



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle. ABDELGHAFAR Djihane Khadîdja & Mlle. BOUCHIKHI Wahiba.

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée.**

THÈME

**Révision d'un stock congelé de souches de bactéries lactiques:  
Contrôle de la viabilité et de l'identification.**

Déposé le      Septembre 2020

Jury :

Président	<b>BENOURED F.</b>	<b>Maitre de Conférences [A]</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Encadreur	<b>BENNAMA R.</b>	<b>Maitre de Conférences [B]</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Examineur	<b>SAIAH F.</b>	<b>Maitre de Conférences [B]</b>	<b>U. Mostaganem</b>

*Année Universitaire: 2019-2020*



## **Avant-propos**

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce travail.

Nous exprimons toute notre reconnaissance et notre plus grand respect et nos remerciements à notre directrice de mémoire **BENNAMA R.**, Maître de conférences au département de biologie, pour avoir assuré l'encadrement de ce mémoire. Pour l'aide constante durant l'élaboration de ce travail. Pour ses conseils, ses compétences scientifiques et sa qualité humaine.

Nous adressons tous nos sincères remerciements aux membres du jury **Dr. BENOURED F.** et **Dr. SAIAH F.**, Maîtres de conférences de l'université de Mostaganem, pour leur rigueur scientifique, leur professionnalisme et le sérieux lors de l'évaluation de ce travail.

Nous remercions toutes les personnes que nous n'avons pas pu citer ici et qui ont participé, de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Sans oublier tous nos enseignants, spécifiquement Mr. DJIBAOUI, qui nous ont assurés des études de haut niveau et qui nous permis d'acquérir des connaissances.

Enfin, nous ne pourrions terminer sans remercier nos parents et tous les membres de nos familles respectives, de nous avoir soutenu et encouragé pour terminer le présent travail.

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>iv</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>v</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Partie I : Revue bibliographique</b>	
I. Les bactéries lactiques.....	<b>3</b>
1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques.....	<b>3</b>
2. Classification des bactéries lactiques.....	<b>3</b>
3. Principales voies métaboliques glycolytiques et exigences nutritionnelles des bactéries lactiques.....	<b>6</b>
3.1. Métabolisme des sucres.....	<b>6</b>
3.2. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques.....	<b>9</b>
3.2.1. Exigences en acides aminés .....	<b>9</b>
3.2.2. Exigences en vitamines.....	<b>9</b>
3.2.3. Exigence en base azotées .....	<b>10</b>
4. Intérêt des bactéries lactiques .....	<b>10</b>
II. Conservation des souches microbiennes .....	<b>11</b>
1. Notion de Bio-banking.....	<b>11</b>
2. Microorganismes et Biobanking .....	<b>12</b>
3. Approches de conservation à long terme.....	<b>13</b>
3.1. Introduction.....	<b>13</b>
3.2. Méthodes de conservation.....	<b>13</b>
3.2.1. La Lyophilisation.....	<b>14</b>
3.2.2. La cryoconservation.....	<b>15</b>
3.3. Les agents protecteurs : natures et effets .....	<b>15</b>
III. Viabilité des ferments lactiques au cours de la conservation.....	<b>16</b>
1. Introduction.....	<b>16</b>
2. Définition de la viabilité.....	<b>17</b>
3. Effets des principales méthodes de conservation sur la viabilité des bactéries lactiques.	<b>18</b>
<b>Partie II : Partie Expérimentale</b>	
<b>Matériel et méthodes</b>	
L'objectif d'étude.....	<b>20</b>
1. Milieux de culture utilisés.....	<b>20</b>
1.1. Milieu MRS.....	<b>20</b>
1.2. Peptone Saline.....	<b>20</b>
2. Souches étudiées.....	<b>20</b>
3.Évaluation de la viabilité et réactivation des isolats.....	<b>22</b>
3.1. Préparation et réactivation des isolats.....	<b>22</b>
3.2. Evaluation de la viabilité par numération directe.....	<b>22</b>
3.3. Réactivation et purification des isolats.....	<b>22</b>

4. Contrôle de l'identification des isolats.....	22
4.1. Étude morphologique.....	23
4.1.1. Examen macroscopique.....	23
4.1.2. Etude microscopique.....	23
4.1.2.1. Observation à l'état frais .....	23
4.1.2.2. Observation après coloration de Gram .....	23
4.2. Etude physiologique et biochimique.....	24
4.2.1. Détermination du type respiratoire .....	24
4.2.1.1. Test de catalase.....	24
4.2.1.2. Caractérisation physiologique et biochimique des isolats.....	24
 <b>Résultats et Discussion</b>	
1.Évaluation de la viabilité par numération directe.....	25
2. Réactivation et purification des isolats.....	27
3. Contrôle de l'identification des isolats.....	28
3.1. Etude morphologique.....	28
3.1.1. Aspect macroscopique.....	31
3.1.2. Aspect microscopique.....	31
3.1.2.1. Observation à l'état frais.....	31
 <b>Partie III : Présentation d'articles scientifiques</b>	
<b>Article 1:</b> Short communication: The effects of frozen storage on the survival of probiotic microorganisms found in traditionally and commercially manufactured kefir (O'Brien et al.,2016) .....	33
<b>Article 2:</b> Viability of freeze-dried cultures of lactic acid bacteria after storage for 30 to 40 years (Cabeza et al., 2011) .....	45
<b>Article 3:</b> Stabilization of Frozen Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus in Glycerol Suspensions: Freezing Kinetics and Storage Temperature Effects (Fonseca et al., 2006) ...	50
 <b>Conclusion</b> .....	71
<b>Références bibliographiques</b> .....	72
<b>Annexe</b> .....	

## Résumé

La viabilité et la stabilité des souches industrielles durant le stockage à long terme est une des propriétés capitales qui caractérise la qualité de ces souches, en vue d'une exploitation durable. Dans cette étude, il a été procédé à la révision d'un stock de 32 isolats de bactéries lactiques entreposé à -20°C, en présence de 30% de glycérol, pendant de nombreuses années. Cette révision a concerné dans un premier temps, l'évaluation directe de la viabilité cellulaire des isolats, après décongélation, par la méthode de numération microscopique directe, en utilisant la cellule de dénombrement "Petit Salumbeni". Les résultats de cette évaluation portés sur le calcul du taux de décroissance (en Log UFC/ml) et du taux de survie (en %) ont révélé un changement dans le nombre des isolats par rapport à leur nombre initial, avant conservation. De même, une grande variabilité dans le degré de résistance au stockage congelé a été observée parmi les isolats. Le taux de décroissance s'est étalé entre 0,2 et 2,5 Log UFC/ml et dont l'isolat N°6 s'est distingué par sa grande stabilité, en affichant une décroissance de 0,2 Log UFC/ml contre les autres isolats et en particulier l'isolat N°31 qui s'est montré le moins résistant avec une décroissance de 2,5 Log UFC/ml. Par ailleurs, le taux de survie (%) a confirmé les résultats observés précédemment, en dévoilant une survie de 67% et 0%, respectivement pour les isolats 6 et 31. Dans un second temps, le travail s'est axé sur la réactivation et le contrôle de l'identification des isolats. Douze isolats sur les 32 étudiés ont pu croître sur bouillon MRS, après réactivation à 37°C pendant 24h ou après prolongation jusqu'à 72h. Les premières étapes de l'identification ont uniquement concerné la détermination des aspects macroscopiques et microscopiques. Les isolats réactivés ont développé sur MRS-agar des colonies d'aspects variables caractéristiques aux bactéries lactiques. L'examen microscopique à l'état frais a révélé des formes cocoïdes et bacillaires, avec une dominance de la forme bacillaire. En dernier lieu, les articles scientifiques de **Fonseca et al., (2006)**, **Cabeza et al., (2011)** et de **O'Brien et al., (2016)** présentés dans ce travail proposent différents protocoles, pour étudier la viabilité des cultures de bactéries lactiques soumises à différentes méthodes de conservation et sous l'influence de plusieurs facteurs. L'étude de **O'Brien et al., (2016)** avait pointé sur l'importance de la congélation dans la préservation des souches probiotiques contenues dans le Kéfir traditionnel. Celle de **Cabeza et al., (2011)** avait indiqué que la lyophilisation est la méthode la plus appropriée pour une conservation plus ou moins efficace et enfin **Fonseca et al., (2006)** avaient noté que la vitesse de refroidissement et la température de congélation ont une grande influence sur la viabilité et l'activité d'acidification de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

**Mots clés:** bactéries lactiques, gestion de collection, conservation, congélation, viabilité et évaluation de la viabilité, décroissance, survie, contrôle de l'identification.

## **Abstract**

The viability and stability of industrial strains during long-term storage is one of the key properties that characterize the quality of these strains, with a view to sustainable exploitation. In this study, a stock of 32 isolates of lactic acid bacteria stored at -20 °C in the presence of 30% glycerol for many years was revised. This revision concerned firstly, direct evaluation of cell viability of isolates, after thawing, by direct microscopic count method, using “Petit Salumbeni” counting cell. Results of this evaluation based on the calculation of the decline rate (in Log CFU / ml) and the survival rate (in %) revealed a change in the number of isolates compared to their initial number before storage. Likewise, great variability in resistance degree to frozen storage was observed among isolates. The decline rate was between 0,2 and 2,5 Log CFU/ml and isolate No. 6 was distinguished by its high stability, showing a decrease of 0,2 Log CFU/ ml against the other isolates and in particular isolate No. 31 which showed out to be the least resistant with a decrease of 2,5 Log CFU/ml. In addition, the calculated survival rate (%) confirmed the results previously observed, revealing a survival of 67% and 0%, respectively for isolates 6 and 31. Secondly, the work focused on reactivation and control of the identification of isolates. Twelve isolates out of the 32 studied were able to grow on MRS broth, after reactivation at 37°C for 24hours or after prolongation up to 72hours. The first steps of identification concerned only, the determination of the macroscopic and microscopic aspects. The reactivated isolates developed on MRS-agar colonies with variable appearances characteristic to the lactic acid bacteria. The wet drop microscopic examination revealed coccoid and bacillary forms, with a dominance of the bacillary form. Finally, the scientific papers of **Fonseca et al., (2006)**, **Cabeza et al., (2011)** and **O'Brien et al., (2016)** presented in this work propose different protocols for studying the viability of lactic acid bacteria cultures, subjected to different preservation methods and under the influence of several factors. The study by **O'Brien et al., (2016)** pointed out the importance of freezing in preserving the probiotic strains contained in traditional kefir. That of **Cabeza et al., (2011)** had indicated that freeze-drying is the most appropriate method for a more or less efficient preservation and finally **Fonseca et al., (2006)** had noted that the cooling rate and the freezing temperature have a great influence on the viability and acidifying activity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

**Key words:** lactic acid bacteria, collection management, storage, freezing, viability and viability evaluation, decrease, survival, Control of identification.

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique.  
**°C** : Degré Celsius  
**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone  
**CRB** : centre de ressources biologiques  
**CC** : collections de cultures  
**CRBm** : centres de ressources biologiques microbiennes  
**CSPs** : cold shock Proteins  
**DMSO** : diméthylsulfoxyde  
**EPS** : exopolysaccharides  
**EMP**: Embden-Meyerhof-Parnas  
**G+C%**: Guanine + Cytosine %  
**g** : gramme  
**LDH** : la lactate déshydrogénase  
**MRS : de Man Rogosa et Sharpe**  
**min** : minutes  
**ml** : millilitre  
**mm** : millimètre  
**nm** : nanomètre  
**O<sub>2</sub>** : oxygène  
**OCDE** : organisation de coopération et de développement économique  
**PCR** : Polymérase Chain réaction  
**P/V** : poids /volume  
**pH** : Potentiel d'hydrogène  
**Subsp** : sous espèce  
**µl** : microlitre  
**T** : Température  
**UFC** : Unité formant colonies.  
**V/V** : volume/volume  
**%** : pourcentage  
**<** : Inférieur  
**+** : présence ou test positif  
**-** : absence ou test négatif  
**PTS** : système de phospho-transférase  
**LDH** : lactate déshydrogénase  
**GAP** : glycéraldéhyde 3-phosphate  
**Me<sub>2</sub>SO** : Diméthyle sulfoxyde  
**H** : heure  
**Kg** : kilogramme  
**KPa** : kilopascal

## Liste des tableaux

### Tableaux cités dans la revue bibliographique et la partie expérimentale

<b>Tableau I</b> : Caractères différentiels des genres de bactéries lactiques .....	<b>4</b>
<b>Tableau II</b> : Présentation des isolats étudiés.....	<b>21</b>
<b>Tableau III</b> : Principaux résultats des aspects macroscopiques et microscopiques des isolats réactivés.....	<b>28</b>

### Tableaux cités dans l'article de O'Brien et al., 2016.

<b>Tableau I</b> : Effets des traitements de type et de stockage sur la réduction des micro-organismes. Type = kéfir traditionnel et commercial; stockage = 30j.....	<b>38</b>
<b>Tableau II</b> : Dénombrements moyens (log UFC/mL) des lactobacilles viables après stockage jusqu'à 30j.....	<b>38</b>
<b>Tableau III</b> : Dénombrements moyens (log UFC/mL) des lactocoques viables après stockage jusqu'à 30 j.....	<b>39</b>
<b>Tableau IV</b> : Dénombrements moyens (log UFC/mL) des levures viables après stockage jusqu'à 30 j.....	<b>43</b>

### Tableaux cités dans l'article de Cabeza et al., 2011.

<b>Tableau I</b> : Récupération des organismes (UFC/ml) dans plusieurs milieux à partir des cultures lyophilisées après 30-37 ans de stockage.....	<b>49</b>
--	-----------

### Tableaux cités dans l'article de Fonseca et al., 2006.

<b>Tableau I</b> : Activités de viabilité et d'acidification après congélation et après 1 mois de stockage à -20°C et -80°C suivant trois protocoles de congélation .....	<b>58</b>
<b>Tableau II</b> : Températures de transition vitreuse, chaleur de cristallisation, quantité de glace formée et concentration de glycérol pour chaque protocole de congélation appliqué.....	<b>62</b>

## Liste des figures

## Figures citées dans la revue bibliographique et la partie expérimentale

<b>Figure 1</b> : Arbre phylogénétique des membres représentatifs des Firmicutes.....	5
<b>Figure 2</b> : Arbre phylogénétique des Actinobactérie .....	6
<b>Figure 3</b> : Vue d'ensemble de la fermentation des sucres chez les bactéries lactiques.....	8
<b>Figure 4</b> : Taux de viabilité (estimé par le calcul de la décroissance en Log UFC/ml) des isolats étudiés.....	26
<b>Figure 5</b> : Survie (%) des isolats étudiés après décongélation.....	26
<b>Figure 6</b> : Aspects des cultures de quelques isolats réactivés sur MRS bouillon indiquant présence ou absence de trouble, après 24h d'incubation à 37°C.....	31
<b>Figure 7</b> : Aspect des colonies formées par les isolats 10 et 16 sur MRS-agar après 24h à 37°C.....	31

## Figures citées dans l'article de O'Brien et al., 2016

<b>Figure 1</b> : Réduction des populations de lactobacilles, lactocoques et levures dans le kéfir traditionnel et commercial pendant 30 j de stockage congelé.....	39
<b>Figure 2</b> : Réduction des lactobacilles dans le kéfir traditionnel et commercial pendant 30 jours de stockage congelé. Les valeurs sont indiquées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type.....	40
<b>Figure 3</b> : Réduction des lactocoques dans le kéfir traditionnel et commercial pendant 30 jours de stockage congelé. Les valeurs sont indiquées sous forme de moyenne $\pm$ ET.....	42
<b>Figure 4</b> : Réduction des levures dans le kéfir traditionnel et commercial pendant 30 jours de stockage congelé. Les valeurs sont indiquées sous forme de moyenne $\pm$ ET.....	43

## Figures citées dans l'article de Cabeza et al., 2011

<b>Figure 1</b> : Les souches lyophilisées utilisé dans cette étude, présentée dans leurs flacons originaux avant de leur récupération.....	47
---	----

## Figures citées dans l'article de Fonseca et al., 2006

<b>Figure 1</b> : Protocoles de congélation FP 1, FP 2 et FP 3.....	54
<b>Figure 2</b> : Activités d'acidification.....	55
<b>Figure 3</b> : Cryo-SEM de <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CFL1 en suspension dans du glycérol et refroidi par différentes conditions de traitement, c'est-à-dire FP 3 (a et b), FP 1 (c et d) et FP 2 (e et f).....	59
<b>Figure 4</b> : Les détails de l'interface entre la matrice congelée concentrée et la glace pour les échantillons refroidis par FP 2 (a) ou par FP 3 (b) sont indiqués.....	59
<b>Figure 5</b> : Microscopie électronique à substitution par congélation de <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CFL1 soit en suspension dans du glycérol et refroidi par différentes conditions de traitement après congélation à différentes vitesses à 196 °C (FP 3 [a], FP 1 [b] et FP 2 [c]) soit suspendu dans de l'eau distillée et directement immergé dans azote liquide(d).....	61
<b>Figure 6</b> : Cryo-SEM (a et b) et microscopie électronique à substitution par congélation (c et d) de <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CFL1 en suspension dans du glycérol, refroidi par FP 1, maintenu à 20 °C pendant 24 h, puis réimmergé dans de l'azote liquide.....	63

# *Introduction*

## **Introduction**

Les bactéries lactiques est un groupe de microorganismes hétérogène et exigent (**Chen et al., 2005**), elles ont été étroitement associées aux humains tout au long de l'histoire (**Lynch et al., 2018**). Leur utilisation dans la technologie alimentaire était et reste une tendance même à nos jours (**Yanagida et al., 2007; Fonseca et al, 2019**), où elles peuvent contribuer principalement comme cultures starters, pour améliorer les caractéristiques organoleptiques et augmenter la durée de conservation des produits laitiers fermentés et ainsi comme une culture protectrice.

Les entreprises de production du domaine doivent livrer les souches starters aux industriels du secteur dans un état intact. Pour ces raisons, plusieurs méthodes de conservation sont utilisées, parmi lesquelles la congélation et la lyophilisation, largement employées dans le maintien et stockage des bactéries lactiques (**Fonseca et al, 2019**). Cependant, au cours de ces processus les cellules sont exposées à plusieurs niveaux de stress, tels que la cristallisation de glace, la basse température, le choc osmotique, le pH extrême...etc., qui peuvent causer une perte de la viabilité cellulaire. Ainsi, pour remédier à ces contraintes, différents agents protecteurs (sucre, polyols, acides aminés et sels) sont utilisés (**Choi et al., 2018**).

«La viabilité des bactéries, ce n'est pas une simple question de cellules mortes ou vivantes » (**Kramer et al., 2009**), elle peut être influencer par plusieurs facteurs qui sont liés aux microorganismes eux-mêmes et aux conditions de production (fermentation, concentration, congélation) et de stockage (**Fonseca et al., 2001**), tels que la teneur en humidité des échantillons, la température, le niveau d'oxygène, humidité relative de l'environnement et le type de protecteur utilisé (**Ambros et al., 2018**).

De ces considérations, une problématique se pose sur la viabilité des bactéries lactiques durant la conservation, quelle méthode provoque moins de dommages cellulaires et de perte de viabilité, et laquelle peut préserver plus de caractères physico-chimiques des cellules conservées. Parmi les protecteurs, lesquels peuvent garantir un taux plus ou moins élevé de viabilité pendant la conservation?

C'est dans cette perspective relative à la conservation et à la préservation de la viabilité des souches d'intérêt que la présente étude a été proposée, pour effectuer une révision d'un stock d'isolats de bactéries lactiques entreposé à -20°C. Le but principal a été de contrôler la viabilité des isolats, mais surtout de réorganiser ce stock après un contrôle de l'identification.

Ce mémoire est présenté en trois parties:

**La partie bibliographique:**

Cette partie traite les titres suivants: Les bactéries lactiques, conservation des souches microbiennes, viabilité des ferments lactiques au cours de la conservation.

**La partie expérimentale:**

Elle concerne le travail réalisé durant notre séjour au laboratoire et est organisée dans la structure: matériel & méthodes et résultats & discussion.

**La partie Présentation d'articles scientifiques**

Elle comprend la présentation de trois articles de recherches, dont la thématique est proche de celle de notre mémoire.

- Nous tenons à signaler qu'à cause du problème commun dans le monde cette année 2020: « la pandémie du covid-19 », nous n'avons pas pu achever nos travaux pratiques au laboratoire. Pour cela, nous avons essayé de compléter notre mémoire, en présentant des articles scientifiques traitant la même problématique, pour parvenir en bout de piste au résultat souhaité avec la pratique planifiée avant cette pandémie, et obtenir un manuscrit de valeur digne du niveau d'un master, qui traduit notre apprentissage pendant notre cursus.

# *Revue Bibliographique*

## I. Les bactéries lactiques

### 1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de bactéries Gram-positif, hétérotrophes et chimioorganotrophes très ubiquistes, omniprésentes et répandues dans la nature. Elles sont souvent trouvées dans une variété d'habitats riches en nutriments tels que les denrées alimentaires, les aliments pour animaux, les plantes et le sol (Carr *et al.*, 2002; Ruiz Rodríguez *et al.*, 2019). Ces germes dotés d'adaptations nutritionnelles, environnementales et adhésives sont aussi des habitants communs des surfaces muqueuses humaines, telles que la cavité buccale, le vagin et le tractus gastro-intestinal (Cai *et al.*, 1999; Bintsis, 2018).

Les bactéries lactiques typiques sont asporulées, catalase négative, dépourvues de cytochromes, anaérobies, mais aéro-tolérantes, coccoïdes ou bâtonnets tolérant l'acidité et produisant de l'acide lactique comme principal produit final de la fermentation des glucides (Salminen *et al.*, 2004; Lahtinen *et al.*, 2011). En raison de leur faible capacité biosynthétique, les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994; Mokoena, 2017).

### 2. Classification des bactéries lactiques

L'approche classique de la taxonomie bactérienne est basée sur des traits morphologique et physiologique. Sur le plan morphologique, le groupe des bactéries lactiques *stricto sensu* est formé par des bactéries ayant une morphologie très diversifiée, parmi lesquelles, des bactéries de forme coccoïde, appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*, et celles de forme bacillaire des genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium* (Tableau I) (Stiles & Holzapfel, 1997; Ringo *et al.*, 2018). Par ailleurs, les critères physiologiques les plus considérés incluent : le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures (de 15 à 45°C) (Mokoena, 2017; Mittholiya *et al.*, 2020), la nature de l'acide lactique produit (D, L ou DL), la tolérance ou l'intolérance aux fortes concentrations en sel (6,5%, 18% NaCl), la tolérance à l'acidité (des pH relativement bas), au milieu alcalin ou à l'éthanol, l'hydrolyse de l'arginine et la formation de l'acétoïne (Axelsson, 2004; Liu *et al.*, 2014).

**Tableau I:** Caractères différentiels des genres de bactéries lactiques adaptés d'après (Axelsson, 2004 ; Dellaglio et al. 1994).

Caractère		Formation de tétrade	Formation de CO <sub>2</sub> du glucose	Croissance à 10°C	Croissance à 45°C	Croissance à 6,5% NaCl	Croissance à 18% NaCl	Croissance à pH 4,4	Croissance à pH 9,6	Acide lactique <sup>d</sup>	%(C-G)
Genre											
Bâtonnets	<i>Carnobacterium</i>	-	- <sup>b</sup>	+	-	ND <sup>c</sup>	-	ND	-	L	33 à 37%
	<i>Lactobacillus</i>	-	±	±	±	±	-	±	-	D, L, DL <sup>e</sup>	32 à 53%
coques	<i>Aerococcus</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	L	35 à 44%
	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	L	37 à 44%
	<i>Lactococcus</i>	-	-	+	-	-	-	±	-	L	34 à 36%
	<i>Vagococcus</i>										33 à 37%
	<i>Leuconostoc</i>	-	+	+	-	±	-	±	-	D	36 à 43%
	<i>Oenococcus</i>										
	<i>Pediococcus</i>	+	±	+	±	±	-	+	-	D, DL <sup>e</sup>	34 à 42%
	<i>Streptococcus</i>	-	-	-	±	-	-	-	-	L	34 à 46%
<i>Tetragenococcus</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	L	34 à 36%	
<i>Weissella<sup>a</sup></i>	-	+	+	-	±	-	±	-	D, DL <sup>e</sup>	DND	

+ : positif, - : négatif, ±: variable entre les espèces, **ND** : Non Déterminé.

*Weissella<sup>a</sup>* : peuvent avoir des formes bâtonnets.

Production de **D**, **L** ou **DL** : acide lactique produit varie entre les espèces.

**b** : quantité insuffisante de CO<sub>2</sub> produite, dépens du milieu de culture.

**c** : absence de croissance à 6,5% de NaCl.

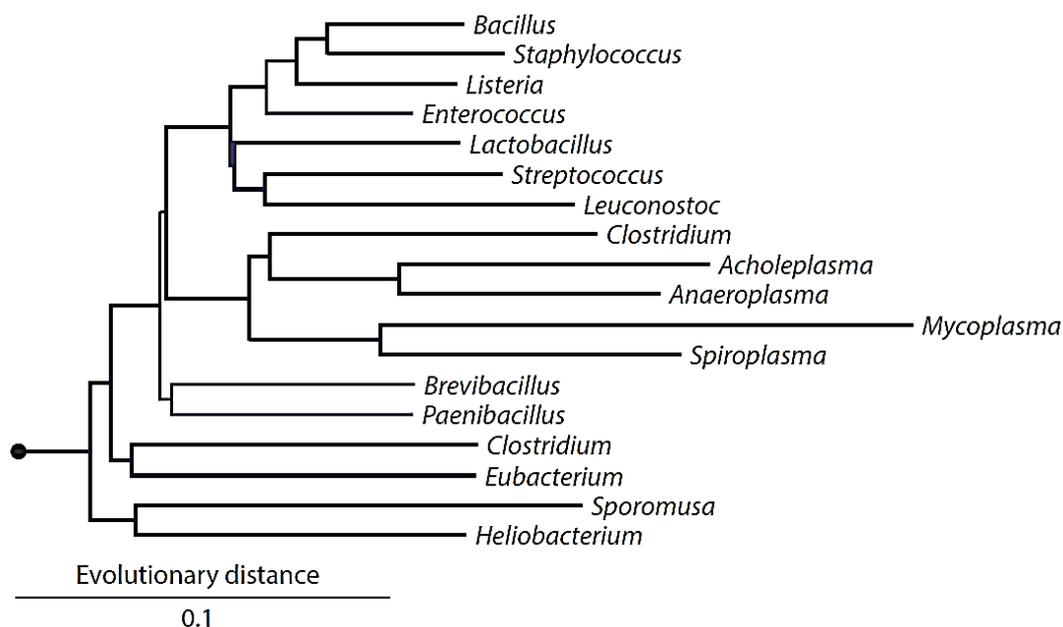
**d** : configuration de l'acide lactique produit à partir du glucose.

**e** : production de l'acide lactique varie entre les espèces.

**DND** : Donnée Non Disponible.

Les caractéristiques moléculaires telles que la teneur de l'ADN en % G+C et la séquence de l'ARN ribosomal (ARNr) sont devenues des outils taxonomiques importants. Cela a entraîné des changements spectaculaires dans la taxonomie des bactéries lactiques (**Schleifer, 1987**). En effet, selon la classification taxonomique actuelle basée essentiellement sur le séquençage de l'ARN 16S, les bactéries lactiques appartiennent à l'embranchement des firmicutes, la classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales. Cette hiérarchie taxonomique a permis de les organiser dans les familles suivantes : Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae et Streptococcaceae (**Lahtinen et al., 2011; Liu et al., 2014**).

Phylogénétiquement, tous les genres susmentionnés forment un clade proche de la branche clostridiale (Figure 1) des bactéries à Gram-positif, avec une faible teneur en guanine-cytosine (<50%). Cette propriété éloigne ces bactéries lactiques "traditionnelles" des bifidobactéries, qui ont une teneur en (G+C) supérieure à 55%, figurant parmi l'embranchement des Actinobactéries et proche du clade des "Actinomycetes" (Figure 2). Néanmoins, le genre *Bifidobacterium* est toujours considéré par certains chercheurs comme une bactérie lactique, en raison de ses propriétés physiologiques et biochimiques similaires et parce que le genre *Bifidobacterium* partage certaines niches écologiques communes telles que le tractus gastro-intestinal (**Liu et al., 2014**).



**Figure 1** : Arbre phylogénétique des membres représentatifs des Firmicutes (**Brown, 2015**).

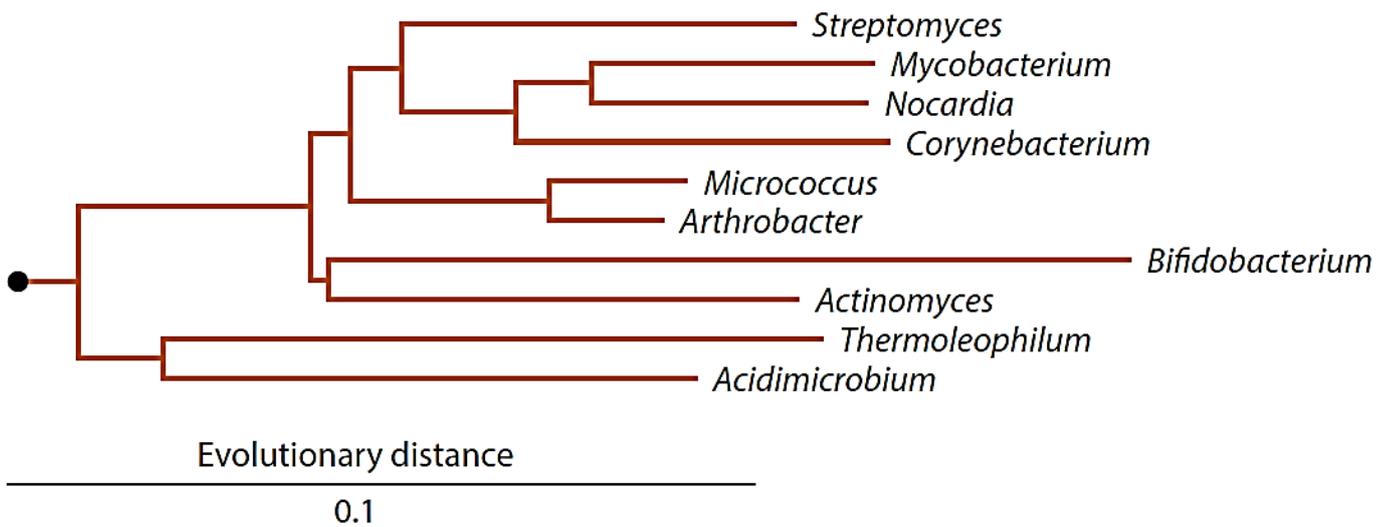


Figure 2 : Arbre phylogénétique des Actinobactéries (Brown, 2015).

### 3. Principales voies métaboliques glycolytiques et exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

#### 3.1. Métabolisme des sucres

En l'absence d'un système respiratoire fonctionnel, les bactéries lactiques utilisent les glucides comme source de carbone et d'énergie par une voie homo-fermentaire ou hétéro-fermentaire (Axelsson, 2004; Lahtinen et al., 2011). Les sucres ou les oligosaccharides sont absorbés par un système de phospho-transférase (PTS) ou un transporteur ATP-binding cassette (ABC) ou des perméases (Poltronieri et al., 2018).

L'homo-fermentation ou la fermentation homolactique des hexoses se déroule via la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ou la glycolyse, qui mène à la formation du pyruvate (Figure 3). Dans des conditions anaérobies en présence d'un excès de glucose, le pyruvate est principalement converti par la lactate déshydrogénase (LDH) en lactate. La conversion du pyruvate en lactate permet de régénérer le  $\text{NAD}^+$  qui a été consommé lors du catabolisme du glucose en pyruvate. La fermentation homolactique est accompagnée d'accumulation de deux moles d'acide lactique, générant un filet de deux ATP par mole de glucose métabolisé, et l'acide lactique est le produit majeur de cette fermentation (Axelsson, 2004; Gobbetti & Gänzle, 2013).

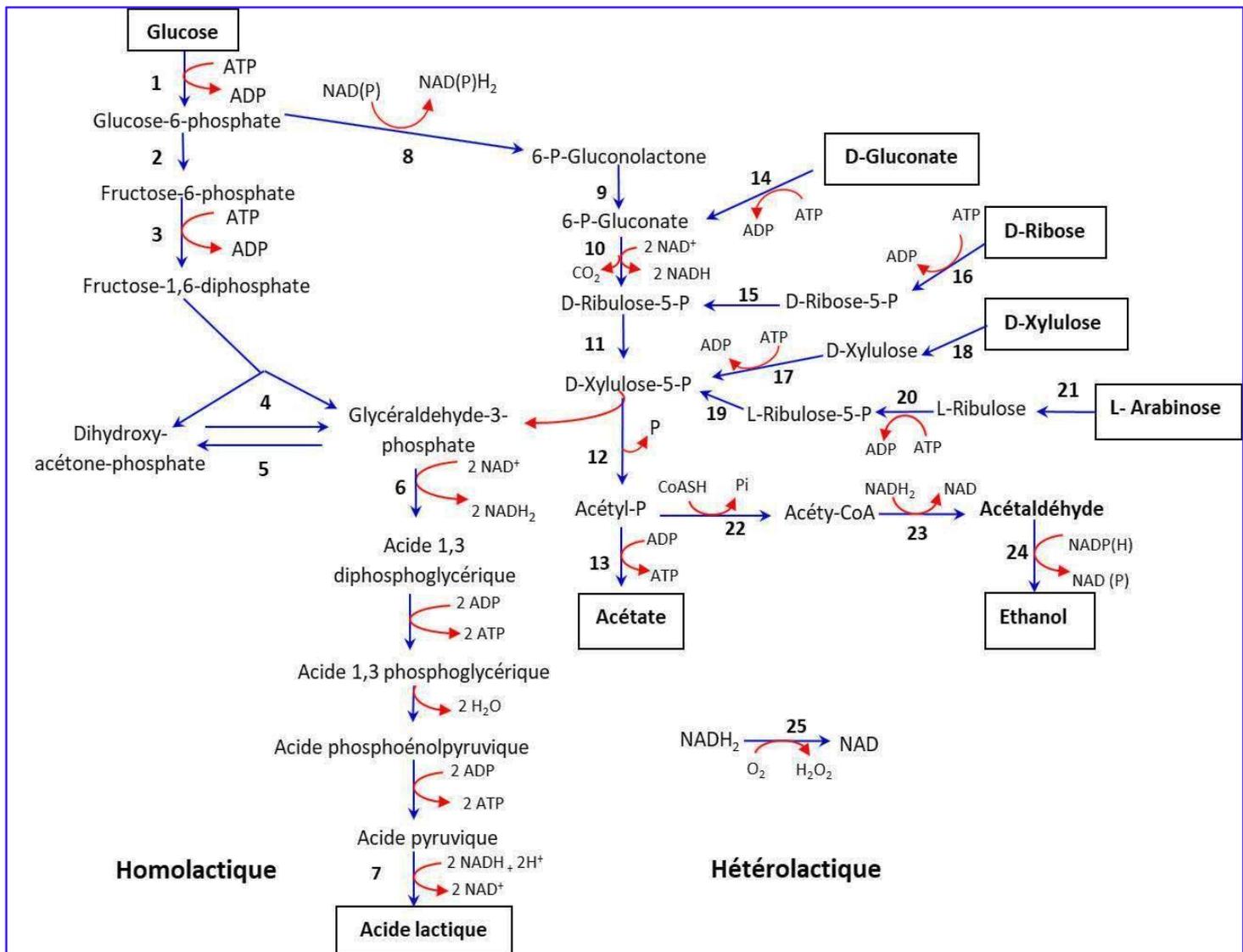
L'hétéro-fermentation ou la fermentation hétérolactique est réalisée via la voie du 6-phosphogluconate/phosphocétolase (6-PG/PK), avec la synthèse de quantités équimolaires de CO<sub>2</sub>, de lactate et d'éthanol/d'acétate. Comme indique-la figure 3, le glucose est converti en xylulose 5-phosphate et la xylulose 5-phosphate phosphocétolase (XPK), l'enzyme centrale et spécifique de la voie hétéro-fermentaire convertit ce dernier en glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) et en acétyl-phosphate (acétyl-P) (**Posthuma et al., 2002**). Le GAP est en outre métabolisé par les enzymes de la voie d'EMP en lactate. Tandis que, l'acétyl-P est métabolisé en éthanol ou en acétate selon les besoins en ATP ou en NAD<sup>+</sup> d'une part et les conditions de culture d'autre part (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Dans des conditions anaérobies, l'acétyl-P est converti en éthanol, afin de ré-oxyder le NADH qui a été consommé lors de la conversion du glucose en xylulose 5-phosphate; alors que l'acétate est principalement produit dans des conditions aérobies. La disponibilité de l'oxygène augmente l'activité spécifique de l'enzyme NADH oxydase, et induit la conversion de l'acétyl-P en acétate par l'acétate kinase, avec la formation d'une mole d'ATP (**Condon, 1987**).

Par ailleurs, les pentoses comme le xylose, l'arabinose et le ribose sont métabolisés par leurs enzymes appropriées en xylulose 5-phosphate, qui est ensuite dégradé dans la voie du 6-PG/PK (Figure 3). Cette propriété concerne seules les bactéries lactiques hétérofermentaires équipées d'enzymes pour le transport et la conversion des pentoses en xylulose 5-phosphate. Dans des conditions anaérobies, le métabolisme des pentoses via le 6-PG/PK conduit à l'accumulation de quantités équimolaires d'acétate et de lactate, en tant que produits finaux (**Posthuma et al., 2002**).

En général, les bactéries lactiques homofermentaires sont incapables de fermenter les pentoses, en raison de l'absence de l'activité XPK. Cependant, un groupe de lactobacilles composé des espèces *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. pentosus* et autres a été identifié comme étant capable d'utiliser les pentoses comme seule source d'énergie. Ces lactobacilles qui possèdent une XPK inductible sont appelés "lactobacilles hétérofermentaires facultatifs", pour les distinguer des lactobacilles homofermentaires (fermentation uniquement via la voie d'EMP) et des lactobacilles hétérofermentaires obligatoires (fermentation uniquement via la voie du 6-PG/PK) (**Kandler, 1983**).

Il est à noter que les bactéries lactiques forment de l'acide lactique D (-) ou L (+) ou un mélange racémique d'isomères d'acide lactique (**Kandler, 1983; Zourari et al., 1992**).



**Figure 3 :** Vue d'ensemble de la fermentation des sucres chez les bactéries lactiques (D'après Posthuma, 2001).

A gauche, fermentation homolactique via la voie Embden-Meyerhoff-Parnas; à droite, fermentation hétérolactique via la voie de la phosphocétolase. La "branche acétate" et "la branche éthanol" de la voie de la phosphocétolase sont indiquées sur la figure. **1**, glucokinase ou phosphorylation pendant le transport PTS dépendant du PEP; **2**, glucose 6 phosphate isomérase; **3**, 6-phosphofruktokinase; **4**, fructose bis phosphate aldolase; **5**, triose-phosphate isomérase; **6**, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, phosphoglycérate kinase, phosphoglycéromutase, énoïase, pyruvate kinase; **7**, lactate déshydrogénase; **8**, glucose 6-phosphate déshydrogénase; **9**, lactonase; **10**, 6- phosphogluconate déshydrogénase; **11**, D-ribulose 5-phosphate 3-épimérase; **12**, xylulose 5-phosphate phosphocétolase; **13**, acétate kinase; **14**, phosphorylation de gluconate kinase pendant le transport PTS dépendant du PEP; **15**, ribose 5-phosphate isomérase; **16**, ribose kinase; **17**, xylulose kinase; **18**, xylose isomérase; **19**, L-ribulose 5-phosphate 4-épimérase; **20**, ribulose kinase; **21**, arabinose isomérase; **22**, phosphotransacétylase; **23**, acétaldéhyde déshydrogénase; **24**, alcool déshydrogénase; **25**, NADH oxydase.

### 3.2. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

Afin de réaliser une conversion complète du lait en un produit fermenté, il est estimé que les bactéries lactiques doivent en quelques heures se multiplier jusqu'à  $10^9$  cellules/ml dans le lait. Cette capacité de croissance dépend de plusieurs types de facteurs, à savoir:

- Des facteurs nutritionnels propres aux bactéries lactiques.
- Des facteurs de l'environnement: Température, pH et la présence d'autres microorganismes (**Marshal et Law., 1984**).

La croissance des bactéries lactiques demeure un phénomène fastidieux qui nécessite un apport complexe, aussi bien qualitativement que quantitativement, en éléments nutritifs: vitamines, bases nucléiques, oligo-éléments et acides aminés (**Loubière et al., 1996**).

#### 3.2.1. Exigences en acides aminés

La concentration d'acides aminés essentiels (sous forme libre) dans le lait est généralement bien inférieure au minimum requis pour la synthèse protéique cellulaire chez les bactéries lactiques. Par conséquent, l'azote limite la croissance et la production d'acide est lente, sauf si les cellules des starters laitiers ont un système protéolytique qui produit des acides aminés libres à partir des protéines du lait (**Thomas & Pritchard, 1987**). Les bactéries lactiques ont des exigences absolues différentes en acides aminés (**Pastink et al., 2009**). L'espèce thermophile *S. thermophilus* nécessite moins d'acides aminés que les lactocoques et les lactobacilles (**Garault et al., 2000**). Par exemple, *S. thermophilus* LMG18311 n'a besoin que de 2 acides aminés (uniquement l'histidine et la méthionine ou la cystéine), tandis que *L. lactis* MG1363 et *L. plantarum* WCFS1 ont besoin et pour une croissance minimale de 6 acides aminés (Glutamate, histidine, isoleucine, leucine, méthionine, valine) et 11 acides aminés (Arginine, cystéine, glutamate, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, tyrosine, valine), respectivement (**Pastink et al., 2009**).

#### 3.2.2. Exigences en vitamines

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser les vitamines, connues par leur rôle irremplaçable de coenzymes dans le métabolisme cellulaire. Par exemple, les lactocoques sont exigeantes en particulier à la niacine (B3), la pyridoxine (B6) et sans doute à la biotine (B8) (**Loubière et al., 1996**). Les streptocoques thermophiles consomment au cours de leur développement de l'acide ascorbique, la thiamine (B1), la biotine (B8) et la pyridoxine (B6)

(Liu et al., 2018). La riboflavine (B2), l'acide nicotinique (B3) et le pantothénate de calcium sont nécessaires à *S. thermophilus* et ils favorisent la croissance des bactéries (Letort et Juillard, 2001). Pour les lactobacilles, toutes les espèces présentent un besoin au pantothénate de calcium, à la niacine et des exigences différentes pour les autres vitamines (Desmazeaud, 1996).

### 3.2.3. Exigence en base azotées

Les exigences en bases azotées sont très variables selon les espèces bactériennes. Les lactobacilles nécessitent au cours de leur croissance l'adénine, la cytidine, la désoxy-guanosine, la thymidine et l'uracile. Par ailleurs, les *S. thermophilus* ont plutôt besoin d'adénine, de guanine, d'uracile et de xanthines (Desmazeand, 1992).

## 4. Intérêt des bactéries lactiques

L'apparition des bactéries lactiques dans l'alimentation humaine a pris sa place depuis environ 8000 à 10000 ans. Elles jouent un rôle multifonctionnel dans les applications industrielles, alimentaires, agricoles et médicales (Bintsis, 2018; Mittholiya et al., 2020), mais leur principale utilisation est plutôt industrielle, dans la fabrication des produits laitiers fermentés comme les fromages, le beurre, les yaourts et les boissons de laits fermentés (Tamime, 2002) (Johansen, 2018),. Dans le monde entier, les bactéries lactiques sont utilisées pour leurs attributs d'acidification, de saveur et de texture (Widyastuti et al., 2014; Omony et al., 2019). Un autre attribut important de nombreuses souches de bactéries lactiques, est leur capacité à produire des composés antimicrobiens, appelés bactériocines (ex. la nisine). L'intérêt pour ces composés a considérablement augmenté, en raison de leur utilité potentielle comme substitut naturel aux conservateurs chimiques, dans la production d'aliments, avec une durée de conservation améliorée (Soomro et al., 2002; Kröckel, 2013). Les bactéries lactiques sont également connues pour leurs effets probiotiques (Holzapfel & Schillinger, 2002; Masood et al., 2011). En effet, les probiotiques sont des «micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, confèrent à l'hôte un avantage pour la santé» (WHO, 2002). Plusieurs effets positifs des bactéries lactiques probiotiques sur la santé humaine ont été démontrés, notamment leur rôle dans l'amélioration du profil lipidique, de la sensibilité à l'insuline et la diminution des marqueurs inflammatoires (ex. la CRP). Ces résultats ont été observés avec des préparations

pharmaceutiques sous forme de gélules contenant un mélange composé principalement de *L. paracasei*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus* et des certaines bifidobactéries (Rajkumar et al., 2014). Leurs propriétés anti-oxydantes contre les dérivés réactifs de l'oxygène ont aussi été bien documentées (Lin et al., 1999; Amaretti et al., 2013; Wang et al., 2017). Les rapports scientifiques montrent également les avantages de l'utilisation prophylactique des probiotiques dans différents types de cancer et les effets secondaires associés au cancer (Zhong et al., 2014; Markowiak & Śliżewska, 2017).

Plusieurs autres effets bénéfiques en santé humaine ont été rapportés, par exemple, les bactéries lactiques productrices d'acide lactique viables dans les desserts lactés surgelés peuvent être une source de  $\beta$ -galactosidase pour les personnes qui absorbent insuffisamment le lactose (Sung et al., 2001).

## II. Conservation des souches microbiennes

### 1. Notion de Bio-banking

Les "biobanques" font référence à des collections organisées d'échantillons biologiques et aux données qui leur sont associées (Cambon-Thomsen et al., 2003). Dans le cadre de la recherche génétique, les "biobanques" sont définies comme un groupe d'échantillons biologiques obtenus à partir d'un groupe d'individus identifiés sélectionnés, en fonction des caractéristiques cliniques ou biologiques d'un ou plusieurs membres du groupe, ainsi que de tout dérivé de ces échantillons (Moutel et al., 2004; Auray-Blais & Patenaude, 2006). Les "biobanques" sont plus officiellement appelés "centre de ressources biologiques" (Day & Stacey, 2008).

Afin de répondre aux demandes modernes de progrès de la biotechnologie et des sciences de la vie, l'organisation de coopération et de développement économique (OCDE) a introduit en 2001 un nouveau concept de référentiels et de fournisseurs de données et d'informations biologiques de haute qualité : le centre de ressources biologiques (CRB). Les CRBs sont constitués de prestataires de services et de dépositaires de cellules vivantes, de génomes d'organismes et d'informations relatives à l'hérédité et aux fonctions des systèmes biologiques. Les CRBs contiennent des collections d'organismes cultivables (e.g. micro-organismes, cellules végétales, animales et humaines), des parties reproductibles de ceux-ci (e. g. génomes, plasmides, virus, ADN), des cellules et tissus d'organismes viables mais pas

encore cultivables, ainsi que des bases de données contenant des informations moléculaires, physiologiques et structurales pertinentes de ces collections **(OECD, 2007)**.

Selon **De Paoli, (2005)**, le “biobanque” est sous-entendu comme le processus de collecte, de traitement et de stockage à long terme d'échantillons biologiques, il représente un outil essentiel pour la recherche biologique, biomédicale et industrielle et pour le diagnostic en laboratoire.

Dans une enquête menée en 2012, des chercheurs impliqués dans la gestion des collections d'échantillons ont été interrogés sur leur définition des biobanques. Les résultats de l'enquête ont montré le consensus parmi les répondants que le terme “biobanque” peut être appliqué à des collections biologiques d'échantillons humains, animaux, végétaux ou microbiens **(Branković et al., 2014)**.

## **2. Microorganismes et Biobanking**

Les micro-organismes représentent la majeure partie de la biodiversité des organismes vivants dans chaque habitat écologique. Ils ont des effets profonds sur le fonctionnement de tout l'écosystème, et donc sur la santé de la planète et des êtres humains. De plus, les micro-organismes sont les principaux protagonistes des industries alimentaires, médicales et biotechnologiques et ont plusieurs applications environnementales. En conséquence, la caractérisation et la préservation de la biodiversité microbienne sont essentielles non seulement pour le maintien des écosystèmes naturels, mais également à des fins de recherche et d'exploitation biotechnologique. Pour toutes ces considérations, les collections de cultures (CC) et les centres de ressources biologiques microbiennes (CRBm) sont cruciaux pour la sauvegarde et la circulation des ressources biologiques, ainsi que pour le progrès des sciences de la vie **(De Vero et al., 2019)**.

Le terme inventé “ressources microbiennes” désigne des souches de virus, bactéries, archées, champignons ou protistes taxinomiquement définies, physiologiquement bien caractérisées, génétiquement stables, authentifiées, bien documentées, dont la qualité est contrôlée et dont la conservation est à long terme **(Overmann, 2015; De Vero et al., 2019)**.

### 3. Approches de conservation à long terme

#### 3.1. Introduction

Les années 1800 ont vu une formidable expansion des connaissances et des capacités d'ingénierie avec le développement de nouvelles techniques dont la compression des gaz à l'état liquide fournissant, des environnements stables à ultra-basse température, qui ont permis au domaine de la cryobiologie de se développer rapidement. La possibilité d'utiliser des températures ultra-basses pour empêcher la dégradation des matériaux biologiques a probablement été utilisé par l'homme pendant des millénaires et les découvertes scientifiques des 17<sup>e</sup> et 18<sup>e</sup> siècles ont ouvert la voie à la préservation réussie des procaryotes et des eucaryotes au 20<sup>e</sup> siècle, afin de pouvoir les stocker dans un état viable pour des périodes indéfinies. La préservation des bactéries et des champignons a été établie par des pionniers du 19<sup>e</sup> et du début du 20<sup>e</sup> siècle, avec les travaux ultérieurs de certains chercheurs, notamment de ceux de **Polge et al. (1949)**, pour la conservation des cellules animales et de Sakai (1966), pour les cellules végétales, agissant ainsi comme des jalons clés dans le développement du processus de la cryoconservation (**Day & Stacey, 2008**).

#### 3.2. Méthodes de conservation

Les méthodes de conservation suspendent instantanément les activités métaboliques, tout en conservant la viabilité et la stabilité génétique et physiologique de l'échantillon (**Smith et al., 2013**). L'objectif principal de toute technique de conservation de cultures microbiennes est d'assurer une plus grande viabilité cellulaire (**Alonso, 2016**). Le séchage et la cryoconservation sont les techniques les plus couramment utilisées pour la conservation long terme des cellules microbiennes (**Smith et al., 2013; Alonso, 2016**).

Outre la lyophilisation, les autres méthodes de séchage utilisées sont : le séchage par pulvérisation et le séchage en lit fluidisé. Le séchage par pulvérisation implique l'évaporation de l'eau par atomisation d'une solution homogène dans une chambre de séchage. Cette technique est choisie pour la déshydratation microbienne, en raison de sa grande flexibilité de traitement ainsi que de sa rentabilité en milieu industriel (**Schuck et al., 2013**).

Le séchage en lit fluidisé consiste à mettre en suspension des particules dans un air ascendant en amont. Ce processus est rapide (environ 30 min) et peut être effectué avec de l'air à des températures douces, ce qui est important lorsqu'il s'agit des souches probiotiques (**Silva et al., 2016**).

Traditionnellement, les cellules microbiennes sont conservées à long terme par cryoconservation ou lyophilisation (**Alonso, 2016**), bien que la lyophilisation soit largement utilisée dans le stockage à long terme (**Schuck et al., 2013**). Les méthodes de cryoconservation se caractérisent généralement par la perte de viabilité. La cryotolérance et la fonctionnalité de la culture microbienne peuvent être améliorées en fonction des variables de traitement utilisées (**Alonso, 2016**).

Le Choix de la technique de conservation doit être décidé après comparaison des facteurs de conditionnement d'une méthode donnée, des équipements disponibles et des besoins de l'utilisateur. La viabilité doit être maintenue aussi élevée que possible. Le risque de contamination de la culture préservée doit être aussi faible que possible (**Smith et al., 2013**).

### **3.2.1. La Lyophilisation**

La lyophilisation est la méthode la plus utilisée pour la conservation à long terme des micro-organismes (**Shafique et al., 2010; Alonso, 2016**). Elle est préférée, en raison de la facilité de transport et d'utilisation, du faible coût de maintenance et du taux élevé de survie cellulaire sur de longues périodes (**Polo et al., 2017**). La lyophilisation est un processus de déshydratation, qui permet le passage de l'eau congelé à l'intérieur des cellules microbienne de l'état solide à l'état gazeux (**Tan & Mustapha, 2014**). Elle est basée sur un procédé de séchage à froid qui consiste en la déshydratation d'une substance, par sublimation. Elle comporte trois phases: la congélation, le séchage primaire (sublimation) et le séchage secondaire (désorption) (**Polo et al., 2017**).

Comme le processus de lyophilisation implique une étape de congélation, des dommages cellulaires peuvent survenir en raison de la formation de cristaux et des contraintes osmotiques. Pour protéger les cellules contre de tels dommages, une large gamme de lyoprotecteurs, par exemple du lait écrémé, des sucres peuvent être ajoutés au milieu de séchage avant la lyophilisation (**Alonso, 2016**). Les souches bactériennes correctement lyophilisées peuvent être stockées pendant 30 ans et même au-delà, sans frais de refroidissement élevés pendant le stockage ou le transport. Aussi, elles peuvent être utilisées immédiatement après réhydratation sans aucune étape de lavage, contrairement à la cryoconservation (**Peiren et al., 2015; Kim et al., 2018**).

### 3.2.2. La cryoconservation

La Cryopréservation est une méthode utilisant des températures très basses (- 80°C et/ou - 196°C), pour préserver les cellules et les tissus vivants structurellement intacts en présence d'agents cryoprotecteurs **(Tan & Mustapha, 2014)**. La cryoconservation est la technique la plus privilégiée pour la sauvegarde des cultures microbiennes dans les CRBs **(Heylen et al., 2012; Peiren et al., 2015)**. Elle reste à ce jour la principale méthode de conservation cellulaire à long terme en raison de ses taux de survie élevés. La cryoconservation de souches microbiennes à des températures cryogéniques (< -150°C) entraîne généralement des taux de survie plus élevés par rapport à celles stockées à -20°C. Cependant, la phase de croissance optimale pour la survie à la dessiccation est largement dépendante de l'organisme. Il a été rapporté que les cellules collectées en début de phase exponentielle montrent une survie de 14%, comparativement aux cellules en phase stationnaire qui affichent une sensibilité plus élevée, avec une survie cellulaire de 2% **(Tan & Mustapha, 2014)**.

### 3.3. Les agents protecteurs: natures et effets

Comme il a été précédemment signalé, pour améliorer la survie des cellules conservées, des agents protecteurs sont généralement ajoutés pour la protection des cellules contre les dommages pendant le processus de conservation ainsi que pendant le stockage **(Bircher et al., 2018)**. Il s'agit d'additifs cryoprotecteurs, également appelés lyoprotecteurs dans les processus de lyophilisations, qui sont mélangés aux suspensions microbiennes avant la congélation, pour minimiser l'influence délétère due à la formation de cristaux de glace et pour abaisser le point de congélation pendant les processus de congélation **(Alonso, 2016)**.

Le glycérol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et les additifs non-perméables comme les polysaccharides sont actuellement utilisés comme cryoprotecteurs dans les cultures microbiennes. Les cryoprotecteurs non- perméables s'adsorbent à la surface de la cellule en formant une couche visqueuse et provoquent un efflux partiel d'eau de la cellule **(Saarela et al., 2005)**. Ils réduisent la concentration extracellulaire de sel, influencent la formation extracellulaire de glace et peuvent stabiliser les structures membranaires **(Smith et al., 2013; Bircher et al., 2018)**.

Le glycérol agit comme une membrane perméante, et facilite le processus de vitrification en remplaçant l'eau dans les cellules et en créant des liaisons hydrogène avec des molécules

d'eau, pour exercer un effet protecteur (**Martin-Dejardin et al. 2013; Alonso, 2016**). Les agents cryoprotecteurs améliorent donc la survie des bactéries pendant la conservation en minimisant les dommages membranaires et la dénaturation des protéines (**Kandil & El Soda, 2015**).

Par ailleurs, les cryoprotecteurs perméables rendent la membrane cellulaire plus plastique (**Saarela et al. 2005**). Ils remplacent partiellement l'eau intracellulaire pour la stabilisation des protéines et des membranes Influencées par la formation des cristaux de glace, en équilibrant ainsi la pression intracellulaire (**Smith et al., 2013**).

Pour la cryoprotection des bactéries lactiques, une large sélection de composés a été utilisée, notamment le lait écrémé avec ou sans suppléments tels que le polyéthylène glycol, le dextrane, l'albumine bovine, le glycogène, le saccharose, le tréhalose, le glycérol, le lactose, le maltose et le tréhalose, le Me<sub>2</sub>SO, la bétaine, l'ascorbate, le glutamate et la maltodextrine (**Saarela et al, 2005**).

Pour les processus de séchage, le lait écrémé, le sérum et les peptones, ainsi que des substances pures telles que les sucres, les acides aminés et leurs mélanges se sont révélés favorables au maintien d'une viabilité élevée (**Smith et al., 2013; Kim et al., 2018**).

### **III. Viabilité des ferments lactiques au cours de la conservation**

#### **1. Introduction**

Les ferments lactiques ou les cultures starters peuvent être définis comme une préparation microbienne d'un grand nombre de cellules d'au moins un microorganisme à ajouter à une matière première, pour produire un aliment fermenté en accélérant et en pilotant son processus de fermentation (**Leroy & de Vuyst, 2004; Hati et al., 2013**). Le groupe des bactéries lactiques occupe un rôle central dans ces processus et a une longue et sûre histoire d'application et de consommation dans la production d'aliments et de boissons fermentés (**Leroy & de Vuyst, 2004; Liu et al., 2014**).

Historiquement les ferments lactiques étaient constitués d'un mélange inconnu, non maîtrisé et variable, de plusieurs souches ou espèces de bactéries. Ils provenaient d'une fermentation naturelle dans le produit cible. Une partie de ce produit fermenté était conservée, pour ensuite ensemercer les fermentations ultérieures. Ces méthodes ne sont plus utilisées que pour la fabrication des fromages artisanaux et en fermentation panaiere (**Corrieu & Luquet, 2008**). Ces dernières informations font référence au processus appelé

“back-slopping” où une petite quantité de produits fermentés est ajoutée en transférant une partie d'un ancien ou précédent lot vers des matières premières fraîches **(Buckenhiiskes, 1993; Schoustra et al., 2013)**. Le back-slopping ressemble de très près à la procédure de transfert de culture par lots utilisée par les microbiologistes pour étudier l'évolution des populations microbiennes et des communautés en laboratoire. Lorsqu'il est répété sur de nombreux cycles, ce processus peut aboutir à une communauté microbienne co-adaptée et évolutive stable **(Schoustra et al., 2013; Wirawati et al., 2019)**.

D'une manière générale, les préparations utilisées aujourd'hui comme starters parfois appelées “démarrateurs” peuvent être classées en trois catégories: en premier lieu, les “cultures indéfinies” qui dans l'industrie laitière, sont appelées “cultures de souches mixtes”. Ces starters sont basés sur l'utilisation d'un substrat de fermentation, issu d'un processus sélectionné qui a abouti à des produits finis de bonne qualité. Ces starters sont également propagés et distribués commercialement. Les deux autres catégories de ferments sont représentées par des “cultures à une seule souche” et des «cultures à souches multiples», qui contiennent respectivement une ou plusieurs souches définies **(Buckenhiiskes, 1993; Corrieu & Luquet, 2008)**.

L'utilisation industrielle des bactéries lactiques comme cultures starters dépend des propriétés technologiques, des technologies de concentration et de conservation, nécessaires pour maintenir un niveau élevé de viabilité, d'activité d'acidification et d'activité enzymatique pendant le stockage à long terme **(Rault et al., 2007; Kandil & El Soda, 2015)**.

## **2. Définition de la viabilité cellulaire**

La viabilité bactérienne fait référence à la capacité d'une cellule à se développer et à générer ultérieurement une colonie de cellules dans des conditions environnementales définies **(Terpou et al., 2019)**. Les caractéristiques des cellules viables comprennent la présence et le fonctionnement d'une gamme de propriétés structurelles, métaboliques, physiologiques et génétiques. Cependant, cette définition traditionnelle exige qu'une seule cellule «viable» doit croître et générer par la suite une colonie de cellules qui peuvent être mesurées optiquement dans des milieux liquides ou solides, formant ainsi la base des principes de Koch **(Muller & Nebe-von-Caron, 2010; Wilkinson, 2018)**. Par conséquent, la viabilité est généralement assimilée à la capacité de se reproduire et ensuite à la cultivabilité. Cependant, il est clair que toutes les cellules bactériennes n'obéissent pas à cette relation et,

en effet, même si elles peuvent ne pas avoir la capacité de se reproduire et de se développer dans certaines conditions, elles peuvent posséder de nombreuses propriétés de cellules viables pleinement fonctionnelles. De ce fait, **Wilkinson, (2018)** et en se basant sur les données de **Kramer & Thielman, (2016)** rapporte une autre classification basée sur le terme «vitalité» ou le degré auquel une cellule peut effectuer divers aspects de la fonctionnalité métabolique, physiologique et génétique et l'étendue de l'intégrité structurelle et morphologique.

### **3. Effets des principales méthodes de conservation sur la viabilité des bactéries lactiques**

Nous rappelons que la congélation et la lyophilisation sont couramment utilisées pour la conservation et le stockage des ferments utilisés dans l'industrie laitière. Ces techniques peuvent entraîner des effets secondaires indésirables, tels que des lésions membranaires, une dénaturation des protéines et des enzymes et des lésions de l'ADN. Plusieurs facteurs sont pertinents pour la préparation des cultures bactériennes qui auront un nombre élevé de cellules et une viabilité à long terme pendant le stockage. Ceux-ci incluent des facteurs intrinsèques, tels que la forme et la taille des cellules, la composition génétique et les différences dans la composition de la paroi et de la membrane cellulaire, les conditions de croissance, le milieu de séchage et les conditions de stockage (**Kandil & El Soda, 2015**).

Par exemple lors de la lyophilisation la survie des cellules est affectée par de nombreux paramètres physico-chimiques et biologiques. Les facteurs physico-chimiques, tels que les conditions de croissance cellulaire, le type du lyoprotecteur, les températures de congélation, de sublimation et de décongélation, le degré de déshydratation atteint, le milieu de reconstitution, la durée et le stockage, et les conditions de réhydratation ont été décrits comme influençant fortement la survie des microorganismes. Les facteurs biologiques, tels que le type de microorganisme, la concentration cellulaire initiale, l'âge des cellules et la présence de solutés compatibles dans le cytoplasme, peuvent affecter la survie des cellules lyophilisées (**Donev et al., 1995; Polo et al., 2017**).

En revanche, lors de la congélation, les cellules bactériennes sont exposées à des stress froids et osmotiques, entraînant un raidissement de la membrane, une déshydratation cellulaire et une réduction du volume, en raison de la cryo-concentration du milieu extracellulaire (**Fonseca et al., 2016; Fonseca et al., 2019**). **Béal et al. (2001)** ont rapporté que la résistance à la congélation et au stockage congelé de *S. thermophilus* est liée à la

composition en acides gras de la membrane cellulaire; et que l'addition de l'acide oléique et la diminution du pH de fermentation ont amélioré le rapport acides gras insaturés/saturés et améliorées la récupération de l'activité d'acidification. Le comportement de *S. thermophilus* dans de telles conditions indique l'adaptation de cette espèce thermophile à l'addition de l'acide oléique et aux conditions de croissance défavorables qui correspondait à un pH de fermentation bas. D'après les mêmes auteurs, l'ajout de glycérol n'a pas modifié la composition de la membrane en acides gras, mais a augmenté la résistance au stockage congelé.

## *Matériel et Méthodes*

## L'objectif d'étude

Cette étude a pour but d'effectuer une révision d'un stock de souches de bactéries lactiques de différentes origines après une conservation à long terme par congélation à -20°C. Cette révision est axée sur le contrôle de leur viabilité par énumération microscopique directe, pour en déterminer le taux de viabilité et vérifier leur identification.

### 1. Milieux de culture utilisés

#### 1.1. Milieu MRS

Les souches étudiées ont été cultivées sur milieu MRS (annexe 1), additionné de 10% (P/V) de glucose et 5% (P/V) de lactose, ajusté à pH 7, et est utilisé sous les deux formes liquide et solide par addition de 2% (P/V) d'agar agar. Le MRS est considéré comme un milieu polyvalent pour sa capacité à soutenir la croissance de plusieurs groupes de bactéries lactiques, il est utilisé comme milieu de culture et comme milieu basale pour les tests de tolérance des BL (Carr et al., 2002). Le milieu MRS (De Man et al., 1960) est le milieu sélectif le plus utilisé pour l'isolement et le dénombrement des bactéries lactiques, il est aussi considéré comme un étalon d'or pour leur isolement à partir de divers échantillons environnementaux (Endo et al., 2018; Blajman, 2020).

#### 1.2. Peptone Saline

Un diluant de récupération maximale parmi les diluants les plus couramment utilisés pour le dénombrement des microorganismes, composé de 1% (P/V) de Peptone qui agit comme un protecteur, avec sa faible concentration qui ne provoque pas la multiplication des organismes dans les 45 minutes de dilution, avec le support osmotique de 0,85% (P/V) de chlorure de sodium qui garantit la récupération des organismes de diverses sources grâce à sa force isotonique (Oxoid).

### 2. Souches étudiées

Les manipulations effectuées durant les premiers temps de notre séjour au laboratoire ont concerné 32 isolats de bactéries lactiques d'origines diverses (Tableau II). Il est à noter que ces isolats ont été initialement conservés à -20°C, avec une concentration initiale  $\approx 6 \times 10^9$  UFC/ml et en présence de 30% de glycérol.

Tableau II: Présentation des isolats étudiés.

Code	Origine de l'isolat	Année de conservation	Couleur du dépôt
1	Lait cru de vache	2007	Beige
2	Lait cru de vache	2007	Beige
3	Lait cru de vache	2007	Beige clair
4	Lait cru de vache	2008	Beige
5	Lait cru de vache	2008	Beige foncé
6	Lait cru de vache	2008	Beige foncé
7	Lait cru de vache	2008	Beige
8	Camembert	2015	Blanc
9	Beurre traditionnel	2015	Beige
10	Lait de collecte	2007	Marron
11	Lait de collecte	2007	Beige clair
12	Lait de collecte	2007	Jaunâtre
13	Lait de collecte	2007	Beige
14	Camembert	2015	Blanc
15	Camembert	2015	Blanc
16	Lait de collecte	2007	Beige
17	Lait cru de vache	2007	Beige clair
18	Beurre traditionnel	2015	Beige clair
19	Lait cru de vache	2007	Beige clair
20	Lait cru de vache	2007	Transparent
21	Lait cru de vache	2007	Transparent
22	Camembert	2015	Blanc
23	Beurre traditionnel	2015	Blanc
24	Beurre traditionnel	2015	Beige
25	Camembert	2015	Blanc
26	Camembert	2015	Blanc
27	Lait cru de vache	2007	Jaunâtre
28	Lait cru de vache	2007	Blanc
29	Lait cru de vache	2007	Beige
30	Lait cru de vache	2007	Beige
31	Beurre traditionnel	2015	Beige
32	Camembert	2015	Blanc

### **3. Évaluation de la viabilité et réactivation des isolats**

#### **3.1. Préparation des isolats**

La viabilité des isolats a été évaluée par une numération microscopique directe, suivie par une réactivation sur milieu MRS. Les isolats à réactiver sont décongelés, puis codés par des numéros (1-32). La suspension de chaque isolat est bien homogénéisée afin d'obtenir une suspension homogène. Puis, 100 µl sont prélevés et transvasés dans un tube à hémolyse, pour réaliser une dilution au 1/10 dans la peptone saline et effectuer par la suite une numération directe, en utilisant une cellule de dénombrement microscopique de "Petit Salumbeni" (Preciss, France). La quantité restante est inoculée dans le milieu MRS pour la réactivation.

#### **3.2. Évaluation de la viabilité par numération directe**

Tout d'abord les plates-formes latérales de la cellule de numération sont humidifiées et une lamelle est adhéree. Ensuite, à partir de la suspension bactérienne (de la dilution au 1/10) préparée préalablement, un prélèvement est effectué pour remplir la chambre de comptage de la cellule. L'observation se fait à l'objectif 40 à l'aide d'un microscope optique, pour déterminer la forme de la souche et énumérer les cellules viables présentes dans dix unités de comptage (quadrillés) choisies. Le calcul est effectué selon les indications de l'utilisation de la cellule. Brièvement, le nombre de cellules comptées est divisé par 10 et multiplié par  $10^8$ , pour avoir la concentration des cellules en UFC/ml. Pour le traitement des résultats, nous avons calculé d'une part le taux de décroissance (Taux de létalité) exprimé en Log UFC/ml et d'autre part le taux de survie exprimé en pourcentage (%).

#### **3.3. Réactivation et purification des isolats**

Les tubes de MRS inoculés par les quantités restantes des isolats sont incubés à 37°C pendant 24h. Après cette période d'incubation et à partir des cultures présentant un bon trouble, un ensemencement en vue d'une purification est effectué sur MRS-agar à l'aide d'une anse de platine par la méthode d'épuisement, ensuite les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

### **4. Contrôle de l'identification des isolats**

Il à signaler que les isolats étudiés ont déjà été identifiés lors des travaux relatifs à leur premier isolement, mais nous tenons dans ce travail juste à effectuer un contrôle de

l'identification au niveau du genre. Après la purification, l'identification des isolats sera réalisée selon des étapes classiques connues en microbiologie. Pour les bactéries lactiques, différents tests basés sur l'étude des propriétés et des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques sont appliqués (**De Roissart et Luquet, 1994; Guiraud, 1998**).

**Remarque:** Nous rapportons ici que les premières étapes qui ont été prévues dans le programme de notre travail. Par ailleurs, parmi les tests cités ci-après, nous avons seulement pu réaliser l'étude macroscopique et l'examen à l'état frais.

#### **4.1. Étude morphologique**

L'étude morphologique est portée sur la description des aspects morphologiques macroscopiques et microscopiques des souches (**Guiraud, 1998**).

#### **4. Examen macroscopique**

C'est un examen à l'œil nu pour mettre en évidence les caractères des cultures sur milieux liquides (trouble, dépôt), ainsi que la description des colonies sur milieux solides (la forme, le contour, la surface, la taille et la couleur des colonies).

##### **4.1.2. Etude microscopique**

L'examen microscopique constitue une étape cruciale dans toute procédure d'identification bactérienne. Dans la présente étude, afin de déterminer la forme des souches ainsi que la mobilité, une observation vitale et une coloration de Gram ont été réalisées.

##### **4.1.2.1 Observation à l'état frais**

L'examen microscopique à l'état frais permet l'observation des cellules vivantes avec la détermination de la morphologie, de la mobilité éventuelle ainsi que la quantité approximative des bactéries (**Delarras, 2007**). À partir d'une culture jeune, une goutte est prélevée aseptiquement et déposée sur une lame propre. Ensuite, la préparation est recouverte d'une lamelle et l'observation se fait immédiatement à l'objectif 40. Les bactéries sont dites mobiles si les corps bactériens se déplacent et traversent le long du champ microscopique.

#### **4.1.2.2 Observation après coloration de Gram**

La coloration de Gram est une coloration différentielle. Selon la structure de la paroi, cette technique permet de diviser, les bactéries en deux classes, les Gram positives et les Gram négatives. La coloration de Gram commence par la préparation du frottis fixé sur une lame, qui est recouvert de violet de gentiane pendant 1min. Ensuite, le frottis est traité deux fois 30 secondes, avec une solution de lugol, suivi d'une décoloration à l'éthanol 95° pendant quelques secondes. La préparation est rincée immédiatement et abondamment à l'eau distillée. En fin, le frottis est contre coloré par la fuchsine pendant 1 minute, la fuchsine colore les bactéries à Gram négatif en rose et laisse les bactéries à Gram positif colorées en violet foncé. Les bactéries lactiques sont des Gram positif.

### **4.2. Etude physiologique et biochimique**

#### **4.2.1. Détermination du type respiratoire**

##### **4.2.1.1. Test de catalase**

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) en eau métabolique ( $H_2O$ ) et oxygène ( $O_2$ ), selon la réaction suivante :  $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$  (**Marchal et al., 1991**). Pour ce test, sur une lame propre et sèche, une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes est déposée, et à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, une colonie est prélevée et mélangée avec la goutte d'eau oxygénée. L'observation est immédiate, s'il y aura une apparition de bulles, causée par le dégagement gazeux de dioxygène, la souche est catalase positive(+), sinon elle est catalase négative(-).

##### **4.2.1.2. Caractérisation physiologique et biochimique des isolats**

Pour l'aspect physiologique, il était prévu de réaliser des tests de croissance en présence de différentes concentrations de NaCl ainsi que sur différentes températures. Par ailleurs, l'utilisation du système API 50CHL était aussi prévue, pour compléter l'identification des isolats avec d'autres tests supplémentaires notamment l'hydrolyse de l'esculine.

## *Résultats et Discussion*

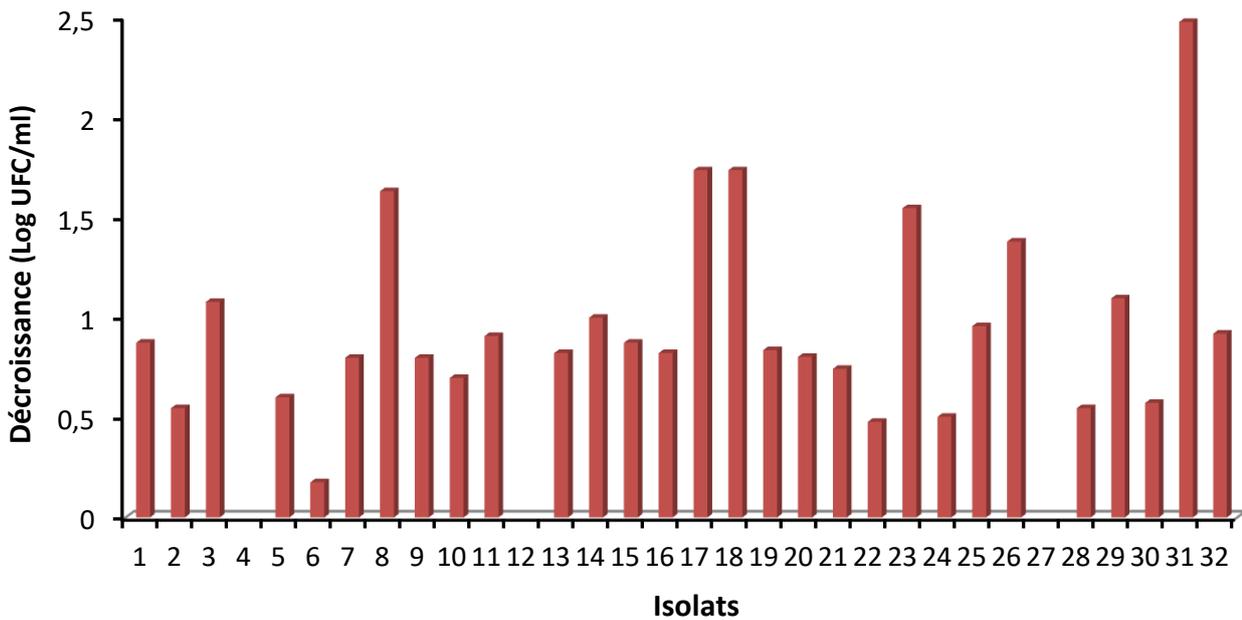
## 1. Évaluation de la viabilité par numération directe

Les préparations des dilutions au 1/10 effectuées à partir des cultures d'isolats contenus dans les cryo-tubes ont présenté un aspect bien homogène, qui a aidé à bien déterminer la morphologie microscopique et à dénombrer les cellules de façon claire et sans condensation, exception est fait pour trois isolats (4, 12 et 27) où leur numération a été impossible. La viabilité des isolats a donc été déterminée par numération microscopique directe. En effet, la numération microscopique directe fait partie des nombreuses méthodes conçues pour y parvenir aux comptages directs des microorganismes. Les comptages microscopiques directs sont effectués en étalant un volume mesuré d'échantillon sur une zone connue d'une lame, en comptant des champs microscopiques représentatifs et en reliant les moyennes aux facteurs volume-surface appropriés. Dans ce sens, des cellules de comptage spécialisées sont utilisées telles que les cellules de comptage Petroff-Hauser et Thoma (**Anonyme, 2017**). Par ailleurs, il existe d'autres méthodes d'évaluation de la viabilité y compris des méthodes fondées sur la culture, comme la numération viable sur milieu solide, par le dénombrement des cellules après réalisation de dilutions décimales et étalement sur des milieux sélectifs ou non sélectifs. Cette méthode de référence consiste à compter les colonies microbiennes après incubation à une température optimale de croissance, afin de déterminer par la suite les concentrations des cellules en UFC/ml (**Uzunova-Doneva et Donev, 2000–2002; Polo et al., 2017**). Par ailleurs, des dosages d'ATP intracellulaire et des mesures d'impédance sont également proposés (**Dumont et al., 2004; Hammes et al., 2010**). L'activité d'acidification par le système CINAC a été aussi utilisée pour mesurer les activités d'acidification de suspensions concentrées de bactéries lactiques avant et après congélation. Le  $t_m$  (Taux maximal d'acidification du lait) donne une mesure précise et significative de l'activité biologique des bactéries lactiques, y compris l'état physiologique et la viabilité. Une augmentation du  $t_m$  correspond à une perte accrue de l'activité d'acidification (**Fonseca et al., 2000; Fonseca et al., 2006**). La cytométrie est également un outil à haut débit pour déterminer les changements de l'activité métabolique et de l'intégrité des membranes des cellules soumises à la congélation et au stockage congelé (**Alonso, 2016; Davey et Guyot, 2020**). D'autres méthodes sont aussi utilisées comme l'évaluation par les nanoparticules d'or (**Kinoshita et al., 2018**), et la spectroscopie de fluorescence (**Ou et al., 2019**).

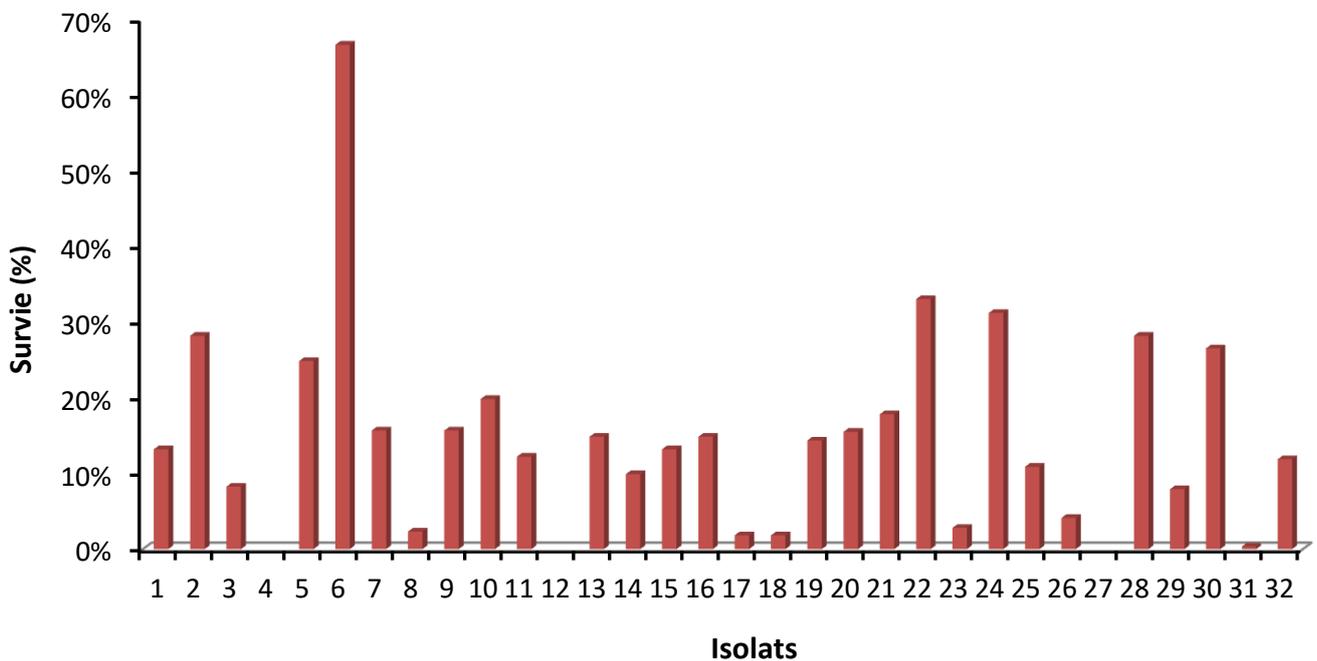
Dans le présent travail et après la numération microscopique directe, le traitement des résultats a été effectué selon deux méthodes. La première méthode a porté sur le calcul du taux de décroissance selon **Martin et Chou (1992)**. Ces auteurs ont utilisé l'équation suivante: Taux de décroissance ou de taux de létalité = au nombre initial des cellules exprimé en (Log UFC/ml) – le nombre final des cellules (Log UFC/ml), pour étudier la survie des bifidobactéries dans des échantillons de laits fermentés entreposés à +4°C. Nous rappelons que les isolats étudiés ont été conservés dans du bouillon MRS et /ou M17 en présence de 30% de glycérol, avec un nombre initial  $\approx 6 \times 10^9$  UFC/ml. Les résultats des calculs ainsi effectués sont illustrés par la figure 4. Ils montrent clairement un changement dans le nombre des cellules durant la période de stockage à -20°C, par rapport au nombre initial de conservation. La décroissance calculée varie selon les isolats entre 0,2 et 2,5 Log UFC/ml (Figure 4). L'isolat 6 apparaît le plus stable avec un taux de viabilité de 0,2 Log UFC/ml, suivi des isolats 22 et 24 avec un taux de 0,5 Log UFC/ml. Cependant, l'isolat 31 a connu une chute importante dans le nombre des cellules, en affichant un taux de décroissance de 2,5 Log UFC/ml, suivi des isolats 17 et 18 avec une décroissance de 1,7 Log UFC/ml.

En revanche, la seconde méthode utilisée dans le traitement des résultats a concerné le calcul du pourcentage de survie. Cette détermination de la survie des isolats après conservation a été faite selon l'équation suivante :  $c (\%) = b/a \times 100$ , où "a" est le nombre des cellules (UFC/ml) avant conservation, "b" est le nombre des cellules après conservation et "c", est la survie de la culture en pourcentage (**Uzunova-Doneva et Donev, 2000–2002**). Ces résultats présentés dans la figure 5 confirment les données obtenues avec le taux de décroissance (Figure 4) et révèlent la stabilité de l'isolat 6, avec une survie de 67%. Le taux de survie le plus bas est allé à l'isolat 31, avec une survie de 0%. Notons que l'isolat 6 est un bâtonnet, tandis que l'isolat 31 est un coccoïde. Selon **Kandil et El Soda, (2015)**, les coccoïdes sont plus résistants aux méthodes de conservation que les bâtonnets, mais nos résultats ont montré que les isolats de formes bâtonnets ont une décroissance moins importante que celles des isolats de formes coccoïdes, quoique dans la sélection d'isolats étudiés, la forme bâtonnet avait dominé.

Le critère de viabilité sous toutes conditions (Fabrication ou conservation) était et reste parmi les facteurs qui limitent la sélection des souches à intérêt industriel (probiotiques et ferment lactiques), et qui déterminent leur qualité (**Rault et al., 2007; Khoramnia et al., 2011; Ullah et al., 2019**).



**Figure 4 :** Taux de viabilité (estimé par le calcul de la décroissance en Log UFC/ml) des isolats étudiés.



**Figure 5:** Survie (%) des isolats étudiés après décongélation.

**Remarque:** Les isolats 4, 12 et 27 étaient non-viables, car lors du dénombrement microscopique de ces isolats, il a été remarqué la présence de corps cellulaires déformés noirs agglutinés et sans le moindre mouvement, malgré le mouvement brownien. Leur aspect microscopique a fait mention de corps cellulaire sans vie. Ces isolats n'ont pas pu être dénombrés.

## 2. Réactivation et purification des isolats

Le développement des isolats sur bouillon MRS s'est manifesté par la formation d'un trouble visible à l'œil nu. Les isolats 5, 7, 9, 14 et 15 ont montré une croissance très rapide dans les premières 18 heures qui ont suivi l'incubation, alors que les isolats 6, 8, 9, 12 et 16 ont eu besoin d'une prolongation de 24h. Par ailleurs, la réactivation des isolats 18, 19 et 20 a nécessité un prolongement de l'incubation jusqu'à 72h. L'isolat 10 a fait une petite exception, car il s'est développé en formant un trouble à peine visible même après prolongation, nous avons alors procédé à un test de température de croissance à 42°C et à 30°C. L'isolat 10 a donc eu une croissance rapide et dense à 30°C.

Pour les autres isolats aucune croissance n'a été observée même après prolongation, ce qui nous fait conclure que la viabilité reste à séparer de la cultivabilité des souches. Selon certains auteurs la cultivabilité n'est pas suffisante pour définir complètement la viabilité (**Hammes et al., 2010**). Dans certaines conditions, toutes les cellules bactériennes n'ont pas la capacité de se reproduire et de croître, elles peuvent posséder de nombreuses propriétés des cellules viables pleinement fonctionnelles. Cela peut être dû à plusieurs raisons, dont la cellule peut être inactive mais reste viable, elle a une croissance limitée et ne peut développer que des micro-colonies qui ne sont pas visibles à l'œil nu (**Austin, 2017**), ou la cellule peut être décrite comme étant dans un état viable, mais non cultivable (VBNC) comme rapporté par **Wilkinson, (2018)**. Ce phénomène (VBNC) a été découvert pour la première fois par **Xu et al.** en 1982, après une enquête réalisé sur *Escherichia coli* ATCC et *Vibrio cholerae* ATCC 14035 et CA401, où ils ont révélé que certains cellules non-cultivables était effectivement viables.

Les quelques isolats réactivés et purifiés sur MRS-agar ont formé des colonies bien distinctes présentant différents aspects.

## 3. Contrôle de l'identification des isolats

### 3.1. Etude morphologique

Les premiers résultats relatifs à cette étude ont été rassemblés et présentés dans le tableau III.

**Tableau III** : Principaux résultats des aspects macroscopiques et microscopiques des isolats réactivés.

Isolat	Aspect microscopique <sup>b</sup>	Aspect macroscopique									
		Sur milieu liquide (MRS)	Sur milieu solide (MRS-agar)								
			T°C	Taille (mm)	Forme	Elévation	Transparence	Surface	Consistance	Pigment	Type
1	Coques	Absence de trouble	Non repiqués								
2	Coques associées en chaînettes										
3	Coques										
4	Coques	Non-viable									
5	Diplocoques	Trouble uniforme dépôt non collant	37	<1	Circulaire	Légèrement	Opaque	Lisse	Crémeuse	Blanc	M
6	Bâtonnet courts associés en chaînettes	Trouble homogène		>1		Convexe			Visqueuse	Beige	S
7	Bâtonnets	Dépôt visqueux		>1		Convexe			Visqueuse	Blanc	S
8	Bâtonnets courts	Absence de trouble	Non Repiqués								
9	Diplocoques	Trouble homogène dépôt non collant	37	>1	Circulaire	Légèrement convexe	Opaque	Lisse	Crémeuse	Beige	M
10	Bâtonnets courts	Trouble homogène	30	<1	Circulaire	Légèrement convexe	Opaque	Lisse	Crémeuse	Blanc	M
11	Diplocoques	Absence de trouble	Non repiqués								
12	Bâtonnets courts	Non-viable									
13	Diplocoques	Absence de trouble	Non Repiqués								

*Résultats et Discussion*

**Tableau III : suite.**

14	Coques	Trouble uniforme	37	>1	Circulaire	Légèrement convexe	Opaque	Lisse	Visqueuse	Blanc	S
15	Diplocoques	Absence de trouble	Non Repiqués								
16	Bâtonnets longs	Trouble homogène Dépôt visqueux	37	<1	Circulaire	Légèrement convexe	Opaque	Lisse	Crémeuse	Blanc Jaunâtre	M
17	Bâtonnets courts associé en deux	Absence de trouble	Non repiqués								
18	Bâtonnets courts associés en deux	Trouble homogène Dépôt visqueux									
19	Bâtonnets condensés	Trouble hétérogène Dépôt visqueux									
20	Diplocoques	Trouble hétérogène Dépôt visqueux									
21	Bâtonnets courts	Absence de trouble									
22	Bâtonnets										
23	Courts associés										
24	en deux										
25	Bâtonnets										
26	Courts										
27	Bâtonnets	Non-viable									
28	Bâtonnets fins	Absence de trouble	Non repiqués								
29	Bâtonnets courts										
30	associés en deux										
31	Coques										
32	Bâtonnets courts										

<sup>a</sup> Après un état frais, S : Smooth (Lisse), M: mucoïde (Muqueuse).

### 3.1.1. Aspect macroscopique

Après une incubation pendant 24h à 37°C dans le bouillon MRS, les isolats 5, 7, 9 et 18 ont formé un trouble beige remarquable et les isolats 5 et 9 ont présenté aussi un dépôt cellulaire non collant au fond du tube. Le reste des isolats ont formé un trouble peu remarquable et pour la plupart il y avait absence de trouble (**Tableau III, Figure 6**). Les isolats 5 et 9 sont des diplocoques comme a révélé l'observation microscopique, et les deux ont formé un dépôt cellulaire dans le milieu liquide avec un trouble uniforme et homogène respectivement. Tandis que les isolats 7 et 18 sont des bâtonnets et ont formé un trouble visqueux sur milieu liquide, mais l'isolat 18 a présenté un mode d'association en deux (diplobacille) et un trouble homogène avec dépôt (**Tableau III**).

Sur MRS gélosé, les isolats repiqués (5, 6, 7, 9, 10, 14, 16) ont formé des colonies blanches, beiges, et même jaunâtres, d'une forme circulaire, lisse et d'une taille moyenne (>1 mm), sauf que les isolats 5, 10, et 16 ont été caractérisés par des colonies de petite taille (<1 mm) de type M (circulaire, convexe ou légèrement convexe, opaque, lisse et crémeuse) (**Figure 7**). Contrairement à ces derniers, les colonies des isolats 6, 7, 14 sont de type S (circulaire, convexe, opaque, lisse et visqueuse). Il est bien connu que selon les conditions de culture et le genre ou l'espèce, les bactéries lactiques forment des colonies d'apparences variables (**Zhang et Cai , 2014**). Il a été rapporté que les colonies du genre *Lactobacillus* sont parfois jaunes ou rouges (**Cai et al., 2014**). L'espèce *Lactobacillus bulgaricus* a été décrite former sur MRS-agar des colonies grandes (diamètre 2-3mm), caractérisées par une couleur claire et un centre opaque (**Chammas et al., 2006**).

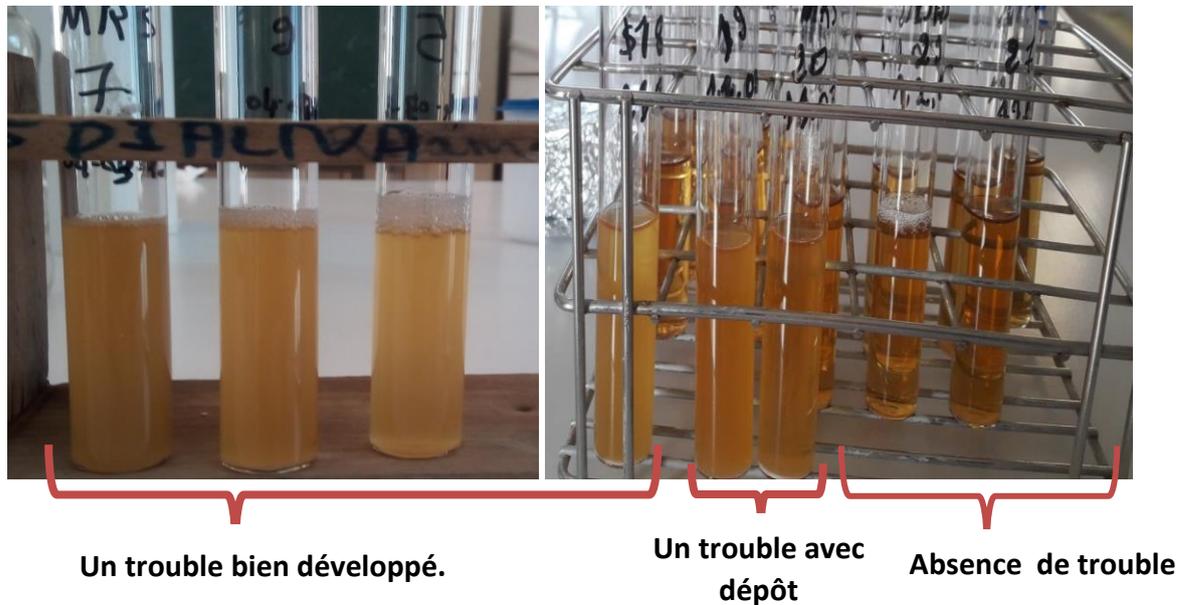
### 3.1.2. Aspect microscopique

#### 3.1.2.1. Observation à l'état frais

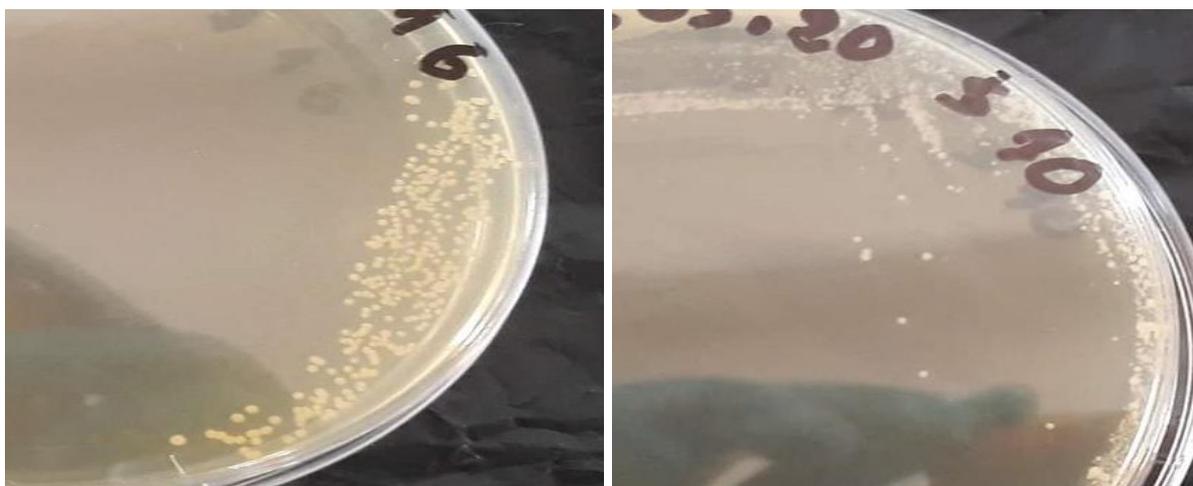
Différentes formes entre cocci et bacille ont été observées comme il est indiqué dans le **Tableau III**. Les isolats 1, 2, 3, 5, 9, 11, 13, 14, 15, 20, 31 sont des coques avec différents modes de regroupement, parmi lesquels, nous mentionnons les isolats 5, 9, 11, 13, 15, 20 avec un mode d'association en diplocoques, et l'isolat 2 était le seul avec des cellules associées en chaînettes.

Par ailleurs, les isolats 6, 7, 8, 10, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 32 sont des bacilles, la plupart sont courts, à l'exception de l'isolat 16 qui a présenté des bacilles longs. Les cellules des isolats 17, 18, 22, 23, 34, 29, 30 étaient associées en diplobacilles, alors que

celles des isolats 2 et 6 en chaînettes. Ces aspects micro-morphologiques sont largement décrits chez différentes espèces de bactéries lactiques d'origines diverses (Dellaglio et al., 1994; Zadeh et al., 2014; Ghahremani et al., 2015).



**Figure 6 :** Aspects des cultures de quelques isolats réactivés sur MRS bouillon indiquant présence ou absence de trouble, après 24h d'incubation à 37°C.



**Figure 7 :** Aspect des colonies formées par les isolats 10 et 16 sur MRS-agar après 24h à 37°C. Celles de l'isolat 16 à gauche, elles sont jaunâtres.

*Presentation d'articles scientifiques*

**Article 1:** Short communication: The effects of frozen storage on the survival of probiotic microorganisms found in traditionally and commercially manufactured kefir. O'Brien K. V., Aryana K. J., Prinyawiwatkul W., Ordonez K. M. C. & Boeneke C. A., 2016. *Journal of Dairy Science*, **99**(9) : 7043–7048. Article disponible sur:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030216303551>

### Description de l'étude

- Cette étude qui porte sur les effets du stockage congelé sur la survie des microorganismes probiotiques trouvés dans le kéfir de fabrication traditionnelle et commerciale (industrielle) a été réalisée par O'Brien et ses collaborateurs de l'école des sciences animales, de la station d'expérimentation agricole, du centre agricole, de l'école de nutrition et des sciences alimentaires de l'Université de l'État de Louisiane (USA). Elle a été publiée en 2016 dans : *Journal of Dairy Science*.

### Justification du choix de l'article

- Cet article a été choisi pour être présenté et analysé pour deux principales raisons : la première concerne sa thématique qui traite de l'influence des conditions de stockage congelé sur la survie des souches probiotiques. Ces aspects (stockage congelé et survie) représentent les mots clés de notre mémoire de fin d'études. La seconde raison est comprise dans sa démarche expérimentale académique.
- **Remarque:** Cet article est de type "Short Communication" ou "Communication Courte", il a été publié sous forme d'un texte unique. Il sera présenté en respectant son contenu scientifique, mais pour plus d'organisation dans la présentation, chaque section sera présentée à part comme dans les articles de recherche, selon la structure et le plan: introduction, matériel & méthodes et résultats & discussion.

### 1. Résumé

Le résumé de la présente étude a été rédigé de manière exhaustive en décrivant tout le contenu de l'article. Il a été introduit par la définition du Kéfir qui est un lait fermenté fabriqué traditionnellement à partir d'une culture starter unique, constituée de nombreuses bactéries et espèces de levures liées ensemble dans une matrice d'exopolysaccharide produite par certaines bactéries lactiques. Il a aussi rapporté sur les avantages du Kéfir produit traditionnellement pour la santé et sur les problèmes liés à son emballage (bombé et

fuyant), qui ont limité sa fabrication à grande échelle. Ces effets négatifs ont encouragé la production commerciale du Kéfir qui bien menée et contrôlée. Les auteurs ont ensuite décrit les conditions expérimentales de l'étude relatives à la préparation à la fois du Kéfir traditionnel et commercial. Après fermentation (à 24–28°C) jusqu'à ce que le pH atteigne 4,6, les échantillons sont congelés (-8°C à -14°C) immédiatement et sont décongelés pour dénombrer les lactobacilles, les lactocoques et les levures aux jours 0, 7, 14 et 30 de l'entreposage congelé. Les résultats obtenus ont révélé une réduction considérable dans le nombre des lactobacilles, des lactocoques et des levures contenus dans le kéfir commerciale. Cependant, le kéfir produit traditionnellement s'est avéré avoir un nombre significativement plus élevé de bactéries et de levures à chaque prélèvement. Les auteurs ont conclu que le stockage congelé et le développement de produits de kéfir congelés pourraient éliminer la plupart des problèmes d'emballage associés à la fabrication à grande échelle de kéfir traditionnellement produit, résultant en une augmentation de la production et de la commercialisation de ce produit sain.

## **2. Introduction et objectifs**

Dans cette section, les auteurs ont tout d'abord souligné l'importance des critères sélection des souches probiotiques, pour qu'elles apportent des bienfaits à la santé humaine. Ces souches doivent avoir de bonnes propriétés technologiques, survivre dans le tractus gastro-intestinal supérieur et être capables de fonctionner dans l'environnement intestinal (**Mattila-Sandholm et al., 2002**). Ces propriétés, ainsi que de nombreux avantages pour la santé ont été examinés, et le Kéfir a démontré un large éventail d'aspects positifs tels que des effets anti-tumoraux et une activité immunostimulante chez les animaux (**Quiros et al., 2005**). Les propriétés prébiotiques et probiotiques du Kéfir se révèlent aussi utiles en santé humaine (**Vinderola et al., 2006; Medrano et al., 2008; Maalouf et al., 2011**). Ensuite, les auteurs ont enchaîné pour évoquer les conditions de fabrication du Kéfir traditionnel qui peut être dominée par la fermentation des levures, en particulier lors du stockage ce qui entraîne des changements substantiels de saveur ainsi que des emballages bombés ou fuyants, en raison de la production continue de gaz carbonique (**Kwak et al., 1996**). En parallèle, une brève description du Kéfir commercial a été donnée, sa fabrication commerciale est donc mieux orientée et utilise une culture starter séchée contenant jusqu'à 12 espèces isolées à partir des grains de kéfir lyophilisés. Ce développement des cultures

starters commerciales a permis une large distribution du kéfir et des produits à base de kéfir. Cependant, la demande pour le kéfir produit traditionnellement est croissante et les méthodes pour produire un produit cohérent avec une durée de conservation adéquate sont encore en cours de développement. Cela indique que la préférence du consommateur pourrait être pour un produit avec une saveur proche du kéfir produit traditionnellement. Parce que les préférences gustatives sont satisfaites avec le kéfir produit traditionnellement et en raison des avantages pour la santé supplémentaires possibles du kéfir traditionnel par rapport au kéfir commercial. Ainsi rapportent les auteurs que le stockage et le transport congelés pourraient servir de solution alternative aux problèmes généralement associés au kéfir produit traditionnellement. La survie des microorganismes dans les produits laitiers a été par la suite abordée par les auteurs, pour en parler des dommages structuraux des cellules causés par la congélation et la décongélation, en citant le cas des cellules vivantes des lactobacilles (**Breunan et al., 1986; Lopez et al., 1998**). D'où l'importance de prendre d'autres considérations, telles que la méthode de congélation, afin de fournir un produit contenant le plus grand nombre de probiotiques survivants. D'autres facteurs permettant d'améliorer la survie sont informés, notamment les exopolysaccharides, tels que le kéfiran, qui pourraient également servir à améliorer la survie des organismes probiotiques dans un dessert glacé, en fournissant une couche protectrice qui peut aider à améliorer les conditions difficiles associées à la congélation et à la décongélation. L'étude faite par **Monnet et al. (2003)** a montré une cryotolérance significativement plus élevée lors de la congélation de souches de *Lactobacillus delbrueckii* avec une mutation responsable d'une production excessive d'exopolysaccharide. En dernier lieu, les auteurs renseignent sur les préférences des consommateurs quant à l'acceptabilité des produits laitiers acidifiés, qui est généralement élevée dans les tests sensoriels effectués sur d'autres desserts laitiers glacés, comme le yogourt glacé (**Guinard et al., 1994**). La même étude a également montré que les échantillons les plus préférés de yogourt glacé étaient ceux avec la plus faible acidité. Ces résultats suggèrent qu'un dessert laitier glacé idéal, pour la plupart des consommateurs, devrait combiner les propriétés sensorielles de la crème glacée et les avantages nutritionnels du yogourt (**Guinard et al., 1994**). Cependant, le kéfir traditionnel aromatisé, qui a obtenu un score élevé lors des études sensorielles, pourrait être plus acceptable pour le palais occidental que le kéfir non aromatisé (**Muir et al., 1999**). De l'ensemble des considérations sus-citées, l'objectif de cette étude était de quantifier les bactéries probiotiques viables et

les levures dans le kéfir produit traditionnellement et commercialement, après diverses périodes de stockage congelé.

### **3. Matériel et méthodes**

#### **3.1 Description générale des expériences**

Deux types de kéfir ont été fabriqués: l'un était traditionnellement produit par inoculation du lait avec des grains de kéfir et le second par inoculation du lait avec un starter de kéfir commercial. Une fois fermenté, le kéfir a été divisé en 4 aliquotes. Trois ont été congelés immédiatement, et le quatrième n'a pas été congelé et a servi de témoin. Les échantillons ont ensuite été testés pour 3 types différents de probiotiques: les lactobacilles, les lactocoques et les levures. L'expérience entière a été répétée en triplicate.

#### **3.2 Procédure de préparation du Kéfir**

Le kéfir traditionnel a été préparé en inoculant 1 L de lait de chèvre pasteurisé entier (Ryals Goat Dairy, Tylertown, MS) avec des grains de kéfir dans d'un récipient en verre d'un litre. Trente grammes de grains de kéfir (Cultures for Health, Morrisville, NC) ont été ajoutés à 1 L de lait pour donner un rapport de 3 à 5% de grains de kéfir au lait comme décrit par **Chen et al. (2005)**. Les grains ont été cultivés, en utilisant cette méthode et avec l'ajout de lait frais chaque semaine, dans le bâtiment de la crèmerie de l'Université d'État de Louisiane pendant plusieurs mois avant l'utilisation expérimentale.

Le kéfir commercial a été préparé en inoculant 1 L de lait de chèvre pasteurisé entier avec un starter de kéfir commercial (Lyo-San, Inc., Lachute, QC, Canada) dans un récipient en verre d'un litre. Le lait a été laissé fermenter à température ambiante (24–28 ° C) et a été agité, en secouant manuellement toutes les quelques heures pendant environ 24h, pour assurer un mélange correct des grains et du lait. La fermentation du kéfir était considérée comme terminée lorsqu'un pH de 4,6 était atteint. Les grains utilisés pour fermenter le kéfir traditionnel ont été récupérés, en filtrant le kéfir à travers un tamis à mailles fines.

#### **3.3 Conditions relatives au stockage des échantillons et au suivi de la densité microbienne**

Trois échantillons de 50 g des kéfirs traditionnels et commerciaux ont été collectés dans des récipients en plastique de qualité alimentaire séparés avant d'être stockés à  $-14\pm 6^{\circ}\text{C}$ , la gamme de températures qui englobe la plupart des congélateurs domestiques. Les échantillons ont été congelés immédiatement après la fin de la fermentation (environ 24h).

Les échantillons ont été décongelés et ensemencés sur milieux aux 7j, 14j et 30j de stockage congelé. Un échantillon supplémentaire n'a pas été congelé et a été utilisé comme témoin pour chaque réplication de l'expérience; cet échantillon a été ensemencé pour les microorganismes probiotiques immédiatement après la fermentation. Les échantillons congelés ont été laissés décongeler à température ambiante pendant 4h et ont été incubés à 37°C pendant 1h avant ensemencement sur milieux (**Hong et Marshall, 2001**)

Pour quantifier les taux des bactéries probiotiques et des levures dans chaque échantillon, des dilutions en série ont été réalisées en utilisant de l'eau peptonée à 0,1% (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD; **Mian et al., 1997**). L'eau peptonée a été stérilisée par autoclavage à 121°C pendant 15 min, puis refroidie à environ 27°C et inoculée avec 1% (vol/vol) de kéfir et diluée jusqu'à  $10^{-10}$ . Pour les lactobacilles et les lactocoques, les échantillons de kéfir ont été étalés, sur les géloses de Man, Rogosa et Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Allemagne) et M17 (Becton, Dickinson and Company) (**Witthuhn et al., 2005a; Garcia Fontan et al., 2006**). Pour éviter la croissance des levures sur les boîtes des bactéries, 200 mg/L de cycloheximide (Acros, Geel, Belgique) ont été ajoutés aux géloses MRS et M17 (**Chen et al., 2008**). Plusieurs dilutions de chaque échantillon ont été étalées et chaque dilution a été étalée en triplicate. Les boîtes de MRS et M17 ont été incubées en anaérobiose pendant 48 à 72h à 32°C (**Irigoyen et al., 2005**). Les levures ont été cultivées sur la gélose au glucose et au chloramphénicol à l'extrait de levure (Merck) pendant 5 jours à 25°C dans des conditions d'aérobiose (Gronnevik et al., 2011). Après incubation, la croissance a été déterminée en comptant le nombre de colonies bactériennes et de levures sur chaque boîte. Le nombre total des colonies a été exprimé en unités formant colonies par millilitre de kéfir.

### **3.4 Analyse statistique**

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test F ANOVA à mesures répétées, avec un intervalle de confiance de 95% ( $p < 0,05$ ). L'analyse de la covariance (ANCOVA) a été utilisée pour déterminer le taux de réduction microbienne comme représenté par la pente de la régression. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

#### 4. Résultats & Discussion

##### 4.1 Effets des interactions : type de kéfir et la période de stockage sur la densité microbienne

La réduction globale des lactobacilles dans le kéfir traditionnel et commercial s'est avérée être significativement différente ( $P < 0,05$ ) (tableau I). Les populations de lactobacilles trouvées dans le kéfir traditionnel ont également diminué à un rythme plus lent que les populations de lactobacilles dans le kéfir commercial pendant le stockage congelé (tableau II). La réduction globale des lactocoques dans le kéfir traditionnel n'était pas significativement ( $P > 0,05$ ) différente de celle dans le kéfir commercial (figure 1), avant la congélation. Cependant, les taux de réduction des lactocoques dans les kéfirs traditionnels et commerciaux étaient significativement différents ( $P < 0,05$ ) entre chaque intervalle de temps au cours des 30 jours de stockage congelé (tableau III). Le taux de réduction des levures trouvé dans le kéfir traditionnel ne s'est pas révélé significativement différent ( $P > 0,05$ ) du taux de réduction des levures dans le kéfir commercial (tableau I).

**Tableau I :** Effets du type de Kéfir et les traitements de stockage sur la réduction des microorganismes. Type = kéfir traditionnel et commercial; stockage = 30 j.

Effect <sup>1</sup>	Lactobacilles	<i>P</i> > <i>F</i>	
		Lactocoques	Levures
Type	<0.0001	0.0094	<0.0001
Stockage	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Type × stockage	<0.0001	<0.0001	0.2137

**Tableau II :** Dénombrements moyens (log UFC/mL) des lactobacilles viables après stockage jusqu'à 30j.

Type de kéfir	Témoin	Lactobacilles		
		7 j	14 j	30 j
Traditionnel Commercial	10.41 <sup>A,a</sup>	8.48 <sup>B,a</sup>	8.00 <sup>C,a</sup>	7.24 <sup>D,a</sup>
	9.15 <sup>A,b</sup>	8.95 <sup>B,b</sup>	6.61 <sup>C,b</sup>	6.33 <sup>D,b</sup>

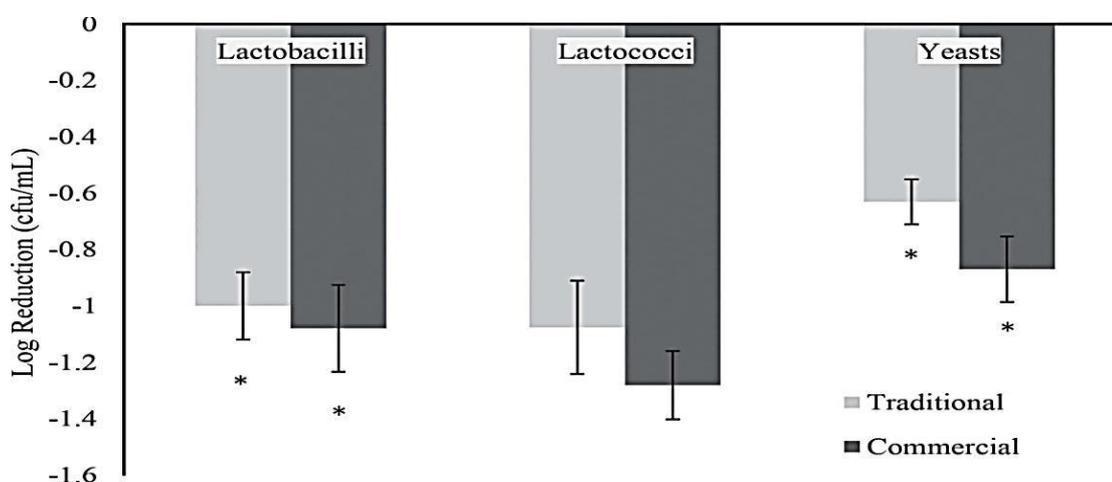
**Tableau III** : Dénombrements moyens (log UFC/mL) des lactocoques viables après stockage jusqu'à 30 j.

Type de kéfir	Témoin	Lactocoques		
		7 j	14 j	30 j
Traditionnel Commercial	9.32 <sup>A,a</sup>	8.87 <sup>B,a</sup>	7.36 <sup>C,a</sup>	6.24 <sup>D,a</sup>
	9.00 <sup>A,b</sup>	8.71 <sup>B,b</sup>	6.55 <sup>C,b</sup>	5.44 <sup>D,b</sup>

<sup>A-D</sup> avec la même lettre majuscule dans la ligne ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ).  
<sup>a,b</sup> avec la même lettre dans la colonne ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2 Évolution de la densité microbienne au cours du stockage

Les taux individuels de réduction microbienne des 3 types de probiotiques entre le kéfir traditionnel et commercial ont été comparés. La figure 1 présente les taux de réduction microbienne (pente) pendant la période de stockage congelé.

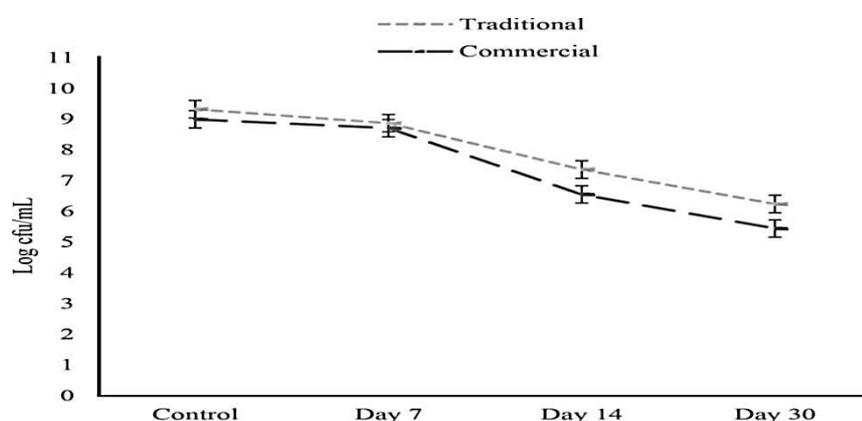


**Figure 1** : Réduction des populations de lactobacilles, de lactocoques et des levures dans le kéfir traditionnel et commercial pendant 30 j de stockage congelé.

(\*) Indique les valeurs de réduction logarithmique pour chaque catégorie microbienne qui sont significativement ( $P < 0,05$ ) différentes entre les types de kéfir. Les valeurs sont indiquées sous forme de moyenne  $\pm$  ET.

#### 4.2.1 Evolution des lactobacilles

Lorsqu'il est soumis à des conditions de stockage congelé, les lactobacilles dans le kéfir préparé traditionnellement ont montré une diminution significative dans le nombre après 30 jours de stockage et des différences significatives ( $P < 0,05$ ) ont été trouvées entre les numérations bactériennes dans le kéfir traditionnel à tous les intervalles de temps testés (tableau II; figure 2). Les lactobacilles dans le kéfir commercial étaient également significativement ( $P < 0,05$ ) différent à la fin de la période de stockage et des différences significatives ont été trouvées à tous les intervalles de temps. Pour discuter ces résultats les auteurs ont cité les travaux de **Guzel-Seydim et coll. (2005)** qui ont trouvé un nombre de  $10^9$  de bactéries lactiques dans le kéfir turc, avec des espèces de lactobacilles prédominantes. Cependant, des études antérieures sur les grains de kéfir irlandais, réalisés par **Rea et al. (1996)**, a montré que les grains ainsi que le lait fermenté contenaient  $10^6$  UFC/ml de lactobacilles. Les auteurs indiquent que les résultats relatifs au taux des lactobacilles présents dans le kéfir commercial sont en accord avec plusieurs études antérieures (**Garcia Fontan et al., 2006; De Oliveira Leite et al., 2013**). Ces études ont également révélé que le nombre de lactobacilles présumés obtenus à partir du kéfir produit avec des grains était de l'ordre d'un log supérieur à celui des lactobacilles du kéfir produit avec un starter commercial. **Witthuhn et coll. (2005b)** ont rapporté des nombres variables de lactobacilles pendant la production de kéfir entre  $4,6 \times 10^3$  et  $2,6 \times 10^8$ . Ces chiffres reflètent le kéfir produit commercialement et traditionnellement, le kéfir traditionnel représente systématiquement les valeurs les plus élevées, ce qui signifie que le kéfir traditionnel a toujours une charge microbienne globale plus élevée que le kéfir commercial.

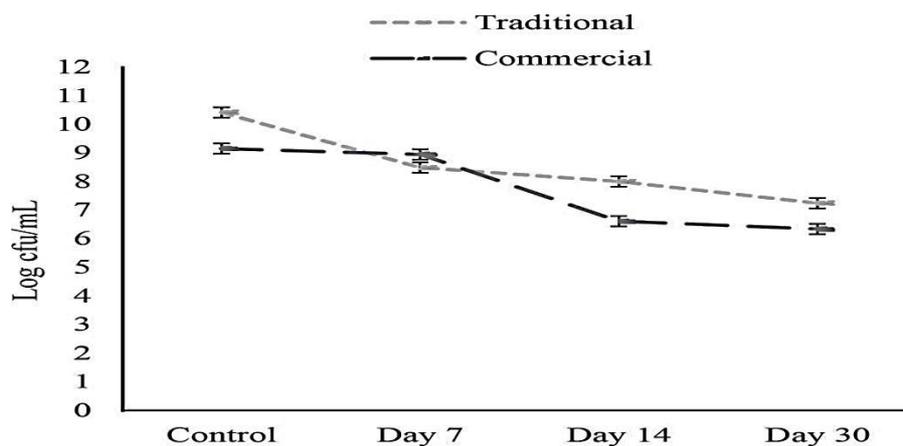


**Figure 2 :** Réduction des lactobacilles dans le kéfir traditionnel et commercial pendant 30 jours de stockage congelé. Les valeurs sont indiquées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.

#### 4.2.2 Evolution des lactocoques

Les lactocoques soumis à des conditions de stockage congelé, dans le kéfir préparé traditionnellement ont montré une diminution significative ( $P < 0,05$ ) en nombre après stockage pendant 30 jours, et des différences significatives ( $P < 0,05$ ) étaient trouvées entre tous les intervalles de temps testés (tableau III; figure 3). Des différences significatives ( $p < 0,05$ ) dans la réduction globale à la fin de la période de stockage de 30 jours et la réduction entre chaque intervalle de stockage étaient également observées dans le kéfir commercial ( $P < 0,05$ ). Pour comparer leurs résultats, les auteurs ont reporté les résultats de **Rea et al. (1996)** qui ont montré que le contenu en lactocoques des grains de kéfir irlandais était de  $10^9$  UFC/ml. Ceci est cohérent avec les nombres de lactocoques observés dans cette étude, mais les nombres rapportés ici ( $10^9$  UFC/g) étaient inférieurs de 2 logs à ceux des travaux de **Beshkova et al. (2002)**, qui ont rapporté un nombre de cellules de  $10^{11}$  CFU/g pour le kéfir traditionnel et commercial, immédiatement après la fermentation. Dans **Guzel-Seydim et al. (2005)**, un dénombrement microbien et une microscopie électronique ont été effectués sur le kéfir turc et les grains de kéfir et n'ont trouvé aucun lactocoque présent dans aucune partie du grain de kéfir. Cependant, les lactocoques ont été dénombrés à  $10^8$  dans la boisson traditionnelle au kéfir. L'absence des lactocoques dans le grain de kéfir, et sa croissance ultérieure dans le kéfir en fermentation, peuvent avoir été causées par l'élimination des lactocoques de la surface des grains lors de la fabrication dans le milieu laitier où ils peuvent proliférer; cela se produirait très probablement en raison de l'agitation pendant le processus de fabrication (**GuzelSeydim et al., 2005**). Ceci a été expliqué par le fait que les lactocoques présents dans le kéfir ne sont pas connus pour produire des exopolysaccharides qui peuvent aider à l'adhérence aux grains, et ils peuvent ne pas être en mesure de se fixer et de s'intégrer dans le grain de kéfir.

La diminution des lactocoques dans le kéfir traditionnel était significativement ( $P > 0,05$ ) différente de la diminution des lactocoques dans le kéfir commercial. Le kéfir traditionnel contenait finalement plus de lactocoques à la fin des 30 jours de stockage congelé, comme l'indique la signification ( $P < 0,05$ ), il y a moins de lactocoques dans le kéfir commercial que dans le kéfir traditionnel.



**Figure 3** : Réduction des lactocoques dans le kéfir traditionnel et commercial pendant 30 jours de stockage congelé. Les valeurs sont indiquées sous forme de moyenne  $\pm$  ET.

#### 4.2.3 Evolution des levures

Lorsqu'elles ont été soumises à des conditions de stockage congelées, les levures dans le kéfir traditionnellement préparé ont montré une diminution significative ( $P < 0,05$ ) en nombre après stockage pendant 30 jours, et des différences significatives ( $P < 0,05$ ) dans les nombres de levures pour le kéfir traditionnel ont été trouvées entre tous les intervalles de temps testés (tableau IV; figure 4). Aucune différence significative ( $P > 0,05$ ) dans le taux de réduction des levures n'a été observée entre le kéfir traditionnel et le kéfir commercial. Le kéfir commercial s'est également avéré avoir des réductions significatives ( $P < 0,05$ ) des levures viables entre les intervalles et après les 30 jours d'entreposage congelé.

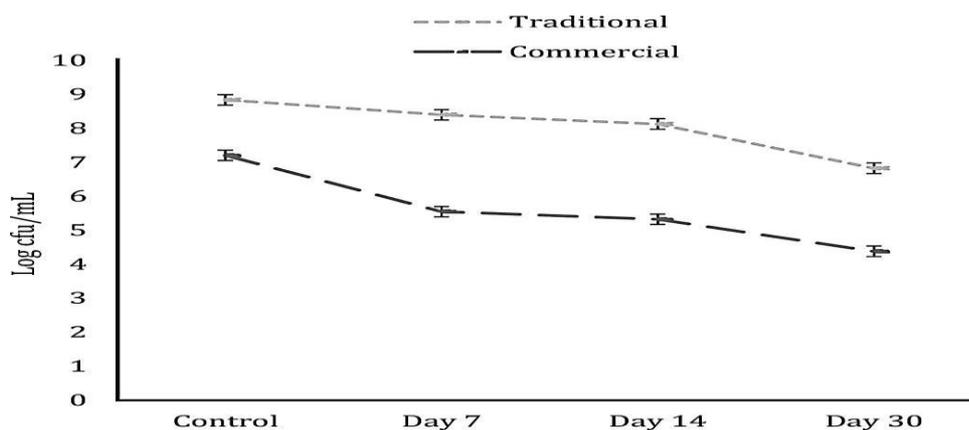
Par comparaison, la population de levures était inférieure aux populations des bactéries lactiques dans le kéfir traditionnel et commercial. Les comptages initiaux de  $10^8$  UFC/g dans le kéfir traditionnel observés étaient supérieurs à ceux trouvés par **Wang et al. (2008)** ( $10^7$  UFC/g). Les auteurs expliquent que les conditions de fermentation, et très probablement une baisse fluctuante de la température ambiante, auraient pu créer un environnement plus favorable pour les levures et être à l'origine des nombres élevés. Cependant, le kéfir commercial est conforme aux conclusions de **Beshkova et al. (2002)**, qui ont rapporté que le nombre total de levures était de  $10^6$  à  $10^7$  UFC/g dans le kéfir fabriqué avec des cultures pures. Pendant le stockage sous réfrigération, les populations de levures ont montré une

croissance marquée dans le kéfir traditionnel, en raison de leur consommation accrue des métabolites bactériens (Guzel-Seydim et al., 2000). La quantité de levures dans cette étude est plus directement corrélée aux comptages de levures observés directement après la Fermentation. Par conséquent, les auteurs s'attendraient à ce que la quantité de levures dans le kéfir congelé soit inférieure à celle d'un kéfir stocké non-congelé.

**Tableau IV** : Dénombrements moyens (log UFC/mL) des levures viables après stockage jusqu'à 30 j.

Type de kéfir	Témoïn	Levures		
		7 j	14 j	30 j
Traditional	8.83 <sup>A,a</sup>	8.40 <sup>B,a</sup>	8.13 <sup>C,a</sup>	6.82 <sup>D,a</sup>
Commercial	7.20 <sup>A,b</sup>	5.56 <sup>B,b</sup>	5.32 <sup>C,b</sup>	4.38 <sup>D,b</sup>

<sup>A-D</sup> avec la même lettre majuscule dans la ligne ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ).  
<sup>a, b</sup> avec la même lettre dans la colonne ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



**Figure 4** : Réduction des levures dans le kéfir traditionnel et commercial pendant 30 jours de stockage congelé. Les valeurs sont indiquées sous forme de moyenne  $\pm$  ET.

## **5. Conclusion**

Les auteurs ont conclu ce travail en rapportant que les effets de la congélation du kéfir qui est formulé dans un mélange contenant du sucre et d'autres arômes, ainsi que la méthode de congélation doivent également être examinés pour prédire plus précisément le nombre de probiotiques qui seront présents dans le produit fini et disponibles pour le consommateur. Aussi, l'agitation et le grattage supplémentaires des parois du cylindre du congélateur nécessaires, pour obtenir un dépassement approprié dans les desserts laitiers congelés peuvent réduire le taux de survie, et l'exposition cellulaire à l'oxygène pendant le fouettage pourrait également augmenter la mort cellulaire due à l'exposition aux radicaux libres (**Marshall, 2001**). Ces variables doivent être prises en compte lors de la détermination du potentiel protecteur total des exopolysaccharides naturels sur les probiotiques. Cependant, l'écologie en constante évolution qui est unique au kéfir de fabrication traditionnelle peut encore augmenter le nombre total des bactéries viables en garantissant, avec un très large éventail d'espèces, qu'un pourcentage élevé de populations diverses survivra à des conditions telles que la congélation, la décongélation et l'exposition aux acides et aux sels biliaires nécessaires pour la digestion. Il a été démontré que l'exopolysaccharide, le kéfiran, produit par une souche spécifique du kéfir de fabrication traditionnelle, aide à la colonisation de l'intestin, avec des bactéries et des levures bénéfiques, en assurant l'adhésion d'espèces probiotiques à l'épithélium. Pour ces raisons, la consommation de kéfir produit traditionnellement pourrait être préférée au kéfir produit à partir des cultures de départ starters, afin d'assurer une plus grande survie et une plus large gamme d'espèces probiotiques. Un produit congelé fabriqué à partir de kéfir traditionnel fournirait une charge microbienne suffisamment importante pour être considéré comme un complément bénéfique pour le consommateur, et les problèmes de distribution généralement associés au transport et au stockage réfrigérés seraient éliminés.

**Article2:** Viability of freeze-dried cultures of lactic acid bacteria after storage for 30 to 40 years. Cabeza M., Burgos J., Ordóñez J.A., Cambero M.I., & Hoz L., 2011.

*Milchwissenschaft*, 66(2): 135-137. **Article disponible sur:**

**[https://www.researchgate.net/publication/281819440\\_Viability\\_of\\_freeze-dried\\_cultures\\_of\\_lactic\\_acid\\_bacteria\\_after\\_storage\\_for\\_30\\_to\\_40\\_years](https://www.researchgate.net/publication/281819440_Viability_of_freeze-dried_cultures_of_lactic_acid_bacteria_after_storage_for_30_to_40_years).**

### **Description de l'étude**

- Cette étude qui porte sur la viabilité des cultures lyophilisées de bactéries lactiques après stockage de 30 à 40 ans a été réalisée par Cabeza et ses collaborateurs de l'université de Complutense, Madride, Espagne. Elle a été publiée en 2011 dans *Milchwissenschaft*.

### **Justification du choix de l'article**

- Cet article a été choisi pour être présenté car son protocole est simple et clair, il est aussi intéressant puisqu'il donne les résultats d'une enquête importante sur la conservation par lyophilisation qui a duré plus de 30.

### **1. Résumé**

Le résumé de cette étude donne une description générale du travail réalisé et qui a concerné la détermination de la viabilité de trois souches lyophilisées de bactéries lactiques (*Enterococcus durans*, *Enterococcus hierae* et *Lactococcus lactis*) isolées du fromage après 30, 32, et 37 ans de stockage, respectivement. Ainsi, les survivants ont été dénombrés sur trois milieux (PCA, Elliker-agar et BHI-agar), par la technique d'ensemencement en profondeur à 30°C après 36h d'incubation. Les dénombrements ont également été déterminés par le nombre le plus probable en utilisant le bouillon Elliker, comme milieu de culture. Les trois souches ont été récupérées, mais le pourcentage de viabilité différait sensiblement de 0,3, 24 et 0,04%, respectivement. Il est confirmé une fois de plus que la lyophilisation est une méthode appropriée pour le stockage à long terme des cultures bactériennes.

### **2. Introduction et objectifs**

Dans l'introduction de cet article, les auteurs ont signalé que la préservation à long terme des cultures microbiennes pour maintenir leur viabilité et propriétés biochimiques et

technologiques est une exigence pour la recherche microbiologique et quelques applications industrielles. Ils ont aussi rapporté que la lyophilisation est généralement la méthode la plus fiable pour le stockage à long terme et que si elle est correctement appliquée, les cultures doivent rester viables pendant de nombreuses années. Il y a environ un demi-siècle, il a été reporté sur la viabilité de nombreuses cultures lyophilisées de plusieurs bactéries stockées dans des conditions différentes. La plus longue durée de conservation enregistrée dans cette publication était de 18 ans pour une culture de *Pasteurella* sp. Un autre exemple a été aussi cité est celui du département de biologie des sols de l'université de l'Illinois où 277 cultures souches ont été testées, dont 158 rhizo-bactéries, 57 autres bactéries, 40 levures, 3 actinomycètes et 19 moisissures. Seules deux cultures fongiques et une culture bactérienne n'ont pas réussi à se développer après avoir été stockées pendant 21 ans à l'état lyophilisé à des températures ambiantes ou de réfrigération. Ces résultats indiquent que la lyophilisation peut préserver indéfiniment les microorganismes. Cependant, à la connaissance des auteurs, aucune étude publiée n'a examiné la viabilité de tout organisme lyophilisé stocké pendant plus de 21 ans. C'est la raison pour laquelle que les auteurs présentent dans ce travail la viabilité de trois souches de bactéries lactiques isolées du fromage et conservées sous forme lyophilisée pendant plus de trente ans.

### **3. Matériel et méthodes**

Comme il a été déjà signalé cette étude a suivi un protocole simple et clair basé essentiellement sur des techniques de dénombrement afin d'évaluer la viabilité.

Nous présentons cette section telle qu'elle a publiée.

#### **3.1. Organismes**

La première souche a été isolée du "fromage Ulloa" en 1971 par **Ordoñez (1974)** et identifiée comme *Streptococcus lactis* (Actuellement, *Lactococcus lactis* var *lactis*) sur la base des critères de **Sharpe et al. (1966)**. Les deux autres souches ont été isolées par le même auteur à partir du fromage "Manchego" en 1976 et 1978. Elles ont été caractérisées, respectivement, comme *Str. faecalis* (Actuellement, *Enterococcus faecalis*) et *str. durans* (actuellement, *E. durans*), en utilisant les critères de **Sharpe et al. (1966)**. La figure 1 montre les flacons contenant les bactéries lyophilisées avant leur ouverture dans la présente étude. Les flacons ont été ouverts pour analyse en 2008.



**Figure 1** : Les souches lyophilisées utilisées dans cette étude, présentées dans leurs flacons originaux avant leur récupération.

### 3.2. Lyophilisation et stockage des organismes

Le *Streptococcus lactis* a été mis en culture dans du lait de tournesol (Difco) pendant 24h à 25°C, en donnant une population d'environ  $10^8$  UFC/ml. La culture a été transférée aseptiquement dans une ampoule en verre contenant deux gouttes de glycérol à 10%, puis elle a été congelée par immersion dans un mélange de dioxyde de carbone solide/acétone 1: 1 (P/V) et lyophilisée dans un dispositif en verre "Quickfit" équipé d'une pompe à vide (Edwards, mod ED-35) et d'un condenseur refroidi avec le même mélange de dioxyde de carbone solide/acétone. L'ampoule a été scellée avec une flamme d'acétylène. Par ailleurs, les isolats d'entérocoques ont été cultivés dans des flacons en verre pharmaceutique de 5 ml (Fig. 1) contenant du lait écrémé (Difco) pendant 24h à 25°C et lyophilisés dans un appareil Terruzzi. Les flacons ont été fermés sous vide avec des bouchons en caoutchouc et scellés avec des bouchons en aluminium. La plupart du temps, ils ont été stockés à -18°C bien que pendant certaines périodes, ils aient été exposés à des températures ambiantes/de réfrigération.

### 3.3. Récupération des cultures lyophilisées

De l'eau peptonée stérile (1 ml) a été ajoutée à la poudre lyophilisée et agitée doucement jusqu'à ce que la suspension soit homogénéisée. Ensuite, des échantillons (100 µl) ont été prélevés et dénombrés par la technique d'ensemencement en profondeur. Les échantillons ont été étalés sur trois milieux (PCA, Elliker-agar et BHI-agar) et incubés à 36°C à 30°C. Les colonies ont été dénombrées en utilisant un compteur automatique (Counterstat Flash, IUL Instruments). Les dénombrements ont également été déterminés par la méthode des nombres les plus probables, en utilisant le bouillon Elliker comme milieu de culture.

### 3.4. Identification définitive des cultures

Après récupération, les cultures ont été envoyées aux collections coordonnées Belges de microorganismes laboratoire de microbiologie (BCCM/LMG, Université de Gand), pour identification. *Streptococcus lactis* a été caractérisé comme *Lactococcus lactis* et *S. faecalis* et *S. durans* ont été identifiés comme *E. hiraе* et *E. durans*, respectivement.

## 4. Résultats

Le tableau 1 présente le comptage bactérien des souches après la période de stockage. Toutes les cultures ont pu être récupérées de l'état lyophilisé, mais la viabilité était variable de 0,04% pour *L. lactis*, 0,3% pour *E. durans* et 24% pour *E. hiraе*. La faible viabilité fait sens, car il est bien connu que les lactocoques sont, en général, plus sensibles que les entérocoques à la fois à la lyophilisation et au stockage prolongé.

Cependant, la grande différence de viabilité entre les deux souches d'entérocoques était surprenante. Cette différence était similaire pour trois supports de comptage et deux méthodes de comptage. En outre, aucune relation n'a été trouvée entre les souches, les milieux de lyophilisation et les années de stockage. La viabilité observée pour ces cultures lyophilisées après plus de 30 ans de stockage est cohérente avec les travaux antérieurs. Heckly (1961) a signalé que la viabilité de nombreuses cultures lyophilisées était généralement supérieure à 10% lorsque la période de stockage était inférieure à 2 ans.

Pour des périodes de stockage plus longues de 5 à 18 ans, cette étude n'a pas précisé les pourcentages de viabilité puisqu'elle a simplement enregistré "la croissance", ce qui indique que les organismes ont été récupérés.

**Tableau I** : Récupération des organismes (UFC/ml) dans plusieurs milieux à partir des cultures lyophilisées après 30-37 ans de stockage.

Organisme	Milieu	Stockage (années)	Elliker	PCA	BHI	NPP	Viabilité* (%)
<b>L.lactis (x 10<sup>4</sup>)</b>	Lait de tournesol	37	3.65	5.00	3.33	4.30	0.04
<b>E.hirae (x 10<sup>7</sup>)</b>	Lait écrémé	32	1.75	1.46	1.66	4.80	24
<b>E.durans (x 10<sup>5</sup>)</b>	Lait écrémé	30	3.44	2.63	3.20	2.20	0.3

Elliker: gélose d'Elliker; PCA : plate count agar; BHI: gélose infusion cœur/cervelle; NPP: nombre plus probable; résultats: moyenne de 4 déterminations, sauf NPP (effectué une seule fois), \* valeurs approximatives en supposant une charge de 10<sup>8</sup> UFC/ml avant lyophilisation.

## 5. Conclusion

Les résultats de cette étude confirment que la lyophilisation est la méthode la plus favorable pour la conservation à long terme des cultures bactériennes, et même avec un faible pourcentage de viabilité comme été le cas de *L. lactis*.

**Article 3:** Stabilization of Frozen *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* in Glycerol Suspensions: Freezing Kinetics and Storage Temperature Effects. Fonseca F., Marin M., & Morris G. J., 2006. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(10): 6474–6482.

Article disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1610330/>

### Description de l'étude

- Ce travail qui porte sur la stabilisation de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* dans des suspensions de glycérol, avec l'étude des cinétiques de congélation et des effets de la température de stockage a été réalisée par Fonseca et ses collaborateurs de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris-Grignon. Elle a été publiée en 2006 dans *Applied and Environmental Microbiology*.

### Justification du choix de l'article

Cet article a été choisi pour être présenté pour son rapprochement de la thématique de notre mémoire de fin d'études.

### 1. Résumé

Les auteurs ont souligné le contexte de l'étude qui concerne les effets de trois protocoles de congélation et de deux températures de stockage sur la viabilité et l'activité d'acidification de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1 en présence de glycérol. Les échantillons ont été examinés à -196° C et -20°C par microscopie électronique (substitution par congélation; fracture par congélation). La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a été utilisée pour mesurer les proportions de glace et les températures de transition vitreuse pour chaque condition de congélation testée. Par ailleurs, après stockage à basse température (-196°C et -80°C), la viabilité et l'activité d'acidification de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* a diminué après la congélation et dépendait fortement de la cinétique de congélation. Les vitesses de refroidissement élevées obtenues par immersion directe dans l'azote liquide ont entraîné une perte minimale de l'activité d'acidification et de la viabilité. La quantité de glace formée dans la matrice congelée concentrée a été déterminée par le protocole de congélation, mais aucune glace intracellulaire n'a été observée dans les cellules en suspension dans le glycérol à toute vitesse de refroidissement. Pour les échantillons conservés à -20°C, la perte maximale de viabilité et d'activité d'acidification a été observée

avec des cellules rapidement refroidies. En microscopie électronique à balayage, ces cellules n'ont pas été observées contenir de la glace intracellulaire, et elles ont été observées comme étant plasmolysées. Il est suggéré que les dommages cellulaires qui se produisent dans les cellules rapidement refroidies pendant le stockage à des températures inférieures à zéro sont causés par un déséquilibre osmotique pendant le réchauffement, et non par la formation de glace intracellulaire.

## **2. Introduction et objectifs**

Pour justifier le cadre général de l'étude, les auteurs ont évoqué "Les concentrés" de bactéries lactiques (LAB) qui sont largement utilisés comme starters pour la fabrication de fromage, de lait fermenté, de viande, de légumes et de produits panifiés (**Leroy & De Vuyst, 2004**). La congélation et le stockage à basse température (< -40°C) sont couramment appliqués pour préserver la viabilité des concentrés, tout en conservant leurs propriétés technologiques lors de la décongélation (activité d'acidification, production de composés aromatiques et contribution à la texture du produit). Cependant, la résistance bactérienne à la congélation et au stockage congelé dépend de la souche, des conditions de culture avant la congélation, de la récolte, de la formulation (type et concentration du cryo-protecteur), des conditions de congélation et de la température de stockage finale (**Fonseca et al., 2001**). La congélation est une étape critique dans la production des concentrés de LAB, car elle affecte à la fois la viabilité et l'activité d'acidification lors de la décongélation (**Smittle et al., 1972; Fonseca et al., 2000**). Cependant, les mécanismes des dommages causés par la congélation aux bactéries ne sont pas bien compris. Deux mécanismes d'endommagement dépendant de la vitesse de refroidissement ont généralement été proposés. À de faibles vitesses de congélation, les dommages cellulaires sont principalement causés par un stress osmotique sur les cellules (ce qui est appelé les «effets de solution»). La formation de glace extracellulaire induit des concentrations élevées de soluté dans le milieu extracellulaire, exposant les cellules à une augmentation de la concentration ionique, des changements de pH, etc., pendant de longues périodes de temps. À des vitesses de refroidissement très élevées, il a été supposé que les dommages étaient dus à la formation de glace intracellulaire (**Mazur, 1977; Karlsson et al., 1993**). Cependant, aucune preuve directe de formation de glace intracellulaire dans les bactéries cryoconservées n'a été présentée. Un mécanisme alternatif a été proposé dans lequel les dommages cellulaires survenant après

des vitesses de refroidissement rapides sont causés par un déséquilibre osmotique rencontré pendant la décongélation, et non par la formation de glace intracellulaire (**Morris et al., 2006**).

Selon les auteurs les interactions entre les conditions de congélation et la température subséquente de stockage et leurs effets sur l'activité biologique des LAB n'ont pas été différenciés dans la plupart des études rapportées. De plus, la complexité de la plupart des solutions cryoprotectrices employées, les incohérences dans les températures de congélation et de stockage, et le manque d'informations sur les vitesses de congélation et les différentes durées de stockage à l'état congelé avant les tests font que les résultats sont souvent difficiles à interpréter (**Lund, 2000; Archer, 2004**). Par conséquent, l'examen des interactions entre les effets de la cinétique de congélation et de la température de stockage sur l'activité des bactéries dans un milieu bien défini est essentiel pour améliorer la compréhension des mécanismes d'endommagement par la congélation des concentrés de LAB et fournir des outils rationnels pour une meilleure formulation et une optimisation des processus.

Cette étude vise donc à quantifier les effets individuels de la cinétique de congélation et de la température de stockage en présence de glycérol comme cryoprotecteur sur la viabilité et l'activité d'acidification de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1. Trois protocoles de congélation impliquant des vitesses de refroidissement faibles et élevées et deux températures de stockage ont été étudiés. Pour approfondir la compréhension des comportements physiques des différentes phases des suspensions bactériennes - cristaux de glace, milieu de suspension et cellules bactériennes - des échantillons ont été examinés à -196°C et -20°C par microscopie électronique par congélation et substitution. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a été utilisée pour mesurer les proportions de glace et de transition vitreuse pour chaque condition de congélation testée et pour aider à expliquer les résultats d'activité après recuit à -20°C.

### **3. Matériel et Méthodes**

#### **3.1 Souche bactérienne et milieux de culture**

*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1 ((INRA, Thiverval-Grignon, France) a été choisi pour de sa sensibilité à la congélation. L'inoculation a été effectuée à environ  $10^8$  UFC/ml. L'inoculum a été stocké à -75°C et décongelé pendant 5 min à 30°C.

Pour la production du starter, le milieu de culture était composé de 56,6 g/L de poudre de lactosérum (BBA; Brenntag, Bonneuil sur Marne, France) et a été chauffé à 110°C pendant 10 min. Le surnageant obtenu après centrifugation (17 000 g, 20 min, 4°C) et filtration (0,45µm) a été additionné de 20g/L de lactose (Prolabo, Paris, France), 5g/L d'extrait de levure (Labosi, Oulchy-Le -Chateau, France) et 1ml/L d'agent anti-mousse (Rhodorsil 426R; Prolabo). Le milieu a été stérilisé dans un fermenteur à 110°C pendant 20 min.

Pour les mesures de l'activité d'acidification, le milieu était composé de lait écrémé en poudre (100 g/L ; Elle & Vire, Condé sur Vire, France) pasteurisé pendant 1h à 95°C dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml.

### **3.2 Production de la souche *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1**

Pour cette préparation une culture en batch a été établie en utilisant un fermenteur de 2L à 42°C, avec une vitesse d'agitation de 200 trs/min. Le pH a été contrôlé à 5,5 en ajoutant une solution de NH<sub>4</sub>OH 8,2 M. Des mesures d'absorbance à 480 nm ont été utilisées pour suivre la croissance bactérienne. Afin de récupérer des cellules dans des états physiologiques similaires, les cultures ont été arrêtées au début de la phase stationnaire. La suspension cellulaire a ensuite été refroidie à 15°C à 1°C/min dans le fermenteur. Les cellules ont été récoltées et concentrées 20 fois par centrifugation (17 000g, 30 min, 4° C). Après une période de stockage intermédiaire pendant 30 min à 4°C, les cellules concentrées ont été remises en suspension à 4°C dans le même poids de milieu protecteur stérile.

### **3.3 Milieu de congélation**

Du glycérol a été ajouté au surnageant obtenu après centrifugation du milieu fermenté, étant donné qu'il a été rapporté comme étant un bon cryo-protecteur des LAB (**Lamprech & Foster, 1963; Stadhouders et al., 1969; Fonseca et al., 2001**). La concentration finale du glycérol dans le surnageant était de 10% (P/P). La composition du surnageant a été déterminée par chromatographie liquide à haute performance comme étant 2,3% de lactose, 0,2% de glucose, 1,1% de galactose et 1,1% de lactate de sodium. L'osmolalité du milieu de congélation était de 1600 mosM.

### 3.4 Protocole de congélation

Les échantillons ont été congelés dans des pailles de 0,5 ml (IMV Technologies, L'Aigle, France) scellées avec de la poudre d'alcool polyvinylique. L'enceinte de congélation était pré-réglée à 4°C. La congélation a été effectuée selon les trois méthodes suivantes (Fig. 1).

(i) Protocole de congélation 1 (FP 1) : en utilisant un congélateur à vitesse contrôlée Asymptote EF100 (Asymptote Ltd., Cambridge, Royaume-Uni), les pailles ont été maintenues horizontalement sur une plaque d'échantillons. Les pailles ont été refroidies de 4°C à 5°C à une vitesse de 5°C/min et maintenues à 5°C pendant 10 min, moment auquel elles ont été nucléées manuellement en touchant la paroi de chaque paille avec des pinces qui ont été préalablement refroidies dans l'azote liquide. La température de nucléation était de 2°C inférieure au point de fusion des échantillons (3,0 °C). Les pailles ont ensuite été refroidies à une vitesse de refroidissement linéaire programmée de 5°C/min à 100°C et transférées dans de l'azote liquide.

(ii) Protocole de congélation 2 (FP 2) : était le même que FP1, sauf qu'après la nucléation manuelle de la glace, les échantillons ont été congelés par immersion directe dans l'azote liquide (vitesse de refroidissement de 2 500°C/min).

(iii) Protocole de congélation 3 (FP 3) : Pour FP3, les pailles ont été immergées directement dans de l'azote liquide sans aucune nucléation contrôlée (trempe). La température à l'intérieur des pailles contenant du milieu de congélation a été contrôlée avec des thermocouples (type K; 0,2 mm de diamètre) maintenus dans deux pailles factices. Celles-ci mesuraient la vitesse de refroidissement et garantissaient que la température à l'intérieur de l'échantillon suivait de près la température programmée.

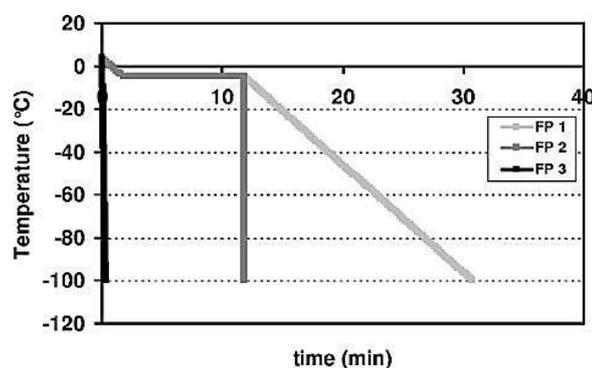


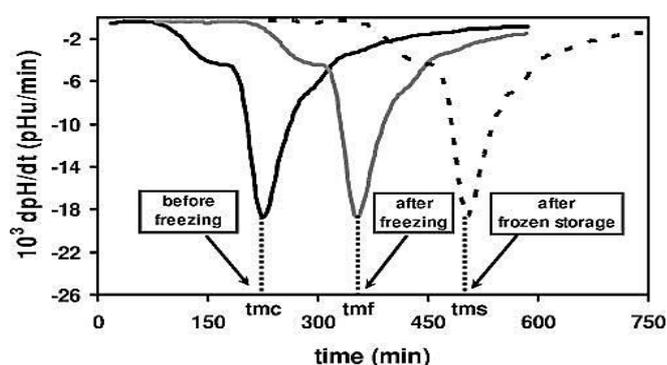
Figure 1: Protocoles de congélation : FP1, FP2 et FP3.

### 3.5 Température de stockage

Après congélation et immersion dans de l'azote liquide, les échantillons ont été stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$ . Après 1 mois de stockage, les échantillons ont été décongelés pendant 2 min dans un bain-marie à  $30^{\circ}\text{C}$  et l'activité d'acidification a été mesurée.

### 3.6 Activité d'acidification

Le système Cinac (Corrieu et al., 1988) a été utilisé pour mesurer les activités d'acidification des suspensions concentrées de bactéries lactiques avant et après congélation. L'acidification a été réalisée en triplet, en utilisant du lait écrémé en poudre reconstitué à  $42^{\circ}\text{C}$ . Pour chaque échantillon, le temps nécessaire pour atteindre le taux d'acidification maximal dans le lait ( $t_m$ , en minutes) a été utilisé pour caractériser l'activité d'acidification de la suspension bactérienne: plus la  $t_m$  est élevée, plus la phase de latence est longue et plus l'activité d'acidification est faible. De plus, la valeur de  $t_m$  était corrélée au logarithme naturel de la concentration bactérienne ( $X$  [en UFC/ ml]) (Fonseca et al., 2000). Par conséquent, le  $t_m$  donne une mesure précise et significative de l'activité biologique des LAB, y compris l'état physiologique et la viabilité. L'activité d'acidification a été mesurée avant congélation ( $t_{mc}$ , en minutes), après congélation ( $t_{mf}$ , en minutes), et après un mois de stockage congelé ( $t_{ms}$ , en minutes) (Fig. 2). En conséquence,  $dt_{mf}$  ( $t_{mf} - t_{mc}$ ) et  $dt_{ms}$  ( $t_m - t_{mf}$ ) ont caractérisé la perte d'activité d'acidification pendant la congélation et au stade congelé, respectivement. Une augmentation du  $dt_m$  correspond à une perte accrue d'activité d'acidification pendant le traitement expérimental.



**Figure 2:** Activités d'acidification de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1 en présence du glycérol, tel que déterminé par le système Cinac, avant ( $t_{mc}$ ) et après congélation lente (FP 1) ( $t_{mf}$ ) et après 1 mois de stockage congelé ( $t_{ms}$ ) à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.7 Viabilité**

Les concentrations de cellules bactériennes (UFC/ml) ont été déterminées en utilisant la méthode de comptage en boîtes avant et après congélation et après 1 mois de stockage à -20°C ou -80°C. Le MRS (Biokar Diagnostics, France) était le milieu spécifique utilisé pour *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1. Les boîtes Pétri ont été incubées dans des conditions anaérobiose (GENbox96124; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) à 42°C pendant 48h avant le comptage des cellules.

### **3.8 Analyse statistique**

Une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) avec des interactions à deux facteurs (Statgraphics Plus 3) a été réalisée pour déterminer les effets du protocole de congélation et la température de stockage. La procédure de comparaison multiple de Neuman-Keuls a été utilisée pour discriminer entre les moyennes des différences significatives au niveau de confiance 5%.

### **3.9 Microscopie électronique à Cryofracture (ou gel-tech) et substitution par congélation**

Après la congélation des échantillons selon les trois protocoles de congélation, en utilisant du glycérol à 10% comme cryoprotecteur et avec des cellules en suspension dans de l'eau distillée, une microscopie électronique conventionnelle par fracture par congélation et une substitution par congélation des pailles congelées ont été effectuées (Morris, 1999). L'analyse d'image de la taille des cristaux de glace a été réalisée avec Optimas 6.1 (Imasys, Suresnes, France).

### **3.10 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)**

Les échantillons contenant des bactéries avaient une composition complexe, ce qui rend l'analyse des thermogrammes incertaine. Pour comprendre la composition de la matrice congelée concentrée à laquelle les cellules sont exposées pendant la congélation, le milieu de congélation (surnageant plus glycérol) a été examiné par DSC sans présence de bactéries. Les mesures DSC ont été effectuées en utilisant un calorimètre à balayage différentiel à compensation de puissance (Pyris 1; Perkin-Elmer LLC, Norwalk, CT) équipé d'un accessoire de refroidissement à l'azote liquide (CryoFill; Perkin-Elmer). L'étalonnage de la température a été effectué en utilisant du cyclohexane (transition cristal-cristal à -87,1°C), du mercure et

du gallium (points de fusion de  $-38,6^{\circ}\text{C}$  et  $-29,8^{\circ}\text{C}$ , respectivement). Environ 5 mg de chaque échantillon ont été placés dans des récipients en aluminium scellés Perkin-Elmer DSC de  $50\mu\text{L}$ . Un récipient vide a été utilisé comme référence. Trois profils de refroidissement et de chauffage ont été utilisés tout au long des études afin de simuler les protocoles de congélation réels (FP1, FP2 et FP3) (Fig. 1). Des vitesses de refroidissement et de chauffage linéaires de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  et  $300^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ont été utilisées pour étudier la cinétique de refroidissement lent (FP1) et rapide (FP2 et FP3), respectivement. Pour les profils DSC correspondant aux conditions de congélation dans FP1 et FP2, le cholestérol a été utilisé comme agent de nucléation (**Head, 1961**). Environ 1mg de cholestérol a été ajouté à l'échantillon, et une étape de maintien de 10 minutes à  $-5^{\circ}\text{C}$  a été introduite avant un refroidissement supplémentaire, afin d'induire la nucléation au même point dans le profil de congélation que la nucléation manuelle a été effectuée précédemment. Les échantillons ont été refroidis à  $-175^{\circ}\text{C}$  et balayés à  $25^{\circ}\text{C}$  à  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . La cristallisation de la glace était caractérisée par la chaleur latente de cristallisation de la glace ( $\Delta H_c$ , en J/g) à partir de la zone du pic exothermique et la température du début de pic extrapolée de la cristallisation de glace ( $T_c$ , en  $^{\circ}\text{C}$ ). La chaleur latente de cristallisation de la glace et la matière sèche totale ont été utilisées pour calculer la concentration de glycérol dans la matrice congelée concentrée. Les températures de transition vitreuse caractéristiques ( $T_{g1}$  et  $T_{g2}$ ) d'échantillons liquides ont été déterminées comme les températures médianes des étapes d'écoulement thermique associées à la transition vitreuse par rapport à la méthode standard ASTM E 1356-91. Les résultats ont été obtenus à partir d'au moins deux répliques.  $T_{g2}'$  a été identifiée comme la température de ramollissement à laquelle le système présente une déformation observable (écoulement visqueux en temps réel) sous son propre poids (**Shalaev & Franks, 1995**).

Après chaque profil de refroidissement, une étape de recuit à  $-20^{\circ}\text{C}$  a été appliquée pendant 30 à 60 min, afin de simuler l'impact du stockage sur la cristallisation de la glace et la concentration de glycérol.

#### **4. Résultats**

Dans cet article la section des résultats est séparée de la discussion. Les résultats sont très bien détaillés et illustrés, c'est la raison pour laquelle, ils seront présentés tel qu'ils ont été publiés par les auteurs.

#### 4.1 Congélation à des températures d'azote liquide

##### (i) Viabilité et activité d'acidification

La viabilité et l'activité d'acidification de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ( $2 \times 10^9$  UFC/ml; tmc, 210min) a diminué après congélation (UFC/ml,  $\leq 3,3 \times 10^8$ ; tmf,  $\geq 310$  min) et étaient fortement dépendants ( $P > 0,001$  par ANOVA) de la cinétique de congélation. La perte minimale de viabilité et d'activité d'acidification a été obtenue après immersion directe dans l'azote liquide (FP3) (tableau I). Lorsque les échantillons ont été nucléés, la viabilité a diminué de  $2 \times 10^8$  à  $1 \times 10^8$  UFC/ml, et la tmf a augmenté de 329 min à 355 min, pour des vitesses de refroidissement de  $2500^\circ\text{C}/\text{min}$  (FP2) et  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  (FP1), respectivement.

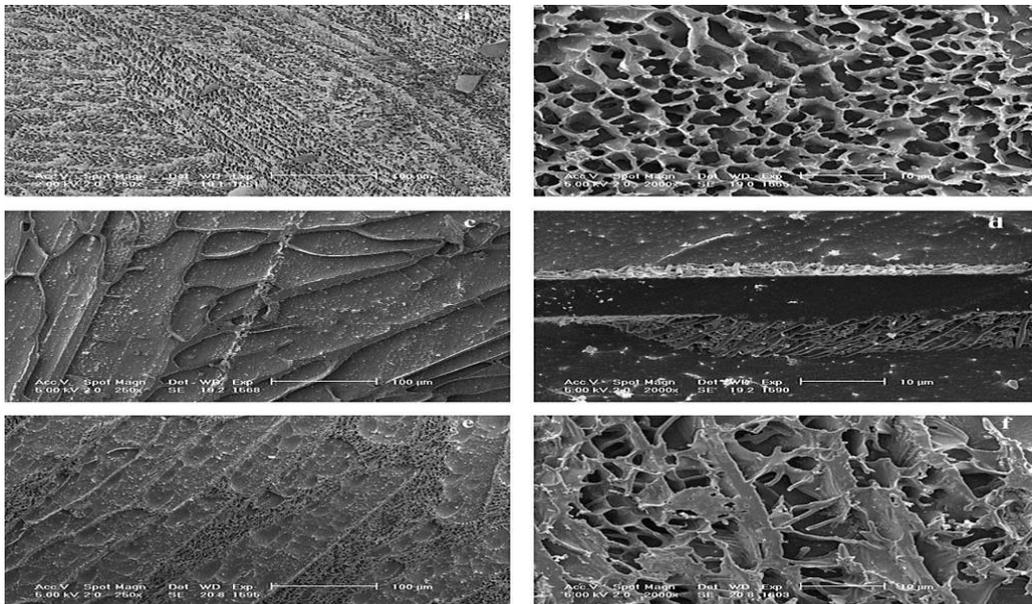
**Tableau I :** Activités de viabilité et d'acidification après congélation et après 1 mois de stockage à  $-20^\circ\text{C}$  et  $-80^\circ\text{C}$  suivant trois protocoles de congélation.

Protocole de congélation	Moyenne (ET) après :					
	Congélation		Stockage à $-20^\circ\text{C}$		Stockage à $-80^\circ\text{C}$	
	Viabilité (UFC/ml $10^8$ )	T <sub>mf</sub> (min)	Viabilité (UFC/ml $10^6$ )	T <sub>ms</sub>	Viabilité (UFC/ml $10^8$ )	T <sub>ms</sub>
1	1.1 (0.1)	355 (4)	6.6 (0.5)	480 (8)	1.1 (0.1)	367 (8)
2	2.2 (0.2)	329 (3)	7.3 (0.8)	476 (8)	1.8 (0.2)	350 (8)
3	3.3 (0.4)	310 (5)	2.5 (0.6)	522 (6)	3.4 (0.2)	304 (6)

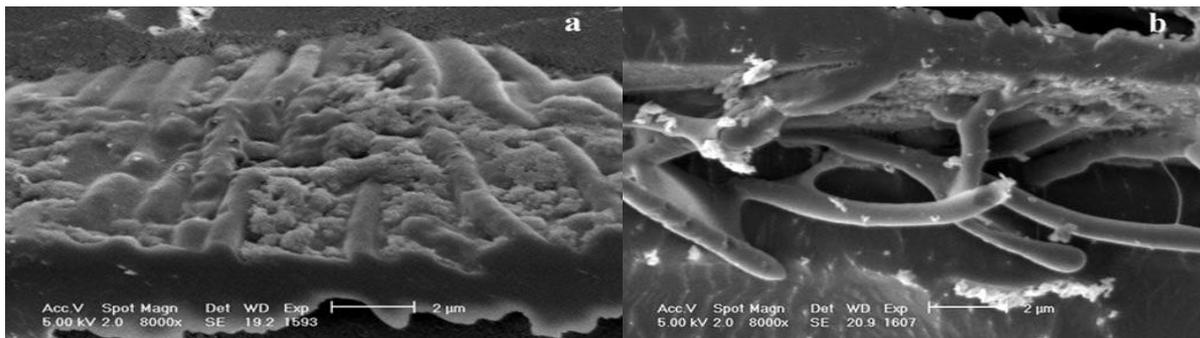
##### (ii) Microscopie électronique Cryofracture

Une fracture croisée des pailles suivie d'une gravure profonde pour éliminer la glace a révélé la structure de la matrice congelée concentrée contenant le surnageant, le glycérol et les cellules (Fig. 3). La distribution des cristaux de glace et de la matrice congelée concentrée a été déterminée par la méthode de congélation appliquée. Dans les échantillons trempés (FP3), les cristaux de glace (Fig. 3a et b) avaient  $2,5 \pm 1 \mu\text{m}$  de diamètre ( $n=600$ ). La structure des échantillons nucléés manuellement était en fonction de la vitesse de refroidissement après la nucléation. Pour une vitesse de refroidissement de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  (FP1), de gros cristaux de glace ( $80 \pm 30 \mu\text{m}$ ) se sont formés (Fig. 3c). Les domaines du matériau congelé concentré avaient une structure homogène, et l'interface entre le matériau congelé concentré et la glace gravée était lisse. Les échantillons immergés dans l'azote liquide après nucléation (FP2) ont présenté un comportement intermédiaire entre les deux précédemment décrits (Fig. 3e), et de gros cristaux de glace (environ  $70 \mu\text{m}$ ) ont été observés. La matrice congelée

concentrée occupait une section transversale beaucoup plus grande et contenait de nombreux cristaux de glace, qui étaient évidents sous forme de piqûres gravées.



**Figure 3** : Cryo-SEM de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1 en suspension dans du glycérol et refroidi par différentes conditions de traitement, c'est-à-dire FP 3 (a et b), FP 1 (c et d) et FP 2 (e et f).



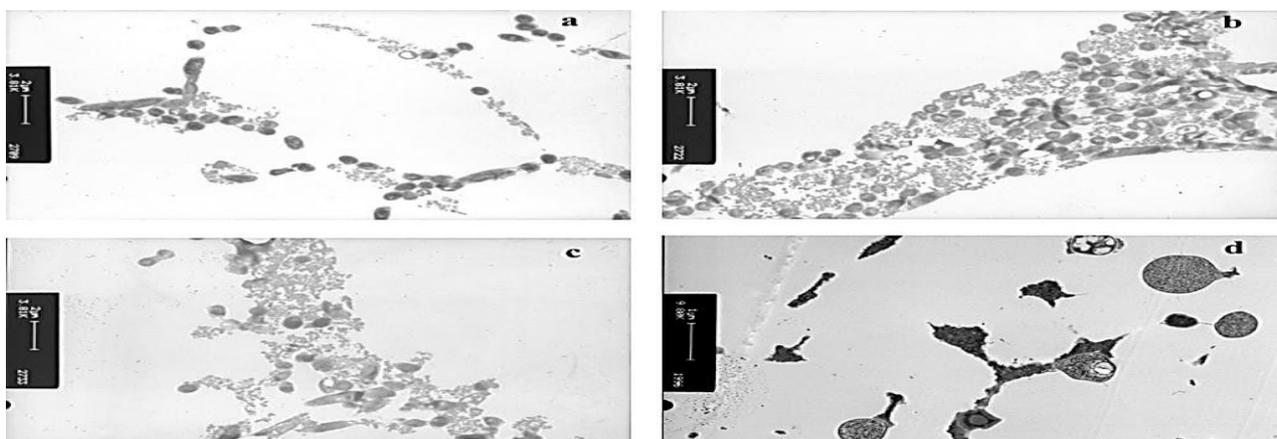
**Figure 4** : Cryo-SEM de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1 refroidi au glycérol. Les détails de l'interface entre la matrice congelée concentrée et la glace pour les échantillons refroidis par FP2 (a) ou par FP3 (b) sont indiqués.

La distribution des cellules bactériennes dans l'échantillon congelé a été déterminée par la morphologie des cristaux de glace. Suite à l'immersion directe dans l'azote liquide (FP3), des bâtonnets bactériens ont été piégés dans la matrice congelée concentrée et dans des vides qui auraient contenu des cristaux de glace (Fig. 3b). Lorsqu'elles ont été refroidies à 5°C/min après la nucléation de la glace (FP1), toutes les cellules bactériennes ont été densément emballées dans le matériau congelé concentré (Fig. 3d). Lorsque les cellules ont été immergées dans de l'azote liquide après nucléation manuelle (FP2), les deux morphologies ont été observées: des cellules bactériennes ont migré dans la matrice congelée concentrée, et quelques bâtonnets se sont éloignés du matériau congelé concentré dans des vides de cristaux de glace à l'extérieur ou à l'intérieur de la matrice congelée concentrée (Fig. 3f).

Il a observé que les cellules bactériennes s'accumulaient à l'interface entre le matériau congelé concentré et les cristaux de glace. Lorsqu'elles ont été congelées à une vitesse de 5°C/min (FP2), les bactéries à l'interface étaient densément compactées (Fig. 4a). À une vitesse de refroidissement plus élevée (FP 3), les cellules étaient plus diffuses à l'interface (Fig. 4b). Des amas irréguliers de matériel dérivé du milieu de croissance ont également été observés à l'interface

### **(iii) Microscopie électronique à substitution par congélation**

La substitution par congélation et la microscopie électronique à transmission ont révélé la distribution des cellules au sein de la matrice congelée concentrée (Fig. 5). Après immersion directe des cellules dans de l'azote liquide (FP3), la distribution des bactéries était diffuse (Fig. 5a). Dans les échantillons qui ont été nucléés puis refroidis à une faible vitesse (FP1), les cellules bactériennes ont été densément emballées dans la matrice congelée concentrée (figure 5b). La nucléation de la glace suivie d'un refroidissement rapide (FP2) a abouti à un mélange de cellules qui étaient densément compactées ensemble et des cellules qui étaient plus diffuses (Fig. 5c). À toutes les vitesses de refroidissement examinées, certaines cellules présentaient des vacuoles ou des «trous»; cependant, aucun vide de glace n'a été observé dans les cellules pour aucune des méthodes de congélation examinées. La substitution par congélation d'échantillons en suspension dans de l'eau distillée et directement immergés dans de l'azote liquide (FP 3) a révélé une importante glace intracellulaire (Fig. 5d).



**Figure 5:** Microscopie électronique à substitution par congélation de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1 soit en suspension dans du glycérol et refroidi par différentes conditions de traitement après congélation à différentes vitesses à  $-196^{\circ}\text{C}$  (FP3 [a], FP1 [b] et FP2 [c]) ou suspendu dans de l'eau distillée et directement immergé dans azote liquide (d).

#### (iv) Effet du protocole de congélation sur la quantité de glace formée.

Les thermogrammes de DSC du milieu de congélation suivant les différents protocoles de congélation ont montré un pic exothermique pendant le refroidissement qui correspond à la cristallisation de la glace. La quantité de glace formée pendant le refroidissement d'échantillons de 5 mg a été déterminée à partir de la zone du pic exothermique dans le balayage de refroidissement d'un thermogramme DSC ( $\Delta H_c$ , en J/g). Dans les échantillons qui ont été nucléés puis refroidis à faible vitesse ( $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; FP1), la quantité de glace formée pendant le refroidissement était proche de la valeur prédite à partir du diagramme de phase d'équilibre du NaCl-glycérol (81% de la teneur totale en eau) (Pegg, 1983). Des échantillons nucléés puis refroidis à une vitesse de  $300^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ont formé moins de glace. Les échantillons refroidis à cette vitesse sans nucléation avaient seulement 35% de la teneur totale en eau convertie en glace. La concentration de glycérol correspondante dans la matrice concentrée par congélation a également été calculée (tableau II). Les échantillons qui ont été nucléés puis refroidis à une vitesse de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  avaient une concentration de glycérol de 54%, tandis qu'à  $300^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , la concentration de glycérol dans la solution congelée concentrée était d'environ 20%. Les échantillons qui ont été congelés rapidement sans nucléation avaient une

concentration de glycérol estimée à 15%. Lors du chauffage des échantillons, deux événements endothermiques consécutifs correspondant à la transition vitreuse ont été observés, à  $Tg1'$  et  $Tg2'$ . L'étape de nucléation et une augmentation des vitesses de refroidissement testées n'ont pas modifié la valeur  $Tg1'$  (environ  $-97^{\circ}\text{C}$ ), tandis que les valeurs  $Tg2'$  ont diminué de  $-51^{\circ}\text{C}$  (FP1) à  $-66^{\circ}\text{C}$  (FP3) (tableau II). La quantité de glace déterminée à partir du pic endothermique dans le balayage de réchauffement du thermogramme DSC s'est avérée être d'environ 81% de la teneur totale en eau, indépendamment du protocole de congélation utilisé.

**Tableau II** : Températures de transition vitreuse, chaleur de cristallisation, quantité de glace formée et concentration de glycérol pour chaque protocole de congélation appliqué.

Protocole de congélation	$Tg1'^a$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$Tg2'^a$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$Tg2$ après stockage à $-20^{\circ}\text{C}^a$	$\Delta H_c^a$ (J/g)	Amt ice <sup>b</sup> (%)	Glycérol conc <sup>b</sup> (%)
1	-97	-51	-48	232	81	54
2	-97	-56	-50	150	53	21
3	-96	-66	-56	100	35	15

<sup>a</sup> Mesuré par DSC. <sup>b</sup> Calculé à partir de  $\Delta H_c$  et de la teneur totale en eau.

## 4.2 Stockage congelé à $-20^{\circ}\text{C}$ et $-80^{\circ}\text{C}$

### (i) Viabilité et activité d'acidification

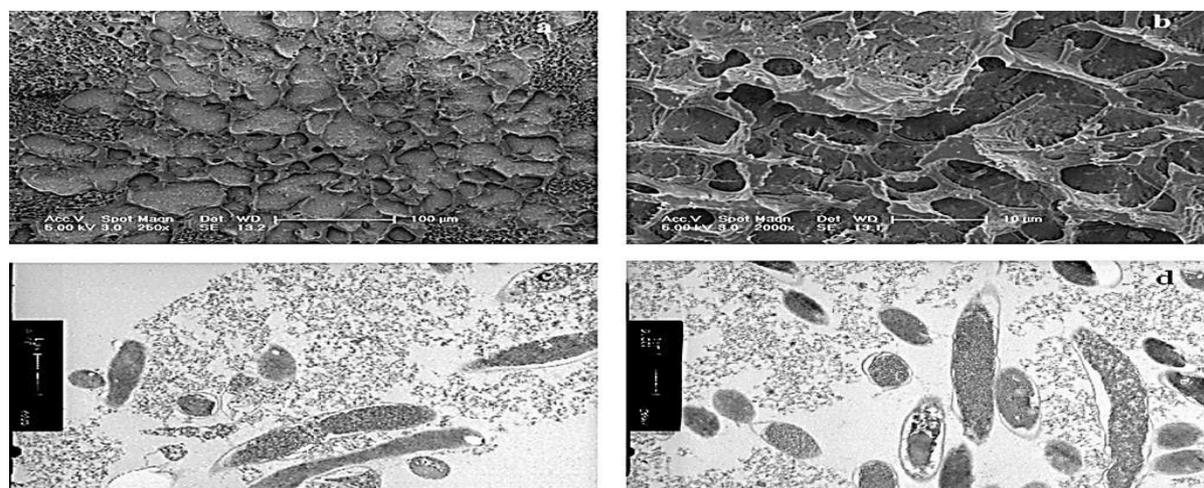
La viabilité et l'activité d'acidification après 1 mois de stockage congelé (tms) étaient dépendantes ( $P < 0,01$  par ANOVA) du protocole de congélation et de la température de stockage (tableau I). La concentration cellulaire et l'activité d'acidification ont diminué après 1 mois de stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  (UFC/ml,  $\leq 7,3 \times 10^6$ ; tms,  $\geq 476$  min). Cependant, à  $-80^{\circ}\text{C}$ , la viabilité et l'activité d'acidification après stockage congelé ont été préservées, quel que soit le protocole de congélation appliqué.

L'effet néfaste du stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  était réduit lorsque les échantillons étaient nucléés. La résistance au stockage congelé était légèrement plus élevée pour une vitesse de refroidissement de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  après nucléation (perte la plus faible d'activité d'acidification à  $-20^{\circ}\text{C}$  [dtms = tms - tmf],  $125 \pm 10$  min) que celle après immersion dans l'azote liquide (FP2; dtms =  $147 \pm 10$  min) (Tableau I). La plus faible résistance au stockage congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  a été obtenue en congelant des échantillons par immersion directe dans de l'azote liquide (FP3).

Environ 50% de la perte d'activité d'acidification a eu lieu au cours du premier jour de stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  après immersion directe dans l'azote liquide. Cependant, la viabilité et l'activité d'acidification des échantillons immergés dans de l'azote liquide restaient élevées lorsqu'ils étaient stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### (ii) Microscopie électronique après stockage à $-20^{\circ}\text{C}$

Les échantillons qui avaient été trempés (FP3) ont été chauffés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 24h, puis immergés dans de l'azote liquide jusqu'à ce qu'ils soient examinés par fracture par congélation et microscopie électronique de substitution par congélation (Fig. 6). La microscopie électronique par congélation a révélé que par rapport à la structure initiale trempée (Fig. 3a), une recristallisation extensive s'était produite (Fig. 6a), bien que ce ne soit pas uniforme. Certaines parties de l'échantillon (figure 6b) avaient une structure similaire à celle observée après nucléation de la glace et refroidissement lent (figure 3c), tandis que les zones adjacentes avaient une structure de glace beaucoup plus fine. La substitution par congélation (Fig. 6c et d) a montré que les cellules étaient agrégées par rapport à l'échantillon désactivé (Fig. 5a) et que les cellules semblaient être plasmolysées. La glace intracellulaire n'était pas évidente.



**Figure 6 :** Cryo-SEM (a et b) et microscopie électronique à substitution par congélation (c et d) de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1 en suspension dans du glycérol, refroidi par FP1, maintenu à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 24h, puis ré-immersé dans de l'azote liquide.

### (iii) DSC après recuit à -20°C

Les échantillons suivant chaque protocole de congélation dans l'équipement DSC ont été chauffés à -20°C, maintenus pendant 30 à 60 minutes, puis ré-analysés (re-scannés) à 25°C. L'étape de recuit n'a pas modifié la valeur Tg1', tandis que les valeurs Tg2' ont augmenté de 3°C (FP 1) à 10°C (FP3) (tableau II).

## 5. Discussion

### (i) Effets de congélation

Le protocole de congélation est l'un des principaux facteurs déterminant la viabilité des bactéries pendant le processus de congélation (**Albrecht et al., 1973; Dumont et al., 2004**). Les résultats de cette étude montrent clairement que la vitesse de refroidissement élevée (2 500°C/min) obtenue par immersion directe dans l'azote liquide se traduit par des taux de survie élevés de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1, ce qui est en accord avec des rapports antérieurs sur différentes espèces de LAB (**Baumann & Reinbold, 1966; Tsvetkov & Shishkova, 1982; Foschino et al., 1996**).

Il est généralement supposé qu'à des taux élevés de refroidissement, de la glace intracellulaire se formera dans les bactéries. Cependant, étonnamment peu de preuves directes de formation de glace intracellulaire chez les bactéries ont été présentées. **Rapatz et Luyet (1963)** ont observé de la glace cristalline à l'intérieur de bactéries (*Escherichia coli*) qui étaient rapidement congelées dans de l'eau distillée, mais la glace intracellulaire n'était pas apparente lorsqu'une solution de saccharose à 15% était utilisée comme cryoprotecteur. De la glace intracellulaire a également été observée lorsque des suspensions cellulaires de *Lactobacillus casei* et *Leuconostoc mesenteroides* dans un tampon phosphate étaient immergées dans de l'azote liquide (**Albrecht et al., 1973**). Cependant, d'autres bactéries (*Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *Serratia marcescens*) soumises au même protocole se sont avérées avoir peu ou pas de glace intracellulaire (**Albrecht et al., 1973**). Dans l'étude actuelle, la glace intracellulaire n'a pas été observée dans les cellules en suspension dans le glycérol, même à des taux de refroidissement élevés. Nous avons confirmé que la méthode de substitution par congélation utilisée dans cette étude peut détecter la glace intracellulaire dans les cellules de *L. delbrueckii subsp bulgaricus* en suspension refroidies rapidement dans de l'eau distillée (Fig. 5d). Par conséquent, avec le milieu protecteur utilisé,

il n'est pas prévu que de la glace intracellulaire se forme, même à des vitesses de refroidissement élevées.

Il a été démontré que la viscosité de la solution résiduelle non congelée à laquelle les cellules sont exposées lors de la congélation en présence de glycérol augmente rapidement. Dans le système binaire glycérol-eau, la viscosité mesurée dépassait 1000 cPa à -40°C, tandis que la viscosité d'un système ternaire, glycérol-eau- NaCl, dépassait 100 000 cPa à -55°C. En raison de la viscosité élevée, le processus de diffusion devient limité et la quantité de glace formée dépend de la vitesse de refroidissement (**Morris et al., 2006**). Dans la présente étude, l'osmolalité mesurée de la solution (10% [P/P] glycérol plus milieu de croissance) dans laquelle les cellules étaient en suspension était de 1600 mosM, ce qui est très similaire (1549 mosM) à celle du système ternaire d'eau -glycérol (10% [P/P])-NaCl (0,15 M). Dans la solution bactérienne, le milieu de suspension contenait des sucres qui devraient augmenter la viscosité pendant la congélation plus qu'une espèce ionique et déplacer la transition vitreuse vers des températures plus élevées. Ceci est cohérent avec l'observation qu'à faible taux de refroidissement (5°C/min), la Tg<sub>2'</sub> pour la solution bactérienne était de -51°C, contre -63°C pour le système ternaire de l'eau-glycérol (10% [P/P]) – NaCl.

La quantité de glace formée dans la matrice congelée concentrée a été déterminée par le protocole de congélation. À un faible taux de refroidissement (5°C/min), la quantité de glace formée (81% [P/P] glace/eau) était en accord avec les valeurs estimées à partir du diagramme de phase d'équilibre du système ternaire de glycérol -H<sub>2</sub>O- NaCl (**Pegg, 1983**). Au fur et à mesure que la vitesse de refroidissement augmentait, la quantité de glace formée diminuait, à 53% (P/P) à 300°C/min après la nucléation (la vitesse de refroidissement la plus élevée possible avec l'équipement DSC utilisé dans cette étude). Sans l'étape de nucléation, la quantité de glace formée était de 35%. Le déplacement des valeurs de Tg<sub>2'</sub> vers des températures plus basses à des vitesses de refroidissement accrues confirme également les teneurs en eau plus élevées des échantillons refroidis rapidement que de ceux refroidis lentement. Suite à une congélation lente, la concentration en glycérol de la matrice a augmenté, comme prévu par le diagramme de phase. Le déplacement de la Tg<sub>2'</sub> après le recuit suggère que le processus de formation de glace pendant le refroidissement est limité par une viscosité élevée, même à la vitesse de refroidissement la plus faible examinée (5°C/min).

Les effets de la vitesse de refroidissement sur le processus de formation de glace dans les solutions de glycérol et l'ultrastructure de la matrice congelée concentrée sont cohérents avec les travaux antérieurs effectués sur le système ternaire de H<sub>2</sub>O-NaCl-glycérol (**Morris et al., 2006**). Les effets de la vitesse de refroidissement ont souvent été considérés comme étant simplement liés au temps pendant lequel les cellules sont exposées à un gradient de concentration prédit à partir du diagramme de phase d'équilibre. Cependant, ce n'est pas le cas avec des taux de refroidissement élevés: la composition du milieu autour des cellules change et la diffusion de l'eau de la cellule peut être modifiée. Il n'est pas approprié de supposer que les cellules subissent la concentration de soluté prédite par le diagramme de phase d'équilibre pendant un refroidissement rapide.

Il à noter aussi que dans les échantillons dans lesquels une nucléation contrôlée de la glace est induite et ensuite les cellules sont refroidies rapidement, les domaines du matériau congelé peuvent être plus grands que la distance de diffusion. Il est probable à ce que la concentration des gradients serait établie à l'intérieur du matériau congelé pendant le refroidissement. La concentration de glycérol la plus élevée serait à l'interface entre le matériau congelé et la glace, et la concentration la plus faible serait au milieu du domaine, conduisant à une surfusion constitutionnelle (**Davies, 1973**). Il est probable que les cellules situées à différentes positions dans le matériau concentré par congélation rencontreront différents gradients de concentration pendant la congélation et la décongélation.

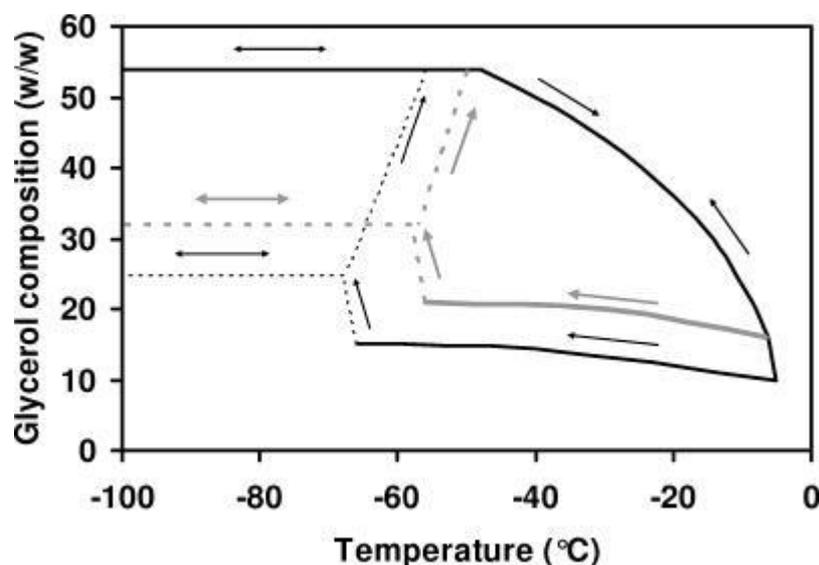
### **(ii) Effets du stockage congelé**

La congélation rapide et le réchauffement lent ont les effets les plus néfastes sur la viabilité des LAB (**Baumann & Reinbold, 1966**) et sur la survie de nombreux autres types de cellules (**Mazur, 1968; Leibo et al., 1970; Woelders & Malva, 1998; Koshimoto & Mazur, 2002**), et cette l'observation est fréquemment utilisée comme preuve de la formation de glace intracellulaire pendant la congélation et la recristallisation rapides lors du réchauffement (**Mazur, 1984**).

Nous avons précédemment démontré (**Morris et al., 2006**) par cryo-scan microscopie électronique (cryo-SEM), conductivité et mesures DSC des solutions de glycérol qui après refroidissement rapide, la formation de glace se produit dans la matrice congelée à une certaine température inférieure à la valeur de T<sub>g2'</sub> déterminée pour faible vitesse de refroidissement. Lors du réchauffement de l'échantillon, DSC indique que la quantité

d'équilibre de glace fond dans tous les échantillons, quelle que soit la vitesse de refroidissement initiale, et que  $Tg2'$  passe à une valeur plus élevée après le recuit des échantillons à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les résultats pour le milieu de congélation le plus complexe étudié ici confirment ces précédents résultats avec un système de modèle défini. Il peut être conclu qu'à des taux de refroidissement élevés, il n'y a pas suffisamment de chances que la croissance des cristaux de glace se produise pendant le refroidissement, et que lors du réchauffement, la recristallisation migratoire se produit lorsque la mobilité moléculaire augmente, permettant la cristallisation de l'eau résiduelle qui a été cinétiquement inhibée pendant le refroidissement. La microscopie électronique de bactéries rapidement congelées maintenues à une température inférieure à zéro n'a pas révélé la croissance de glace intracellulaire; au lieu de cela, les cellules ont été plasmolysées.

La figure 7 est un schéma des contraintes subies par *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* suivant les protocoles expérimentaux utilisés dans cette étude.



**Figure. 7.** Schéma des concentrations de glycérol rencontrées par les cellules selon les FP 1, FP 2 et FP 3. Les concentrations de glycérol et les valeurs de  $Tg2'$  proviennent du tableau II. Les lignes pointillées indiquent les valeurs de glycérol atteintes selon le FP2 et le FP3.

Dans le FP1, la nucléation de la glace est initiée à des températures proches du point de fusion. Les cellules sont exposées à toutes les températures à la concentration de glycérol prédite à partir du diagramme de phase d'équilibre, et à  $-51^{\circ}\text{C}$ , la solution de glycérol va

vitrifier. Lors du réchauffement, l'environnement cellulaire est dilué de la solution concentrée au maximum à la concentration d'origine.

Dans le FP2, la nucléation de la glace est initiée à des températures proches du point de fusion. A n'importe quelle température pendant le refroidissement rapide ultérieur, les cellules sont exposées à une concentration de glycérol significativement inférieure à celle prédite à partir du diagramme de phase d'équilibre. À une certaine température inférieure à  $-56^{\circ}\text{C}$ , la glace se nucléée dans la matrice congelée concentrée (Fig. 3d et f), et la concentration de glycérol atteint alors une valeur plus concentrée et vitrifie. Lors d'un réchauffement au-dessus de  $Tg2'$ , les cellules qui ont été en équilibre avec 21% de glycérol pendant le refroidissement sont initialement exposées à une concentration plus élevée de glycérol (54%).

Dans le FP3, la nucléation de la glace n'est pas initiée, et à une certaine température inférieure à  $-66^{\circ}\text{C}$ , il est supposé que la glace se nucléée dans la matrice congelée concentrée et que la concentration de glycérol atteindra alors une valeur plus concentrée et vitrifiera. Lors d'un réchauffement au-dessus de  $Tg2'$ , les cellules qui ont été en équilibre avec 15% de glycérol pendant le refroidissement sont initialement exposées à une concentration plus élevée de glycérol (54%).

Les transitions se produisant lors du réchauffement d'échantillons rapidement refroidis peuvent être dommageables, en particulier pour les cellules conservées à tout moment à une température supérieure à  $Tg2'$  ou lors d'un réchauffement lent. Ce mécanisme pourrait expliquer les dommages observés dans les spermatozoïdes humains congelés rapidement dans le glycérol, où la glace intracellulaire n'est observée ni par cryo-SEM ni par microscopie électronique à substitution par congélation (**Morris, 2006**).

Les échantillons subissant le FP2 et le FP3 ont des comportements non idéaux similaires pendant la congélation mais différents dans leurs stabilités pendant le stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cela pourrait être dû à leurs microenvironnements locaux. Pour le FP2, les cellules sont emballées ensemble pendant le processus de congélation, avec de nombreux contacts de cellule à cellule (Fig. 3e et f), tandis que pour le FP3, les cellules sont plus dispersées, avec plus de contacts cellule à glace et cellule à cellule à matrice congelée concentrée (Fig. 3a et b). La densité cellulaire utilisée dans ce travail est élevée ( $10^9$  cellules/ml avant congélation), et des études ultra-structurales ont révélé qu'il existe de nombreuses interactions de cellule à cellule à l'état congelé (Fig. 3d). La survie des bactéries après congélation et décongélation

dépend de la concentration des cellules, avec une survie accrue observée pour des concentrations cellulaires initiales élevées (**Mazur, 1968**). La fraction survivante des LAB lyophilisées (*L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) a également augmenté avec l'augmentation des concentrations de biomasse (elle était la plus élevée à  $10^{10}$  cellules/ml; les concentrations étudiées étaient de  $10^4$  à  $10^{10}$  cellules/ml), qui a été attribuée à une protection mutuelle des microorganismes contre des conditions environnementales sévères en réduisant la zone inter-faciale entre les cellules et le milieu externe (**Bozoglu et al., 1987**).

D'autres cryoprotecteurs qui ont des viscosités élevées lors de la congélation, par exemple, les sucres et les polymères tels que la maltodextrine (**Kerr & Reid, 1994; Maltini & Anese, 1995**), sont les cryoprotecteurs les plus efficaces lors de vitesses de refroidissement élevées pour les LAB (**Stadhouders et al., 1969; Tsvetkov & Shishkova, 1982; Lagoda & Bannikova, 1983; De Antoni et al., 1989**). Les cryoprotecteurs à faible viscosité, tels que le diméthylsulfoxyde et le méthanol, qui ne modifient pas la structure du matériau congelé concentré à des vitesses de refroidissement élevées (**Morris et al., 2006**), n'ont pas été signalés pour une utilisation avec les LAB et offrent une mauvaise protection aux autres types de cellules, par exemple, les spermatozoïdes et les globules rouges, à des vitesses élevées de refroidissement. Une compréhension des processus affectant la viscosité du milieu de congélation pendant la congélation cellulaire devrait conduire au développement de protocoles spécifiques appropriés pour la cryoconservation des concentrés de LAB.

## 6. Conclusion

Ces travaux ont montré que la résistance de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1 à la congélation et au stockage à l'état congelé dépend à la fois des conditions de congélation et de la température de stockage. La viabilité et l'activité d'acidification après congélation se sont avérées les plus élevées à une vitesse de refroidissement très élevée (2 500°C/min [par immersion dans l'azote liquide]), mais seule une température de stockage basse (-80°C) a préservé cet état. Au contraire, de faibles vitesses de refroidissement seraient préférées si une température de stockage élevée (-20°C) était employée. La perte de viabilité et d'activité d'acidification pendant la congélation à des vitesses de refroidissement élevées et le stockage à -20°C ne peut pas être attribuée à la formation de glace intracellulaire. Les auteurs proposent que la plasmolyse cellulaire se produit en raison d'un déséquilibre

osmotique rencontré par les cellules lors du réchauffement d'échantillons refroidis rapidement, en particulier pour les cellules conservées à tout moment à une température supérieure à la température de transition vitreuse  $Tg_2'$ .

- **Aperçu sur les trois articles** -

Les trois articles ont présenté des travaux de recherches portant sur la viabilité des bactéries lactiques.

**Fonseca et al., (2006)** ont comparé la viabilité de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* selon trois Protocoles de congélation. Ensuite, **Cabeza et al., (2011)** ont présenté une comparaison de la viabilité entre trois espèces de bactéries lactiques lyophilisées après 30-40 années; et enfin, **O'Brien et al., (2016)** ont étudié la viabilité des probiotiques dans le kéfir traditionnel et commercial après diverses périodes de stockage congelé.

**Cabeza et al., (2011)** ont convenu que la lyophilisation est la méthode la plus favorable pour la conservation des bactéries.

*Conclusion*

## **Conclusion**

Ce travail a pris l'occasion de mettre en exergue la viabilité d'isolats de bactéries lactiques après une conservation à long terme à -20°C, avec un nombre initial  $\approx 6 \times 10^9$  UFC/ml.

La viabilité de 32 isolats étudiés a été déterminée par la méthode de numération microscopique directe, suivi d'une réactivation sur milieu MRS liquide et d'une purification sur milieu MRS solide, afin de distinguer les isolats viables des non-viables. Une identification partielle par la détermination des aspects macroscopique et microscopique des isolats a été effectuée, dans le but de contrôler l'identification de chaque isolat.

Les résultats ont confirmé la viabilité de 12 isolats sur les 32 étudiés. Les isolats actifs ont présenté des taux de décroissance (en Log UFC/ml) et de survie (%) variables. L'isolat N° 6 s'est montré le plus stable avec une survie de 67%. L'étude micro-morphologique a révélé la présence de deux formes microscopiques, à savoir des coques et des bâtonnets présentant différents modes d'association. Nous avons bien souhaité terminer les étapes de l'identification, pour pouvoir établir un lien entre l'identité de l'isolat et sa capacité de survie à long terme (viabilité et cultivabilité).

À partir des résultats observés, la méthode de congélation à -20°C, en présence de 30% de glycérol semble satisfaisante, comme un moyen de conservation à long terme, puisqu'elle a préservé plus de 30% des isolats, mais nous ne pouvons pas ignorer la perte marquée dans le nombre de cellules après conservation. Notons que les bâtonnets étaient les plus stables et les plus dominants.

A la fin, il est à signaler que les articles analysés ont attaché une grande importance à la viabilité cellulaire, et spécifiquement à la viabilité des bactéries lactiques.

Ce manuscrit pourrait révéler et décrire certains aspects (positifs et négatifs) de la conservation à long terme, qui peuvent être pris en considération dans de futurs travaux, afin de choisir la méthode appropriée, les protecteurs efficaces, et pour prêter attention aux souches les plus sensibles aux méthodes de conservation.

## *Références Bibliographiques*

- Alonso S., 2016.** Novel preservation techniques for microbial cultures. *Food Engineering Series*, 7-33.
- Amaretti A., Di Nunzio M., Pompei A., Raimondi S., Rossi M., & Bordoni A., 2012.** Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**(2): 809-817.
- Ambros S., Hofer F., & Kulozik U., 2018.** Protective effect of sugars on storage stability of microwave freeze-dried and freeze-dried *Lactobacillus paracasei* F19. *Journal of Applied Microbiology*. **125**(4): 1128-1136.
- Atlan D., Béal C., Chouyekh H., Gaudu P., Hols P., Juillard V., Ladero V., Lortal S., Loubière P., Monnet C., Monnet V., & Yvon M., 2008.** Bactéries lactiques : Métabolisme et ingénierie métabolique, In : **Corrieu G., & Luquet, F.M., 2008** : Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments, Eds. Tec & Doc. Paris (France), 517-752.
- Auray-Blais C., Patenaude J.A., 2006.** biobank management model applicable to biomedical research. *BMC Med Ethics*, **7**(1): 1-9.
- Austin B., 2017.** The value of cultures to modern microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **110**(10): 1247-1256.
- Axelsson L., 2004.** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: **Salminen S., Von Wright A:** Lactic acid bacteria, Eds. Marcel Dekka. New York (Etats-Unis), 1-209.
- Beal C., Fonseca F., & Corrieu G., 2001.** Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, **84**(11): 2347-2356.
- Bintsis T., 2018.** Lactic acid bacteria: an update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, **4**(4): 665-684
- Bircher L., Geirnaert A., Hammes F., Lacroix C., & Schwab C., 2018.** Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microbial Biotechnology*, **11**(4): 721-733.
- Blajman J.E., Vinderola G., Cuatrin A., Lingua M.S., & Páez R.B., 2020.** Technological variables influencing the growth and stability of a silage inoculant based on spray-dried lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiologie*, 1-23.
- Branković I., Malogajski J., & Morré S.A., 2014.** Biobanking and translation of human genetics and genomics for infectious diseases. *Applied & Translational Genomics*, **3**(2): 30-35.
- Brashears M.M., & Gilliland S.E., 1995.** Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* cells as influenced by the growth phase. *Journal of Dairy Science*, **78**(11): 2326-2335.
- Brown J. W. 2015.** Principles of microbial diversity. ASM Press. Washington. DC. DOI: [10.1128/9781555818517](https://doi.org/10.1128/9781555818517). Print ISBN: 9781555814427.
- Buckenhiiskes H.J., 1993.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, **12**(1-3): 253-271.

- Burgain J., Scher J., Francius G., Borges F., Corgneau M., Revol-Junelles A.M., Cailliez Grimal C., & Gaiani C., 2014.** Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in colloid and interface science*, **213**: 21-35.
- Cabeza M.C., Burgos J., Hoz L., Cambero M.I., & Ordóñez J.A., 2011.** Viability of freeze-dried cultures of lactic acid bacteria after storage for 30 to 40 years. *Milchwissenschaft*, **66**(2): 135-137.
- Cai S., Zhao M., Fang Y., Nishinari K., Phillips G.O., & Jiang F., 2014.** Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO<sub>3</sub> as calcium sources. *Food Hydrocolloids*, **39**:295-300.
- Cai Y., Suyanandana P., Saman P., & Benno Y., 1999.** Classification and characterization of Lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *Genetics of Applied Microbiology Journal*, **45**(4): 177-184.
- Cambon-Thomsen A., Ducournau P., Gourraud P.A., & Pontille D., 2003.** Biobanks for genomics and genomics for biobanks. *Comparative and Functional Genomics*, **4**(6): 628-634.
- Carr F.J., Chill D., & Maida N., 2002.** The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, **28**(4): 281-370.
- Chammas G., Saliba R., Corrieu G., & Beal C., 2006.** Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". *International Journal of Food Microbiology*, **110**(1): 52-61.
- Chen Y.S., Yanagida F., & Shinohara T., 2005.** Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology*, **40**(3): 195-200.
- Choi I., Kim H., Wi S., Chun H., Hwang I., Choi H.J., & Park H., 2018.** Effect of cation influx on the viability of freeze-dried *Lactobacillus brevis* WiKim0069. *Applied Sciences*, **8**(11): 2189-2199.
- Condon S., 1987.** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Letters*, **46**(3): 269-280.
- Day J.G., & Stacey G.N., 2008.** Biobanking. *Molecular Biotechnology*, **40**(2): 202-213.
- Delarras C., 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire, Eds. TEC & DOC. Paris (France), 1-476.
- Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C., et Janssens D., 1994.** Caractéristique générale des bactéries lactiques. In : **De Roissart H., Luquet F.M.** Bactéries lactiques., Eds. Lavoisier. Paris (France), 25-116.
- Davey H., & Guyot S., 2020.** Estimation of microbial viability using flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, **93**(1): 1-13.
- De man J.C., Rogosa M., & Sharpe M.E., 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **23**(1): 130-135.
- De Paoli P., 2005.** Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**(5): 897-910.

- De Vero L., Boniotti M.B., Budroni M., Buzzini P., Cassanelli S., Comunian R., Gullo M., Logrieco A.F., Mannazzu I., Musumeci R., Perugini I., Perrone G., Pulvirenti A., Romano P., Turchetti B., & Varese G.C., 2019.** Preservation, characterization and exploitation of microbial biodiversity: The perspective of the Italian network of culture collections. *Microorganisms*, **7**(12): 1-18.
- Donev T., Savova I., & Kujumdzieva A., 1995.** Influence of the cultivation conditions on yeast strains survival after lyophilization. *Journal Of Culture Collections*, **1**: 38-41.
- Dortu C., & Thonart P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **13**(1): 143-154.
- Dumont F., Marechal P.A., & Gervais P., 2004.** Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(1); 268-272.
- Durso L., & Hutchins R., 2003.** Cultures starter. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 5583-5593.
- Endo A., Tanizawa Y., & Arita M., 2018.** Isolation and identification of Lactic acid bacteria from environmental samples. *Methods in Molecular Biology*, **1887**: 3-13.
- Fonseca F., Béal C., & Corrieu G., 2000.** Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*, **67**(1), 83-90.
- Fonseca F., Béal C., & Corrieu G., 2001.** Operating Conditions That Affect the Resistance of Lactic Acid Bacteria to Freezing and Frozen Storage. *Cryobiology*, **43**(3): 189-198.
- Fonseca F., Marin M., & Morris G.J., 2006.** Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects kinetics and storage temperature effects. *Applied And Environmental Microbiology*, **72**(10): 6478-6482.
- Fonseca F., Pénicaud C., Tymczyszyn E.E., Gómez-Zavaglia A., & Passot S., 2019.** Factors influencing the membrane fluidity and the impact on production of lactic acid bacteria starters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**: 6867-6883.
- Garault P., Letort C., Juillard V., & Monnet V., 2000.** Branched-Chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *streptococcus thermophilus* in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(12): 5128-5133.
- Ghahremani E., Mardani M., & Rezapour S., 2015.** Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria from traditional cheese in khorramabad city of Iran with probiotic potential. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **175**(5): 2516-2527.
- Gobbetti M., & Gänzle M., 2013.** Physiology and Biochemistry of Lactic Acid Bacteria, In: **Gobbetti M., & Gänzle M., 2013.** Handbook on Sourdough Biotechnology, Eds. Springer. Boston (Etats-Unis), 183-216.
- Guiraud J.P., 1998.** Microbiologie Alimentaire, Eds . DUNOD. Paris (France), 277-285.
- Hammes F., Berney M., & Egli T., 2010.** Cultivation-independent Assessment of Bacterial Viability. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **(124)**:123-150.

- Hati S., Mandal S., & Prajapati J.B., 2013.** Novel starters for value added fermented dairy products. *Current Research in Nutrition and Food Science*, **1**(1):83-91.
- Heylen K., Ettwig K., Hu Z., Jetten M., & Kartal B., 2012.** Rapid and simple cryopreservation of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(8): 3010-3013.
- Holzapfel W.H., & Schillinger U., 2002.** Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, **35**(2-3): 109-116.
- Johansen E., 2018.** Use of natural selection and evolution to develop new starter cultures for fermented foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, **9**(1): 411-428.
- Kandil S., & El Soda M., 2015.** Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains. *Advances in Microbiology*, **5**(6): 371-382.
- Kandler O., 1983.** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**(3): 209-224.
- Khoramnia A., Abdullah N., Liew S.L., Sieo C.C., Ramasamy K., & Ho Y.W., 2011.** Enhancement of viability of a probiotic *Lactobacillus* strain for poultry during freeze-drying and storage using the response surface methodology. *Journal of Animal Science*, **82**(1): 127-135.
- Kim M., Nam D.G., Kim S.B., Im P., Choe J.S., & Choi A.J., 2018.** Enhancement of viability acid and bile tolerance and accelerated stability in lyophilized *Weissella cibaria* JW15 with protective agents. *Food Science & Nutrition*, **6**(7): 1904-1913.
- Kinoshita T., Ishiki K., Nguyen D.Q., Shiigi H., & Nagaoka T., 2018.** Real-time evaluation of bacterial viability using gold nanoparticles. *Analytical Chemistry*, **90**(6): 4098-4103.
- Kramer B., & Thiemann J., 2016.** Monitoring the live to dead transition of bacteria during thermal stress by a multi-method approach. *Journal of Microbiological Methods*, **123**: 24-30.
- Kramer M., Obermajer N., Bogovič Matijašić B., Rogelj I., & Kmetec V., 2009.** Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **84**(6): 1137-1147.
- Kröckel, L., 2013.** The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. 129-152.
- Lahtinen S., Salminen S., Ouwehand A., & Wright AV., 2011.** Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects, Eds. CRC Press. Boca Raton (Etats-Unis), 1-798.
- Leroy F., & De Vuyst L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, **15**(2): 67-78.
- Letort C., & Juillard V., 2001.** Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, **91**(6): 1023-1029.
- Lin M.Y., & Yen C.L., 1999.** Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Agricultural and*

*Food Chemistry*, **47**(4): 1460-1466.

**Liu A., Jia Y., Zhao L., Gao Y., Liu G., Chen Y., Zhao G., Xu L., Shen L., Liu Y., Chen H., Wu W., Li C., & Liu S., 2018.** Diversity of isolated lactic acid bacteria in Ya'an sourdoughs and evaluation of their exopolysaccharide production characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, **95**: 17-22.

**Liu W., Pang H., Zhang H., & Cai Y., 2014.** Biodiversity of lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria*, 103-203.

**Loubière P., Novak L., Coccagn-Bousquet M., & Lindley N.D., 1996.** Besoins nutritionnels des bactéries lactiques : interactions entre flux de carbone et d'azote. *Lait*, **76**(1-2): 5-12.

**Lynch K.M., Zannini E., Coffey A., & Arendt E.K., 2018.** Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, **9**(1): 155-176.

**Mangiapane E., Mazzoli R., Pessione A., Svensson B., Riedel K., & Pessione E., 2015.** Ten years of subproteome investigations in lactic acid bacteria: A key for food starter and probiotic typing. *Journal of Proteomics*, **127**: 332-339.

**Marchal N., Bourdo J.L., & Richard C.L., 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, Eds. Doin. Paris (France), 1-482.

**Markowiak P., & Śliżewska K., 2017.** Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, **9**(9), 1021-1051.

**Marshall V.M.E., & Law B.A., 1984.** The physiology and growth of dairy lactic- acid bacteria. In: **Davies F.L, Law B.A:** Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, Eds. Elsevier Applied Science Publishers. Londres (Royaume-Uni), 67-98.

**Martin, J. H., & Chou, K. M. 1992.** Selection of Bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: 1Ftolerance to pH of yogurt. *Cultured Dairy Products Journal*, **27**(4) : 21–26

**Martin-Dejardin F., Ebel B., Lemetais G., Nguyen Thi Minh H., Gervais P., Cachon R., & Chambin O., 2013.** A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **49**(2): 166-174.

**Masood M.I., Qadir M.I., Shirazi J.H., & Khan I.U., 2011.** Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Critical Reviews in Microbiology*, **37**(1): 91-98.

**Mittholiya S., Chittora D., & Sharma K., 2020.** Role of lactic acid bacteria as biological control agent. In: **Shyam R., Kaswan R.K., Ghadoliya M.K., Jain S., Gupta A.K., Verma A., & Agnihotri P:** Innovative research on science, humanities, engineering & management, Eds. RFI. india, 21-36.

**Mokoena M.P., 2017.** Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, **22**(8): 1-13

**Monnet C., Béal C., & Corrieu G., 2003.** Improvement of the resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to freezing by natural selection. *Journal of Dairy Science*, **86**(10): 3048-3053.

- Moutel G., Montgolfier S., Duchange N., Sharara L., Beaumont C., & Hervé C., 2004.** Study of the involvement of research ethics committees in the constitution and use of biobanks in France. *Pharmacogenetics*, **14**(3): 195-198.
- Müller S., & Nebe-von-Caron G., 2010.** Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiology Reviews*, **34**(4): 554-587.
- O'Brien K.V., Aryana K.J., Prinyawiwatkul W., Ordonez K.M.C., & Boeneke C.A., 2016.** Short communication: The effects of frozen storage on the survival of probiotic microorganisms found in traditionally and commercially manufactured kefir. *Journal of Dairy Science*, **99**(9): 7043-7048.
- OECD, 2007.** Best practice guidelines for BRCs: Best practice guidelines for microorganism domain.
- Omony J., de Jong A., Kok J., & van Hijum S.A.F.T., 2019.** Reconstruction and inference of the *Lactococcus lactis* MG1363 gene co-expression network. *PLOS ONE*, **14**(5): 1-13.
- Ou F., McGoverin C., Swift S., & Vanholsbeeck F., 2019.** Rapid and cost-effective evaluation of bacterial viability using fluorescence spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **411**(16): 3653-3663.
- Overmann J., 2015.** Significance and future role of microbial resource centers. *Systematic and Applied Microbiology*, **38**(4): 258-265.
- Pastink M.I., Teusink B., Hols P., Visser S., De Vos W.M., & Hugenholtz J., 2009.** Genome-scale model of *Streptococcus thermophilus* LMG18311 for metabolic comparison of lactic acid bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, **75**(11): 3627-3633.
- Peiren J., Buyse J., De Vos P., Lang E., Clermont D., Hamon S., Bégaud E., Bizet C., Pascual J., Ruvira M.A., Macián M.C., & Arahal D.R., 2015.** Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**(8): 3559-3571.
- Polge C., Smith A.U., & Parkes A.S., 1949.** Revival of Spermatozoa after verification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**(4172): 666-666.
- Polo L., Mañes-Lázaro R., Olmeda I., Cruz-Pio L.E., Medina Á., Ferrer S., & Pardo I., 2017.** Influence of freezing temperatures prior freeze-drying on the viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *journal of applied microbiology*, **122**(6): 1603-1614.
- Poltronieri P., Battelli G., & Mangia N.P., 2017.** Metabolism and biochemistry of LAB and dairy-associated species. In: **Poltronieri P., 2018:** Microbiology in Dairy Processing, Eds. John Wiley & Sons. India, 97-117.
- Posthuma C.C., 2001.** The phosphoketolase pathway in *Lactobacillus pentosus*. *Enschede: Ipskamp*, 10-30.
- Posthuma C.C., Bader R., Engelmann R., Postma P.W., Hengstenberg W., & Pouwels P.H., 2002.** Expression of the xylulose 5-phosphate phosphoketolase gene, xpkA, from *Lactobacillus pentosus* MD363 is induced by sugars that are fermented via the phosphoketolase pathway and is repressed by glucose mediated by CcpA and the mannose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Applied And Environmental Microbiology*, **68**(2): 831-837.

- Qiao Y., Cai H.L., Yang X., Zang Y.Y., & Che Z.G., 2018.** Effects of natural deep eutectic solvents on lactic acid bacteria viability during cryopreservation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**(13): 5695-5705.
- Rajkumar H., Mahmood N., Kumar M., Varikuti S.R., Challa H.R., & Myakala S.P., 2014.** Effect of probiotic (VSL#3) and Omega-3 on lipid profile, insulin sensitivity, inflammatory markers, and gut colonization in overweight adults: a randomized, controlled trial. *Mediators of Inflammation*, **(2014)**: 1-8.
- Rault A., Béal C., Ghorbal S., Ogier J.C., & Bouix M., 2007.** Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, **55**(1): 35-43.
- Ringø E., Hoseinifar S.H., Ghosh K., Doan H.V., Beck B.R., & Song S.K., 2018.** Lactic acid bacteria in finfish-an update. *Frontiers In Microbiology*, **(9)**: 1-37.
- Ruiz Rodríguez L.G., Mohamed F., Bleckwedel J., Medina R., De Vuyst L., Hebert E.M., & Mozzi F., 2019.** Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. *Frontiers in Microbiology*, **10**: 1-26.
- Saarela M., Virkajärvi I., Alakomi H.L., Mattila-Sandholm T., Vaari A., Suomalainen T., & Mättö J., 2005.** Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology*, **99**(6): 1330-1339.
- Salminen M.K., Rautelin H., Tynkkynen S., Poussa T., Saxelin M., Valtonen V., & Jarvinen A., 2004.** *Lactobacillus Bacteremia*, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. Rhamnosus* GG. *Clinical Infectious Diseases*, **38**(1): 62-69.
- Schleifer K.H., 1987.** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **46**(3): 201-203.
- Schoustra S. E., Kasase C., Toarta C., Kassen R., & Poulain A. J., 2013.** Microbial community structure of three traditional zambian fermented products: Mabisi, Chibwantu and Munkoyo. *PLoS ONE*, **8**(5): 1-12.
- Schuck P., Dolivet A., Méjean S., Hervé C., & Jeantet R., 2013.** Spray drying of dairy bacteria: new opportunities to improve the viability of bacteria powders. *International Dairy Journal*, **31**(1): 12-17.
- Shafique A., Yaghmaee P., & Durance T., 2010.** Optimization of Dehydration of *Lactobacillus salivarius* Using Radiant Energy Vacuum. *Food and Bioprocess Technology*, **5**(3): 1019-1027.
- Silva A.F., Sarraguça M.C., Fonteyne M., Vercruyssen J., De Leersnyder F., Vanhoorne V., Bostijn N., Verstraeten M., Vervaet C., Remon J.P., De Beer T., & Lopes J.A., 2017.** Multivariate statistical process control of a continuous pharmaceutical twin-screw granulation and fluid bed drying process. *International Journal of Pharmaceutics*, **528**(1-2): 242-252.
- Smith D., Fritze D., & Stackebrandt E., 2013.** Public service collections and biological resource centers of microorganisms. *Springer Reference*, **15**(11): 01-47.
- Song H.H., & Marshall R.T., 2001.** Natural exopolysaccharides enhance survival of lactic Acid bacteria in frozen dairy dessert. *Journal of Dairy Science*, **84**(6): 1367-1374.

- Soomro A.H., Masud T., & Kiran A., 2002.** Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health - a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, **1**(1): 20-24.
- Stiles M.E., & Holzapfel W.H., 1997.** Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**(1), 1-29.
- Tan G.H., & Mustapha N., 2014.** A comparative analysis of preservation of functional food cultures by freeze- drying, liquid-drying and freezing methods. *Direct Research Journal of Agriculture and Food Science*, **2**(2): 13-18.
- Terpou A., Papadaki A., Lappa I.K., Kachrimanidou V., Bosnea L.A., & Kopsahelis N., 2019.** Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, **11**(7): 1-32.
- Thomas T.D., & Pritchard G.G., 1987.** Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Letters*, **46**(3): 245-268.
- Ullah M., Raza A., Ye L., & Yu Z., 2019.** Viability and composition validation of commercial probiotic products by selective culturing combined with next-generation sequencing. *Microorganisms*, **7**(7): 1-14.
- Uzunova-Doneva T., & Donev T., 2000-2002.** Influence of the freezing rate on the survival of strains of *Saccharomyces cerevisiae* after cryogenic preservation. *Journal of Culture Collections*, **3**(1): 78-83.
- Wang X., Wang L., Huang X., Ma S., Yu M., Shi W., Qiao X., Tang L., Xu Y., & Li Y., 2017.** Oral Delivery of Probiotics Expressing Dendritic Cell-Targeting Peptide Fused with Porcine Epidemic Diarrhea Virus COE Antigen: A Promising Vaccine Strategy against PEDV. *Viruses*, **9**(11): 312.
- Wang Y., & Lilburn T.G., 2009.** Biological resource centers and systems biology. *Bioscience*, **59**(2): 113-125.
- WHO, 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. No 85.
- Widyastuti Y., Rohmatussolihat R., & Febrisiantosa A., 2014.** The role of Lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Science*, **5**(4): 435-442.
- Wilkinson M.G., 2018.** Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, **78**: 1-10.
- Wirawati C.U., Sudarwanto M.B, Lukman D.W., Wientarsih I., & Srihanto E.A., 2019.** Diversity of lactic acid bacteria in *dadih* produced by either back-slopping or spontaneous fermentation from two different regions of West Sumatra, Indonesia. *Veterinary World*, **12**(6): 823-829.
- Xu H.S., Roberts N., Singleton F. L., Attwell R.W., Grimes D. J., & Colwell R.R., 1982.** Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, **8**(4): 313-323.
- Yanagida F., Chen Y.S., & Yasaki M., 2007.** Isolation and characterization of lactic acid bacteria from lakes. *Journal of Basic Microbiology*, **47**(2): 184-190.
- Zadeh S.R., Eskandari M.H., Shekarforoush S.S., & Hosseini A., 2014.** Phenotypic and genotypic diversity of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional yoghurts produced by tribes of Iran.

*Iranian Journal of Veterinary Research*, **15**(4): 347-352.

**Zeidan A.A., Poulsen V.K., Janzen T., Buldo P., Derkx P.M.F., Øregaard G., & Neves A.R., 2017.** Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, **41**: 1-33.

**Zhong B.L., Chiu H.F.K., & Conwell Y., 2016.** Elderly suicide trends in the context of transforming China. *Scientific Reports*, **6**(1): 1987-2014.

**Zhong L., 2014.** Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **20**(24): 7878-7886.

**Zouari R., De Almeida M., & Feneux D., 1992.** Effect of sperm-associated antibodies on the dynamics of sperm movement and on the acrosome reaction of human spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology*, **22**(1): 59-72.

*Annexe*

## 1. Milieu MRS (Man de Rogosa et Sharpe): (Oxoid)

### - Composition en g/L

Tryptone.....	10
Extrait de viande.....	10
Extrait de levure.....	4
Citrate d'ammonium.....	2
Acétate de sodium.....	5
Sulfate de magnésium.....	0,2
Sulfate de manganèse.....	0,05
Phosphate di-potassique.....	2
Tween 80.....	1mL
Glucose.....	10
Lactose.....	5
Agar agar.....	20

pH du milieu:  $7\pm 0,2$ .

**Observation:** Les méthodes de préparation sont communes entre toute préparation de milieux de culture.

### Procédure de préparation:

Les composés organiques (tryptone, extrait de viande, extrait de levure...) sont pesés et mis dans un Erlenmeyer contenant de l'eau distillée, le tout est mélangé sur une plaque agitatrice à température stable (30-40°C). Les sels (citrate d'ammonium, acétate de sodium...) sont pesés et mise dans un Becher contenant de l'eau distillée à part (une agitation manuelle est appliquée jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène).

Une fois que les composés organiques sont bien dissous dans l'eau distillée, le mélange des sels est versé. Après une homogénéisation, le volume du milieu désiré (QSP) est complété à l'aide d'une éprouvette et le pH est ajusté. Dans le cas d'un milieu solide, l'agar-agar est additionné à raison de 2% (P/V). Les flacons les tubes sont étiquetés et stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15min.

## 2. Peptone saline

### - Composition en g/L

Tryptone.....	1
NaCl.....	8,5

pH du milieu :  $7\pm 0,2$ ; autoclavage à 121°C pendant 15 min.