.s.p)	1000ml

Autoclavage : 121 °C pendant 20 minutes.

PH du milieu pret à l'emploi à 25°C : 7.0

**Bouillon nutritif**

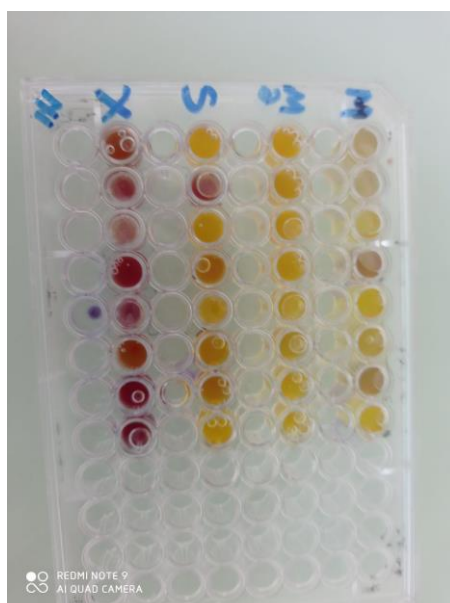
Ingrédients	Composition g/l
Peptone A	10g
Extrait de bœuf	10g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml

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

Annexe 2 : les photos



Lait cru



Microplaque



Microscope optique



Centrifugeuse



Plaque chauffante



Balance



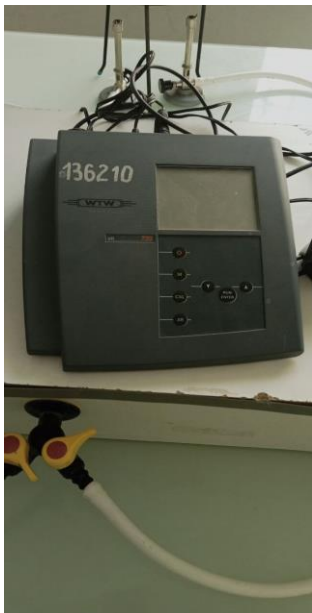
Incubateur



vortex



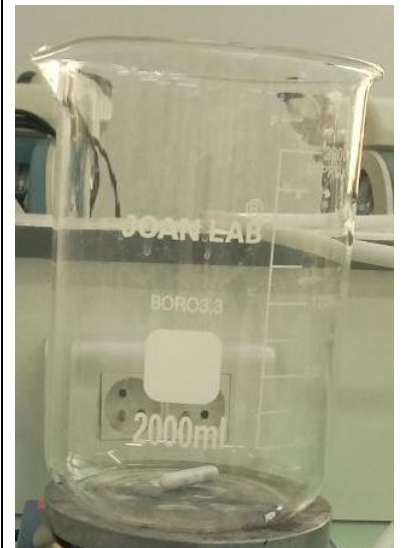
autoclave



Ph mètre



Bec benzen



Becher



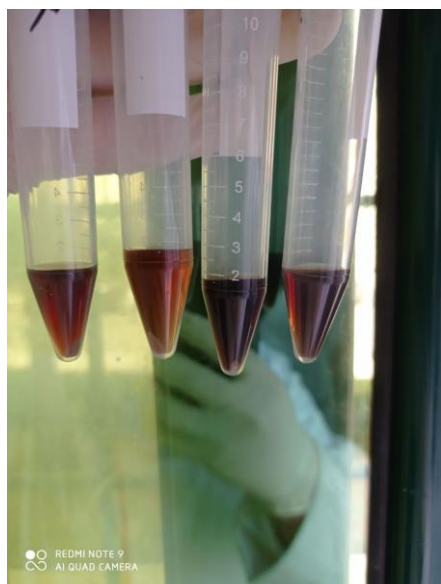
Solution pour coloration de gram



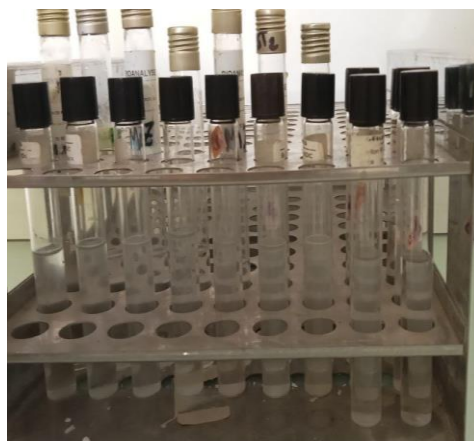
Bain mari



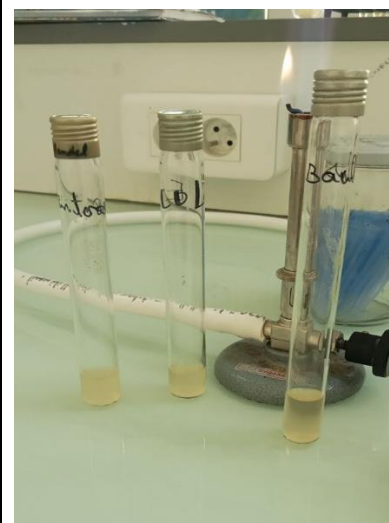
Produit de préparation de milieu



Tube a centrifugeuse



Tubes à essai



les souches pathogènes

**Verrerie :**

Tubes à essai

Béchers 500 ml

Béchers 2L/2000ml

Lames et lamelles

Pipette graduée

Pipette pasteur

Verre de montre

Tube à centrifugeuse

**Outils :**

Anse de platine

Portoirs des tubes essai

Bec bunsen

Boite de pétri

Pince

Spatule

Huile à immersion

Papier para film

Micropipette 100µl à 1000µl

**Appareillage :**

Autoclave

Bain Marie

Balance électrique

Plaque chauffante

Etuves électrique

Microscope optique

Centrifugeuse réfrigérée

Réfrigérateur (4°)

Vortex

Hotte à flux laminaire

Baron magnétique

Ph mètre

**Réactifs et solutions**

Eau distillée

Eau physiologie stérile (9g/1000ml Na CL)

Colorants de Gram (fushine, violet de gentiane, lugol)

Bleu de méthylène,

L'eau oxygénée

Huile de paraffine

Glycérol stérile

Mannitol

Maltose

Xylose

Saccharose

MRS BCP

Hcl

Naoh

Nacl

