

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 BIOCHIMIE ET  
MICROBIOLOGIE

N° : .....



DOMAINE : Sciences de la Nature et de la Vie

FILIERE : Sciences Alimentaires

OPTION : Nutrition et Sciences des Aliments

Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique

Par : CHERIFI Sabrina et CHETIOUI Yamina

## Thème

**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**

Soutenu devant le jury composé de:13/07/2019

<b>Mr. SELOUM</b> Mounir	Université M'sila	Président
<b>Mr. GUETOUACHE</b> Mourad	Université M'sila	Rapporteur
<b>Dr. BOUDJELEL</b> Amel	Université M'sila	Examineur

**Année universitaire : 2018 /2019**

## ***Remerciement***

*Au début et avant tout nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'études.*

*Nous désirons à exprimer notre sincère reconnaissance et remerciement à notre encadreur, Dr. Guetouache Mourad, pour avoir accepté de nous encadrer et consacrer autant de temps pour nous, pour son suivi régulier, sa bienveillance, ses conseils et ses orientations*

*On tient à remercier également les membres de jury*

*On tient à remercier spécialement Dr. Belbahi Amin et Dr. Hammoui Yasmina pour se conseille durant les trois ans passés*

*Non oublier pas Dr. Cherif Kamel*

*Nos grands remerciements s'adressent aussi à nos camarades de Master Nutrition et sciences des aliments (NSA).*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*À mes deux chères Maman, qui ont œuvré pour ma réussite, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute leur assistance et leur présence dans ma vie.*

*À mes chères soeurs, Naziha, Noura, Abla , Houda, Afaf, Warda , mounira, pour leurs encouragements et pour leurs aides.*

*À mes adorables frères Salim, Nabil, Ayoub.*

*À mes chères amies: Siham, Rima, Ahlem, Hafida, Halima, Hayat, Loubna, Radia, qui n'ont pas cessé de m'encourager.*

*À mon cher binôme Sabrina pour le travail que nous avons fourni  
Et à tous mes camarades de NSA.*

***Yamina***

## *Dédicaces*

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

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

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

*À mes chers frères Karim et Bouelam et mes chères sœurs Nadia,  
Khadidja, Meriem et Tawba  
À toute ma grande famille*

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

*À mes chères amies surtout Sihem, Nour Elhouda, Sabah, Hayette,  
Ahlem, Aldjia ,khaoula et toutes les filles de NSA et Ibrahim  
À mon binôme Chetoui Yamina.*

*Sabrina*

# Sommaire

Sommaire.....	I
Résumé.....	IV
Abstract.....	V
Liste des abréviations.....	VI
Liste des tableaux.....	VII
Liste des figures.....	VIII

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

## Chapitre I

1.Produits laitiers traditionnels : .....	2
1.1 Fromages traditionnels : .....	3
<b>1. 1. 1. Klila : .....</b>	<b>3</b>
<b>1. 1.3. Bouhezza : .....</b>	<b>3</b>
1.2. Smen : .....	4
1.3. Dhan : .....	4
1.4. Rayeb : .....	4
1.5. Lben : .....	4
<b>1.5.1. Production traditionnelle: .....</b>	<b>4</b>
2.Les bactéries lactiques : .....	5
<b>2.1.Classification et caractérisation des principaux genres des bactéries lactique : .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. 1.Genre <i>Lactobacillus</i> : .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. 1. 1. Habitat : .....</b>	<b>8</b>
2.1.1. 2. Caractères morphologiques : .....	8
<b>3-5- Intérêt technologique des lactobacilles : .....</b>	<b>8</b>
3-5- 1- Les lactobacilles dans l'industrie laitière : .....	9
3-5- 2- Les lactobacilles dans les végétaux fermentés : .....	9
3-5- 3- Les lactobacilles dans le vin et le pain : .....	9
<b>3-6- Substances antimicrobiennes des lactobacilles : .....</b>	<b>9</b>

## Chapitre II

1-Prélèvement et préparation des échantillons :.....	10
2-Milieus et solutions utilisés :.....	11
2-1- Milieux de culture utilisés au cours de notre travail sont :.....	11
2-2- Solutions utilisées et les réactifs.....	11
2-3-Les souches indicatrices :.....	11
3-Méthodes :.....	12
3-1- Etude physico-chimique des échantillons :.....	12
3-1-1- Mesure du pH et Acidité titrable :.....	12
3-2- Etude des flores lactiques :.....	12
3-2-1- Isolement et purification :.....	12
3-2-2- Conservation des isolats :.....	13
3-2-3-Identification phénotypique des lactobacilles :.....	14
3-2-3-1- Etude morphologique et la production de catalase.....	14
3-2-3-1-1- Examen macroscopique :.....	14
3-2-3-1-2- Examen microscopique:.....	14
3-2-3-1-3- Recherche de la catalase :.....	14
3-2-4- Etude physiologique et biochimique.....	15
3-2-4-1- Croissance à différentes températures :.....	15
3-2-4-5- Croissance dans des conditions hostiles:.....	15
3-2-4-6- Production de dextrane :.....	15
3-2-4-7-Production de l'acétoïne :.....	15
3-2-4-8- Type fermentaire :.....	15
3-2-4-9- Test de citrate :.....	16
3-2-4-10-Fermentation des sucres :.....	16
3-2-5- Essai de l'activité bactériocinogénique :.....	16
3-2-5-1- Préparation du surnageant actif de la souche productrice :.....	17
3-2-5-2- Préparation de l'inoculum de la souche indicatrice :.....	17
3-2-5-3- Test de l'activité antibactérienne :.....	17
3-2-5-4- Caractérisation de l'agent inhibiteur :.....	18
3-2-5-4-1- Effets des enzymes protéolytiques :.....	18
3-2-5-4- 2- Sensibilité thermique de la substance :.....	18
3-2-5-4- 3- Effet du pH et sels biliaire :.....	19

## Chapitre III

1. Etude physico-chimique des échantillons :.....	19
2- Etude microbiologique des échantillons :.....	19
2-1- Dénombrement des Lactobacilles :.....	19
2-2- Isolement et purification :.....	20
2-3- caractérisation et identification des Lactobacilles:.....	20
2-3-1- Caractérisation morphologique : .....	21
2-3-1-1- Examen macroscopique : .....	21
2-3-1-2- Examen microscopique : .....	21
2-3-2- Caractérisations physiologiques et biochimiques :.....	22
2-3-2-1- Croissance à différentes températures :.....	22
2-3-2-2- Effet de NaCl et du pH :.....	22
2-3-2-3- Production de dextrane :.....	23
2-3-2-4- Production de l'acétoïne :.....	23
2-3-2-5- Type fermentaire : .....	23
2-3-2-6- Test de citrate : .....	24
2-3-2-7- Hydrolyse de l'arginine :.....	24
2-3-2-8- Profil fermentaire : .....	25
3- Antagonisme Lactobacilles et bactéries pathogène : .....	26
Conclusion	
Les annexes	

## Résumé

En Algérie, comme dans les différents autres pays du monde on retrouve des produits laitiers indigènes dont le mode de fabrication découle de l'héritage culturel de la population. Ces produits sont issus de la transformation de lait dans le but de prolonger sa durée de conservation. Parmi les préparations lactières traditionnelles algériennes : *Zebda*, *Lben*, *Dhan* qui peuvent être des sources de bactéries lactiques qui ont des activités inhibitrices vis-à-vis des germes pathogènes. Donc elles constituent une ligne de défense par la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène et de bactériocines.

Au cours de cette étude, 37 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir du *Lben* traditionnel. Leur identification phénotypique, selon le profil morphologique et biochimique, a conduit à 7 souches appartenant au genre *Lactobacillus*. L'identification par le profil fermentaire abouti à différentes espèces réparties comme suit: M1 : *Lactobacillus plantarium*, M2 : *Lactobacillus helveticus*, M3 : *Lactobacillus acidophilus*, M4 : *Lactobacillus fermentum*, M5 : *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, M6 : *Lactobacillus rhamnosus*, M7 : *Lactobacillus alimentarius*.

Les 7 souches ont été testées pour leur effet antibactérien à l'encontre de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. L'interaction de nos souches lactiques avec les bactéries pathogènes était détectée par technique des puits sur milieu gélosé dont la formation des halos autour des puits indique la présence d'inhibition.

D'après les résultats on note que Les souches M1 et M2 ayant une activité antibactérienne vis-à-vis les souches *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. La mesure des diamètres d'inhibition révèle des diamètres qui se varient de 1 à 5 mm. Alors que les autres souches ne présentent aucune activité antibactérienne contre les souches pathogènes utilisées. L'effet des bactériocines est aussi aperçu car une substance de nature protéique thermosensible est responsable de l'inhibition des souches pathogènes utilisées

**Mots clés :** Produits laitiers traditionnels, *Lactobacilles*, *Lben*, bactéries lactiques, antagonisme, bactéries pathogènes.

# Abstract

In Algeria, as in the other countries of the world, there are indigenous dairy products whose production method derives from the cultural heritage of the population. These products are derived from the transformation of milk in order to extend its shelf life. Among the traditional Algerian milk preparations: *Zebda*, *Lben*, *Dhan* which can be sources of lactic acid bacteria which have inhibitory activities with respect to pathogenic germs. So they constitute a line of defense through the production of lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins.

In this study, 120 strains of lactic acid bacteria were isolated from the traditional Lben. The phenotypic identification by morphological and biochemical tests showed that seven strains belonged to the genus *Lactobacillus*. The identification by the fermentation profile led to different species as: M1: *Lactobacillus plantarium*, M2: *Lactobacillus helveticus*, M3: *Lactobacillus acidophilus*, M4: *Lactobacillus fermentum*, M5: *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, M6: *Lactobacillus rhamnosus*, M7: *Lactobacillus alimentarius*.

The 7 strains were tested for their antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The interaction of our lactic strains with pathogenic bacteria was detected by well diffusion technique on agar medium including forming halos around wells indicates the presence of inhibition.

From the results we note that the strains M1 and M2 having antibacterial activity against strains, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. The measurement of inhibition diameters reveals diameters which range from 1 to 5 mm. While the other strain exhibits no antibacterial activity against the pathogenic strains used. The effect of bacteriocins is also realized as a heat-sensitive protein substance is responsible for inhibition of pathogenic strains used.

**Key words:** Traditional dairy products, *Lactobacillus*, *Lben*, lactic acid bacteria, antagonism, pathogenic bacteria.

## *Liste des abréviations*

°C : Degré Celsius

°D : Degré Dornic.

**g**: gramme.

**Kg** : Kilogramme.

**L** : Litre.

**Lb** : *Lactobacillus*

**g**: microgramme.

**cm**: centimètre

**mg**: milligramme.

**ml**: millilitre.

**Nm** : Nanomètre.

**%** : Pourcent.

**pH**: Potentiel d'hydrogène.

**mn** : minute

**hr**: heures

**NaOH**: hydroxyde de sodium

**CFU/ml** : Unité formant colonie par millilitre

**FAO**: Food and Agriculture Organization

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ADN**: Acide DésoxyriboNucléique

**MRS**: de Man Rogosa et Sharpe

**EMP** : Embden Meyerhof Parnas

**MSE** : Mayeux Sandine et Elliker

**KMK** : kempler et Me Kay, 1980

**AFNOR**: Association Française de Normalisation

**ISO**: International Organization of standardization

**NaCl**: chlorure de sodium

**AOAC**: Association Officiel Analytical Chemists

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1</b> : Quelques produits laitiers traditionnels les plus connus dans l'Afrique du nord...	<b>02</b>
<b>Tableau 2</b> : les différents genres de bactéries lactiques.....	<b>07</b>
<b>Tableau 3</b> : Habitat des <i>Lactobacillus</i> (Perry <i>et al</i> , 2004).....	<b>07</b>
<b>Tableau 4</b> : Souches utilisées dans le test antimicrobien.....	<b>11</b>
<b>Tableau 5</b> : Résultats des analyses physico-chimiques du <i>Lben</i> traditionnel.....	<b>19</b>
<b>Tableau 6</b> : Résultats de dénombrement des lactobacilles sur gélose MRS.....	<b>19</b>
<b>Tableau 7</b> : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des espèces des genres <i>Lactobacillus</i> .....	<b>25</b>
<b>Tableau 8</b> : Résultats d'activité antibactérienne des <i>Lactobacillus</i> isolés vis-à-vis des bactéries pathogènes. ....	<b>26</b>
<b>Tableau 9</b> : Action des enzymes protéolytiques, du pH et du traitement thermique sur l'activité antimicrobienne du surnageant extraits contre la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 65 38.....	<b>28</b>

# *Introduction*

Le lait donne naissance par transformation à une très grande famille de produits laitiers. Traditionnellement, la production de lait caillé est exigée par des actions de la nature et résulte de la production du beurre dont le lait caillé est un coproduit, ce processus de coagulation est très utilisé en fabrications domestiques et conduit à l'obtention de produits variés. Le démarrage de ce processus est consécutif à la présence dans le lait de bactéries lactiques dont la principale fonction est la dégradation du lactose en acide lactique. En effet, ces bactéries aussi produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes telles que les acides organiques, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (Ilboudo *et al*, 2012 ; Zarour et al, 2012).

Dans ce travail, la présente thèse a pour objectif l'isolement, le criblage, la sélection des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* à partir d'un produit laitier traditionnel (Lben) de la commune Ben Srour de la région de M'sila, ainsi que leurs identifications phénotypiques, En fin, d'estimer leur activité antibactérienne.

Notre manuscrit est structuré en trois chapitres, le premier est rédigé dans le souci de synthétiser des données bibliographiques. Des généralités sur les différents produits laitiers traditionnels en premier lieu. Ce premier chapitre permettra aussi de connaître les bactéries lactiques. Un second chapitre est consacré à la description du matériel et regroupe l'ensemble des techniques et méthodologies utilisées pour la réalisation de ce travail, et en dernier chapitre réservé à la présentation des résultats et leur interprétation.

*Chapitre I*  
*Synthès Bibliographique*

## 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 *Lben*, *Klila*, *Jben*, *Rayeb*, *Dhan*, *Zebda*

Ces produits laitiers fermentés sont consommés depuis la plus haute antiquité. Associée à l'action de la présure, la flore microbienne des laits permettra la production d'une gamme très diversifiée de fromages (Hicham *et al*, 2009)

**Tableau 1 :** Quelques produits laitiers traditionnels les plus connus dans l'Afrique du nord (Benkerroum, 2003).

Nom	Description	Microorganisms
<b>LBEN</b>	Lait fermenté (babeurre) obtenu par le barattage du lait coagulé spontanément pour enlever le beurre. Un produit laitier commun dans tous les pays d'Afrique du Nord, mais sous des noms différents.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
<b>SMEN</b>	Beurre rance de pays du Maghreb obtenus à partir de beurre salé brut (8% à 10%) et mûri dans l'obscurité dans un endroit frais anaérobie (13 à 15 ° C) des conditions pour une période de 6 à 12 mois.	Levures Moisissures
<b>RAIB</b>	Lait coagulé spontanément. Il peut s'agir d'un produit fini où c'est un intermédiaire pour la production de fromages traditionnels ou d'autres laits fermentés. Un produit laitier commun dans tous les pays d'Afrique du Nord, mais avec des noms différents.	<i>Lc. Lactis Lc. lactis</i> ssp. <i>Lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .
<b>JBEN</b>	Le fromage frais obtenu par fermentation spontanée du lait suivie par le drainage de petit-lait. Il est occasionnellement saumuré dans une solution saline saturée (25 à 30 g de sel par 100 ml d'eau) à la température ambiante pendant 2 à 15 d. Largement consommé dans les pays du Maghreb (Maroc, Tunisie, et Algérie).	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Leuconostoc lactis</i>
<b>KLILA</b>	Caillé de fromage obtenu à partir du <i>Lben</i> par chauffage et tamisage à travers un tissu de mousseline ou le panier de paille à jeter lactosérum. Habituellement consommé en Algérie et au Maroc comme lactosérum pour éviter le gaspillage de <i>Lben</i> trop aigre.	<i>Pediococcus acidilactis</i> <i>Lactobacillus confusus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>

### 1.1. Fromages traditionnels :

Selon la norme FAO/OMS n° A6 du Codex Alimentarius (1996) "Le fromage est le produit frais ou affiné, solide ou semi-solide, dans le quel le rapport protéines de lactosérum/caséine ne dépasse pas celui du lait et obtenu par coagulation complète ou partielle des matières premières suivantes : lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème, ou babeurre, seul ou en combinaison, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par l'égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation".

Quelques fromages fabriqués en Algérie qui méritent d'être connus :

#### 1.1.1. Klila :

Le *Klila* comme étant un fromage durci obtenu en déshydratant complètement le caillé obtenu après chauffage modéré du lait acidulé. Le lait caillé est baratté pour obtenir une boisson acide : le *Lben* qui subit un traitement thermique modéré pour obtenir le *Klila* frais (Claps et Morone, 2011 ; Leksir et Chemmam, 2015).

#### 1.1.2. Bouhezza :

C'est un fromage à pâte molle traditionnellement affiné produit dans les régions d'Est Algérien, très apprécié dans la région d'Oum El-Bouaghi Khenchela et dans certaines régions de Batna. En effet, à l'origine, *Bouhezza* était traditionnellement le produit de la transformation du lait de chèvre et éventuellement de brebis mais actuellement il est préparé à partir du lait de vache. Le fromage est obtenu après transformation du *Lben* dans une outre, la *Chekoua*, faite de peau de chèvre préalablement traitée avec du sel et du genièvre. L'égouttage, le salage et l'affinage de *Bouhezza* sont réalisés simultanément dans la *Chekoua* pendant une durée allant de 24 h à 3 mois. Au cours de la période d'affinage, du *Lben* et du lait sont rajoutés au contenu de la *Chekoua*. Au stade de la consommation, le fromage est pétri avec incorporation de la poudre de piment rouge ou de l'ail, ce qui lui donne une caractéristique particulière (Aissaoui *et al*, 2006).

#### 1.1.3. Smen :

Le *Smen* est du beurre rance salé obtenu après transformation du beurre frais par lavage, saumurage et salage à sec (Benkerroum et Tamine, 2004).

#### 1.1.4. Dhan :

Est un beurre frais (traditionnel) qui est obtenu après barattage du *Rayeb*. À la fin du barattage pour favoriser l'agglomération des globules lipidiques et accroître le rendement en beurre (Benkerroum et Tamime, 2004).

#### 1.1.5. Rayeb :

Le *Raïb*, comme le leben, fait aussi partie des produits laitiers fermentés populaires en Algérie. Mais contrairement à lui, il ne subit pas une opération de barattage et d'écémage, il s'agit d'un lait fermenté entier. Il est fabriqué à partir du lait cru de vache ou de chèvre. La fermentation du lait, comme de nombreux procédés traditionnels de fermentation, est spontanée et incontrôlée et pourrait être une source précieuse des bactéries lactiques autochtones (Mechai et Kirane, 2008).

#### 1.1.6. Lben :

Le *Lben* (babeurre) est une boisson préparée par fermentation spontanée du lait cru jusqu'à coagulation, suivie d'un léger mouillage, puis d'un barattage, permettant de recueillir une part plus ou moins importante de matière grasse sous forme de beurre (Zebda beldia). Sa préparation, très simple, est demeurée au stade familial ou artisanal : le lait est abandonné à lui-même dans une baratte (*Chekoua*) en peau de chèvre jusqu'à sa coagulation. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48 heures suivant la saison (Benkerroum et Tamime, 2004).

### 1.2. Production traditionnelle:

- 1) La préparation artisanale est simple, le lait est abandonné à lui-même jusqu'à coagulation qui se fait à température ambiante et dure 24 à 48 h selon la saison.
- 2) Le barattage qui lui succède dure 30 à 40 minutes.
- 3) Un volume d'eau (environ 10 % du volume du lait), chaud ou froid, suivant la température ambiante est ajouté de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre (Benkerroum et Tamime, 2004 ; Ouadghiri, 2009).
- 4) Traditionnellement, le barattage se faisait dans une outre de peau de chèvre ou d'agneau, nommée *chekcoua*.

- 5) Le l'ben produit industriellement est fabriqué avec un lait pasteurisé à 84 °C pendant 30 secondes puis refroidies à 22 °C etensemencées de ferment lactique (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextransucrum*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*).



**Figure 1 :** Peau de chèvre ou d'agneau, nommée Chekoua.

## 2. Les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques (BL) sont des cellules vivantes, procaryotes, gram-positives, hétérotrophes et chimioorganotrophes. Elles sont le plus souvent immobiles, ne produisant pas en général de spores, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives, microaérophiles. Les bactéries lactiques par leurs propriétés acidifiantes, aromatisantes et texturantes sont largement utilisées dans les produits dérivés du lait et leurs propriétés probiotiques sont très utiles à la santé, en effet, elles améliorent les fonctions digestives et ont un effet très positif sur la microflore intestinale.

Les produits dérivés issus d'une fermentation lactique traditionnelle connaissent depuis quelques années un développement considérable grâce, à l'intérêt que trouvent les consommateurs sur le plan organoleptique, nutritionnel, thérapeutique, voire hygiénique en raison de leur acidité.

La biodiversité de ces bactéries lactiques impliquées dans ce processus est un facteur fondamental pour la préservation de la typicité et des caractéristiques originales des produits et sans inconvénients pour les consommateurs intolérants au lactose (Lairini *et al*, 2014).

## 2.1. Classification et caractérisation des principaux genres des bactéries lactique :

Onze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière. Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Seuls les cinq genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont communément propagés dans les salles à ferments des industries laitières ou employés dans la fermentation lactique des produits laitiers en Amérique du Nord. Le rôle principal des bactéries lactiques est la production d'acide lactique qui influence la texture, le goût et la qualité microbiologique du fromage.

En effet, la production d'acide facilite la coagulation des protéines par la présure ainsi que la synérèse. L'abaissement du pH limite aussi la croissance des bactéries indésirables. Enfin, la production d'acide lactique intervient également sur le goût des produits fermentés, soit directement dans les produits frais, soit indirectement en agissant sur les activités enzymatiques pendant l'affinage (Doleyres, 2003). Il existe deux grands groupes morphologiques des bactéries lactiques bien distincts :

- I. les coques (cocci) sont des sphères plus ou moins ovoïdes, de 0.5 à 1.5µm de diamètre dont la division peut engendrer des paires, des tétrades, des chaînettes ou des amas, (Filion, 2006).
- II. Les bacilles sont des bactéries en forme de bâtonnets qui peuvent avoir différents aspects : bâtonnets droits, coccobacilles, ils ont 0.2 à 2 µm de diamètre, et de 1.5 à environ 10µm de long qui se présentent par paires ou en chaînettes de longueur variable (Bourgeois *et al.* 1996).

La différenciation entre espèces repose sur la spécificité relative de leur caractère physiologique. La différenciation entre biotypes ou souches d'une même espèce s'appuie sur un ensemble de caractères tel que les degrés de résistance aux inhibiteurs : bactériophages, antibiotiques, agglutinines, etc. ainsi que les aptitudes : acidifiantes, aromatisant, protéolytique, gazogène, etc. Le tableau 2 illustre quelques caractéristiques des différents genres de bactéries lactiques (Leveau et Bouix, 1993).

**Tableau 2 :** les différents genres de bactéries lactiques.

Genres	Forme	Arrangement	Fermentation	ADN : GC%
<i>Streptococcus</i>	Coque	Chaînes	Homolactique	34-46
<i>Leuconostoc</i>	Coque	Chaînes	Hétérolactique	36-43
<i>Pediococcus</i>	Coque	Tétrades	Homolactique	34-42
<i>Lactococcus</i>	Bacille	Chaînes	Homolactique Hétérolactique	32-53
<i>Bifidobacterium</i>	Variée	Variée	Acétique et lactique	55-67

### 2.1.1 Genre *Lactobacillus*:

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactiques intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles souvent allongés, Gram +, asporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles. Ils sont catalase- et microaérophiles ou anaérobies. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactique produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> à côté de l'acide lactique. (Guiraud, 2003)

#### 2.1.1.1 .Habitat :

Les lactobacilles ont un habitat vaste et ils sont présents dans de nombreux biotopes, Tableau 3 (Perry *et al*, 2004). Les lactobacilles constituent, entre autres, une part importante du microbiote humain et animal. Chez l'Homme sain, ils se retrouvent tout au long du système digestif : de la bouche au côlon. Les espèces les plus rencontrées sont : *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. brevis*, le groupe *L. casei*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. vaginalis* et *L. ruminis* (Ozgun et Vural, 2011).

**Tableau 3 :** Habitat des *Lactobacillus* (Perry *et al*, 2004).

Habitat	Espèces rencontrées	Activité ou produit
<b>Matériel végétal en décomposition</b>	<i>Lb. Plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> ,	Cornichons, ensilage et choucroute
<b>Laiterie</b>	<i>Lb. delbrukii</i> , <i>Lb. lactis</i>	Fromage, yoghourts
<b>Tractus gastro-intestinal des animaux</b>	<i>Lb. salivarius</i> <i>L. gasseri</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Formation de carie dentaire Flore normale
<b>-Oral</b>	<i>Lb. casi</i> , <i>Lb. plantarum</i> ,	
<b>-Intestinal</b>	<i>Lb. gasseri</i>	
<b>Vagin des mammifères</b>	<i>Lb. vaginalis</i> <i>Lb. ssp</i>	Flore normale

### 2.1.1. 2. Caractères morphologiques:

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et généralement non mobiles. Ils sont sous la forme de bâtonnets longs et fins ou très courts ou coccobacilles, où la formation de chaînes de cellules est courante (De Vos *et al*, 2009).

### 2.1.1. 3. Caractères biochimiques:

Les lactobacilles sont catalase négative, nitrate réductase négative. Ils sont microaérophiles ou anaérobies. Le métabolisme énergétique des lactobacilles est fermentaire (Prescott *et al*, 2003). Les lactobacilles sont subdivisés, selon leur type fermentaire, en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss (Sutra *et al*, 1998).

- **Groupe I** : il comprend les espèces homofermentaires obligatoires thermophiles (croissance à 45°C), dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*.
- **Groupe II** : ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces, dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles.
- **Groupe III** : il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires, mésophiles ; comme *Lb. brevis* et *Lb. kefir*.

## 3. Intérêt technologique des lactobacilles :

L'intérêt pratique des lactobacilles est considérable pour plusieurs raisons. Les lactobacilles sont très utilisés dans l'industrie, en laiterie, fromagerie, dans la fabrication de choucroute et interviennent dans les saumures et charcuteries (Giraud et Rosec, 2004 ; Giraffa *et al*, 2010).

### 3.1. Les lactobacilles dans l'industrie laitière :

Dans les yaourts *Lb. delbreuckii* subssp *bulgaricus* forme des peptides utilisés par *Streptococcus thermophilus* qui forme de l'acide formique qui est capable de le stimuler (synergie). L'arôme du yaourt est dû à l'acétaldéhyde formé à partir de thréonine par l'aldolase de *Lb. delbreuckii* subssp *bulgaricus*. Divers lactobacilles (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*...) interviennent pendant l'affinage des fromages (Giraud et Rosec, 2004; Giraffa *et al*, 2010).

### 3.2. Les lactobacilles dans les végétaux fermentés :

Le rôle de Lb est également important dans les végétaux fermentés. Dans les ensilages, il y a d'abord intervention des coliformes qui utilisent l'oxygène, puis de leuconostocs et d'enterocoques, enfin de pediocoques et de lactobacilles (*Lb.plantarum*, *Lb.casei*, *Lb.brevis*) Dans les cornichons, on trouve *Lb.plantarum*, *Lb.brevis* à côté de *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*. (Giraud et Rosec, 2004 ; Giraffa *et al*, 2010).

### 3.3. Les lactobacilles dans le vin et le pain :

Dans certains pains les lactobacilles homofermentaires et hétérofermentaires (*Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*...) interviennent à côté des levures. Dans le vin, les lactobacilles participent à la fermentation malolactique (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb.casei*,.....) et à la dégradation de l'acide tartrique : *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* (Guiraud et Rosec, 2004; Giraffa *et al*, 2010).

### 3.4. Substances antimicrobiennes des lactobacilles :

Les lactobacilles, peuvent produire des substances antimicrobiennes, actives in vitro et in vivo sur les microorganismes pathogènes : les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Cependant, la plupart ont une activité contre des pathogènes alimentaires tels que *Listeria monocytogenes*.

*Chapitre II*  
*Matériel et Méthodes*

Cette étude a été réalisée dans le Laboratoire pédagogique de Microbiologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de M'sila Mohamed Boudiaf.

### 1-Prélèvement et préparation des échantillons :

Les échantillons du Lben traditionnel ont été collectés à la région Ben Srour de la ville de M'sila. Les prélèvements ont été mis dans des flacons stériles dans des conditions d'asepsies autant que possible. Les produits prélevés doivent être transportés à l'aide une glacière à l'obscurité jusqu'au laboratoire. En laboratoire, les cultures doivent être réalisées immédiatement, sinon, il faut ranger les échantillons dans un réfrigérateur à 4 ou 5°C.



**Figure 2 :** Situation géographique de la zone d'étude (M'sila) (Google Maps).

### 2-Milieus et solutions utilisés :

Les milieux de culture utilisés sont soit liquides, soit solides, la stérilisation se fait par l'autoclave à 121°C pendant 20minutes.

#### 2-1- Milieux de culture utilisés au cours de notre travail sont :

- a) Milieu MRS (Man Rogos et Sharpe, 1960) pour les cultures courantes est acidifié pour les lactobacilles.
- b) Milieux MSE (Mayeux sandine et Elliker) permettant la recherche et le dénombrement des Leuconostoc

- c) Milieu KMK(kempler et Me Kay,1980) :utilisé pour mettre en évidence présence de citratase.
- d) Lait écrémé a 30% de glycérol : milieu de conservation des souches.
- e) Et autres milieux de cultures présentes dans les annexes.

### 2-2- Solutions utilisées et les réactifs :

- a) L'eau physiologique est utilisée pour effectuer les dilutions décimales des échantillons du Lben.
- b) phénophtaléine (l'acidité).

### 2-3-Les souches indicatrices :

Différents germes pathogènes (souches cibles ou indicatrices) fournis par le laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université Mohamed Boudiaf de M'sila . Les bactéries pathogènes utilisées dans notre étude sont cités dans le tableau 4.

**Tableau 4:**Souches utilisées dans le test antimicrobien.

Bactéries pathogènes	Gram	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 65 38	Université de M'sila
<i>Bacillus subtilis</i>	Positif	ATCC 93	Université de M'sila
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC L 25 922	Université de M'sila

## 3-Méthodes:

### 3-1- Etude physico-chimique des échantillons :

Deux tests ont été pratiqués afin de déterminer le pH, l'acidité en degré Dornic.

#### 3-1-1- Mesure du pH et Acidité titrable :

Le pH des échantillons du Lben a été déterminé en utilisant un pH-mètre (AFNOR, 1986), et l'acidité titrable en degré Dornic (°D) a été déterminée selon la méthode officielle de l'AOAC. L'acidité totale a été déterminée en titrant 10 ml de la culture avec la solution basique NaOH N/9 en utilisant l'indicateur de pH la phénophtaléine. Les souches testées produisant de l'acide lactique sont exprimées en degrés Dornic (1°D = 0,1g/l d'acide lactique) (Bourgeois *et al*, 1996). La quantité d'acide lactique est dosée par le titrage d'échantillon avec le NaOH, en y ajoutant 5 gouttes de phénophtaléine à 1%. La quantité

de NaOH nécessaire pour le virage de couleur est noté et ceci de la couleur blanche jusqu'au virage au rose pâle, (Acidité Dornic = °D = V NaOH x10, V : volume).

### 3-2- Etude des flores lactiques :

#### 3-2-1- Isolement et purification :

Afin de préparer la solution mère, 1 ml d'échantillon de Lben contenu dans un tube stérile est additionné de 9 ml d'eau physiologique. Des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-6}$  ont été préparées à partir de la solution mère : par une pipette Pasteur stérile, un volume de 1 ml de la phase aqueuse est pris et additionné aseptiquement à 9 ml d'eau physiologique pour l'obtention de la dilution  $10^{-1}$ . Ensuite, 1 ml de cette dernière est pris et additionné à 9 ml d'eau physiologique pour réaliser la dilution  $10^{-2}$ , et le processus a été continu ainsi jusqu'à l'obtention de la dernière dilution.

Quelle que soit la méthode utilisée pour le comptage sur boîte il faut que le nombre de colonies qui se développent sur les boîtes ne soit pas trop élevé. Certaines cellules peuvent ne pas former de colonies et certaines colonies peuvent fusionner, ce qui amène à des comptages erronés. Dans la pratique, le meilleur résultat est statistiquement obtenu pour des boîtes comprenant entre 30 et 300 colonies. De plus, il convient de déterminer les conditions d'incubation (37 °C pendant 48h à 72 h)(Madigan et Martinko, 2007).

Cette méthode ne prend en compte que les germes vivants (revivifiable) et aptes à se développer sur un milieu sélectif. Les résultats sont exprimés selon la relation:

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0.1n_2) d}, \text{ Ainsi que trois dilutions : } N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0.1n_2 + 0.01n_3) d}$$

Où :

- N : nombre d'UFC par gramme ou par ml de produit initial ;
- $\sum C$  : est la somme des colonies comptées sur les boites ;
- $n_1$  : est le nombre de boîtes comptées à la dilution la plus faible ;
- $n_2$  : est le nombre de boîtes comptées à la deuxième dilution;
- $n_3$  : est le nombre de boîtes comptées à la troisième dilution ;
- d : est la valeur correspondant à la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements ont été retenus ;
- V (ml) : volume de solution déposée (1ml) (Norme AFNOR NF ISO 7218, 2004).

Afin d'obtenir un nombre de colonies significatif, l'échantillon doit presque systématiquement être dilué. L'analyse microbiologiques et l'isolement sélectif des Lactobacilles par culture sur plusieurs milieux ont été réalisés selon les méthodes décrites

par la Fédération Internationale du Lait 1996. La purification des isolats consiste à effectuer des repiquages successifs alternant sur milieux MRS liquide à pH 5.6 et solide, jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes. La purification des isolats sur milieu solide se fait par la méthode des stries (Badis *et al*, 2005). La pureté des isolats est contrôlée par des observations microscopiques après coloration de Gram, suivie d'un test de la catalase. Seuls les isolats caractéristiques des Lactobacilles Gram positif et catalase négatif qui sont retenues et conservés pour une identification ultérieure (Guiraud, 1998).

### **3-2-2- Conservation des isolats :**

Pour une bonne continuité du travail, les isolats purifiés doivent être bien conservés. Les mesures techniques, nécessaires à la conservation d'un isolat, seront prises le plus rapidement possibles après l'isolement. Pour une conservation à courte durée, le repiquage se fait sur la pente d'une gélose inclinée en tubes hermétiques clos. Les tubes sont conservés au froid à + 4°C à l'abri de la lumière (Larpen, 1990). La conservation à long terme des isolats purifiés est réalisée dans un milieu contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0.05 % d'extrait de levure et 0.05 % de glucose) et 30% de glycérol et stockés à une température de -20 °C au congélateur (Badis *et al*, 2005).

### **3-2-3- Identification phénotypique des lactobacilles :**

Souvent un premier screening est effectué en vue d'une identification en observant les colonies et les caractéristiques morphologiques des cellules. Suite à une culture on observe les propriétés morphologiques et les caractéristiques des parois cellulaires (coloration de Gram)

Les méthodes d'identification phénotypiques comprennent également l'étude du profil biochimique et les propriétés métaboliques par l'intermédiaire de tests sur ses conditions de croissance, sur ses activités enzymatiques (Carre *et al*, 2002 ; Puigmal, 2016).

#### **3-2-3-1- Etude morphologique et la production de catalase**

##### **3-2-3-1-1- Examen macroscopique :**

Il s'agit d'une observation visuelle de la culture des isolats sur gélose et bouillon MRS, sur la gélose, les colonies obtenues des isolats après incubation sont observées à la loupe binoculaire afin de mentionner plusieurs aspects (la taille, la forme, l'aspect de la

surface, l'opacité, la consistance, la couleur). Ainsi, l'aspect du trouble dans le bouillon (Badis *et al*, 2005).

### 3-2-3-1-2- Examen microscopique:

L'observation microscopique permet de définir certains caractères morphologiques et organisationnels des bactéries : coques ou bacilles, organisées en chaînettes ou isolés, bactéries Gram-positif ou négatif (Singleton, 1999). Ces caractères sont déterminés selon la méthode de coloration de Gram. Cette technique a été mise au point en 1884 par Hans Christian (voire annexe).

### 3-2-3-1-3- Recherche de la catalase :

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



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (Marchal *et al*, 1991).

## 3-2-4- Etude physiologique et biochimique

### 3-2-4-1- 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 37°C et 45°C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux (sous forme de trouble).

### 3-2-4-5- Croissance dans des conditions hostiles:

Deux milieux de MRS liquides ont été utilisés contenant différentes concentration de NaCl : 5% de NaCl (5 g de NaCl par 100 ml de milieu), et 10%, avec un pH de 6,2. Une autre série d'essais a été réalisée sur le milieu MRS avec un pH de 6,6 et 8,3.

### 3-2-4-6- Production de dextrane :

La production de la dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur le milieu solide MSE (Mayeux *et al*, 1962). Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes.

#### **3-2-4-7-Production de l'acétoïne :**

La production d'acétoïne est recherchée le milieu Clark et Lubs. Après l'ensemencement de chaque isolat dans 10 ml de ce milieu et après incubation à 30 °C pendant deux jours on effectue la réaction de Voges Proskauer, en ajoutant 0.5 ml d'une solution alcoolique  $\alpha$ -naphthol (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O) à 6 % dans l'alcool absolu (VPI) et 0.5 ml d'une solution de soude (NaOH) à 16 % dans l'eau distillée (VPII). Les tubes sont ensuite chauffés et agités par un agitateur de type Vortex. Laissés les tubes sur la paillasse à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu (Guetouache *et al*, 2014).

#### **3-2-4-8- Type 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 hétérofermentaire se manifeste par l'apparition de gaz dans la cloche de Durham, qui est absente chez les bactéries homofermentaires (Bourgeois *et al*, 1991).

#### **3-2-4-9- Test de citrate :**

On utilise le milieu (KMK) (Kempfer et Mac Kay, 1980) contenant du citrate de fer et du ferrocyanure de potassium. Les souches capables de fermenter le citrate (dans le milieu) permettent la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanure. De cette réaction résulte la formation de colonies bleues (après 24 à 72 heures d'incubation).

- Citrate-positive : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
- Citrate-négative : pas de culture (coloration verte de milieu inchangée) (Marchal *et al*, 1991).

#### **3-2-4-10-Fermentation des sucres :**

Dans des tubes à essai stériles, on introduit 1 ml de milieu liquide MRS dépourvu de glucose et d'extrait de viande (MRS-BCP) contenant le pourpre de bromocrésol (0.04

g/l) comme indicateur de pH ( ou le rouge de chlorophénol) et additionné avec 1 % de carbohydrates stérile par filtration (glucose, galactose, fructose, maltose, mannose, lactose, saccharose, xylose, raffinose, arabinose, mannitol, ribose, sorbitol, cellobiose, maltose, melibiose, tréhalose, rhamnose, esculine, sucrose et raffinose). On ensemence le contenu des tubes de MRS-BCP avec 0.1 ml des souches obtenue après centrifugation des milieux de cultures jeunes et on y ajoute après une goutte d'huile de paraffine stérile et ajoutée pour l'anaérobiose. Après 48 h de culture à 30 °C, la croissance des souches et le virage de l'indicateur coloré du rouge au jaune traduit la fermentation du sucre (Samelis *et al*, 1994 ; Ismaili *et al*, 2016).

### **3-2-5- Essai de l'activité bactériocinogénique :**

Les souches de bactéries lactiques isolées sont testées pour leur pouvoir antibactérien a partir des cultures jeunes en phase de croissance (phase exponentielle), entre cinq bactéries pathogènes de références (*Bacillus subtilus*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*), suivant la méthode de diffusion sur gélose par les puits (Tagg *et al*, 1976; Khay *et al*, 2011).

#### **3-2-5-1- Préparation du surnageant actif de la souche productrice :**

Les souches isolées sont ensemencées dans le bouillon MRS et incubées pendant 18 heures. Après incubation, le bouillon est centrifugé à 15000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant (l'extrait bactériocinique) est récupéré avec élimination des cellules bactériennes rassemblées en fond des tubes (Barefoot and Klaenhammer,1983). Le surnageant est ajusté à pH neutre 6.5 à 7 avec du NaOH 10 M. La neutralisation de l'extrait bactériocinique permet d'éliminer l'effet des acides organique snot amment l'acide lactique et l'acide acétique. L'extrait est ensuite filtré sur filtre Millipore stériles de diamètre 0,22 µm. Le filtrat est conservé à +4°Cà l'obscurité et ajout de quelques gouttes de catalase pour éliminer l'effet de peroxyde d'oxygène (Allouche *et al*, 2010).

#### **3-2-5-2- Préparation de l'inoculum de la souche indicatrice :**

Chaque culture doit être ensemencée en stries sur la gélose d'infusion de cœur et de cerveau pour obtenir des colonies isolées. Après une incubation d'une nuit à une température comprise entre 35 et 37°C, choisir 4 à 5 colonies bien isolées avec l'anse de platine et les transférer dans un tube de solution salée stérile ou dans le bouillon de Mueller-Hinton. Émulsionner une quantité suffisante de culture bactérienne dans la

solution salée ou le bouillon pour que la turbidité avoisine celle du standard McFarland 0,5 qui est équivalente à  $10^8$ UFC /ml (Jorgensen *et al*, 1999 ; De Vlieghe *et al*, 2004). Cette comparaison peut être faite plus facilement si les tubes sont observés contre une fiche de papier blanc avec lignes noires. Si c'est nécessaire, la turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de solution saline stérile ou de bouillon (Esmail *et al*, 2015).

### 3-2-5-3- Test de l'activité antibactérienne :

Vingt ml de milieu Mueller-Hinton gélosé coulés dans des boîtes Pétri, sont recouverts avec cinq ml de milieu semi-solide (0,8 % d'agar)ensemencé avec 0,05 ml de la suspension de souche cible. Les boîtes de Pétri inoculées par les bactéries cibles préparées préalablement, de petits cylindres d'un diamètre de 6 mm, vont nous permettre de confectionner des puits (diamètre de 6 mm) qui sont remplis par la suite par 50 µl de l'extrait bactériocinique brut. Les boîtes de Pétri ainsi préparées sont pré-incubées pendant 2 à 4 heures à + 4 °C, afin de permettre la diffusion radiale de l'agent inhibiteur ensuite suivi par une incubation de 18 à 24 heures à 37 °C en anaérobiose pour éviter la présence de l'air nécessaire à la production de peroxyde d'hydrogène. En fin d'incubation, on observe les zones d'inhibition autour des puits, pour les différentes souches sélectionnées vis-à-vis des germes cibles testés. La lecture de l'activité bactériocinogénique se fait par lame sure du diamètre d'inhibition autour du puits, exprimée en mm (Guétouache *et al*, 2015). Cette méthode a été testée avec les extraits des souches ayant montré un pouvoir inhibiteur par la méthode directe. La détermination du diamètre d'inhibition se fait par la formule suivante :

$$Z_i = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue} - \text{diamètre du puits}$$

$Z_i$  : zone d'inhibition,  
Diamètre du puits = 6 mm

### 3-2-5-4- Caractérisation de l'agent inhibiteur :

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la

température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (Dortu et Thonart, 2009).

#### **3-2-5-4-1- Effets des enzymes protéolytiques :**

Les bactéries lactiques sécrètent les bactériocines dans le milieu extracellulaire d'où l'intérêt de rechercher de ces substances dans les surnageant de culture. Les bactériocines qui sont des substances protéiques, sont dégradées par des enzymes protéolytiques (Klaenhammer, 1993), Les deux enzymes protéolytiques utilisées (pepsine et trypsine). Mélanger 1mL du surnageant neutralisé avec 1mL de la solution enzymatique (Rapport volumique 1:1) pour avoir une concentration finale en enzymes de 1mg/ml. Incuber 2 heures à 37°C dans un bain marie, afin de permettre le contact avec l'enzyme (Cocolin et Rantsiou, 2007). Charger les puits avec des solutions suivantes : tampon, tampon avec enzyme, surnageant sans enzyme et surnageant avec enzyme des boîtes déjàensemencées par la souche pathogène. Laisser diffuser 1heure à la paillasse, puis incuber 24 heures à 37°C.

#### **3-2-5-4- 2- Sensibilité thermique de la substance:**

Pour l'effet de la chaleur sur l'activité des extraits, un surnageant de chaque culture des souches bactériocinogènes a été chauffé à 100°C pendant 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 60 minutes et 75 minutes. Après refroidissement, l'activité antibactérienne a été vérifiée vis-à-vis de la souche pathogène par la méthode de diffusion en puits (Tagg et Mc Given, 1971). La lecture des résultats consiste à faire la comparaison entre ceux obtenus avec le surnageant traité et le surnageant non traité (Ten Brink *et al*, 1994 ; Guetouache *et al*, 2015).

#### **3-2-5-4- 3- Effet du pH et sels biliaires :**

La méthode utilisée est celle de Dilmi Bouras *et al*. (2002) qui consiste à préparer une fraction de 5ml du surnageant des bactéries productrices additionnées de 0,3% sels biliaires. Ensuite les valeurs du pH sont réajustées à: 2,5 (représente la valeur de pH de l'estomac à jeun), 4,3 (valeur du pH de l'estomac au moment juste après le repas) et 6,5 (représente le pH au niveau des intestins (proche du pH du milieu de culture) en utilisant du HCl ou du NaOH à 3N. Après 2 heures d'incubation à 37°C, on a testé l'activité des surnageant traités vis-à-vis de la souche indicatrice par la méthode de diffusion en puits (Tagg et McGiven, 1971 ; Vinod Kumar *et al*, 2006).

***Chapitre III***  
***Résultats et discussion***

### 1. Etude physico-chimique des échantillons :

Les résultats obtenus de l'étude physicochimique exécutés sur les différents échantillons du *Lben* étudiés sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 5 :** Résultats des analyses physico-chimiques du *Lben* traditionnel.

			Moyenne de 5 échantillons ± écart-type
Paramètres	Unité	Méthode	<i>Lben</i>
pH à 20 °C	UI	Potentiométrie	04.72 ± 0.57
Acidité (°D)	Dornic	Titrage	87.60 ± 01.49

D'après ces résultats, le pH du *Lben* traditionnel est compris entre 04.01 et 04.69. Ces résultats est similaire à celui signalé par Aissaoui et al. (2011). La teneur en acide lactique dans les échantillons du *Lben* traditionnel est de 7.22 à 8.50 gramme pour cent gramme du *Lben*, ces valeur Dans le même contexte les mesures obtenues de l'acidité titrable (°D) sont varient entres 72.2 °D et 85.5 °D, ceci correspond avec les résultats obtenus par Mennane *et al*, 2007. Les produits analysés sont caractérisés par une acidité titrable partiellement élevée et un pH faible ce qui confirme de la présence des Lactobacilles.

### 2- Etude microbiologique des échantillons :

#### 2-1- Dénombrement des Lactobacilles :

Sur gélose MRS à pH 5.6 des dénombrements ont été effectués, les résultats sont résumés dans le tableau 5.

**Tableau 6 :** Résultats de dénombrement des lactobacilles sur gélose MRS

Echantillons	E1	E2	E3	E4	E5
MN (Ufc/g)	19x10 <sup>6</sup>	20x10 <sup>6</sup>	23x10 <sup>6</sup>	22x10 <sup>6</sup>	17x10 <sup>6</sup>

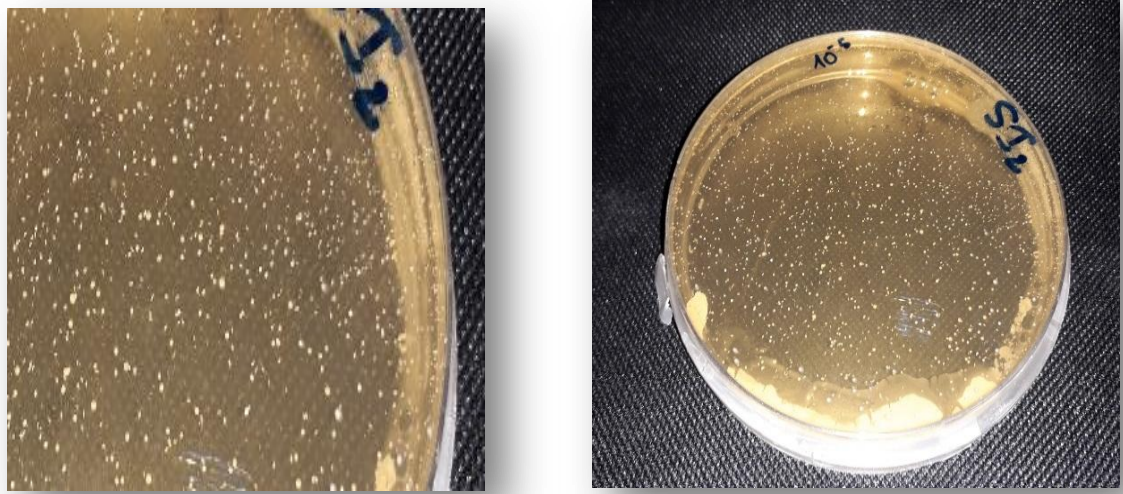
MN : Nombre de Lactobacilles, Ufc : Unité formant colonies

Le dénombrement des Lactobacilles à 37° C sur milieu MRS, montre que le *Lben* possède une charge moyenne entre 23x10<sup>6</sup> et 17x10<sup>6</sup>. Nos valeurs sont beaucoup plus moins que celles trouvés dans de *Lben* étudié par Belyagoubi et Abdelouahid (2013) ou la charge est de (3.47x10<sup>7</sup> UFC/g). Elles sont aussi moins par rapport aux valeurs trouvées par Mennane *et*

al, (2007) soit  $(7.5 \times 10^4)$  UFC/g). Les résultats obtenus montrent que les lactobacilles sont très élevés dans les échantillons du Lben analysés sur le milieu MRS.

### 2-2-Isolement et purification :

Parmi les 37 souches isolées de *Lben* traditionnelle sur milieu MRS acidifiant (pH 5,6), à des températures de 37° C. Les colonies isolées et purifiées sont apparues de tailles variables avec une couleur blanchâtre ou laiteuse (Figure 3).



**Figure 3 :** Aspect des colonies de bactéries lactiques obtenues après 72 h d'incubation à 37°C sur milieu MRS (ensemencement en masse).

### 2-3- caractérisation et identification des Lactobacilles:

L'identification des souches bactériennes a été réalisée selon le schéma de la démarche dichotomique des espèces proposée par Carr *et al.* (2002) et selon la classification proposée par Jiwoua et Milliere, (1990), Manero et Blanch, (1999) et Bjorkroth et Holzapfel. (2006).

#### 2-3-1- Caractérisation morphologique :

##### 2-3-1-1- Examen macroscopique :

L'aspect macroscopique, permet de décrire les colonies obtenues sur milieu solide MRS à pH =5.6 après incubation, les comparant ainsi aux critères relatifs aux colonies de bactérie lactique (Ana BelenFlorez *et al*, 2006). Nous avons constaté sur milieu solide des colonies de petite taille d'environ 1 à 2 mm de diamètre, de forme circulaire, et de couleur blanchâtre (Figure 4). Par contre, l'observation macroscopique en milieu liquide nous a permis

d'observer un trouble assez dense comparativement au témoin, ce qui indique une croissance bactérienne au fond du tube (Figure 4).



**Figure 4 :** (A) Aspect des colonies de bactéries lactiques sur gélose MRS. (B) Aspect de culture pure de bactéries lactique, en milieu MRS liquide (T : Témoin, 1 : Pas de croissance, 2 : Trouble de croissance).

#### 2-3-1-2- Examen microscopique :

Après cet examen, toutes les souches Gram positif et catalase négative sont présumées des bactéries lactiques ; elles se présentent en forme de bâtonnet disposé en chaînette plus ou moins longue (Figure 5), des coques disposées en amas, en chaînes, et en paires et des bacilles disposés en chaînes et en paires.



**Figure 5:** Observation des Lactobacilles au microscope optique (Grossissement x 1000) après coloration de Gram.

#### 2-3-2- Caractérisations physiologiques et biochimiques :

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats sont résumés dans le tableau 6. Ces tests ont permis d'établir une identification des souches. De toutes les souches

Gram positive, catalase négative, les 06 isolats sont des thermophiles. La majorité des souches sont homofermentaires (90%), le reste est représenté par les bactéries hétérofermentaires.

### 2-3-1- Croissance à différentes températures :

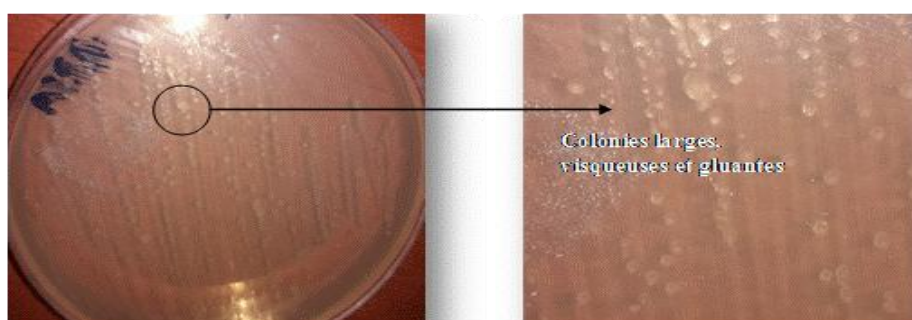
L'emploi de ce test permet de diviser les souches en deux groupes : groupe des souches mésophiles et le groupes des souches thermophiles. La croissance des isolats a été testée à 37 et 45°C. Dans cette étude, la majorité des souches testées sont signalées mésophile, elles poussent bien à 37°C après 48 h d'incubation. Selon Tailliez, (2004), la plupart des lactobacilles se multiplie dans une gamme de températures comprise entre 15 °C et 42 °C. Certaines souches de lactobacilles dites «thermophiles » restent viables à 55 °C.

### 2-3-2- Effet de NaCl et du pH :

La mise en culture des souches à pH 6,6 , 8.3 et 3et à la présence de différentes concentration de NaCl 5 et 10 % , nous a permis d'évaluer leurs aptitudes à croitre La plus part des souches isolées sont capable de croitre sur bouillon MRS avec concentration5% de NaCl et pour une concentration de 10% de NaCl, les souches n'ont pas peuvent se développées .Toutes les souches isolées sont capables de croitre sur bouillon MRS à pH 6.6,et sont incapables de croitre à pH 8.3.

### 2-3-3- Production de dextrane :

La seule souche qui produit le dextrane est M 05, M 06 ,M 07 mais les autres souches ne produisent pas le dedextrane.



**Figure 6:** Aspect des colonies produisant de dextrane sur milieu MSE.

### 2-3-4-Production de l'acétoïne :

Il apparaît que toutes les souches n'arrivent pas à produire des arômes (acétoïne)d'où l'absence de la couleur rose dans le milieu. Donc ils n'ont pas un pouvoir aromatisant

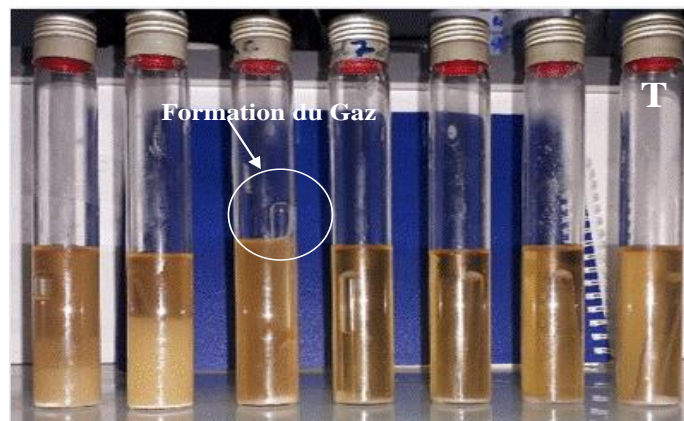
(Figure7). Ces résultats ne pas identiques de ceux de Slamnia et Saddok, (2018), qui ont montré la production d'acétoïne chez les Lactobacilles.



**Figure 7 :** Test de l'acétoïne des *Lactobacillus* isolés.

### 2-3-5-Type fermentaire :

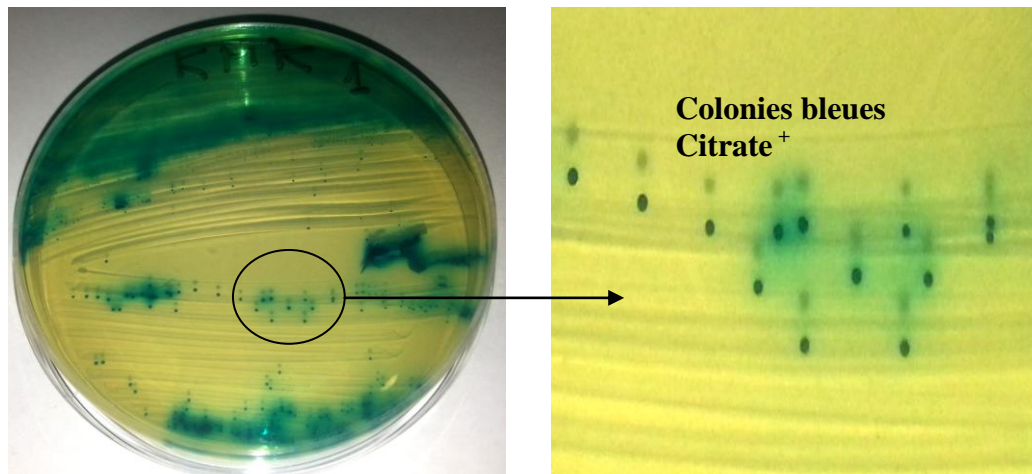
Les résultats de l'étude du pouvoir fermentaire sont mentionnés dans le tableau (7). Ce teste est effectué sur le milieu MRS liquide avec cloche de Durham et permet de différencier les isolats homolactiques des hétérolactique après une incubation à 37°C pendant 24 heures jusqu'à 48 heures. Les résultats positifs se traduisent par la production du gaz CO<sub>2</sub> dans les cloches. Dans notre cas les souches (M1, M2, M4, M5, M6 et M7) sont des homofermentaires sauf une seule souche M3) est hétérofermentaire (Figure 8).



**Figure 8 :** Test de fermentation (milieu MRS liquide contenant la cloche de durham incubé à 37 °C pendant 24 à 72h. T : témoin.

### 2-3-6-Test de citrate :

Le milieu KMK, différencié entre les bactéries utilisant le citrate et donnant ainsi des colonies bleues et entre celles qui n'utilisent pas le citrate donnant des colonies blanches. Les souches (M1, M2, M5, M6 et M7) ont données un résultat positif (citrate positif) et les autres souches (M3 et M4) sont Citrate négatif (Figure 9).



**Figure 9:** Test du citrate (culture de lactobacilles sur le milieu KMK), colonie bleue.

### 2-3-7-Hydrolyse de l'arginine :

L'incapacité à hydrolyser l'arginine de lactobacilles est un résultat normal, dû à leur appartenance au groupe II des lactobacilles. Les souches des lactobacilles sont différenciées par le test d'ADH. Les souches M1, M2, M5, M6 et M7 donne des colonies blanches sur M16 BCP, lors de l'absence de l'enzyme ( $ADH^-$ ), tandis que la présence de cette enzyme ( $ADH^+$ ), la souche M3 et M4 donne des colonies bleues (Bourgois et Larpent, 1996).

### 2-3-9- Profil fermentaire :

Le test de fermentation des sucres dans le milieu MRS-BCP, utilisé dans l'identification des espèces. La lecture du profil fermentaire montre que le lactose, le glucose et le fructose sont fermentés par tous les Lactobacilles. Les tests physiologiques associés aux profils fermentaires ont permis d'identifier l'appartenance des souches aux espèces de bactéries lactiques (Tableau 07). D'autres différences sont observées chez les autres espèces et elles sont dues à des facteurs génétiques transférables (comme les plasmides) ou à des mutations (Anderson et McKay, 1983).

**Tableau 7** : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des espèces des genres*Lactobacillus*.

Caractérisations	Souches						
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Production du gaz à partir du glucose	-	-	-	+	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de :							
ADH	-	-	+	+	-	-	-
Citrate	+	-	+	+	-	-	-
Croissance à différentes températures °C :							
-37	+	+	+	+	+	+	+
-45	-	+	+	+	-	+	-
croissance à différent pH :							
6.5	+	-	+	-	+	+	+
8.3	-	-	-	-	-	-	-
croissance en présence de NaCl :							
10 %	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation des sucres :							
-Arabinose	-	ND	+	+	-	-	-
-Cellobiose	+	-	+	-	-	+	+
-Mannitol	+	-	-	-	-	+	-
-Mannose	+	+	+	-	+	+	+
-Melibiose	+	-	+	+	-	-	-
-Raffinose	+	-	+	+	-	-	-
-Ribose	+	-	-	+	-	+	+
-Lactose	+	+	+	+	+	+	+
-Rhamnose	+	-	-	-	-	+	-
-Sorbitol	ND	+	+	ND	ND	ND	ND
-Xylose	-	ND	ND	+	-	-	-
-Tréhalose	+	+	+	-	-	+	+
-Maltose	+	-	+	+	-	+	+
-Esculine	+	+	+	-	-	-	+
-Sucrose	+	-	+	+	-	+	+
-Galactose	+	+	+	+	+	+	+
-Fructose	+	+	+	+	+	+	+

(+):Positif ; (-): Négatif ; (V): variable ; (ND) : Non déterminé. M1 : *Lactobacillus plantarium*, M2 : *Lactobacillus helveticus*, M3 : *Lactobacillus acidophilus*, M4 : *Lactobacillus fermentum*, M5 : *Lactobacillus casei* subsp.tolerans, M6 : *Lactobacillus rhamnosus*, M7 : *Lactobacillus alimentarius*.

### 3- Antagonisme Lactobacilles et bactéries pathogène :

Le pouvoir antagonisme des bactéries lactiques envers les bactéries à potentiel pathogène, notamment celle qui existe aux environnements laitiers. Est un caractère très recherché dans la bioconservation alimentaire. L'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes montre une activité antagonisme qui se manifeste par l'apparition des halots d'inhibition (Fleming et al, 1975).Les différents isolats de bactéries lactiques sélectionnées possèdent un fort effet bactéricide vis-à-vis de bactéries pathogènes à Gram positif: *Staphylococcus aureus* ATCC 65 38, *Bacillus subtilis* ATCC 9et de bactéries pathogène à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC L 25 922, suivant la méthode de diffusion à partir des

puits. Les résultats relatifs à ce test sont présentés dans le tableau 10 et illustrés dans les figures 10 et 11.

**Tableau 8 :** Résultats d'activité antibactérienne des *Lactobacillus* isolés vis-à-vis des bactéries pathogènes.

Souches indicatrices	Diamètre de la zone d'inhibition vis-à-vis des bactéries pathogène.		
	A	B	C
<i>Lactobacillus helveticus</i>	4.5	0.7	4
<i>Lactobacillus fermentum</i>	4.7	0.7	4.5
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Tolerans</i>	0.5	0	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0.2	0	0
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	0	0	0.4
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarium</i>	4	0.7	4.5

A : *S. aureus*, B : *E.coli*, C : *B. subtilis*.



**Figure 10:** Activité antibactérienne des souches lactiques sélectionnées vis-à-vis de *Bacillus subtilis* par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton après 24 heures d'incubation à 37°C à l'obscurité. (M1 : *Lactobacillus plantarium*, M2 : *Lactobacillus helveticus*, M3 : *Lactobacillus acidophilus*, M4 : *Lactobacillus fermentum*, M5 : *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, M6 : *Lactobacillus rhamnosus*, M7 : *Lactobacillus alimentarius*).



**Figure 11 :** Activité antibactérienne des souches lactiques sélectionnées vis-à-vis de, (1) : *Staphylococcus aureus*. (2) : *Escherichia coli* par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton après 24 heures d'incubation à 37°C à l'obscurité. (M1 : *Lactobacillus plantarium*, M2 : *Lactobacillus helveticus*, M3 : *Lactobacillus acidophilus*, M4 : *Lactobacillus fermentum*,).

Les résultats obtenus par la mesure des zones d'inhibitions après plusieurs tests ont montré que le diamètre des zones d'inhibition varie de 0.0 à 5 mm. Il était plus grand vis-à-vis aux bactéries pathogènes suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC 65 38 et *Bacillus subtilis* ATCC 9, par contre aucune inhibition n'a été détecté sur *Escherichia coli* ATCC L 25 922, sauf avec les souches *Lactobacillus plantarium*(M1) avec une zone d'inhibition de 0.7 mm et *Lactobacillus helveticus* (M2), ces résultats sont comparé avec les travaux de *Sharma et al*, (2017), Où les résultats était presque identiques.

Les souches : *Lactobacillus plantarium*(M1), et *Lactobacillus helveticus* (M2), présentent une activité bactéricide forte sur *Staphylococcus aureus* ATCC 65 38 et *Bacillus subtilis* ATCC 9, avec une zone d'inhibition plus de 4 mm (Figure 11 ). Les autres souches sont soit moins actives ou ne sont pas active avec des diamètres entre 0 et 1.5 mm.

Après avoir analysé les résultats des figures, il s'avère que la plus parts des bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices, ces ayant une activité antibactérienne et sont actives sur les bactéries pathogènes à Gram positifs mais, pas tous sur à Gram négatifs. La neutralisation du surnageant et l'ajout de catalase se prolongent à augmenter le degré d'inhibition (*Labioui et al*, 2005). D'après les résultats obtenus, il en ressort que la plupart des souches pures du genre *Lactobacillus* sont à l'origine de zones

d'inhibitions importantes. Ces résultats étaient presque proches des travaux de Metlef et Dilmi-Bouras, (2009).

L'activité des bactériocines ne se manifeste significativement qu'à des pH supérieurs à 4 et bien observée à pH compris entre 5 et 7, Vinod Kumar *et al.* (2006) et Metlef et Dilmi-Bouras, (2009) ont confirmé que le pH optimal de l'activité antimicrobienne est 6,5, de plus, ils ont confirmé que l'action de ces bactériocines est maximale au même pH (6,5). Après le traitement thermique pendant 20 minutes aux différentes températures : 70 °C, 80 °C et 100 °C le surnageant garde son activité antibactérienne, mais l'activité de cette substance diminuée rapidement lors d'un traitement de 20 minutes à 121 °C. Ces résultats pourraient être expliqués par la dénaturation de la bactériocine. Ce résultat est en accord avec celui de Mekri *et al.*, (2015).

Après neutralisation du surnageant (pH 6,5) et son traitement avec les enzymes protéolytique pepsine et  $\alpha$ -chymotrypsin, son activité inhibitrice a disparu et les diamètres des zones d'inhibition ont été nuls, ce qui assure que les enzymes protéolytiques ont détruit ces substances qui sont de nature protéique (Tableau 9). Preuve de cela, les bactériocines sont par définition des substances de nature protéique et thermostable (Dortu et Thonart, 2009).

**Tableau 9 :** Action des enzymes protéolytiques, du pH et du traitement thermique sur l'activité antimicrobienne du surnageant extraits contre la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 65 38.

Surnageant extraits des souches	Enzymes protéolytique $\alpha$ -chymotrypsin pepsine	pH du milieu				Traitement thermique T °C /20 minutes				
		3 7	4.5	5	6	70	80	100	120	
M1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
M2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
M5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
M6	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-

(-) : Pas d'inhibition, (+) : bonne inhibition. M1 : *Lactobacillus plantarium*, M2 : *Lactobacillus helveticus*, M5 : *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, M6 : *Lactobacillus rhamnosus*,

# *Conclusion*

## *Conclusion générale*

Les bactéries lactiques (ou ferments lactiques) représentent un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires comme la viande, les végétaux et les céréales, elles font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animale.

L'isolement et l'identification des bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus* a été effectué à partir du Lben traditionnel provient de la commune Ben Srou wilaya de M'sila. 07 isolats ont été caractérisés par leur forme de bâtonnet, Gram positif, catalase négative. Ces 07 isolats sont retenus et ont subi des tests physiologiques et biochimiques pour identification de l'espèce. Les espèces révélées sont: *Lactobacillus plantarium*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* subsp.*tolerans*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus alimentarius*.

Les *Lactobacillus* identifiées ont été testées pour déterminer leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis des souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et à Gram négatif (*Escherichia coli*). Les résultats d'inhibition révèlent que les souches M1 et M2 ayant une activité antibactérienne vis-à-vis les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* Les souches M7 et M3 ne présentent aucune activité antibactérienne contre les souches pathogènes utilisées.

D'après les résultats de détermination de la nature de l'agent antibactérien on a constaté que les 07 souches isolées produisent des acides organiques et une substance de nature protéique inhibant la croissance des souches cibles utilisées.

Ces observations ouvrent des perspectives futures :

- ✓ Application du génie génétique pour l'identification des souches lactiques isolées.
- ✓ Il serait intéressant de faire une caractérisation plus poussée et une purification des substances inhibitrices produites par les souches de *Lactobacillus*. Des

études plus approfondies doivent être menées pour caractériser l'agent inhibiteur.

- ✓ l'évaluation de leurs aptitudes technologiques tel que : le pouvoir acidifiant et l'activité protéolytique.
- ✓ Possibilités de développer un levain lactique local, constitué par les souches isolées, ayant une activité antimicrobienne satisfaisante vis-à-vis des germes nuisibles.

# *Annexes*

## I) MILIEUX DE CULTURES :

1. **Gélose MRS (de De Man Rogosa et Sharpe, 1960)** : est utilisée pour la culture et le dénombrement des *Lactobacillus* dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires ainsi que dans les produits destinés à l'alimentation animale.

Ingrédients	Composition g/l
• Polypeptone	• 10.00
• Extrait de viande	• 10.00
• Extrait autolytique de levure	• 05.00
• Glucose	• 20.00
• Tween 80	• 01.08
• Phosphate de sodium	• 02.00
• Acétate de sodium	• 05.00
• Citrate d'ammonium	• 02.00
• Sulfate de magnésium	• 00.20
• Sulfate de manganèse	• 00.05
• Agar-agar bactériologique	• 15.00
• Eau distillée (q. s. p) : 1000 ml de Milieu	
• Autoclavage: 121 °C pendant 20 minutes.	
• pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 5.7 ± 0.1	

2. **Bouillon MRS-BCP**: Utilisé pour l'étude du profil fermentaire.

Ingrédients	Composition g/l
• Peptone	• 10.00
• Extrait de levure	• 05.00
• Tween 80	• 01.08
• Bromocrésol pourpre	• 00.25
• Phosphate de sodium	• 02.00
• Acétate de sodium	• 05.00
• Citrate d'ammonium	• 02.00
• Sulfate de magnésium	• 00.20
• Sulfate de manganèse	• 00.05
• Eau distillée (q. s. p) : 1000 ml de Milieu	
• Autoclavage: 121 °C pendant 20 minutes.	
• pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7.0	

3. **Gélose MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)** : est un milieu électif permettant la recherche et le dénombrement des *Leuconostoc* dans le lait, les produits laitiers et les aliments sucrés.

Ingrédients	Composition g/l
• Tryptone	• 10.00
• Gélatine	• 02.50
• Extrait autolytique de levure	• 05.00
• Saccharose	• 100.0
• Glucose	• 05.00
• Citrate de sodium	• 01.00
• Azide de sodium	• 0.075
• Agar-agar bactériologique	• 15.00
• Eau distillée (q. s. p) : 1000 ml de Milieu	
• Autoclavage: 121 °C pendant 20 minutes.	
• pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 6,8 ± 0,2	

4. **Bouillon lait écrémé** : utilisé en bactériologie pour les cultures bactériennes, l'étude du pouvoir acidifiant, l'étude de l'activité protéolytiques et la conservation des souches (30% lai écrémé +70% de glycérole).

Ingrédients	Composition g/l
• Lait écrémé	• 10.00
• Extrait de levure	• 00.50
• Eau distillée (q. s. p) : 1000 ml de Milieu	
• Autoclavage: 121 °C pendant 10 minutes.	
• pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 6.8 ± 0,2	

5. **Bouillon CL (Clark et Lubs, 1915)** : permet de différencier les *Enterobacteriaceae* avec les réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer. Le rouge de méthyle différencie le processus de fermentation, il est jaune au-dessus d'un pH de 6,3 et rouge en dessous de 4,2. La production d'acétoïne (acetyl méthyl carbinol) se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu.

Ingrédients	Composition g/l
• Peptone	• 07.00
• Glucose	• 05.00
• Phosphate dipotassique	• 05.00
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eau distillée (q. s. p) : 1000 ml de Milieu</li> <li>• Autoclavage: 121 °C pendant 20 minutes.</li> <li>• pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 5.0 ± 0,2</li> </ul>	
<u>La réaction de VogesProskauer (VP) :</u>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ajouter 10 gouttes de VPI et le même volume de VPII</li> <li>2. Ne pas fermer les tubes pour une bonne oxygénation</li> <li>3. Attendre quelques minutes</li> </ol>	
<u>Réactif VPI</u> : alpha-naphtol (06 g)/100 ml d'alcool éthylique à 60% (conservé en flacon opaque au réfrigérateur) <u>Réactif : VPII</u> : Soude concentrée (ou de potasse).	

6. **Gélose MH (Mueller Hinton)** : est reconnue par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques et aux sulfamides. Il constitue un excellent milieu de base pour la fabrication de géloses au sang.

7. **Milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980)** : Utilisé pour mettre évidence la présence de Citratase.

Ingrédients	Composition g/l
• Extrait de levure	03.00
• Biopolytone	02.50
• Glucose	05.00
• Agar-agar bactériologique	15.00
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eau distillée (q. s. p) : 1000 ml de Milieu</li> <li>• Autoclavage: 121 °C pendant 15 minutes.</li> <li>• pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7.4 ± 0,2</li> </ul>	

-Au moment de l'emploi on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanure de potassium 10 % (p/v), 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p). Ces solutions doivent être stérilisées par filtration (millipores 0.22 µm) sont conservées à l'obscurité à 4°C.

## II) SOLUTION, REACTIFS ET TAMPONS PHOSPHATE :

1. **Eau physiologique (type eau péptonée)** : est une solution utilisée en bactériologie pour la préparation des dilutions et la recherche d'indole.

Ingrédients	Composition g/l
• peptone exempte d'indole	• 10.00
• chlorure de sodium	• 05.00
• Eau distillée (q. s. p) : 1000 ml de Milieu	
• Autoclavage: 121 °C pendant 20 minutes.	
• pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7.1 ± 0,2	

2. **Tampons phosphate (Larpent, 1996)** : est une solution utilisée en bactériologie pour avoir des milieux tamponés.

pH	5.	5.5	5.8	6.	6.	6.	7.	7.	7.	8.	8.
	2			1	4	7	0	3	7	0	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	32	16	8	4	2	1	1	1	1	1	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	1	1	1	1	1	2	4	8	16	32
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tampons phosphate 0.1M : Solution de phosphate monopotassique 0.1M = 13.617 g/l. Solution de phosphate disodique 0.1M = 17.814g/l.</li> <li>• Autoclavage: 121 °C pendant 15 minutes.</li> </ul>										

3. **Les sucres** :glucose, galactose, fructose, fructose, mannose, lactose, xylose, raffinose, arabinose, mannitol, ribose, sorbitol, cellobiose, maltose, melibiose, tréhalose, rhamnose, esculine, sucrose et raffinose.

Ingrédients	Composition g
• <b>Sucre</b>	• 02.00
• <b>Eau distillée (q. s. p) : 100 ml de solution</b>	
• <b>Autoclavage: par filtration ou bain marie à 90°C pendant 15minutes.</b>	

## Annexe II

### COLORATION DE GRAM:

#### **Mettre des gants avant tout.**

1. Près d'un bec bunsen : prélever un frottis des bactéries de la culture à l'aide d'une anse de platine et les poser sur une lame. La passer au dessus bec bunsen pour sécher la lame. Dans cette étapes tout est stérile (milieux+objets manipulés).
2. Recouvrir la lame d'alcool pour fixer le frottis.
3. Incliner la lame et verser du violet de gentiane dessus puis laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau distillée.
4. Incliner la lame et recouvrir de solution de Lugol. Laisser agir 30 secondes puis rincer à l'eau distillée.
5. Verser quelques gouttes d'alcool sur la lame puis rincer à l'eau distillée.
6. Incliner la lame et recouvrir de fushine en évitant le frottis. Laisser agir 10-20 secondes puis rincer à l'eau distillée.

Répéter cette manipulation pour chaque lame. Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

# *Références*

## A

**Aissaoui Zitoun O ép. H, (2014).** Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnel algérien « *Bouhezza* » Thèse de Doctorat en sciences. Spécialité : Sciences Alimentaires. Université Constantine 1. Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires I.N.A.T.A-A. 196.

aliments.

**Allouche F A, Hellal A, Laraba A, (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nat. Technol.* 3:13-20.

**Amiot J., Angers P., Bazinet L., Boutonnier J.L., Britten M., Castaigne F., Champagne Arthur C, Ouwehand, AV W, (2011).** *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition*, CRC Press, 4<sup>e</sup> édition. ISBN: 1439836779.

## B

**Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M. &Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « arabia et kabyle ». *Science and Technologie*, **23**: 30-37.

**Barefoot S F, Klaenhammer T R, (1983).** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (45): 1808-1815.

**Bartels H.J., Johnson M.E. et Olson N.F. (1987).** *Milchwissenschaft*, 42, 83.

**Bencharif A.(2001).** Stratégies des acteurs de la filières lait en Algérie : états des lieux et problématique.

**Benkerroum N, Tamime A Y, (2004).** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (l'ben, j'ben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* (21): 399-314.

**Benkerroum N. et Tamime A.Y. (2004).** Technologytransfer of someMoroccantraditional

**Benthin S. et Villadsen J., (1995).**Different inhibition of *Lactobacillus delbruckiisubsp. bulgaricus* by D- and L- lacticacid : effects on lag phase. growth rate and cellyield. *J. Appl. Bacteriol.* 78 : 647-654

**Berefoots S.F. et Klaenhammer T.R. (1983).** Detection and activity of lactacin b, abacteriocinsproduced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1808.

**Bourgeois C.M., Larpent J.P. 1996.** *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentes et fermentations alimentaires.* Tome 2

**Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zuca, J. (1991).** Lait et les produits laitiers non fermentés,

## C

**C., Dupuis C., Fliss I. et al. (2002).** *Science et technologie du lait transformation du lait.*

**Carr, F J, Chill, D, Maida, N, (2002).** The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, (28): 281-370.

**Claps S. et Morone G. (2011).** Produit laitiers et fromagers traditionnels d'Algérie. Corfilac.

**Cocolin L., Rantsiou K. 2007.** Sequencing and expression analysis of sakacigenes in *Lactobacillus curvatus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76, 6, 1403-11.

## D

**Dahou A, Homrani, A, Bensaleh F, Medjahed M. 2015** «La microflore lactique d'un fromage traditionnel Algérien « type j'ben » : connaissance des écosystèmes microbiens laitiers locaux et de leurs rôles dans la fabrication des fromages». *Afrique Science*, 11 (6).

dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiol.* 21:399–314.

de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastro-duodénales. 22 Février 2011

**De Roissart, H. & Luquet, F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Loriga, France, 1 : 1-286.

**De Vliegher S, Opsomer G, Vanrolleghem A, Sampimon O, Sol J, Barkema H W, Haesebroeck F, De Kruif A, (2004).** In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Vet. Microbiol.* 101:215–221

Département des sciences des aliments et de nutrition. Doctorat en sciences et technologie des aliments. Directeur de recherche : Lacroix, Christophe.

**Doleyres Y, (2003).** Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées, Philosophiæ Doctor (Ph.D.). Université Laval.

Dortu C., Thonart P. 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* Edition Ecole polytechnique de Montréal.

**Esmail A, Chahboun N, Mennane Z, Amiyare R, Abed H, Barrahi M, Qebibo A, Ouhssine M, Berny E H, (2015).** Étude de l'activité antimicrobienne des margines issues de Fès Boulman vis-à-vis de souches pathogènes. *J Mater Environ Sci* 6 (3): 869-876.

**Esmail A, Chahboun N, Mennane Z, Amiyare R, Abed H, Barrahi M, Qebibo A, Ouhssine M, Berny E H, (2015).** Étude de l'activité antimicrobienne des margines issues de Fès Boulman vis-à-vis de souches pathogènes. *J Mater Environ Sci* 6 (3): 869-876.

et l'identification biochimique des bactéries .3 ème édition, Doin éditeurs, Paris.

## F



**Klaenhammer T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12(1-3): 39-85**

**König, H. & Fröhlich, J. (2009).** Lactic acid bacteria. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 522 p.

## L

**labioui H, Elmoualdi L, El Yachoui M, Ouhssine M, (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériocines. Laboratoire de biotechnologie microbienne, Université Ibn Tofail, 14000 Kénitra, BP 133, Maroc : 237-248.

**Larpent J P, (1990).** Mémento technique de microbiologie : Microorganismes eucaryotes et procaryotes. Structure, métabolisme, Systématique, Applications industrielle et Milieux de culture et réactifs. Deuxième édition. Lavoisier, ISBN : 2-85206-679-3 : 399.

**Leksir C, Chemmam M, (2015).** Contribution à la caractérisation du *klila*, un fromage traditionnel de l'est de l'Algérie. *Livestock Research For Rural Development*, 27: (5). 0121-3784

**Leveau, J. Y. & Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. *Tec et Doc*, Lavoisier, Paris. 85-87 p.

**Luquet F.M. (1994).** Bactéries Lactiques II. Edition Loriga

## M

**Madigan M, Martinko J, (2007)** Brock Biologie des micro-organismes: Pearson Education, France. 11<sup>e</sup> édition: 1019.

**Marchal N., Bourdon J.L. et Richard, C.L. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement

**Medouni Y., Boulahchiche N. et Brahimi R. (2005).** Role de la femme rurale dans le

**Mekri M, Abbouni B, Tifrit A, LarbiDaouadji K, Doumandji A, (2015).** Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Goat's Milk against Spoilage and Pathogenic Bacteria. *Global Veterinaria* 15 (5): 485-492.

**Metlef S, Dilmi-Bouras A, (2009).** Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrémophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Revue Nature et Technology* 1: 33-44.

Microbiologie alimentaires. vol. 1, aspect micro biologique de la sécurité et de la qualité des  
optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J Appl Bacteriol.* 77, 140-148.

*Options Méditerranéennes Série B. Etudes et recherches* 32 : 25-45.

## P

pathogens. *FEMS. Microbiol. Rev.* 28: 405-440.

*Pediococcus* from cucumber. *Appl. Environ. Microbiol.*, 30:1040-1042.

**Pilet M.F ., Magras C. et Federighi M..2005.**Bactéries lactique .*In* : bactériologie alimentaire (Federighi M.).2<sup>e</sup> Ed., Economica .Paris 219-240.

Polytechnica. Edition, Paris. France.

**Puigmal Y, (2016).**Comparaison des différentes techniques d'identification microbienne dans le cadre des contrôles environnementaux.

## R

Region de Djelfa (Steppe central). Option : Méditerranéennes, série A., n°70.

**Roissant H.** (1986). bactéries lactiques In *Écosystème microbien d'un atelier fermier de*

## S

**Saidi N., Hadadji et Guessas B. (2011).** Screening of Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria isolated from West Algerian Goat's Milk. *Global J. Biotechnol. Biochem* 6(3): 154-166  
salaison identification et propriétés lactiques. thèse de doctorat. Université de Rennes. France. pp. 437-488.

**Savado A, Traore A S, (2011).** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5): 2057-2075

**Schmidt J.L., Tourneur C. et Lenoir J.** (1994). Fonctions et choix des bactéries lactiques et

**Servin AL. (2004).** Antagonistic activity of lactobacilli and bifidobacteria against microbial

**Singleton P. (1999).** Bactériologie. 4<sup>ème</sup> Edition. Dunod, Paris. 317 p.

smen. *MIRCEN Journal*, 3: 211-220.

S. LAIRINI 1\*, N. B. N. BEQQALI 1, R. BOUSLAMTI 1, R. BELKHOUCHE 1 et F. ZERROUQ. (2014). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. pp. 267-277.

**Sutra L., Federighi M. et Jouve J-L. (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire.

système de production agropastoral. Cas de la fabrication Ouled-Baida de la zone d'El Guedid

## T

**TABAK Souhila\*, BENSOLTANE Ahmed , 22 Février 2011.** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis ,71-78,73 .

**Tagg J.R., Mc Given A.R. 1971. Appl. Microbiol. 21: 943**

**Tailliez P. (2004).** Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Actualités microbiologiques. pp. 35-41.

**Tantoui-Elaraki A. et El Marrakchi A. (1987).** Study of Moroccan dairy products: Iben and technologies laitières. in : Bactéries lactiques II. De Roissart H. et Luquet F.M., Ch. IV-2, P.

**Ten Brink B., Minekus M., Van Der Vossen J.M.B.M., Leer R.J., Huis in't Veld J.H.J.**

**1994.** Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and

**Touati, K. (1990).** Chimie d'un fromage artisanal algérien "la klila". Mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, Algérie. 83 p. **Pilet, M. F., Magras, C. et Federighi, M. (1998).** Bactéries lactiques. Polytechnica, Paris. Pp : 235-260.

## V

**Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996).**

Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, **60**:407

Vinod Kumar J., Somesh S., Neerja S. 2006. Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. Food technology and Biotechnology, 44 (3): 435- 439.

## W

**Wilson A.R., Signee D. et Epton H. A. S. (2005).** Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* due to lactic acid production. *J. Appl. microbiol.* 99: 1516-1522.

## Abstract

In Algeria, as in the other countries of the world, there are indigenous dairy products whose production method derives from the cultural heritage of the population. These products are derived from the transformation of milk in order to extend its shelf life. Among the traditional Algerian milk preparations: *Zebda*, *Lben*, *Dhan* which can be sources of lactic acid bacteria which have inhibitory activities with respect to pathogenic germs. So they constitute a line of defense through the production of lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins.

In this study, 120 strains of lactic acid bacteria were isolated from the traditional Lben. The phenotypic identification by morphological and biochemical tests showed that seven strains belonged to the genus *Lactobacillus*. The identification by the fermentation profile led to different species as: M1: *Lactobacillus plantarium*, M2: *Lactobacillus helveticus*, M3: *Lactobacillus acidophilus*, M4: *Lactobacillus fermentum*, M5: *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, M6: *Lactobacillus rhamnosus*, M7: *Lactobacillus alimentarius*.

The 7 strains were tested for their antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The interaction of our lactic strains with pathogenic bacteria was detected by well diffusion technique on agar medium including forming halos around wells indicates the presence of inhibition.

From the results we note that the strains M1 and M2 having antibacterial activity against strains, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. The measurement of inhibition diameters reveals diameters which range from 1 to 5 mm. While the other strain exhibits no antibacterial activity against the pathogenic strains used. The effect of bacteriocins is also realized as a heat-sensitive protein substance is responsible for inhibition of pathogenic strains used.

**Key words:** Traditional dairy products, *Lactobacillus*, *Lben*, lactic acid bacteria, antagonism, pathogenic bacteria.

## المخلص

في الجزائر، كما هو الحال في بلدان العالم الأخرى، توجد منتجات الألبان الأصلية التي تستمد طريقة إنتاجها من التراث الثقافي للسكان. هذه المنتجات مستمدة من تحول الحليب من أجل إطالة العمر الافتراضي لها، ومن بين المستحضرات التقليدية للحليب الجزائري: الزبدة البلدي، اللبين، السمن البلدي التي يمكن أن تكون مصادر لبكتيريا حمض اللب ن التي لها أنشطة مثبطة فيما يتعلق بـالجراثيم المسببة للأمراض. لذلك فهي تشكل خط دفاع من خلال إنتاج حمض اللب ن، بيروكسيد الهيدروجين والبكتريوسين. من خلال هذه الدراسة تم عزل 37 بكتيريا حمض اللب ن من اللبين البلدي، 7 منها كانت من جنس *Lactobacillus* بعد التعرف عليها وفقا للمعيار المورفولوجي والبيوكيميائي. كما نتج عن التعريف بواسطة اختبار تخمير السكريات توزيع أنواع مختلفة على النحو التالي:

M1: *Lactobacillus plantarium*, M2: *Lactobacillus helveticus*, M3: *Lactobacillus acidophilus*, M4: *Lactobacillus fermentum*, M5: *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, M6: *Lactobacillus rhamnosus*, M7: *Lactobacillus alimentarius*.

تم اختبار سبع سلالات بحثاً عن آثار لوجود مواد مضادة للبكتيريا المرصدة التالية: *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis*. تم اكتشاف تفاعل سلالاتنا اللبينية مع البكتيريا المسببة للأمراض عن طريق تقنية انتشار المواد المثبطة في الأبار المحدث على وسط الزرع الصلب بما في ذلك تشكيل هالات حول الأبار يشير إلى وجود تثبيط. من النتائج المتحصل عليها نلاحظ أن السلالات M1 و M2 لها نشاط مضاد للجراثيم ضد السلالات التالية: *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis*. يكشف قياس أقطار التثبيط التي كانت تتراوح من 1 إلى 5 مم. في حين أن سلالات أخرى لا تملك أي نشاط مضاد للجراثيم المسببة للأمراض المستخدمة. ويتحقق أيضاً تأثير البكتريوسين باعتباره مادة بروتينية حساسة للحرارة مسؤولة عن تثبيط السلالات المسببة للأمراض المستخدمة.

**الكلمات المفتاحية:** منتجات الألبان التقليدية، *nebL*، *sullicabotcaL*، بكتريا حمض اللب ن، مضاد البكتيريا المسببة للأمراض.

