



UNIVERSITE  
Abdelhamid Ibn Badis  
MOSTAGANEM

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem  
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie  
Département de Biologie



# Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

## MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité :.....Microbiologie Fondamentale .....

Par

**BENKADDOUR ASMA**

**&**

**BOUCHAREB CHAIMA**

Thème :

---

*Isolement et caractérisation des bactéries lactiques à  
partir des sources laitières naturelles et le rôle  
antagoniste vis-à-vis des souches pathogènes*

---

Soutenue le 11/06/2024 devant le jury composé de :

Président	Mme. CHOUGRANI Fadela	Professeur	Université de Mostaganem
Encadreur	Mr. CHERIGUENE.A	Professeur	Université de Mostaganem
Examineur	Mme. SIDHOUM Warda	MCA	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2023/2024

## *Remerciements :*

Nous adressons en premier lieu nos reconnaissances à notre DIEU tout puissant, de nous avoir permis d'en arriver là, car sans lui rien n'est possible. Nos sincères remerciements s'adressent à notre encadreur Mr. CHERIGUENE Abderrahim pour son soutien, ses conseils et son encouragement continu, sa gentillesse et sa bonté.

Nous remercions également Mme. CHOUGRANI Fadela qui a fait l'honneur de présider ce jury de soutenance.

Et nous remercions aussi Mme. SIDHOUM Warda d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce modeste travail.

L'ensemble des enseignants de l'université Abdelhamid Ben Badis de Mostaganem qui ont contribué à notre formation durant les 5 années particulièrement ceux de l'option Biologie chacun son nom.

Toute personne qui nous a aidés de loin ou de près afin de réaliser ce travail.

Enfin, nous ne saurions oublier d'exprimer toutes nos sympathies à l'ensemble du personnel de laboratoire de Microbiologie particulièrement Mme. Hafida.

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A celle qui attend mon retour à chaque jour*

*A ma mère: Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence. La source de tendresse aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner.*

*A mon père : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être et qui m'a toujours encouragée et donné envie d'aller plus loin.*

*A mon très chère frère mon ange Soufiane*

*A mes très chères sœurs : Sarah, Nesrine, Rania, Nour*

*A ma sœur et mon très cher binôme Chaima, je tiens à te remercier pour ta confiance en moi.*

*A tous mes amis de la promotion de l'année 2019, surtout mes collègues, Yahia, Nisou, Houda*

*A toute la promotion microbiologie fondamentale chacun par son nom en particulier.*

*Asma*

# *Dédicace*

*Grace à Dieu et à ma prière je suis ici*

*Je dédie ce modeste travail : A mes parents,*

*Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous,*

*Vos prières, vos encouragements et votre soutien,*

*M'ont toujours été d'un grand secours.*

*Puisse dieu, le tout puissant vous préserver du mal,*

*Vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie*

*A mes très chers frères : Tayeb, Bendhaiba, Adda, Mohamed, Mahfoud, Toufik et*

*leur enfant*

*A ma chère sœur Fatima et leur filles Rahil, Hanin et Rokaia*

*A ma sœur qui n'est pas née de ma mère a mon amie Asma Benkaddour et au même*

*temps mon binôme dieu a rendu votre vie entière heureuse et j'espère vous voir au*

*plus haut niveau*

*A mon promo Microbiologie fondamentale*

*A mes collègues Nour el houda, Nesrin et Yahia*

*A mon homme et toute la famille Bouchareb*

*Chaima*

### Liste des abréviations :

**NaCl** : Chlorure de Sodium

**MRS** : Man-Rogosa et Sharp

**MSE** : Mayeux , Sandine et Elikér

**ADH** : Arginine Dihydrolase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : eau oxygénée

**BCP** : Pourpre de bromocrésol

**D°**: Degré Dornic

**µg**: microgramme

**µm**: micromolaire

**BL**: bactérie lactiques

**FAO**: Food Agriculture Organisation

**NaOH**: Hydroxyde de sodium

**ATCC**: American Type Culture Collection

**E** : Enterococcus

**E Coli** : Escherichia coli

**LAB**: Acid Lactic Bacteria

**Lb** : Lactobacillus

**Lc** : Lactococcus

**Ln** : Leuconostoc

**M** : Micrococcus

**Pc**: Pediococcus

**St**: Streptococcus

**UFC**: Unité formant Colonie

**VP**: Voges- Proskauer

**ATP** : adénosine triphosphate.

**ADP** : adénosine diphosphate.

**NAD<sup>+</sup>/ NADH, H<sup>+</sup>** : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

**Pi** : phosphate inorganique.

## Liste des figures :

<b>Figure 01</b> : Répartition du dromadaire en Algérie .....	04
<b>Figure 02</b> : Bactérie lactique sous microscope électronique .....	11
<b>Figure 03</b> : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques.....	12
<b>Figure 04</b> : Représentation schématique des principales voies de fermentation.....	16
<b>Figure 05</b> : Protéolyse du lait par les bactéries lactiques.....	18
<b>Figure 06</b> : principale voie de lipolyse .....	19
<b>Figure 07</b> : Mode d'action des bacteriocine de bactéries lactiques.....	28
<b>Figure 08</b> : Schéma représentatif de la préparation de l'échantillon.....	31
<b>Figure 09</b> : Schéma représentative de la technique de dilution et d'ensemencement.....	32
<b>Figure 10</b> : Schéma représentative de la méthode de purification .....	33
<b>Figure 11</b> : Mesure de l'acidité Dornic.....	39
<b>Figure 12</b> : schéma de la méthode de diffusion en puits .....	40
<b>Figure 13</b> : Aspect des bactéries lactiques sur milieu M17 et MRS solide.....	42
<b>Figure 14</b> : Observation microscopique de coloration de Gram au grossissement x100.....	43
<b>Figure 15</b> : Résultat de purification .....	44
<b>Figure 16</b> : catalase négative .....	45
<b>Figure 17</b> : La croissance à différentes températures.....	45
<b>Figure 18</b> : La croissance à différents pH.....	45
<b>Figure 19</b> : La thermo résistance .....	46
<b>Figure 20</b> : La croissance en milieu hyper salé .....	47
<b>Figure 21</b> : La croissance sur lait de Sherman 1% et 3% .....	48
<b>Figure 22</b> : L'arginine di hydrolase (ADH ) .....	49
<b>Figure 23</b> : Production d'acétoïne .....	49
<b>Figure 24</b> : Test de type fermentaire .....	50
<b>Figure 25</b> : Test de l'utilisation de citrate .....	50
<b>Figure 26</b> : La fermentation des sucres sur micro-plate .....	51
<b>Figure 27</b> : La répartition en pourcentage des 14 souches lactiques isolées .....	54
<b>Figure 28</b> : Activité protéolytique des isolats lactiques.....	56
<b>Figure 29</b> : Activité lipolytique des isolats sur gélose MRS additionné .....	57
<b>Figure 30</b> : Evolution de pH des souches isolées à différents intervalles de temps.....	59
<b>Figure 31</b> : Evolution de l'acidité des souches isolées à différents intervalles de temps.....	60
<b>Figure 32</b> : Activité antibactérienne des souches lactiques contre <i>proteus mirabilis</i> .....	61
<b>Figure 33</b> : Activité antibactérienne des isolats contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	61
<b>Figure 34</b> : Activité antibactérienne des isolats contre <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	64

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 01</b> : Caractéristiques physico-chimiques du lait de chamelle .....	05
<b>Tableau 02</b> : Composition biochimique du lait de chèvre .....	08
<b>Tableau03</b> : Quelques genres de bactéries lactiques .....	14
<b>Tableau 04</b> : classification des bactériocines de bactéries lactiques.....	25
<b>Tableau 05</b> : les quatre bactériocines de la classe III.....	27
<b>Tableau 06</b> : les souches pathogènes utilisé pour l'antagoniste .....	30
<b>Tableau 07</b> : Caractéristiques physico- chimiques effectuées sur les 2 échantillons.....	41
<b>Tableau 08</b> : Critères morphologiques des bactéries lactiques isolées.....	43
<b>Tableau 09</b> : Croissance à différentes pH et différentes température .....	46
<b>Tableau 10</b> :Test de thermorésistance et de salinité et test de lait de Sherman.....	48
<b>Tableau 11</b> : Profil fermentaire des souches isolées.....	52
<b>Tableau 12</b> : Type fermentaire, acétoïne et l'arginine di hydrolyse .....	52
<b>Tableau 13</b> : Caractérisation biochimique et physiologique des isolats lactiques .....	53
<b>Tableau 14</b> : L'identification des souches lactiques isolées .....	54
<b>Tableau 15</b> : Pouvoir protéolytique et lipolytique des isolats.....	58
<b>Tableau 16</b> : Les variations de l'acidité (°D) et pH des souches isolées au temps.....	59
<b>Tableau 17</b> : Spectre d'action les BAL contre les germes pathogènes.....	60

# *Sommaire :*

**Liste des abréviations.**

**Liste des figures**

**List des tableaux**

**Résumé**

**Partie bibliographique :**

**I. INTRODUCTION.....02**

## **Chapitre I : Le lait**

**I.1.Définition de lait en générale.....03**

**I.2. Le lait de chamelle .....04**

**I.2.1. Caractéristiques du lait camelin .....05**

**I.2.1.1 Caractéristiques organoleptiques.....05**

**I.2.1.2 Caractéristiques physico-chimiques.....05**

**I.2.1.3 Caractéristiques biochimique.....06**

**a. Le lactose.....06**

**b. La matière grasse.....06**

**c. Les minéraux.....06**

**d. La vitamine C.....06**

**e. Les protéines.....06**

**I.3. Définition de lait de chèvre.....07**

**I.3.1. Lait de chèvre .....07**

**I.3.2. Particularités et caractéristiques du lait de chèvre.....07**

**I.3.2.1 Composition biochimique.....07**

**I.2.3.2 Les élément de composition de lait de chèvre..... 08**

**a. L'eau.....08**

**b. Les glucides .....08**

**c. Les protéines .....09**

**d. Les lipides.....09**

**I.2.5.5 Matière minérale .....09**

## Chapitre II : Les bactéries lactiques

II.1. La découverte des bactéries lactiques.....	10
II.3. Définition.....	10
II.4. Habitat .....	11
II.5. Taxonomie et classification des bactéries lactiques .....	12
II.5.1. Les principaux genres des bactéries lactiques .....	12
II.5.1.2. Le genre <i>Lactobacillus</i> sp .....	13
II.5.1.3. Le genre <i>Lactococcus</i> sp .....	13
II.5.1.4. Le genre <i>Pediococcus</i> sp .....	13
II.5.1.5 <i>Enterococcus</i> .....	13
II.5.1.6. Les <i>Bifidobacterium</i> .....	14
II.5.1.7 Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i> .....	15
II.6. Les voies fermentaires des bactéries lactiques .....	15
II.6.1. Définition .....	15
II.6.2. Voies fermentaires générales du métabolisme carboné .....	16
II.7. Fermentation des bactéries lactiques :	
II.7.1. Voie homofermentaire .....	17
II.7.2. Voie hétérofermentaire .....	17
II.7.3. Métabolisme des protéines (la protéolyse) .....	18
II.7.4. Métabolisme des acides gras (la lipolyse) .....	19
II.8.1. Intérêt des bactéries lactiques .....	20
II.8.2. Dans l'industrie alimentaire .....	20
II.8.3. Pouvoir texturant .....	20
II.8.4. Pouvoir aromatisant .....	20
II.8.5. Pouvoir protéolytique .....	21
II.8.6. Pouvoir lipolytique .....	21
II.8.7. Pouvoir acidifiant .....	21
II.9. Rôle dans la conservation .....	22
II.10. Effets sur les propriétés sensorielles .....	22
II.11. Dans le domaine thérapeutique .....	22
II.12. Pouvoir antimicrobien : (Antibactérien, Antagoniste) .....	23

## **Chapitre III les bactériocines**

<b>III.1.</b> Historique.....	24
<b>III.2.</b> Définition.....	24
<b>III.3.</b> Nomenclature.....	24
<b>III.4.</b> Nature.....	24
<b>III.5.</b> Propriétés.....	25
<b>III.6.</b> La classification des bactériocines.....	25
<b>III.6.1.</b> Les bactériocines de la classe I .....	26
<b>III.6.1.1.</b> L'antibiotique .....	26
<b>III.6.1.2.</b> Bactériocines de classe II .....	26
<b>III.6.1.3.</b> Bactériocines de classe III.....	27
<b>III.7.</b> Mode d'action des bactériocines.....	27
<b>III.8.</b> L'intérêt des bactériocines.....	28
<b>III.9.</b> Domaines d'application des bactériocines.....	28
<b>III.9.1.</b> Utilisation alimentaire .....	29

## **Partie Expérimentale :**

### **Chapitre IV : Matériels et méthodes**

<b>1.</b> Objectif .....	30
<b>2.</b> Lieu et période d'étude .....	30
<b>3.</b> L'échantillonnage et techniques de prélèvement de lait .....	30
<b>4.</b> Matériels expérimentaux .....	30
<b>4.1.</b> Les souches pathogènes .....	30
<b>5.</b> Analyses physico chimiques .....	31
<b>5.1.</b> Mesure de pH .....	31
<b>5.2.</b> Détermination de l'acidité titrable .....	31
<b>6.</b> Isolement et culture de la souche lactique .....	31
<b>6.1.</b> Préparation des échantillons .....	31
<b>6.2.</b> Les dilutions .....	32
<b>6.3.</b> Purification.....	33
<b>7.</b> Conservation des bactéries lactiques.....	33
<b>7.1.</b> Conservation à courte terme.....	33
<b>7.2.</b> Conservation à long terme.....	33
<b>8.</b> Caractérisation et identification des souches lactiques.....	34

8.1. Caractérisation morphologique.....	34
8.1.1. Examen macroscopique.....	34
8.1.2. Examen microscopique.....	34
8.1.3 Coloration de Gram.....	34
9. Tests physiologiques.....	34
9.1. Recherche de catalase .....	34
9.2. Test de croissance en différentes températures .....	35
9.3. Test de croissance en différents pH .....	35
9.3.1. La croissance à pH=9.6 .....	35
9.3.2. La croissance à pH=4.5 .....	35
9.4. Test de thermorésistance.....	35
9.5. La tolérance de la salinité .....	36
9.6. La croissance sur le lait de Sherman .....	36
10. Tests biochimiques .....	36
10.1. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) .....	36
10.2. Production de l'acétoïne.....	36
10.3. Recherche du type fermentaire .....	37
10.4. Production de dextrane .....	37
10.5. Utilisation de Citrate de Simone .....	37
10.6. Utilisation des carbohydrates .....	37
11. Caractérisation technologique des souches .....	38
11.1. Activité protéolytique .....	38
11.2. Etude de pouvoir lipolytiques des isolats.....	38
11.3. Etude du pouvoir acidifiant des isolats .....	38
11.3. Mesure de PH.....	38
11.3. Mesure d'acidité.....	39
11.4. Activité antibactérienne et effet des surnageant.....	40

## **Chapitre V : Résultats et discussion :**

1. Paramètres physico-chimique .....	41
1.1 Le pH .....	41
1.2 Acidité titrable .....	41
2. Pré-identification des isolats .....	42
2.1 Etude morphologiques.....	42
2.1.1 Aspect macroscopique .....	42
2.1.2 Caractérisation microscopique .....	42

3. Résultat de purification.....	43
4. Les tests physiologiques .....	44
4.1 Recherche de catalase.....	44
4.2 La croissance aux différentes températures .....	44
4.3 La Croissance à différents Ph .....	45
4.4 Test de la thermorésistance.....	46
4.5 Croissance dans milieu hypersalé 6.5% et 4% .....	47
4.6 La croissance dans le lait de Sherman .....	48
5. Les tests biochimiques .....	49
5.1 Recherche de l'arginine di hydrolase (ADH) .....	49
5.2 La production d'acétoïne .....	49
5.3 Recherche de type fermentaire.....	50
5.4 Production de dextrane .....	51
5.5 Utilisation de Citrate de Simmons.....	51
5.6 Etude de la fermentation des sucres .....	51
6. Identification des isolats.....	53
6.1 Analyse des résultats .....	55
7. Aptitude technologique des souches lactiques isolées .....	56
7.1 Etude de l'activité protéolytique des souches isolées .....	56
7.2 Etude de l'activité lipolytique des souches isolée.....	57
7.3 Etude de la capacité d'acidification des souches isolées .....	58
8. Résultats des interactions bactériennes.....	60
9. CONCLUSION .....	64

## Références bibliographiques

### Annexes

## Résumé :

Les bactéries lactiques occupent une place prépondérante dans l'industrie agroalimentaire depuis longtemps. Dans cette étude, nous avons isolé des souches lactiques à partir de deux échantillons de lait cru (chèvre et chamelle) provenant des régions de Laghouat et de Mostaganem, ce qui nous a permis d'obtenir 14 souches Gram positif et catalase négatif.

Notre recherche s'est focalisée sur l'étude de l'antagonisme des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chamelle et de chèvre contre des bactéries pathogènes. Grâce à diverses techniques microbiologiques et biotechnologiques, nous avons identifié quatorze souches appartenant aux genres suivants :

*Lactobacillus delbrueckii* (3)

*Lactobacillus fermentum* (1)

*Streptococcus thermophilus* (6)

*Enterococcus faecium* (1)

*Lactococcus lactis* (3)

Les résultats des tests technologiques montrent que ces souches sont aptes à une utilisation dans l'industrie alimentaire, présentant une bonne activité protéolytique et lipolytique, ainsi qu'une croissance et une acidification optimales dans le lait écrémé à 30°C.

L'étude de l'effet antagoniste des bactéries lactiques productrices de bactériocines, via la méthode de diffusion en puits, contre trois souches de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 et *Proteus mirabilis* ATCC35659, a révélé des résultats positifs et significatifs pour tous les isolats lactiques.

**Mots clés :** bactéries lactiques, lait cru, chèvre, chamelle, caractérisation phénotypique et technologique.

## ملخص:

تلعب البكتيريا اللبنية دورًا هامًا في صناعة الأغذية منذ فترة طويلة. في هذه الدراسة، قمنا بعزل سلالات لبنية من عينتين من الحليب الخام (الماعز والناقة) من منطقتين في ولاية الأغواط وولاية مستغانم، مما أتاح لنا الحصول على 14 سلالة موجبة الجرام وسلبية الكاتالاز.

تركزت أبحاثنا على دراسة التنافس بين البكتيريا اللبنية المعزولة من الحليب الخام للجمل والماعز ضد البكتيريا الممرضة. من خلال استخدام تقنيات ميكروبيولوجية وتقنية حيوية متنوعة، قمنا بتحديد أربعة عشر سلالة تنتمي إلى الأنواع التالية:

*Lactobacillus delbrueckii* (3)

*Lactobacillus fermentum* (1)

*Streptococcus thermophilus* (6)

*Enterococcus faecium* (1)

*Lactococcus lactis* (3)

أظهرت نتائج الاختبارات التكنولوجية أن هذه السلالات واعدة للاستخدام في صناعة الأغذية، حيث تتميز بنشاط بروتيني ودهني جيد، بالإضافة إلى نمو وحموضة مثالية في الحليب الخالي من الدسم عند درجة حرارة 37 درجة مئوية. دراسة التأثير المضاد للبكتيريا، للبكتيريا اللبنية المنتجة للمضادات البكتيرية، باستخدام طريقة الانتشار في الأوساط الصلبة، ضد ثلاث سلالات مرجعية *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853، *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603، و *Proteus mirabilis* ATCC35659، أظهرت نتائج إيجابية وذات دلالة إحصائية لجميع العزلات اللبنية.

**الكلمات المفتاحية:** البكتيريا اللبنية، الحليب الخام، الماعز، الناقة، التوصيف المورفولوجي والتكنولوجي.

## **Abstract:**

Lactic acid bacteria have long held a prominent place in the agro-food industry. In this study, we isolated lactic strains from two raw milk samples (goat and camel) from the regions of Laghouat and Mostaganem, which allowed us to obtain 14 Gram-positive and catalase-negative strains.

Our research focused on studying the antagonism of lactic acid bacteria isolated from raw camel and goat milk against pathogenic bacteria. Through various microbiological and biotechnological techniques, we identified fourteen strains belonging to the following genera:

*Lactobacillus delbrueckii* (3)

*Lactobacillus fermentum* (1)

*Streptococcus thermophilus* (6)

*Enterococcus faecium* (1)

*Lactococcus lactis* subsp. (3)

The results of the technological tests show that these strains are suitable for use in the food industry, exhibiting good proteolytic and lipolytic activity, as well as optimal growth and acidification in skimmed milk at 30°C.

The study of the antagonistic effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, using the well diffusion method, against three reference strains *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, and *Proteus mirabilis* ATCC35659, revealed positive and significant results for all lactic isolates.

**Keywords:** lactic acid bacteria, raw milk, goat, camel, phenotypic and technological characterization.

# La synthèse bibliographique

## Introduction :

Le lait occupe une position stratégique et est une denrée essentielle dans l'alimentation quotidienne de l'homme, c'est un liquide biologique collecté à partir des mammifères (principalement les vaches laitières) et un aliment complet constitué des principaux nutriments nécessaires au développement du corps humain, en particulier le calcium alimentaire, ainsi que la teneur en vitamines et minéraux. Selon la FAO (2019), la production mondiale de lait provient essentiellement du lait de vache 81% suivi du lait de bufflonne 15% et d'autres types de laits (chèvre, brebis et chamelle) 4%, en 2018 (**Kebchaoui, 2013**).

Le lait est un aliment dont la durée de conservation est très limitée. En effet, son pH quasi neutre le rend facilement altérable par les micro-organismes et les enzymes. Sa richesse et sa fragilité en font un milieu idéal de reproduction pour de nombreux micro-organismes, dont les moisissures, levures et les bactéries. Bien que ces micro-organismes soient les principaux facteurs de dégradation du lait, ils sont historiquement utilisés dans sa transformation et sa conservation (**Kara et Mehieddine, 2020**). De nombreux produits alimentaires subissent une fermentation lactique avant leur consommation, ce qui leur confère des caractéristiques d'arômes et de textures très spécifiques.

Les bactéries lactiques sont reconnues pour l'effet bénéfique de leur présence dans la production de nombreux produits laitiers depuis de nombreuses années (**Atlan et al., 2008**).

Les bactéries qui en sont responsables sont toutes classées et regroupées sous la même appellation de bactéries lactiques (**Ghozlane, 2012**). Les bactéries lactiques sont reconnues pour l'effet bénéfique de leur présence dans la production de nombreux produits laitiers depuis de nombreuses années (**Atlan et al., 2008**). Les bactéries lactiques peuvent produire plusieurs composés à partir de la fermentation des sucres, de l'hydrolyse des protéines et des lipides. Ces composés peuvent être sous forme d'acides organiques, de peptides, de composés antimicrobiens, de composés aromatiques et d'exo polysaccharides. Ces produits participent notamment à la qualité organoleptique, technologique et nutritionnelle des produits laitiers (**Mozzi et al., 2010**).

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité sanitaire alimentaire. Cette sécurité est

favorisée grâce à la production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu. Les techniques de biologie moléculaires ont permis de mettre en évidence une forte diversité génomique qui a conduit à la classification récente de treize genres : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Bifidobacterium* (Carine et al, 2009).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries Gram+, telles que *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* et *Listeria monocytogenes*, qui sont des pathogènes majeurs. Ces bactériocines peuvent également inhiber la croissance de bactéries proches de la souche productrice.

Notre travail consiste à l'isolement et l'identification des bactéries lactiques à partir des sources laitières naturelles et le rôle d'antagoniste vis-à-vis des souches pathogènes

L'objectif de notre travail consiste à isoler et identifier les bactéries lactiques par des méthodes biochimiques et physiologiques à partir des échantillons des lait naturelles (lait de chamelle de la willaya de Laghouat et lait de chèvre de la wilaya de Mostaganem).

Notre travail est divisé en trois (03) parties :

➤ Une étude bibliographique composée de trois parties :

La première rappelant les généralités du lait, ses propriétés et ses types et leur composition

La deuxième représente la classification des bactéries lactiques et leur métabolisme.

La troisième c'est Les bactériocines

➤ Une étude expérimentale comprend :

Une étude physico-chimique

Isolement et caractérisation des bactéries lactiques afin de sélectionner des genres prédominants dans le lait étudié.

L'antagonisme des bactéries lactiques et les bactéries pathogènes

Présentation des résultats obtenus et leurs interprétations, en les comparant aux résultats des travaux similaires pour valoriser ce mémoire.

➤ Conclusion et perspectives qui en découlent.

# Chapitre I : Le Lait

### I.1.Définition de lait en générale :

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum » (**Pougheon et Goursaud., 2001**).

Selon ABOUTAYEB., 2009, le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femme et par celles des mammifères femelles pour la nutrition des jeunes. Le lait cru est un lait qui n'a subi aucun traitement de conservation sauf la réfrigération à la ferme. La date limite de vente correspond au lendemain du jour de la traite. Le lait cru doit être porté à l'ébullition avant consommation (peut contenir des germes pathogènes). Il doit être conservé au réfrigérateur et consommé dans les 24h (**FREDOT., 2006**).

Le lait est un produit alimentaire fondamental en Algérie et constitue la base du régime alimentaire. Bien qu'importante, la production laitière du pays ne suffit pas à couvrir les besoins du pays, l'accroissement du cheptel ayant du mal à suivre la croissance démographique. L'Algérie est le deuxième plus grand importateur mondial de produits laitiers après le Mexique, avec environ 20 % des importations alimentaires attribuées au lait. De 1996 à 2004, les importations laitières ont connu une croissance annuelle moyenne de 57 % Afin de pallier sa dépendance aux importations et de répondre à la demande croissante, l'Algérie doit exploiter au mieux ses ressources laitières, en particulier les ressources en chèvres, en brebis et en chamelles, qui sont spécialement adaptées aux conditions agro-climatiques rigoureuses du Sahara.

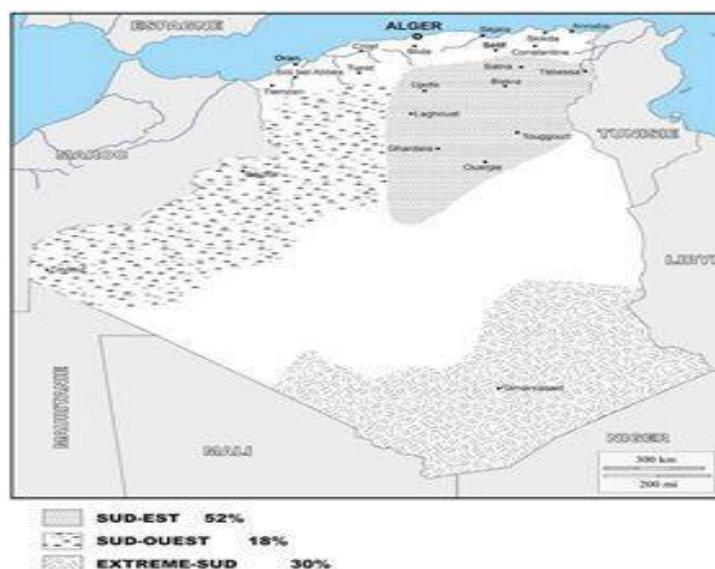
## I.2. Le lait de chamelle :

Le lait de chamelle caractérisé par sa richesse en lysozyme et en vitamine C, est naturellement protégé contre les attaques extérieures. En plus, le milieu naturel du dromadaire, caractérisé par de fortes insulations, des températures élevées et de faibles humidités relatives, limite le développement des microorganismes (Saidi M et al., 1999).

Le lait camelin a un rôle important pour la nutrition humaine dans les zones arides et semiarides. Il renferme tous les nutriments essentiels qu'on trouve dans le lait bovin, en quantités équilibrées (El-Agamy et al, 1998).

Le lait de chamelle contient une teneur élevée en agents antibactériens (Lactoferrine, Lactopéroxydase et le lysozyme) confèrent au lait de chamelle une capacité particulière à le retenir pendant quelques jours à des températures relativement élevées (environ 25°C) (Yagil et al., 1994). Par conséquent, la pasteurisation du lait de chamelle n'est pas nécessaire si tous les chameaux du troupeau sont en bonne santé.

En Algérie, la production du lait de chamelle a occupé 0.5% de la production laitière totale durant la période allant de l'an 2000 à 2005 (Senoussi, 2011). Selon les données de la FAO stat en 2013, l'Algérie produit annuellement 15 000 tonnes de lait de chamelle (chiffre non officiel), ce qui place l'Algérie au 13e rang mondial des pays producteurs de lait de chamelle. Cependant, le potentiel de la production laitière cameline demeurerait sous-estimé et insuffisamment exploité. Il semble que cette branche du lait de chamelle en Algérie soit la plus sous-estimée.



**Figure 1** : Répartition du dromadaire en Algérie (carte adaptée et modifiée à partir de dmaps.com et selon les données de Ben Aissa, 1989 ; Abdelguerfi & Ramdane, 2003)

## I.2.1. Caractéristiques du lait camelin

### I.2.1.1 Caractéristiques organoleptiques

Le lait camelin, est généralement blanc et opaque, avec un goût agréable (Dilanyan, 1959; Yagil et Etzion, 1980). Le lait de chamelle est de couleur blanche, en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse, relativement pauvre en  $\beta$ -carotène (Sawaya et al., 1984). Il est légèrement sucré, avec un goût acide, parfois même salé (Abdel-Rahim, 1987) et/ou amère (Ramet, 2003). Cette variabilité dans le goût est liée au type de fourrage ingéré ainsi qu'à la disponibilité en eau (Yagil et Etzion, 1980). Il peut se présenter sous forme crémeux qu'on il est légèrement agité (Shalash, 1979).

### I.2.1.2 Caractéristiques physico-chimiques

Ce lait présente une composition physico-chimique relativement similaire à celle du lait bovin. Il se distingue des autres laits par la présence d'un système protecteur très puissant, lié à des taux relativement élevés en lysozyme, en lactoperoxydase, en lactoferrine et en bactériocines produites par des bactéries lactiques (Siboukeur et al, 2012).

**Tableau 01** : Caractéristiques physico-chimiques du lait de chamelle (Faye, 1997).

Caractéristiques	Moyenne	Maximum	Minimum
pH	6,56	6,8	6,2
Densité spécifique	1,035	1,038	1,025
Point de congélation	-0,58° C	-0,60°C	-0,55°C
Teneur en eau	87,90%	90%	84,80%
Extrait sec total	12,10%	15,20%	10,00%
Taux de matières grasses	3,80%	5,60%	2,50%
extrait sec dégraissé	8,20%	10,30%	6,20%
Teneur azotée totale	3,50%	5,50%	2,20%
dont caséines	2,60	4,10	1,50
dont alb.et glob	0,90	1,40	0,50
Teneur en lactose	3,90%	5,10%	2,60%
Teneur en Cl	0,16%	0,17%	0,14%
Teneur en cendres	0,76%	0,90%	0,60%

### I.2.1.3 Caractéristiques biochimique :

#### a. Le lactose :

Le taux de lactose contenu dans le lait de chamelle est de 35 g/l (**Abdoun et al., 2007**). Sa teneur maximale est de 54 g/l, varie selon le stade de lactation, le changement de concentration du lactose explique la variation de la saveur du lait de chamelle (**Attia et al., 2003**).

#### b. La matière grasse :

Le lait de la chamelle de Bactriane est plus riche en matières grasses que le lait de dromadaire (**Faye, 1997**).

Le lait de chamelle est plus pauvre en acides gras saturés de courte chaîne (les plus défavorables à la santé) et beaucoup plus riche en acides gras à longue chaîne, notamment les mono-insaturés (acide stéarique, acide oléique notamment) (**Siboukeur, 2007**).

La teneur en matière grasse du lait camelin varie de 1,1 à 4,6% (**Konuspayeva et al., 2004**).

#### c. Les minéraux :

Les sels minéraux présents dans le lait de chamelle sont aussi diversifiés que ceux rencontrés dans le lait de vache (**Siboukeur, 2007**). Le lait de chamelle est une riche source en chlorure en raison des fourrages broutés par le dromadaire, tels qu'Atriplex et Acacia qui contiennent habituellement une forte teneur en sel (**Al haj et al kanhal, 2010**).

Le lait de chamelle contient une quantité de minéraux allant de 6,7g/l (**Abdoun et al., 2007**) à 10,5g/l (**El-Hatmi et al., 2006**).

#### d. La vitamine C :

La teneur moyenne en vitamine C est égale trois fois plus élevées que celles présentes dans le lait bovin, qui ne dépassent pas 22 mg/l (**Mathieu, 1998**).

Lait camelin contient des teneurs plus faibles en vitamines A et E et en certaines vitamines du groupe B (vitamine B2, B5 et B9) par rapport au lait bovin (**Farah, 1993**).

#### e. Les protéines

Les protéines sont des éléments essentiels du lait et des produits laitiers (**Jean Amiot et al., 2002**). Elles se répartissent, en deux fractions : les caséines et les protéines du lactosérum (**Wangoh et al., 1998**).

### I.3. Définition de lait de chèvre :

#### I.3.1. Lait de chèvre :

Le lait de chèvre se présente comme un liquide opaque de couleur blanchâtre mate, dû à l'absence de  $\beta$ -carotène. Le lait de chèvre est une émulsion de matière grasse sous forme de globules gras dispersés dans une solution aqueuse (sérum) comprenant de nombreux éléments, les uns à l'état dissous (lactose, protéines du lactosérum, ... etc.), les autres sous forme colloïdale (caséines) (Doyon., 2005).

En raison de l'absence de  $\beta$ -carotène, le lait de chèvre est plus blanc que le lait de vache et un goût plus relevé que le lait de vache (Zeller., 2005 ; Jouyandah Et Abroumand., 2010). Il est légèrement sucré, d'une saveur particulière et une odeur assez neutre (Alais., 1984).

Le lait de chèvre frais a un léger goût de chèvre dû à la présence d'acide gras caprique, caprylique et caproïque (Jaubert, 1997).

Le goût fort du lait de chèvre est dû à une traite non hygiénique, à certaines sortes d'aliments pour bétail, à un traitement inadéquat ou à un mauvais stockage du lait (Boyaval Et Al., 1999). Le goût dépend aussi de la race caprine (Juillard Et Al., 1996).

#### I.3.2. Particularités et caractéristiques du lait de chèvre

##### I.3.2.1 Composition biochimique

Le lait de chèvre est constitué essentiellement d'eau où sont dissous d'autres éléments tels que le lactose, les protéines (caséines, albumines et globulines), les minéraux et les vitamines. À cette phase aqueuse vient s'ajouter des éléments non solubles, et, qui sont les lipides sous forme de triglycérides (Adrian, 1987)

Plusieurs travaux ont été menés sur la composition du lait de chèvre, ainsi, différents résultats ont été obtenus. A partir de ces résultats il a été déduit que la composition du lait de chèvre dépendait notamment de l'alimentation (Goetsch et al., 2001 ; Cozma et al., 2014). Les composés nutritionnels tels que la matière grasse peuvent aussi dépendre de d'autres facteurs tels que la race et le stade de lactation (Cozma et al., 2014). Ces différences en composition laissent ce type de lait destiné à la fabrication de multiples fromages et d'autres produits dérivés (Paciovski et al., 2015).

Tableau 2 : Composition biochimique du lait de chèvre (Claeys et al., 2014)

Composés	Teneur (%)
Matière sèche totale	11,9-16,3
Protéines	3-5,2
Matière grasse	3-7,2
Lactose	3,2-5
Minéraux	0,7-0,9
Ca (mg/100 ml)	85-198
P (mg/100 ml)	79-153
K (mg/100 ml)	140-242
Mg (mg/100 ml)	10-36
Na (mg/100 ml)	28-59
Fe. (mg/100 ml)	0,05-0,1
Zn (mg/100 ml)	0,4-0,6
Cu (mg/100 ml)	0,02-0,05
Thiamine (Vit. B1) (µg/100 ml)	40-68
Riboflavine (Vit. B2) (µg/100 ml)	110-210
Niacine (Vit. B3) (µg/100 ml)	187-370
Acide Pantothénique (Vit. B5) (µg/100 ml)	310
Pyridoxine (Vit. B6) (µg/100 ml)	7-48
Biotine (Vit. B7) (µg/100 ml)	1,5-3,9
Acide Folique (Vit. B9) (µg/100 ml)	0,24-1
Cobalamine (Vit. B12) (µg/100 ml)	0,06-0,07
Acide Ascorbique (Vit. C) (µg/100 ml)	900-1500
Vitamin A (µg/100 ml)	50-68
Cholecalciferol (Vit. D3) (µg/100 ml)	0,25

### I.2.3.2 Les éléments de composition de lait de chèvre :

#### a. L'eau :

Elle forme une solution variée avec les glucides, les minéraux, une solution colloïdale avec les micelles de caséines et une émulsion avec les matières grasses, le lait de chèvre est constitué de 87% d'eau (Amiot et al, 2002).

#### b. Les glucides :

Le lactose est le glucide le plus important du lait, d'autres glucides peuvent provenir de l'hydrolyse de lactose (glucose, galactose) certains glucides peuvent se combiner aux protéines, formant de glycoprotéines ou peuvent se trouver sous forme libre (Amiot et al, 2002).

### **c. Les protéines :**

Les protéines de lait de chèvre comme celle des autres espèces de mammifères, sont composées de deux fractions, l'une majoritaire dénommée caséine (représente environ 80%) (**Mahe et al, 1996**), précipite à pH 4,2 pour le lait de chèvre et pour le lait de vache (**Masle et Morgan, 2001**).

### **d. Les lipides:**

Les lipides de lait se composent principalement de triglycérides, de phospholipides et forment une émulsion. Le lait de chèvre est pauvre en carotène et donc, peu coloré par rapport aux autres laits, il est plus riche en acide gras à 10 atomes de carbone et présente un pourcentage plus élevé de petits globules gras que le lait de vache, il ne contient pas d'agglutinines et présente une activité lipasique plus faible que le lait de vache (**Chilliard, 1987**).

### **I.2.5.5 Matière minérale :**

Ils prennent la forme de sels, de base et acide mais les deux formes principales sont les sels ionisés solubles dans le sérum et les micelles, les éléments basiques majeurs comme le calcium, potassium, le magnésium et le sodium forment des sels, avec les constituants acides que sont les protéines, les citrates, les phosphates et les chlorures, en outre le calcium, le magnésium, les citrates, et les phosphates se trouvent sous forme colloïdale dans les micelles de caséines (**Amiot et al, 2002**).

Le lait de chèvre semble être plus riche en calcium, phosphore, magnésium, potassium et chlore que le lait de vache mais moins riche en sodium (**Mahieu et al, 1977**) (**Jenness, 1980, Sawaya et al, 1984**).

# Chapitre II:

## Les Bactéries Lactiques

### II.1. La découverte des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2.75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie. De plus, des études sur la physiologie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle de cyanobactéries (Quiberoni et al., 2001 ; Guetarni, 2013) La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Lister en 1873 (**Lister, 1873, 1889, Weigmann, 1908**). En 1890, Storch et al. (**Storch, 1980**).

### II.2. Généralités sur les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un nombre important de ses aliments. Elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons (EUFIC1999). Elles sont devenues les principaux candidats probiotiques et bénéficient d'un statut GRAS (**Generally Regarded AS Safe**) (**Ait Belghanaoui, 2006**).

### II.3. Définition:

Le groupe des bactéries lactique a été défini par **Orla-Jensen (1919)** et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique.

Ce sont des coques ou bâtonnets à gram positif, généralement immobiles et non sporulés. Les bactéries lactiques ne possèdent ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène. L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (**Larpen et al, 1997 ; Bourgeois et al, 1996**). Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC (**Muto et Osawa, 1987**). Ces bactéries ont des exigences nutritionnelles complexes en termes d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras et de sucre (**Dallaglio et al, 1994**).

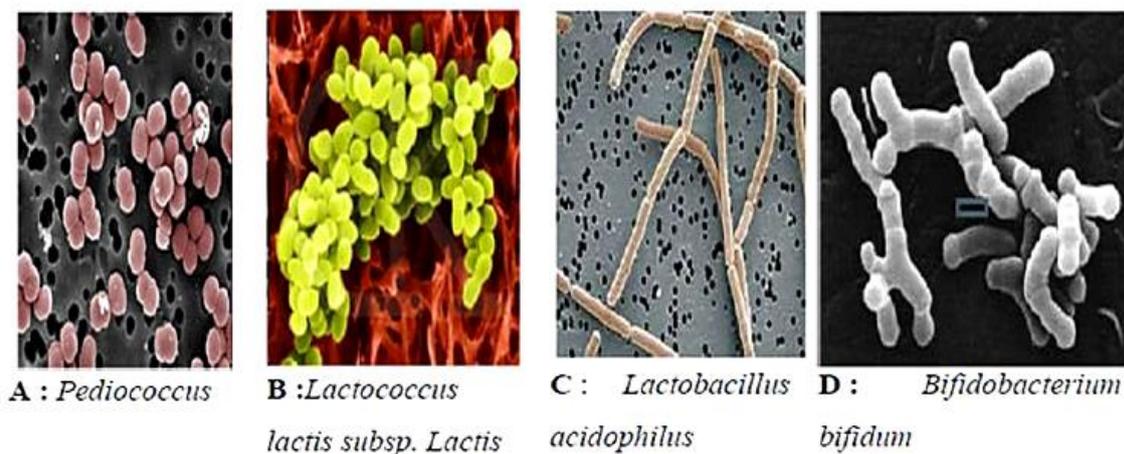


Figure 02 : Bactérie lactique sous microscope électronique ( Maghnia , 2011)

### II.4. Habitat :

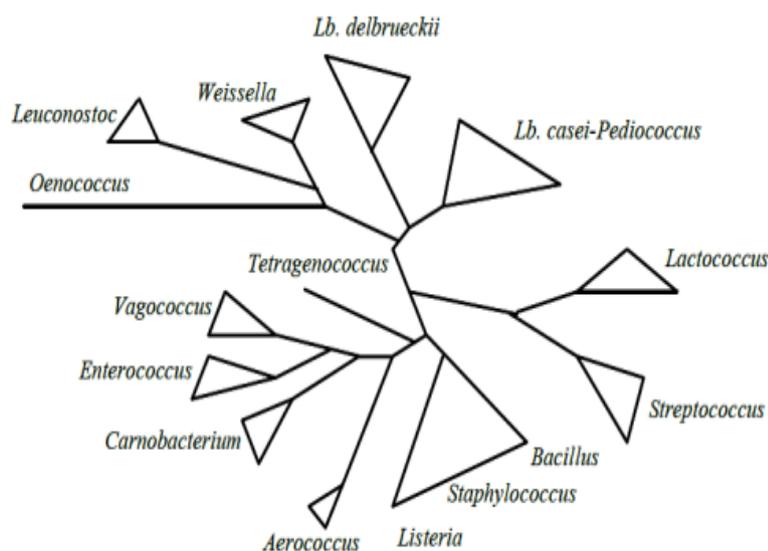
Les bactéries lactiques sont ubiquistes : Elles sont retrouvées dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène (Mayo et al., 2010; Klein et al., 1998) .Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (De Roissart, 1986).

Les espèces appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* sont principalement présentes chez les humains, les animaux et les oiseaux. Elles peuvent être isolées de la peau des animaux, des matières fécales, des poussières, ainsi que de l'ensilage du foin et des grains. Les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues dans la nature, se trouvant dans les végétaux où elles contribuent à l'acidification de l'ensilage. On les retrouve également dans le tube digestif des animaux et des humains en raison de leur résistance aux sels biliaires, et peu d'entre elles présentent un caractère pathogène. En ce qui concerne les espèces du genre *Pediococcus*, elles sont quasiment exclusivement présentes sur les plantes.

### II.5. Taxonomie et classification des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (DeRoissart et Luquet, 1994; Holzapfel et al., 2001).

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales* (De Vos et al., 2009). Cet ordre comporte 33 genres repartis entre six familles qui sont : *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Ces genres classés sur la base d'analyse phylogénétiques des séquences de l'ARNr 16S (Ludwig et al., 2009)



**Figure 03** : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

#### II.5.1. Les principaux genres des bactéries lactiques :

La classification actuelle des bactéries lactiques fait apparaître douze genres qui incluent *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997).

### II.5.1.2. Le Genre *Lactobacillus* sp:

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Les *lactobacilles* représentent un genre important des bactéries lactiques tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale infantile. L'hétérogénéité des espèces est illustrée par le contenu en G + C qui peut varier de 32 à 53 % (Schleifer et Stackebrandt, 1983 ; Pilet et al., 2005).

### II.5.1.3. Le genre *Lactococcus* sp:

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Elles sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes). Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl ou à pH 9.6. Leur température optimale de croissance s'étend de 25 à 35°C, respectivement pour les souches de *Lc. cremoris* et *Lc. lactis*. Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C (Dellaglio et al., 1994).

### II.5.1.4. Le genre *Pediococcus* sp:

Rassemble des coques homofermentaires dont la particularité qui les différencie des autres genres est le regroupement en paires ou en tétrades. Le genre *Pediococcus* est mésophile. Leur exigence nutritionnelle, leur faible activité protéolytique et le plus souvent leur incapacité à utiliser le lactose, ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait. Leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique (acide D. L.-lactique) mais, fréquemment la forme lévogyre L prédomine : les espèces osmophiles non acidophiles ne donnent que cette forme. Ce genre est parfois utilisé comme levain lactique pour les charcuteries (Guiraud, 1998).

### II.5.1.5 *Enterococcus* :

Sont des cocci ovoïdes à Gram positif se présentant isolées, en paires, en chaînes courtes ou elles peuvent être disposées en groupes (tableau1) (**Dellaglio, 1994**). Elles peuvent jouer un rôle bénéfique dans la maturation et le développement de l'arôme de certains produits alimentaires traditionnellement fermentés tels que les fromages et la charcuterie. Elles sont également utilisées comme probiotiques humains, pour traiter les maladies diarrhéiques causées par des pathogènes d'origine alimentaire (**Joubert, 2016**).

### II.5.1.6. Les *Bifidobacterium*:

Les bifidobactéries forment le plus important groupe de bactéries intestinales pour la santé de l'homme. Leur découverte remonte au début du siècle lorsqu'Henri Tissier les a isolées de selles d'enfant nourris au lait maternel (**Tissier, 1900**).

Elles s'installent dans un court temps après la naissance et devient le groupe dominant des bactéries (92%) de la microflore de nouveau-né allaité au sein. Les bifido-bactéries sont des bâtonnets à aspect variable, cellules courtes, coccoidales, ramifiées, bifurquées, spatulées, isolés ou en chaîne, disposé en palissades. Leur nom provient de leur forme en Y ou V que les cellules présentent dans certaines conditions de culture. Ces bactéries sont anaérobies, Gram positives, a sporulées immobiles. Les bifidobactéries métabolisent les carbohydrates en utilisant une enzyme appelée fructose 6 phosphate phosphokétolase retrouvée uniquement chez ce genre bactérien (**Hero et al., 2004**).

**Tableau 3** : Quelques genres de bactéries lactiques (**Bekhouche., 2006**)

Genres	cellules		Fermentation	ADN G+C(%)	Références
	Forme	Arrangements			
<b>Streptococcus</b>	<b>Coques</b>	<b>Chaines</b>	<b>Homolactiques</b>	<b>34-46</b>	<b>SCHLEIFER, 1986</b>
<b>Leuconostoc</b>	<b>Coques</b>	<b>Chaines</b>	<b>hétérolactiques</b>	<b>36-43</b>	<b>FARROW et al, 1989</b>
<b>Pediococcus</b>	<b>Coques</b>	<b>Tétrades</b>	<b>Homolactiques</b>	<b>34-42</b>	<b>SCHLEIFER, 1986</b>
<b>Lactobacillus</b>	<b>Bacilles</b>	<b>Chaines</b>	<b>Homolactiques</b>	<b>32-53</b>	<b>KANDLER et WEISS 1986</b>

### II.5.1.7 Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* :

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques en paires ou en chaînes comme les Streptocoques mais les *Leuconostoc* sont des bactéries hétérofermentaires produisant de l'acide D (-) lactique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>. Des études phylogénétiques, basées sur les séquences des ADN 16S et 23S, ont montré que les espèces du genre *Leuconostoc* sont hétérogènes et peuvent être divisées en trois groupes : un groupe comprenant *Leuconostoc paramesenteroides*, un groupe formé par *Leuconostoc oeni* (actuellement reclassé dans le genre *Oenococcus*) et un groupe rassemblant *Leuconostoc mesenteroides* (espèce type du genre) ainsi que les autres espèces du genre *Leuconostoc*. (Martinez- Muracia et Collins, 1990).

Les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles ou de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (Walter *et al.*, 2001).

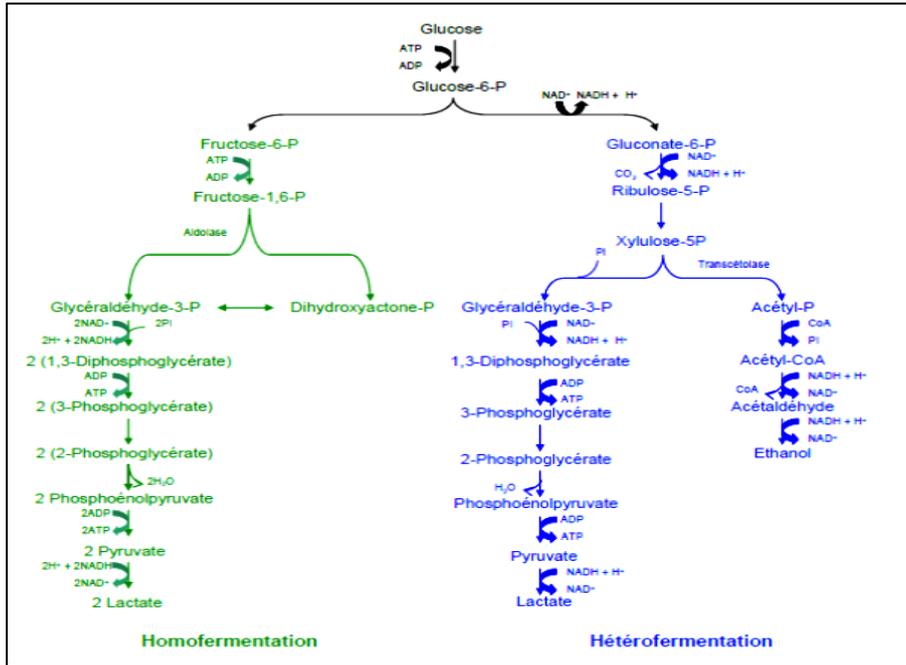
## II.6. Les voies fermentaires des bactéries lactiques :

### II.6.1. Définition :

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques, principalement des glucides, où un donneur d'électron, NADH cède ses électrons à un accepteur endogène, le pyruvate Dans la respiration les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. (Prescott *et al.*, 2003).

**II.6.2. Voies fermentaires générales du métabolisme carboné :**

Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (**Fig 4**). Il s'agit des voies homofermentaires (Embden-Meyerhoff-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate). Ainsi, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces homo ou hétérofermentaires selon la nature et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation du glucose.



**Figure 04 :** Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques.

ATP : adénosine triphosphate.

ADP : adénosine diphosphate.

$NAD^+ / NADH, H^+$  : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

$P_i$  : phosphate inorganique. (Makhloufi., 2012)

### II.7. Fermentation des bactéries lactiques :

#### II.7.1. Voie homofermentaire :

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pédiocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (**Thompson et Gentry-Weeks., 1994**). Des sucres autres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie : monosaccharides, disaccharides, hexitols. Ces micro-organismes présentent un métabolisme de type homolactique lorsque le lactate représente plus de 90 % des produits de fermentation. Dans certaines conditions de croissance (certains sucres, limitation carbone.), le métabolisme de ces bactéries se diversifie vers un métabolisme mixte avec production en plus du lactate, de formiate, de CO<sub>2</sub>, d'acétate et d'éthanol (**Cocaign-Bousquet et al., 1996**). La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaires et indispensable au fonctionnement de la voie EMP. Cette enzyme catalyse la réaction menant à partir du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) à deux molécules à 3 carbones, le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP).

#### II.7.2. Voie hétérofermentaire :

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique (moins de 1,8 moles par mole de glucose), de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites hétérofermentaires (**Thompson et Gentry-Weeks., 1994**). Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostocs et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA, d'une triose-phosphate isomérase (TPI) ainsi que d'un système PTS fonctionnel. Dans ces conditions, le glucose est accumulé par l'intermédiaire d'un transport actif puis subit une phosphorylation intracellulaire par le biais d'une glucokinase (GLK) ATP-dépendante. Le glucose-6-phosphate emprunte ensuite la partie oxydative de la voie des pentoses-phosphate qui conduit à la formation de xylulose-5-phosphate. Le xylulose-5-phosphate est scindé en acétyl-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate par la D-xylulose-5-phosphate phosphocétolase, enzyme spécifique à la voie hétérofermentaire. Enfin, l'acétyl-phosphate est converti en éthanol ou en acétate, et le GAP qui rejoint la glycolyse est métabolisé en acide lactique. Le métabolisme hétérofermentaire

est deux fois moins énergétique que le métabolisme homofermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO<sub>2</sub> et d'un seul ATP.

### II.7.3. Métabolisme des protéines (la protéolyse) :

Après l'utilisation des acides aminés et des peptides libres, les bactéries lactiques doivent hydrolyser les protéines pour croître dans le lait. Le système protéolytique de ces bactéries est constitué de deux types d'enzymes distinctes : les protéases capables d'hydrolyser des protéines natives par exemple les caséines ou leurs dérivés et les peptidases détectées par l'hydrolyse de peptides issus de la dégradation des protéines. Ces enzymes peuvent être intracellulaires ou liées à la paroi bactérienne (Leveau et al., 1993).

Les enzymes intracellulaires peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire par l'autolyse bactérienne liée à l'âge de la cellule ou aux conditions physiologiques défavorables qui activent les autolysines capables d'hydrolyser les peptidoglycanes de la paroi (Roudj et al., 2009). La protéolyse du lait par les bactéries lactiques est résumée dans la (figure05)

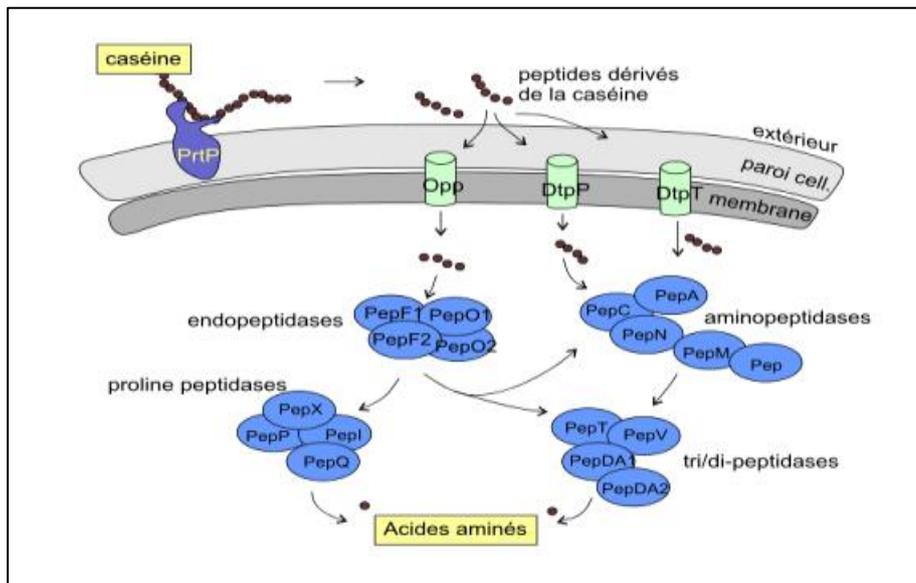


Figure 05 : Protéolyse du lait par les bactéries lactiques

La machinerie protéolytique du lactocoque est composée : d'une protéase extracellulaire ancrée à la paroi (PrtP), de trois systèmes de transport de peptides et d'un grand nombre de peptidases intracellulaires (figure) (Casaburi et al., 2008).

### II.7.4. Métabolisme des acides gras (la lipolyse) :

Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et di glycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la flaveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de méthylcétones, alcools, lactones et esters (Siegumfeldt et al., 2000). La figure 06 présente les différentes voies conduisant à la formation de ces composés.

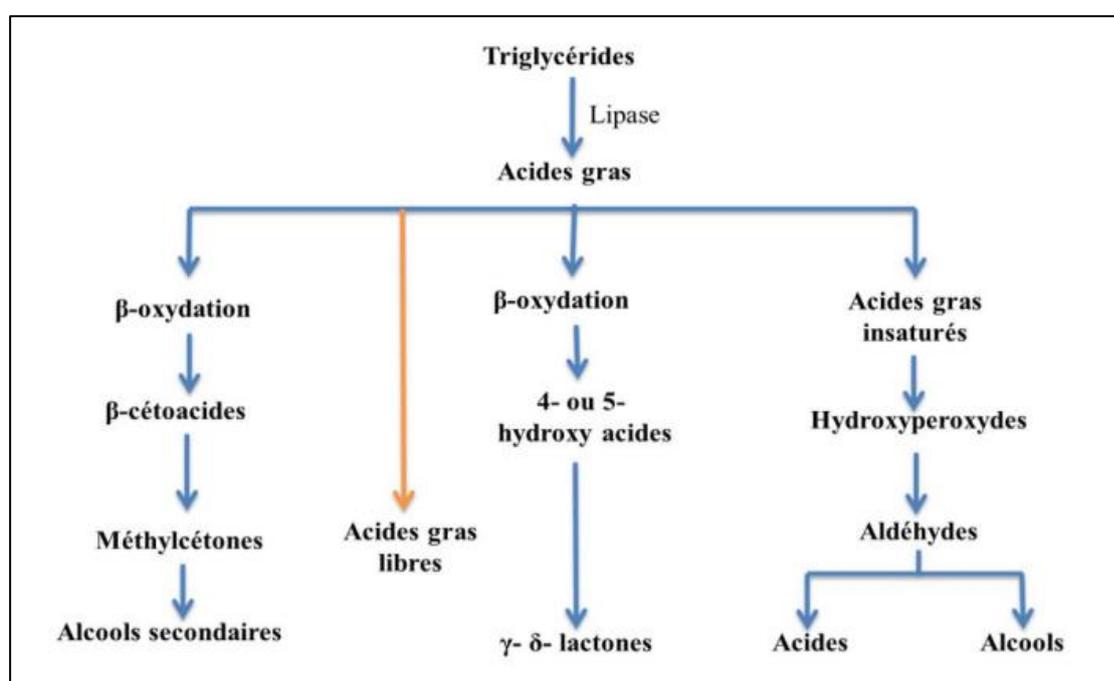


Figure 06 : Principale voie de lipolyse (Siegumfeldt et al., 2000)

### II.8.1. Intérêt des bactéries lactiques :

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

### II.8.2. Dans l'industrie alimentaire :

Ce sont des laits fermentés et l'acidification se traduit par la formation de caillé + ou –.

Selon des bactéries lactiques sont présentes, Selon le produit, la fermeté souhaitée (yaourt ferme) ou crème (yogourt brassé ; kéfir) pour obtenir une consistance définie.

L'utilisation de souches plus ou moins acidifiées peut être combinée avec l'utilisation de souches productrices de polysaccharides (**Belaidouni, 2017**).

### II.8.3. Pouvoir texturant :

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (**Welman et Maddox, 2003**). Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire. Les *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés en tant que starters fonctionnels dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (**Durlu-Özkaya et al., 2007**). L'utilisation des EPS produits par les souches *Lactococcus lactis ssp. cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (**Ruas-Madiedo et al., 2005**).

### II.8.4. Pouvoir aromatisant :

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate : l'acétoïne et le diacétyl sont les plus importants (**Tamime, 2002**). Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (**Cholet, 2006**). La production de diacétyl est généralement associée à la fermentation du citrate. Les lactobacilles synthétisent de l'acétaldéhyde. La teneur en acétaldéhyde est à la fois fonction de son degré de synthèse et du rythme de sa dégradation (**Vignola, 2002**).

Les leuconostocs hétérofermentaires sont souvent associés aux lactocoques dans la production de composants aromatiques (éthanol, acide acétique, diacétyl et acétoïne) (**Mahaut et al, 2000**).

### II.8.5. Pouvoir protéolytique :

La protéolyse joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques chez les bactéries lactiques : nutrition azotée, activation et dégradation de protéines, la machinerie protéolytique des bactéries lactiques est constituée d'un ensemble d'enzyme qui diffèrent par leur mécanisme catalytique, leur spécificité d'hydrolyse, leur localisation cellulaire et leur rôle. Les bactéries lactiques possèdent un système protéolytique complexe qui assure leur croissance dans des milieux à faibles concentrations en acides aminés libres et oligopeptides comme le lait (**Vignola et al., 2002**).

Le système protéolytique joue un rôle clé dans la fermentation du lait et permet l'obtention des acides aminés à partir des caséines, les protéines les plus abondantes dans le lait (**Moussaoui, 2013**).

### II.8.6. Pouvoir lipolytique :

La lipolyse a été largement étudiée dans le domaine alimentaire. Elle joue un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés tels les jambons secs et les saucissons secs, bien que parfois elles soient à l'origine d'altérations. L'addition des lipases exogènes augmente significativement et rapidement la concentration en acides gras libres des produits fermentés (**Nguyet, 2008**).

Les bactéries lactiques possèdent des enzymes lipolytiques capables d'hydrolyser une multitude d'esters d'acides gras, des substrats de tri-di et mono acylglycérols (**Liu et al., 2001**). L'activité lipolytique est relativement faible chez les ferments lactiques, et de très faible activité estérolytique, l'activité lipasique contribue à l'élaboration de la saveur dans les produits laitiers particulièrement dans la maturation des fromages (**Mahamedi, 2015**).

### II.8.7. Activité acidifiante :

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques dans la fabrication des produits fermentés, les bactéries lactiques provenant des matières premières ou de l'environnement sont responsables de la production d'acide lactique résultant de l'utilisation des hydrates de carbone (**Visessanguan et al, 2006**). L'activité acidifiante des ferments dépend de la nature et de l'équilibre entre les différentes souches présentes, en particulier, la présence de certaines espèces ou mélanges d'espèces différentes va permettre d'obtenir l'activité voulue.

Cependant, il est important de souligner qu'il existe une forte variabilité de l'activité acidifiante des bactéries lactiques, y compris au sein d'une même espèce (**Corrieu et Luquet, 2008**).

### II.9. Rôle dans la conservation :

- ✓ Production d'acide lactique : ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.
- ✓ Production de bactériocine : Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand de nombreuses souches de bactéries lactiques, elles sont généralement thermorésistantes (**Belaidouni, 2017**).

### II.10. Effets sur les propriétés sensorielles :

En produisant des produits autres que l'acide lactique, tels que le diacétyle et l'acétaldéhyde, qui est responsable de la saveur unique (**Boudjema, 2008**).

### II.11. Dans le domaine thérapeutique :

Différentes bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de lamicroflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (**Yateem et al., 2008**). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (**Mkrtchyan et al., 2010**).

D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (**El-Ghaish et al., 2011**).

Certaines souches comme *Lactobacillus crispatus* ont démontré la capacité de protection vis-à-vis des infections et utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie (**Belaidouni, 2017**).

### II.12. Pouvoir antimicrobien : (Antibactérien, Antagoniste) :

Les bactéries lactiques peuvent synthétiser des substances antibactériennes et sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments. (Labioui et al., 2005)

Les bactéries lactiques constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments, du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des microorganismes nuisibles (Caridi et al., 2003). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutérine, du diacétyl et des bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

Durant la fermentation du lait, différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques.

- Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries.
- Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes (Ammor et al., 2006).
- Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Leur spectre d'action est généralement étroit. Cependant, la plupart ont une activité contre des pathogènes alimentaires tels que *Listeria monocytogenes* (Dortu et Thonart, 2009).

# Chapitre III : Les Bactériocines

### III.1. Historique :

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

### III.2. Définition :

Les bactériocines sont des substances antibactériennes produites par certains germes bactériens comme les bactéries lactiques, ces molécules sont de la nature peptidique ou protéique, de poids moléculaire variable, à activité bactéricide, soit à spectre étroit (contre des espèces apparentées) soit à large spectre (contre différents genres). La biosynthèse de la bactérie est une caractéristique très recherchée dans les milieux industriels alimentaires et pharmaceutiques en raison de son potentiel en tant que bioconservateur et biopréservateur (**Mermouri, 2018**).

### III.3. Nomenclature :

La nomination des bactériocines est attachée soit au genre ou à l'espèce de la première souche productrice en ajoutant le suffixe « cine » pour indiquer le pouvoir létal ; par exemple: la plantaricine est la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* (**Karthikeyan et Santhosh, 2009**).

### III.4. Nature :

Les bactériocines des bactéries lactiques sont des protéines ou des complexes de protéines constituées généralement de 30 à 60 acides aminés. Ces substances peuvent être des protéines simples comme elles peuvent être associées à une partie lipidique ou glucidique. Certaines d'entre elles renferment des acides aminés inhabituels tels la lanthionine et la  $\beta$ -méthyle lanthionine (**Karthikeyan et Santhosh, 2009**).

### III.5. Propriétés :

Certains critères des bactériocines produites par les bactéries lactiques justifient leur choix comme bioconservateurs (**Thakur et Roy, 2009**) :

- Considérées comme „GRAS“ (Generally Recognized As Safe) ;
- Inactives et non toxiques contre les cellules eucaryotes ;
- Généralement thermostables et tolérantes aux variations du pH ; - possèdent un spectre d'activité relativement large ;
- Mode d'action généralement bactéricide (membrane cytoplasmique) ;
- Déterminants génétiques codés par les plasmides ;
- Sensibilité aux protéases et digestibilité dans le tractus intestinal

### III.6. La classification des bactériocines :

Les bactériocines des LAB constituent un groupe hétérogène d'antagonistes bactériens dont la taille moléculaire peut aller de quelques milliers de daltons jusqu'à des molécules beaucoup plus complexes, mais dont la nature est exclusivement protéique. En se basant sur leurs caractéristiques structurelles et activité biologique (**klaenhammer(1993)**) a établi quatre classes de bactériocines, dont seulement trois sont maintenues actuellement (**Nes et al, 1996**) la découverte et la caractérisation de nouvelles bactériocines ont imposé des modifications notables sur la classification proposée par klaenhammer.

**Tableau 4** : classification des bactériocines de bactéries lactiques (d'après **Nes et al. 1996**)

Classe	Sous catégories
Classe I : lantibiotique	Type A : molécule linéaire Type B : molécule globulaire
Classe II : bactériocines non modifiées thermostables.	Classe IIa : anti-Listeria Classe IIb : bactériocine à deux composants Classe IIc : autres bactériocines
Classe III : bactériocines à grande taille sensible à la chaleur	

### III.6.1. Les bactériocines de la classe I :

#### III.6.1.1. L'antibiotique :

Possèdent une masse moléculaire comprise entre 1.8KDa et 4.1KDa et contiennent des acides aminés particuliers obtenus par modification post-traductionnelle, qui sont la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl-lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine (Carine et al, 2009). La classe des lantibiotique est divisée en six groupes en fonction de leur homologie de séquence, on trouve les cartes groupes décrit par (Towmey et al (2002) :

□□ **Groupe nisine** : Des lantibiotiques de type linéaire ; cationique structurées en hélice  $\alpha$  amphiphiles et de masse moléculaire comprise entre 2,1 et 3,5 KDa. (Towmey et al, 2002).

- **Groupe lacticine 481** : Ont une masse moléculaire comprise entre 2,3 et 3,5 KDa et présentent une structure linéaire en position N-terminale et globulaire dans la partie C terminal. (Towmey et al, 2002).
- **Groupe Mersacidine** : Ces lantibiotiques ont une masse moléculaire comprise entre 1,8 et 2,0 KDa et possèdent une forme globulaire (Towmey et al, 2002).
- **Groupe cinnamycine** : Ce groupe comprend des lantibiotiques ayant une masse moléculaire comprise entre 1,9 et 2,0 KDa et sont secrétés par des bactéries appartenant au genre Streptomyces. (Towmey et al., 2002).
- **Groupe à deux composants** : Ce groupe correspond aux lantibiotiques possédant deux composés peptidiques. La masse moléculaire de ces peptides est comprise entre 2,6 et 4,2 KDa. Les deux peptides ont un effet synergique sur les cellules cibles.

#### III.6.1.2. Bactériocines de classe II :

Les bactériocines de la classe II Sont de faible masse moléculaire (<10KDa); thermostables et ne subissent pas de modification post traductionnelle. Cette classe a un grand nombre de bactériocines et a été divisée en trois sous classe (Drider et al, 2009)

□□ **Sous classe IIa**: Sont des peptides composés de 36 à 48 acides aminés (Drider et al, 2009). Les bactériocines de cette classe sont actives contre les bactéries des genres *Listeria*, *Enterococcus*, *Lactococcus* (Calvez et al, 2009).

□□ **Sous classe II b**: La sous classe II b représente les bactériocines à deux composants peptidiques qui y a un nombre d'acides aminés compris entre 30 et 40. (Carine et al., 2009).

**Sous classe IIc** : Contient les bactériocines telle que la lactococine B. La classification actuelle définit les bactériocines de la sous classe IIc comme étant les bactériocines n'ayant pas toutes les caractéristiques de sous-classes IIa et II b (Calvez et al, 2009).

### III.6.1.3. Bactériocines de classe III :

Ont une masse moléculaire supérieure à 10KDa et sont thermosensibles (Calvez .2009).La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Voir **tableau 4** Cette classe ne contient que quatre bactériocines.

**Tableau 5** : les quatre bactériocines de la classe III (Moll et al, 1999).

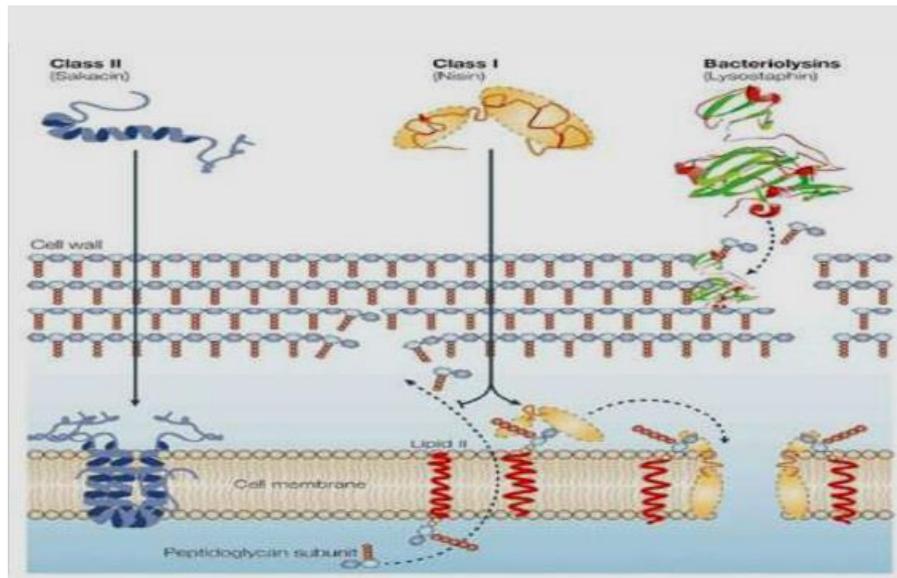
<b>Bactériocines</b>	<b>Espèces producteur</b>
Helveticin	<i>lactobacillus helveticus</i>
Entérolysine A	<i>Enterococcus faecium</i>
Zoocin A	<i>sterptococcus zooepidmicus</i>
Millericin B	<i>sterptococcus milleri</i>

### III.7. Mode d'action des bactériocines :

L'activité inhibitrice des bactériocines se manifeste par une interaction avec les lipides anioniques constituant les membranes bactériennes. Elle aboutit à :

- la formation de pores dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles
- la chute du potentiel de membrane menant à la perte de leur force proton motrice
- une rupture du métabolisme énergétique.
- l'arrêt de la synthèse de macromolécules qui conduisent à la mort des cellules cibles.

L'action des bactériocines sur les cellules cibles peut également entraîner des effets bactériostatiques et sporostatiques (Gonzalez et al.1994, Tagg et al.1976)



**Figure 07** : Mode d'action des bactériocine de bactéries lactiques (Paul et al ., 2005)

### III.8. L'intérêt des bactériocines :

Les bactériocines sont maintenant largement utilisées en science alimentaire pour prolonger la durée de conservation des aliments (Ghraiiri et al, 2012), qui inhibent l'infection pathogène des maladies animales et l'industrie pharmaceutique et médicale pour le traitement des cancers malins (Lancaster et al, 2007).

### III.9. Domaines d'application des bactériocines :

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes. Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogène ou d'altération sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (Galvez et al., 2007). Les bactériocines doivent cependant être considérés comme un moyen de préservation complémentaire à ceux existant.

### III.9.1. Utilisation alimentaire :

Les bactériocines sont employées dans plusieurs domaines. Leur utilisation dans le domaine alimentaire est devenue très intéressante grâce à leur potentiel d'assurer une sécurité microbienne et une bonne qualité du produit alimentaire (**Benech et al., 2002**). L'utilisation des bactériocines comme additifs naturels dans les aliments a suscité l'intérêt du consommateur qui cherche à minimiser l'utilisation des additifs chimiques artificiels dans les produits alimentaires.

Plusieurs études ont montré l'efficacité de la nisine en tant qu'agent de conservation dans les aliments comme la truite fumée, les produits à base d'œufs liquides pasteurisés les fromages et d'autres produits laitiers Afin de s'assurer de l'efficacité des bactériocines utilisées pour des applications alimentaires en tant que préservateurs, un conservateur alimentaire doit avoir les propriétés suivantes :

- être actif sur les micro-organismes pathogènes aussi bien que sur ceux responsables des altérations des aliments ;
- être inoffensif pour les humains ou les animaux ;
- être stable et non détruit au contact de l'aliment ou du micro-organisme ;
- être rapidement soluble et distribué uniformément dans l'aliment (**Delves-Broughton et al., 1996**).

# Partie Expérimentale

## CHAPITRE IV : Matériels et Méthodes

# Chapitre IV : Matériels et Méthodes

## Matériels et méthodes :

### 1. Objectif :

Les objectifs de cette étude s'appuient sur les points suivants :

- Isolement des bactéries lactiques de différentes sources laitières naturelles
- Etude des caractéristiques phénotypiques, physiologiques et biochimiques des souches isolées.
- Caractérisation phénotypique, physiologique et biochimique d'isolats de bactéries lactiques.
- Recherche des propriétés technologiques des isolats, Le rôle antagoniste des souches lactiques contre les souches pathogènes.

### 2. Lieu et période d'étude :

L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire de microbiologie de l'université de Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem durant une période de deux mois allant du 01 Mars jusqu'au 10 Mai 2024.

### 3. L'échantillonnage et techniques de prélèvement de lait :

L'échantillon de lait cru de chamelle provient de la Wilaya de Laghouat et de chèvre de Wilaya de Mostaganem. Les échantillons ont été recueillis dans un flacon en verre de 250ml stérile et conservé dans une glacière et acheminé directement au laboratoire de Microbiologie de l'université de Mostaganem.

Les échantillons ont été soigneusement étiquetés (lieu et date de prélèvement...).

### 4. Matériels expérimentaux :

#### 4.1. Les souches pathogènes :

**Tableau 6** : les souches pathogènes utilisé pour l'antagoniste

La souche	Code
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC35659
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700603
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853

Les souches pathogènes de référence ont été obtenues avec l'aide de la Doctorante Maghnia DJ.

## 5. Analyses physico chimiques :

### 5.1. Mesure de pH :

La valeur du pH a une importance exceptionnelle par l'abondance des indications qu'elle donne sur la richesse du lait en certains de ces constituants, sur son état de fraîcheur ou sur sa stabilité (Mathieu, 1998).

### 5.2. Détermination de l'acidité titrable :

L'acidité peut être titrée de façon précise à l'aide de la soude Dornic (N/9).

On introduit 10 ml de lait à analyser dans un bécher de 100 ml en présence de 0,1 ml de phénolphtaléine à 1% dans l'alcool à 95%. La soude Dornic (N/9) est rajoutée (à la burette) jusqu'au virage au rose pâle. La coloration rose doit persister au moins 10 secondes (Guiraud, 1998).

L'acidité est exprimée en degrés Dornic (°D) selon la formule suivante :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \cdot 10$$

$V_{\text{NaOH}}$  : Volume de la soude Dornic utilisé pour la titration.

## 6. Isolement et culture de la souche lactique :

### 6.1. Préparation des échantillons :

Isolement et identification des souches lactiques se fait après coagulation de lait crue (lait de chèvre et le lait de chamelle).

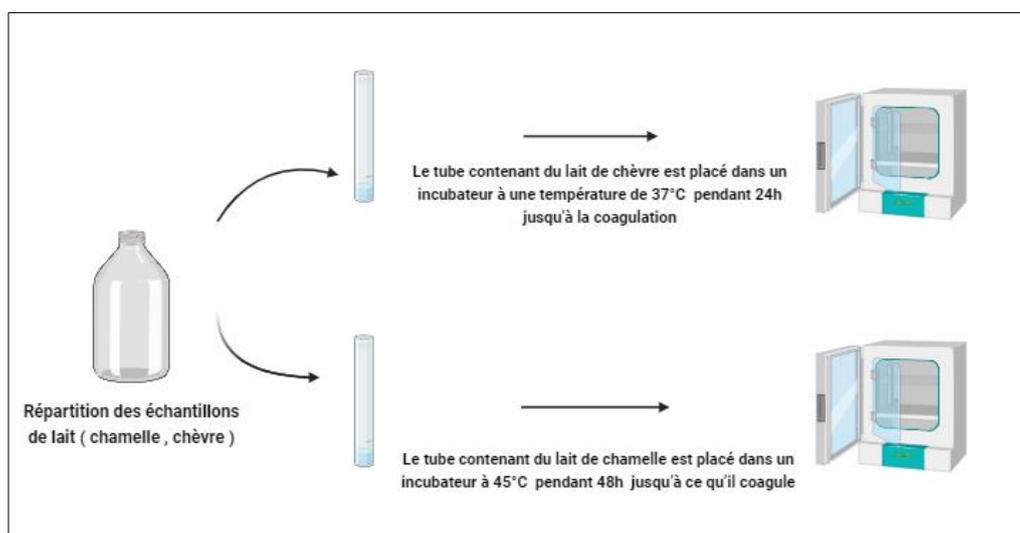
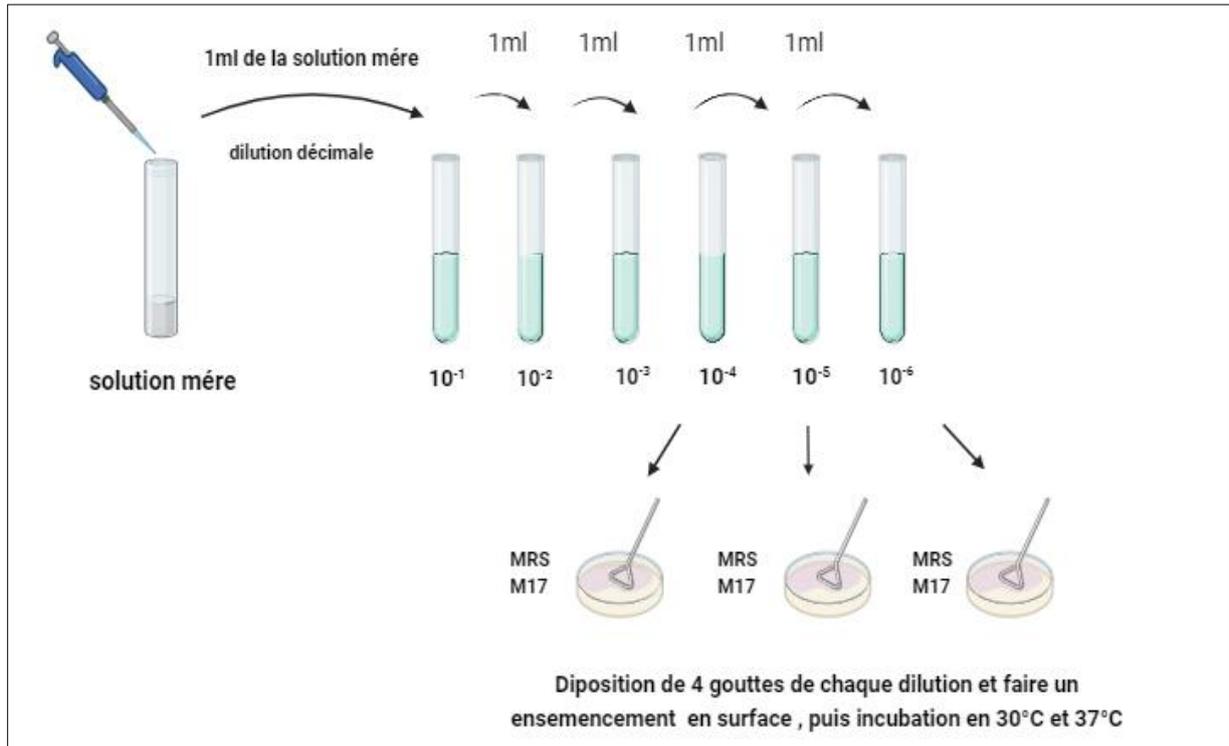


Figure 08 : Schéma représentatif de la préparation de l'échantillon

### 6.2. Les dilutions :

Après homogénéisation des tubes contenant les échantillons, on effectue des dilutions décimales qui vont en général de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-6}$ . On prélève à partir des 03 dernières dilutions 0,1 ml qu'on étale en surface sur milieu (MRS ou M17) les boîtes sont incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures.



**Figure 09 :** Schéma représentative de la technique de dilution et d'ensemencement

- Incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h pour l'isolement des streptocoques lactiques (*Lactococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*) sur milieu M17 (Guiraud, 2003, Bekhouche, 2006).
- Incubation à  $30^{\circ}\text{C}$  et à  $45^{\circ}\text{C}$  pendant 72h sur milieu MRS, pH=5,5 pour l'isolement des Lactobacilles mésophiles et thermophiles respectivement (Corrieu et al., 2008, Doumandji et al., 2008, Kerfouf et al., 2010).

## Chapitre IV : Matériels et Méthodes

### 6.3. Purification :

La purification est effectuée par quatre repiquages successifs d'étalement en milieux MRS et M17 solides (Labioui et al., 2005).

Les souches bactériennes sont ensemencées par la méthode des stries sur milieu solide et cultivées à une température de 37°C pendant 24h-48h et 72h. Seules les bactéries à Gram positif et catalase négative ont été retenues.

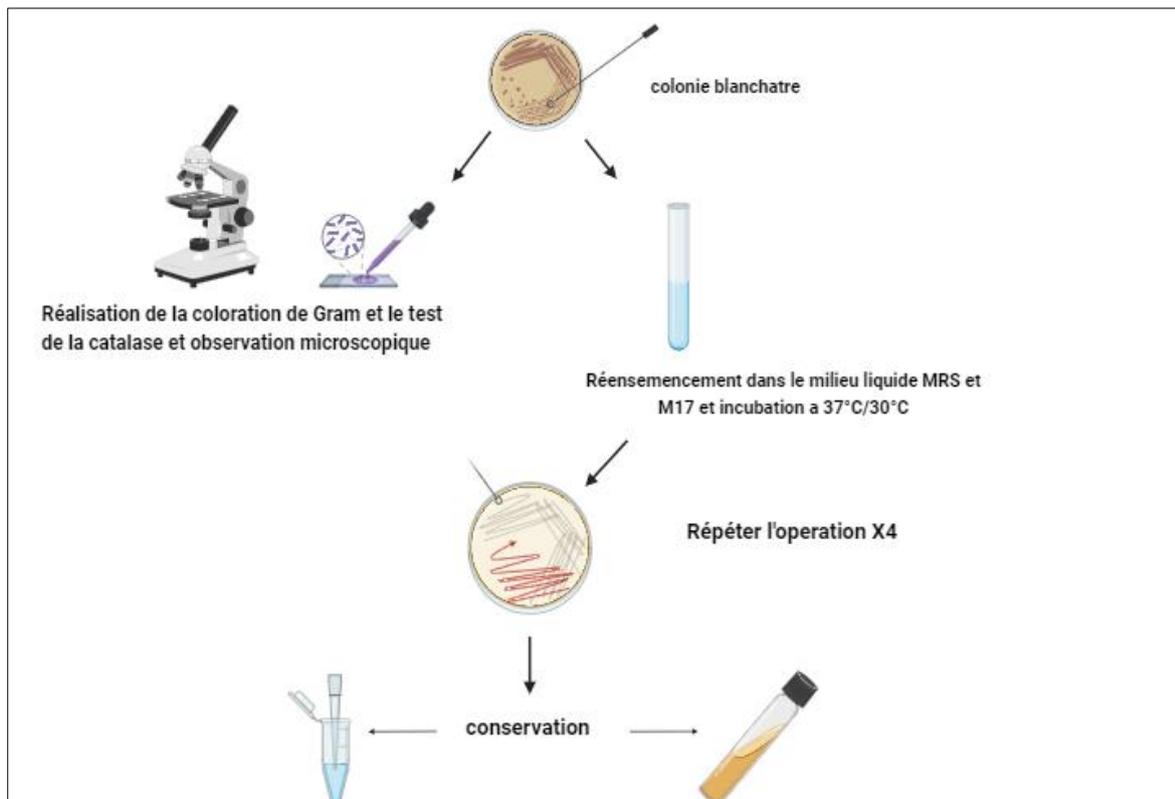


Figure 10 : Schéma représentative de la méthode de purification

## 7. Conservation des bactéries lactiques :

### 7.1. Conservation à court terme :

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 30°C pendant 18 heures, les tubes sont conservés à 4°C. Le renouvellement des cultures se fait tous les trois semaines (Saidi et al, 2002).

### 7.2. Conservation à long terme :

Les souches sont congelées dans des tubes Eppendorf à -20°C dans une solution contenant 70% de glycérol et 30% de Bouillon de milieu de culture.

## 8. Caractérisation et identification des souches lactiques :

### 8.1 Caractérisation morphologique :

Des observations macroscopiques et microscopiques des isolats ont été utilisées pour concevoir cette étude.

#### 8.1.1 Examen macroscopique :

Cet examen permet de constater la morphologie des colonies obtenues sur milieux solide. Ainsi, déterminer la forme, taille, couleur et aspect des colonies et sur milieu liquide présentant un trouble du milieu. (Johnson et al., 1980).

#### 8.1.2 Examen microscopique :

Le frottis bactérien a été préparé à partir de colonies suspectes en cultures pures, puis fixé et coloré par la méthode de Gram. (Voir l'annexe).

#### 8.1.3 Coloration de Gram :

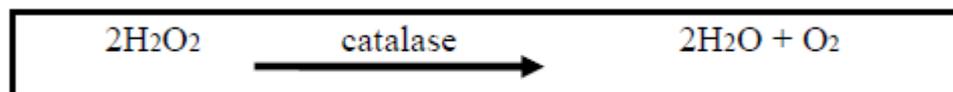
La coloration de Gram est effectuée sur frottis. Elle permet de distinguer deux types de bactéries, les bactéries Gram négatifs (G-) et les bactéries Gram positives (G+). Celles-ci diffèrent par la composition de leur paroi, notamment par l'épaisseur du peptidoglycane, par la présence d'une membrane externe (Larpen, 1990).

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, elles fixent le violet de Gentiane.

## 9. Tests physiologiques :

### 9.1 Recherche de catalase :

La catalase est une enzyme de dégradation de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) en eau métabolique ( $H_2O$ ) et oxygène ( $O_2$ ). La colonie est émulsionnée dans une goutte d'eau oxygénée, placée sur une lame propre. Le processus chimique de dégradation d'eau oxygénée est le suivant :



## Chapitre IV : Matériels et Méthodes

---

### 9.2. Test de croissance à différentes températures :

L'aptitude à la culture est testée à 15°C, 37°C et à 45°C en ensemençant des tubes de bouillon M17 et MRS. Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Leveau et al, 1991). Les tubes sont examinés pendant une période de 24h à 48h, et la croissance est appréciée par l'apparition de trouble.

### 9.3 Test de croissance en différents pH : (pH=9,6 ; pH=6,5 ; pH=4.5)

Toutes les souches sont inoculées dans des tubes contenant 5 ml de milieu stérilisé avec un bouillon MRS ajusté à différents pH avec une solution de NaOH ou d'HCl.

#### 9.3.1 La croissance à pH=9.6 :

Ce test a pour but de distinguer *Enterococcus* et *Streptococcus thermophilus*. Après avoir l'ensemencement dans un milieu MRS avec un pH de 9,6 pendant une période de 24 heures, la culture est incubée à 37°C. Un trouble dans le tube se traduit par une croissance.

#### 9.3.2 La croissance à pH=4.5 :

Il permet de caractériser le *Lactobacillus*. Les étapes décrites à pH=9,6 sont reproduites. L'apparition d'un trouble dans le tube est également un signe de croissance.

### 9.4 Test de thermo-résistance :

Ce test permet de séparer ou d'identifier les souches qui supportent 60°C pendant 30 minutes.

Les souches sont inoculées en milieux liquides (MRS ou M17), la culture bactérienne doit être jeune et pure 18h. Les tubes sont introduits dans un bain marie à 60°C pendant 30 minutes, puis incubés à 37°C durant 24 à 48 heures. Un résultat positif se traduit par un trouble (De Roissart et al, 2006).

Seules les souches thermophiles se développent, tandis que les souches mésophiles ne peuvent pas se développer.

# Chapitre IV : Matériels et Méthodes

---

## 9.5 La tolérance de la salinité:

Les cultures à tester ont étéensemencées sur du bouillon hypersalé avec 6,5% et 4% de NaCl.

Les tubes sont mis en incubateur à 37°C pendant 24 heures. Les lactocoques lactiques ne peuvent pas survivre dans ce milieu de 6.5%.

## 9.6. La croissance sur le lait de Sherman :

Un volume de 5 ml du lait écrémé additionné de 0,1 % ou 0,3 % de bleu de méthylène a été versé dans chaque tube à essais. Les tubes sont stérilisés à 110°C pendant 10 min,ensemencés puis incubés à 30°C pendant (16-72h). Si le lait reste entièrement bleu, la bactérie ne peut pas se développer et elle est donc sensible au bleu de méthylène. Le virage de couleur du lait vers le blanc est traduit par une réduction de bleu de méthylène, résultat des fermentations bactériennes. Un anneau bleu, dû à l'action de l'oxygène présent dans le tube, se forme à la surface. Dans ce cas la bactérie est résistante au bleu de méthylène (**Mami et al, 2013**)

## 10. Tests biochimique :

### 10.1 Recherche de l'arginine di hydrolase (ADH) :

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Pour réaliser ce test, La bouillon M16BCP a étéensemencé en surface par les souches isolées à partir de lait de chèvre et de chamelle. Les bactéries lactiques utilisant le lactose donnent une coloration jaune en acidifiant le milieu, alors que d'autres sont capables d'utiliser l'arginine et ré Alcaliniser le milieu en changeant la couleur du jaune au violet (**Thomas, 1973**).

### 10.2 Production de l'acétoine: (Acétyle-Méthyle-Carbinol) :

Sur milieu de Clark et Lubs, et après ensemencement des souches et incubation à 37°C pendant 24 à 48 h. La production de l'acétoine est testée par la réaction de Vogues-Proskauer (VP) et s'applique de la façon suivante :

Dans un tube à essai on introduit 1ml de la culture à tester, on ajoute 5 gouttes du réactif VPI (solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VPII ( $\alpha$ -naphtol à 6% dans l'alcool à 95%). On agite soigneusement les tubes et laisse reposer 5 à 10 min à température ambiante. Le test positif se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu, après 10 min. (**Guiraud, 1998**).

## Chapitre IV : Matériels et Méthodes

---

### 10.3 Recherche du type fermentaire :

Ce test permet de classer les bactéries en hétérofermentaire ou homofermentaire. On ensemence abondamment un tube de 10 ml de bouillon MRS ou M17 dans le milieu on introduit une cloche de Durham, le dégagé par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans la cloche après l'incubation à 30°C pendant 24h à 48h (**Garvie, 1986**).

### 10.4 Production de dextrane :

On utilise le milieu : Mayeau, Sandine et Elliker, 1962 (la composition du milieu en annexe). La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE (**Mayeux et al, 1962**). La formation de colonies larges, visqueuses et gluantes caractérise les souches productrices de dextrane.

### 10.5 Utilisation citrate de Simmons:

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone: le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu.

La pente du milieu est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubé à 30°C pendant 5 jours.

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

### 10.6 Utilisation des carbohydrates:

La fermentation des carbohydrates a été menée sur milieu MRS sans extrait de viande, sans sucre et additionné de pourpre de bromocrésol BCP comme indicateur de pH.

Ce test a été réalisé sur des microplaques contenant des puits, chaque ligne verticale comporte un sucre qui sera utilisé par différentes souches, chaque puits contient 200µl de MRS.BCP avec 100µl de la suspension bactérienne, le tout a été recouvert par une couche d'huile de paraffine (**BADIS et al, 2005**). Des solutions sucrées ont été préparées de 1g de chaque sucre avec 10ml de l'eau distillé stérile, le tout a été homogénéisé puis stérilisé à 100°C pendant 15 min au bain-marie (**Belarbi, 2011**).

Après 24-48 heures d'incubation à 37°C, tous les sucres fermentés virent au jaune, ceci signifie l'utilisation du sucre par les bactéries.

La microplaquette a été incubée à 30°C pendant 72h et vérifié chaque 24h (**Guessas, 2006**).

Le virage du milieu de vert au jaune indique que la souche lactique fermente la source de carbones au cours de sa croissance (**Bauer et al, 2005**).

## 11. Caractérisation technologique des souches :

### 11.1 Activité protéolytique :

Nous avons testé l'activité protéolytique des souches isolées, par utilisation de milieu MRS additionnée de 10% de lait écrémé. Les bactéries à tester ont étéensemencées à la surface de ces milieux de cultures à l'aide d'un inoculateur multipoint, puis incubées à 30°C pendant 24h. Le résultat attendu est un halo de protéolyse au tour de la colonie bactérienne dont on mesure le diamètre pour évaluer l'intensité de cette action (**Badis et al, 2005**).

### 11.2 Etude du pouvoir lipolytique des isolats :

La lipolyse est mise en évidence sur gélose aux triglycérides. Cette dernière a été coulée et solidifiée. Les souches à tester sontensemencées simultanément en touches à la surface du milieu de culture à l'aide d'une anse. Après incubation à 30 °C pendant 48 heures, la lipolyse est révélée par une zone claire autour des touches (**Guiraud, 2003**).

### 11.3 Etude du pouvoir acidifiant des isolats :

L'un des critères technologiques les plus importants chez les bactéries lactiques, c'est leur cinétique de production d'acide lactique. L'étude de cette cinétique permet de différencier ces souches et de les classer selon leurs potentialités à produire de l'acide lactique, qui s'avère le critère de base pour une éventuelle utilisation en industrie.

L'acidification est le rôle principal des bactéries utilisées comme ferments. Celle-ci a différents buts :

- La coagulation du lait (en facilitant l'action de l'enzyme de la présure) et l'augmentation de la synérèse du caillé.
- La participation aux propriétés rhéologiques du produit final ;
- L'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (**Papamanoli et al 2003**).

L'activité acidifiante est mesurée par le suivi temporel du pH des différentes cultures et la mesure simultanée de l'acidité totale par la soude :

#### ➤ **Mesure de pH :**

Les souches lactiques isolées sontensemencées dans des tubes contenant 9ml de lait écrémé stérile, et incubées à 30°C durant 18 h. Après homogénéisation, on verse le contenu de chaque tube dans des flacons de 200ml de lait écrémé stérile. Puis on les incubent à 30°C.

La lecture s'effectue à différentes périodes d'incubation : 0h, 2h, 4h, 6h et 24h. La mesure du pH et le dosage s'appliquent de la manière suivante :

## Chapitre IV : Matériels et Méthodes

On prélève 20ml du flacon qu'on répartit dans deux béchers à raison de 10 ml pour chacun, puis on mesure le pH (Badis et al, 2004).

### ➤ Mesure de l'acidité :

Pour le 2ème bécher de 10 ml de l'échantillon, on ajoute 3 à 4 gouttes de phénophtaléine 1% et on titre avec la soude N/9 jusqu'au virage de la couleur du blanc au rose pâle. Dans ce moment de changement, on note le volume de la soude écoulee. La couleur rose pâle persistant au moins 10 secondes (Larpent, 1997).

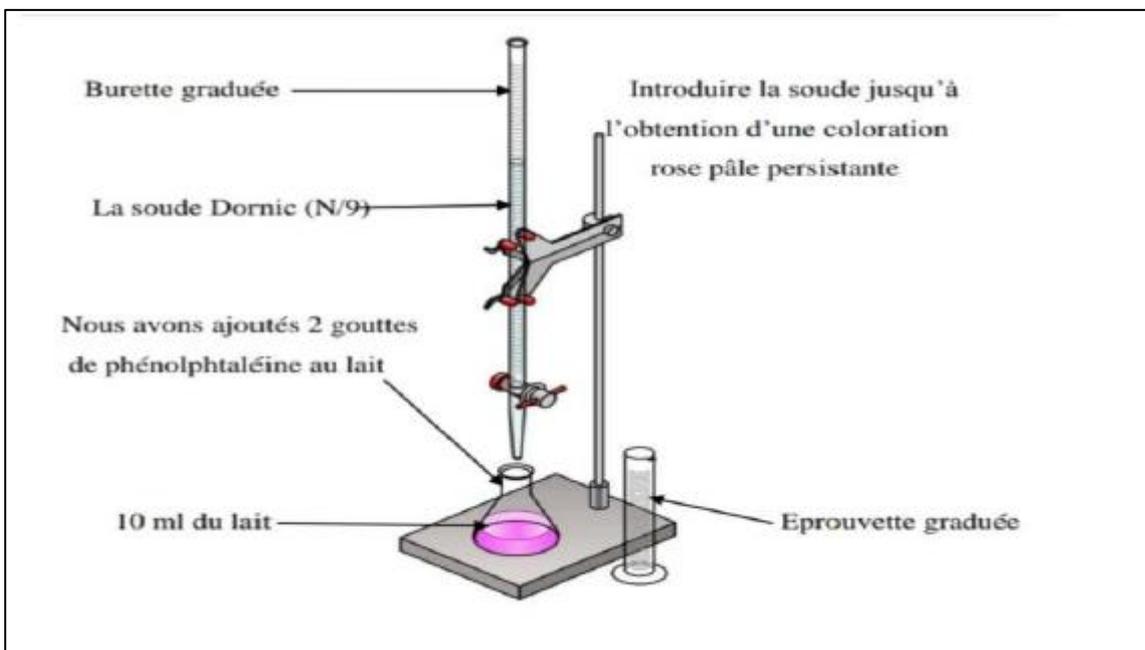


Figure 11 : Mesure de l'acidité Dornic

## 11.4 Activité antibactérienne et effet des surnageant :

Afin de déterminer la nature de la substance inhibitrice produite par nos bactéries lactiques, il est impératif de réaliser une série de tests en utilisant la méthode indirecte. Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant des souches lactiques productrices de substance antimicrobienne avec la souche test (**Tagg et al,1971**). Les souches précédemment sélectionnées pour leur production de substances antimicrobienne sont concernées par ce test. Elles souches sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures. Après (incubation ; le milieu est centrifugé 8000rpm/10min) et le surnageant est conservé a 4C° pendant 2h.

Dans une boîte de Pétri contenant du milieu solide Müller Hinton etensemencé par la souche test. Des puits sont réalisés avec un emporte-pièce. Les puits recevront 100µl du surnageant des souches lactiques (**Khaoua et al , 1997**).

Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 à 48h. Le résultat positif se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la souche productrice.

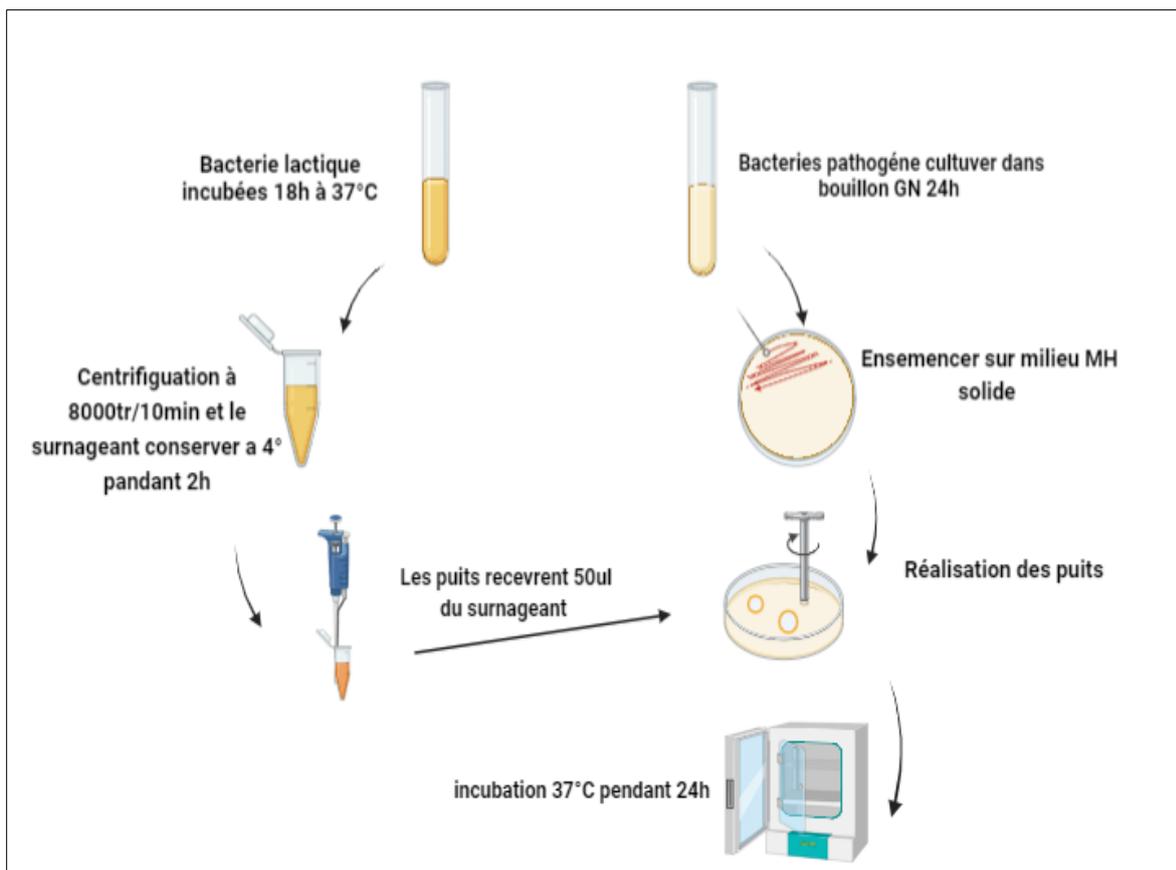


Figure 12 : Schéma de la méthode de diffusion en puits

# Chapitre V : Résultats et discussion

## Résultats et discussion :

### 1. Paramètres physico-chimiques :

#### 1.1 Le pH:

Le code de l'échantillon de lait de chamelle est **E1** et pour le lait de chèvre, c'est **E2**. Ainsi, les valeurs moyennes du pH des deux échantillons sont respectivement : **E1 = 6,57** et **E2 = 6,71**. Les résultats de la mesure du pH du lait de chamelle sont très proches de ceux obtenus dans l'étude précédente de (**Sahel et al. 2023**).

#### 1.2 Acidité titrable :

Les échantillons de lait analysé dans cette étude ont une acidité titrable allant de 12°D pour l'échantillon du lait de chamelle et 15°D pour le lait de chèvre. L'augmentation de l'acidité est un indicateur de la qualité de conservation du lait (**Cassinello et Pereira, 2001**).

**Tableau 7:** Caractéristiques physico-chimiques effectuées sur les 2 échantillons de lait analysés.

Echantillons	pH	Acidité titrable
<b>E1</b>	6.57	12
<b>E2</b>	6.71	15

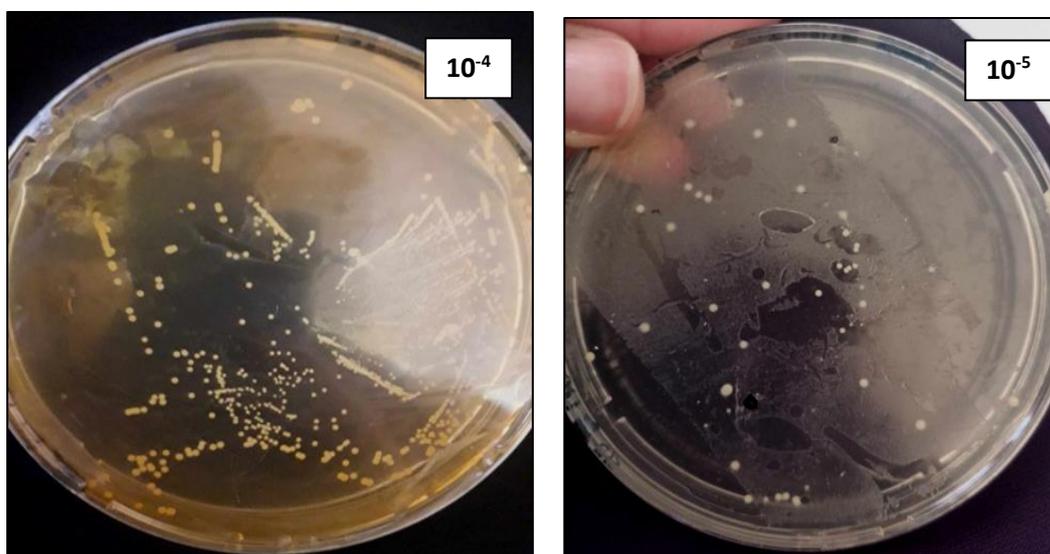
### 2. Pré-identification des isolats :

#### 2.1 Etude morphologique

##### 2.1.1 Aspect macroscopique :

L'analyse macroscopique effectuée en milieu MRS ou M17 solide a permis de constater

- Des petites colonies blanchâtres, de forme circulaire à contour régulier, lisse et légèrement bombé avec un diamètre qui varie entre 0.1 et 0.5 mm.
- Des petites colonies de forme rondes de couleur blanc opaque

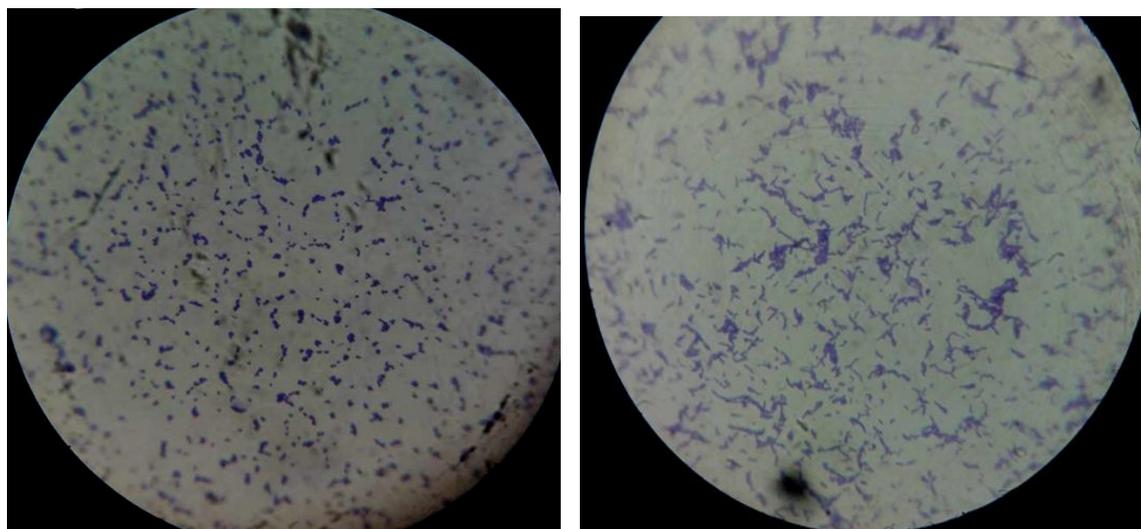


**Figure 13** : Observation de l'aspect macroscopique des souches isolées de lait de chèvre et de chamelle

##### 2.1.2 Caractérisation microscopique :

L'observation microscopique a révélé que nos souches lactiques sont Gram positives après coloration de Gram. Les différentes formes observées sont décrites comme suit :

- Des coques disposées en amas, en chaînes, et en paires.
- Des bacilles disposés en chaînes et en paires.



**Figure 14** : Observation microscopique d'une culture pure d'un isolat du lait de chèvre et de chamelle (x100)

Les souches Y1, Y2, Y3, A1, A2, A3, F1, F2, F3, CH5 sont des cocci, par contre, les souches S1, S2, S4, S5 sont des bâtonnets Gram positif et catalase négative, le mode d'association varie d'une souche à l'autre. Il est mentionné dans **le tableau N° 08**.

**Tableau 08**: Critères morphologiques des bactéries lactiques isolées

Souche	Gram	Catalase	Forme	Mode d'association
S1	+	-	Bacille	En chaine
S2	+	-	Bacille	Paire
S4	+	-	Bacille	En chaine
S5	+	-	Bacille	Isolé
A1	+	-	Cocci	Diploïde ; petit chaine
A2	+	-	Cocci	Diploïde
A3	+	-	Cocci	Sphérique, en amas
Y1	+	-	Cocci	Diploïde
Y2	+	-	Cocci	chaine
Y3	+	-	Cocci	Diploïde
F1	+	-	Cocci	chaine
F2	+	-	Cocci	Diploïde, petit chaine
F3	+	-	Cocci	Diploïde, petit chaine
CH5	+	-	Cocci	Isolé

# Chapitre V : Résultats et discussion

## 3. Résultat de purification :

Après le repiquage dans le bouillon et l'ensemencement à nouveau sur boîte de pétrie contenant gélose MRS ou M17 on obtient des colonies de même taille et même aspect.



Figure 15 : Résultat de la purification

## 4. Les tests physiologiques

### 4.1 Recherche de catalase :

Les résultats de ce test ont révélé que toutes les souches isolées sont catalase négatives.



Figure 16 : Test de catalase négative

### 4.2 La croissance aux différentes températures :

La température d'incubation variable des différents isolats est un critère physiologique de sélection pour l'identification et la démonstration d'aptitudes biotechnologiques (**Tableau N° 09**).

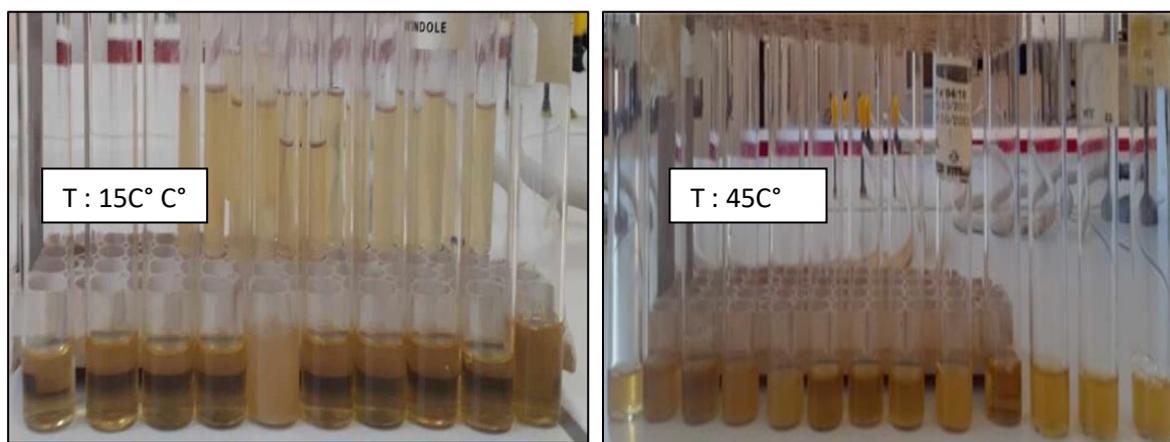
Les résultats de ce test permettent de distinguer les souches mésophiles qui poussent à 37°C, les psychrophiles qui poussent à 15°C et les thermophiles qui se développent à 45°C.

## Chapitre V : Résultats et discussion

Les souches A1, A2, A3, poussent bien à 15°C et 37°C et incapables de pousser à température 45°C alors ils sont des mésophiles.

Les souches S1, S2, S4 Y1, F2, F3, S5, CH5 sont capables de croître à 45°C donc sont de type thermophile.

Les souches Y2, Y3, F1 sont capable de pousser a tous les Températures.



**Figure 17** : La croissance à différentes températures

### 4.3 La Croissance à différents pH :

La croissance dans des milieux MRS à différents pH (4.5, 6.5 et 9.6) a entraîné un trouble bactérien visible et les résultats suivants ont été obtenus.

Les souches S1, S2, S4, S5, A1, Y1, Y2, Y3, F1, F2, F3, CH5 sont marquées positives (+) pour la croissance à pH 4,5.

À pH 6,5, nous avons remarqué que toutes les souches se développaient à cette valeur de pH, alors qu'à pH 9,6, seules les souches S1, A1, F1 se développaient.



**Figure 18** : La croissance à différents pH.

## Chapitre V : Résultats et discussion

### 4.4 Test de la thermorésistance :

La thermorésistance est une caractéristique physiologique qui permet de distinguer les souches capables de tolérer une température de 60°C pendant 30 minutes de celles qui en sont incapables.

Le résultat positif se traduit par un trouble. Seules les souches thermophiles (S5, CH5) poussent, contrairement aux souches mésophiles qui sont incapables de se développer.



Figure 19 : Résultat du test de La thermorésistance

Tableau 09: Croissance à différentes pH et différentes température

Souche	pH			Température			Thermorésistance
	4.5	6.5	9	15	37	45	60
S1	+	+	+	-	+	+	-
S2	+	+	-	-	+	+	-
S4	+	+	-	-	+	+	-
S5	+	+	-	-	+	+	+
A1	+	+	+	+	+	-	-
A2	-	+	-	+	+	-	-
A3	-	+	-	+	+	-	-
Y1	+	+	-	-	+	+	-
Y2	+	+	-	+	+	+	-
Y3	+	+	-	+	+	+	-
F1	+	+	+	+	+	+	-
F2	+	+	-	+	+	+	-
F3	+	+	-	-	+	+	-
CH5	+	+	-	-	+	+	+

## Chapitre V : Résultats et discussion

### 4.5 Croissance en milieu hypersalé 6.5% et 4% :

Les bactéries qui tolèrent des taux élevés de sel peuvent pousser dans un milieu hostile. La tolérance est marquée par un trouble dans les tubes après l'incubation. Les résultats ont révélé que les souches A1, F1 ont pu résister à cette concentration de NaCl 6,5%. Et pour la concentration de 4% NaCl, les résultats ont révélé que les souches A1, A2, A3, S1, S2, S4, S5, Y1, Y2, Y3, F2, F3, CH5 ont pu résister à cette concentration de NaCl.

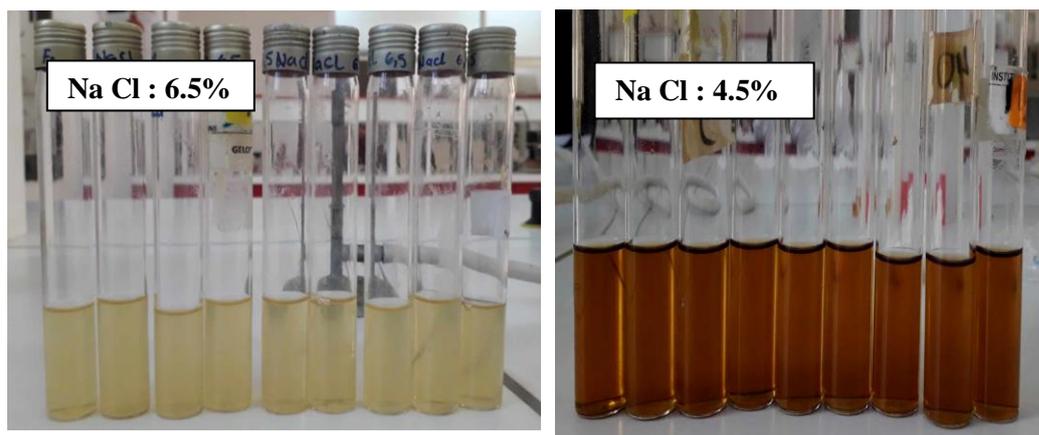


Figure 20 : La croissance dans milieu hypersalé

### 4.6 La croissance dans le lait de Sherman :

Un bleu de méthylène oxydé garde sa couleur bleue, une fois réduit il perd sa couleur par gain d'électrons faisant apparaître la couleur blanche originale du lait, généralement, les tubes ont gardé une couleur bleue, ce qui nous oriente vers des souches micro aérophiles n'ayant utilisé qu'un petit volume d'oxygène présent dans le milieu (Leveau et al, 1991).

Après incubation à 30°C, les résultats obtenus montrent que toutes les souches sont capables de croître avec le bleu de méthylène 1% et pour le lait Sherman à 3%, 4 souches ne peuvent pas pousser à savoir S2, S4, Y1, Y3.

## Chapitre V : Résultats et discussion



**Figure 21:** La croissance sur lait de Sherman 3% et 1%

**Tableau 10 :** Test de thermorésistance et de salinité et test de lait de Sherman

Souches	NaCl %		Lait de Sherman	
	6.5%	4%	Coagulation 1 %	Coagulation 3%
<b>S1</b>	-	+	+	+
<b>S2</b>	-	+	+	-
<b>S4</b>	-	+	+	-
<b>S5</b>	-	+	+	+
<b>A1</b>	+	+	+	+
<b>A2</b>	-	+	+	+
<b>A3</b>	-	+	+	+
<b>Y1</b>	-	+	+	-
<b>Y2</b>	-	+	+	+
<b>Y3</b>	-	+	+	-
<b>F1</b>	+	+	+	+
<b>F2</b>	-	+	+	+
<b>F3</b>	-	+	+	+
<b>CH5</b>	-	+	+	+

## 5. Tests biochimiques :

### 5.1 Recherche de l'arginine di hydrolase (ADH) :

Après 48h d'incubation sur bouillon M16 BCP à 37°C, on a observé l'apparition d'une coloration jaune à cause de l'acidification du milieu donc ADH- pour les souches A1, S1, S2 et S4, par ailleurs, le reste des souches sont à ADH+ (milieu reste violet).



**Figure 22 :** Test de l'arginine di hydrolase (ADH).

### 5.2 La production d'acétoine:

A partir de la **figure 23**, on constate que tous nos isolats ne produisent pas l'acétoine



**Figure 23 :** Production d'acétoine

## Chapitre V : Résultats et discussion

### 5.3 Recherche de type fermentaire :

Toutes les souches isolées et testées sont homofermentaires, aucun gaz n'a été produit dans les cloches (fig. 24)



Figure 24 : Test de type fermentaire

### 5.4 Production de dextrane :

Le test de dextrane est révélé négatif pour l'ensemble des souches isolées.

### 5.5 Utilisation de Citrate de Simmons :

Dans ce test, les résultats observés indiquent que toutes les souches ont donné un test citrate de Simmons (-) à l'exception de la souche S2 qui utilise le citrate comme seule source de carbone.



Figure 25 : Test de l'utilisation de citrate

## Chapitre V : Résultats et discussion

### 5.6 Etude de la fermentation des sucres :

La capacité à fermenter les sucres en acide organique est la principale caractéristique de la détermination des espèces bactériennes. L'étude des profils fermentaires met en évidence une grande variabilité métabolique des isolats.

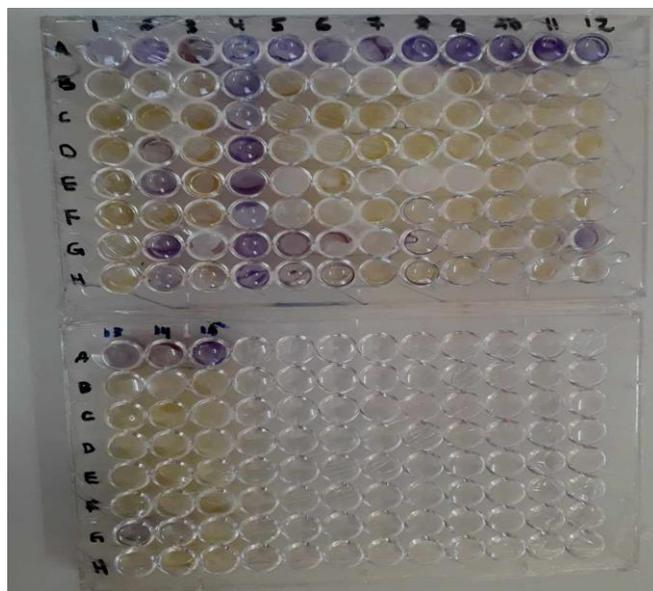


Figure 26 : La fermentation des sucres sur micro-plate

➤ Les lettres de A à H indiquent les sucres utilisés dans ce test, désignés comme suit :

A : glucose , B : lactose , C : fructose , D : sucrose , E : maltose , F : glycerol , G : saccharose. H : Lactose

➤ Les chiffres de 1 à 15 représentent les souches lactiques isolés, désignés comme suit :

1 : S1 , 2: S2 , 3: S4 , 4: S5 , 5: F1 , 6: F2 , 7: F3 , 8: Y1 , 9: Y2 , 10: Y3 , 11: A1 ,12:A2  
13: A3 , 14: CH5

## Chapitre V : Résultats et discussion

**Tableau 11** : Profil fermentaire des souches isolées :

Souche	Glu	Gly	Fruc	Suc	Mal	Sac	lac
<b>S1</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>S2</b>	+	-	+	-	+	-	+
<b>S4</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>S5</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>A1</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>A2</b>	+	-	+	+	+	+	+
<b>A3</b>	+	-	+	+	+	+	+
<b>Y1</b>	+	-	+	+	+	+	+
<b>Y2</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Y3</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>F1</b>	+	-	+	+	+	-	+
<b>F2</b>	+	-	+	+	+	+	+
<b>F3</b>	+	-	+	+	+	-	+
<b>CH5</b>	+	-	+	+	+	+	+

+ : Réaction positive ; - : Réaction négative

**Glu** : Glucose ; **Gly** : Glycérol ; **Fruc** : fructose ; **Suc** : Sucrose ; **Mal** : Maltose ; **Sac** : Saccharose ; **Lac** ; Lactose.

**Tableau 12**: Type fermentaire, acétoine et l'arginine di hydrolyse :

Souches	Homofermentaire	Hétérofermentaire	ADH	Acétoine
<b>S1</b>	+	-	-	-
<b>S2</b>	+	-	-	-
<b>S4</b>	+	-	-	-
<b>S5</b>	+	-	+	-
<b>A1</b>	+	-	-	-
<b>A2</b>	+	-	+	-
<b>A3</b>	+	-	+	-
<b>Y1</b>	+	-	+	-
<b>Y2</b>	+	-	+	-
<b>Y3</b>	+	-	+	-
<b>F1</b>	+	-	+	-
<b>F2</b>	+	-	+	-
<b>F3</b>	+	-	+	-
<b>CH5</b>	+	-	+	-

ADH - : couleur jaune, ADH + : couleur mauve, **Acétoine négative** ; pas d'anneaux rouges

## Chapitre V : Résultats et discussion

### 6. Identification des isolats :

Ces isolats ont été identifiés au stade du genre et espèce en se basant sur leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques d'après les critères mentionnés par (Guiraud, 1998 et Axelsson, 2004.)

**Tableau 13** : Caractérisation Biochimique Et Physiologique Des 14 Souches Lactiques Isolées.

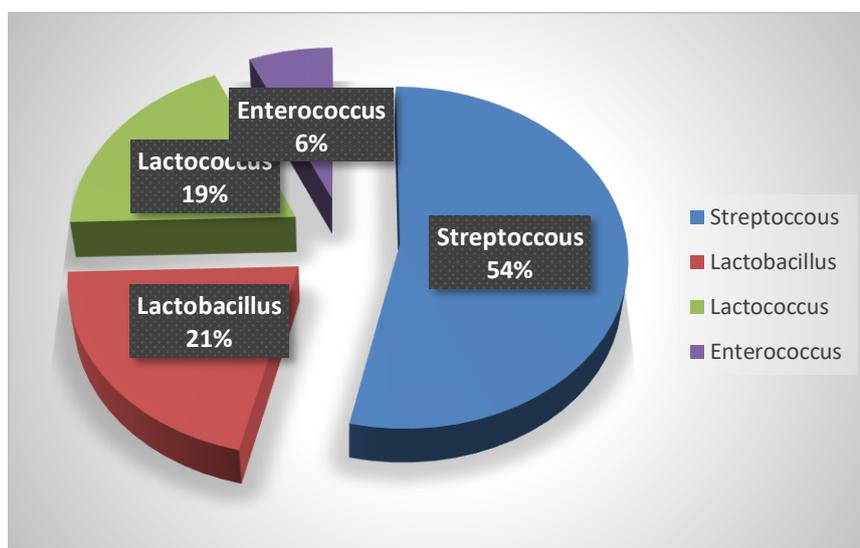
Forme	Bacille				Cocci									
	S1	S2	S4	S5	A1	A2	A3	Y1	Y2	Y3	F1	F2	F3	CH5
SOUCHE														
T°15	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
T°45	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
pH9.6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
pH4.5	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Type. Fermentaire	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Nacl 6.5%	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Nacl 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BM 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BM 3%	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
ADH	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate de Simon	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetoine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thermorésistance	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**H** : Homofermentaire

## Chapitre V : Résultats et discussion

**Tableau 14** : L'identification des souches lactiques isolées à partir de lait de chèvre

Souche	NOM
S1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
S2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
S4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
S5	<i>Lactobacillus fermentum</i>
A1	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
A2	<i>Lactococcus lactis sp cremoris</i>
A3	<i>Lactococcus lactis sp cremoris</i>
Y1	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Y2	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Y3	<i>Streptococcus thermophilus</i>
F1	<i>Enterococcus faecium</i>
F2	<i>Streptococcus thermophilus</i>
F3	<i>Streptococcus thermophilus</i>
CH5	<i>Streptococcus thermophilus</i>



**Figure 27** : La répartition en pourcentage des 14 souches isolées à partir de lait de chamelle et de chèvre

# Chapitre V : Résultats et discussion

## 6.1 Analyse des résultats :

Selon **Guetouache et al., (2018)**, l'identification des isolats au niveau du genre a été faite par la comparaison des divers caractères phénotypiques de chaque isolat. Au niveau du genre, les isolats ont été répartis en 4 genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*.

L'identification des lactobacilles se fait à l'aide de la comparaison entre nos isolats et les souches de références de (**Bergy's manual 2009**).

➤ ***Lactobacillus*** : Parmi les *Lactobacillus*, seule la souche **S5** est classés parmi l'espèce *Lactobacillus fermentum* parce qu'elle est ADH+, T° de croissance 15- et 45+, pas de production de gaz et fermente les 6 sucres : le fructose, maltose, sucrose, saccharose, glucose, lactose. Le reste des *Lactobacillus* sont de ADH-, T° de croissance 15- et 45+, homofermentaire et fermente les six sucres alors sont proches de l'espèce *Lactobacillus delbrueckii*.

➤ ***Lactococcus*** : au total 3 isolats ont été identifiés au *Lactococcus* (A1, A2, A3) par rapport au test de l'ADH ils ont été subdivisés en espèces et sous espèces.

**ADH<sup>-</sup> ACT<sup>-</sup> : A1, est *Lactococcus lactis subsp lactis*** (croissance à 4% de NaCl) et pas de croissance à 45°C. et incapable de croitre a Nacl6.5% Pour caractériser ces trois souches, nous avons comparé les résultats obtenus avec les résultats précédents de des auteurs **Cheriguene et al.,2007**). et ils sont presque similaires.

**ADH<sup>+</sup> , ACT<sup>-</sup> : ( A2, A3 )** sont appartienne au *Lactococcus lactis subsp cremoris* parc que ayant ADH<sup>+</sup> et pad de production d'acétoine.

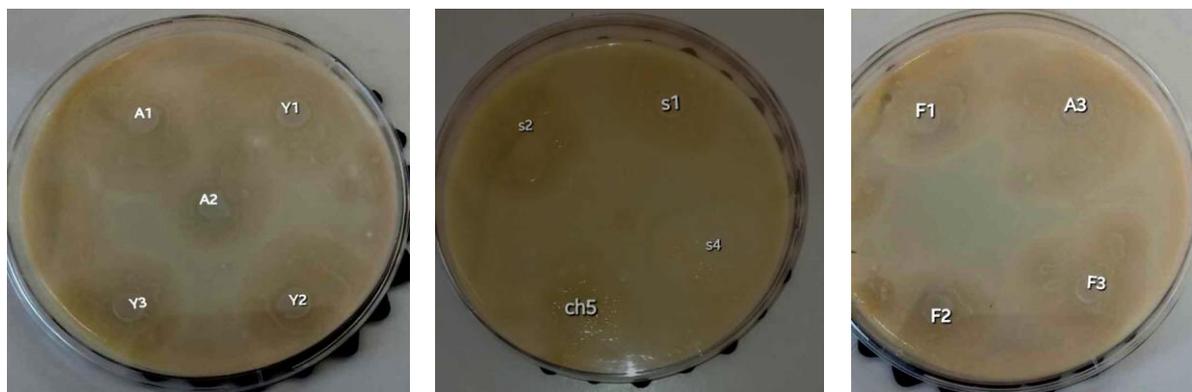
➤ ***Streptococcus*** : les résultats des tests réalisés sont très variables. Sur la base de la thermorésistante et la production des cellules à 45 °C, croissance à pH 6,5, pH 4.5, pH 4.8, pas de production d'acétoine et fermente les différents sucres testés ; les souches CH5, F3, F2 et Y1, Y2, Y3 peuvent être classées en tant que *Streptococcus thermophilus* selon les données de (**Bergy's et manual (2009)**).

➤ ***Enterococcus*** : au total de 1 souche qui a été identifiée en tant que *Enterococcus faecium* par rapport de leur croissance au puisque le résultat est positif pour la majorité des tests qui ont été réalisés sauf pour les trois tests suivants : Hydrolyse de ADH, production dextrans et d'acétoine.

### 7. Aptitudes technologiques des souches lactiques isolées :

#### 7.1 Etude de l'activité protéolytique des souches isolées :

Selon **Vuillemard (1986)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 15 mm. Alors les souches S1, S2, S4, S5 présentent une activité protéolytique positive. Ce résultat s'accorde avec la littérature (**Donkor et al., 2007 ; Monnet et al., 2008 ; Roudj et al., 2009**) ayant rapportés que les *Lactobacilles* présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les *Lactocoques* et que les *streptococcus* et les *Enterococcus* . Les souches que nous avons observées étaient protéolytiques avec des diamètres des zones de protéolyse allant de 8 à 15 mm. Les résultats obtenus lors de la réalisation de ce test sont résumés dans le (**Tableau : 15 Et la fig28**).



**Figure 28** : Exemple d'activité protéolytique des bactéries lactiques isolées de lait de chèvre

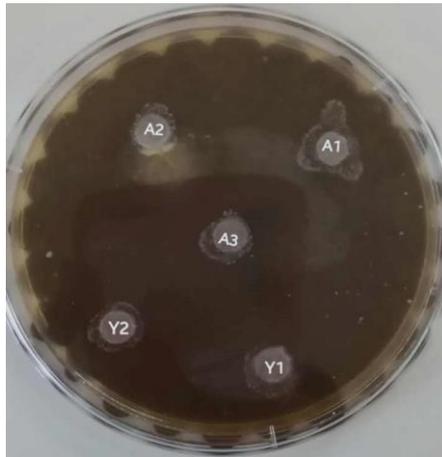
#### 7.2 Etude de l'activité lipolytique des souches isolées :

Il apparaît à travers plusieurs travaux scientifiques que les connaissances sur l'activité lipolytique des bactéries lactiques soient encore fragmentaires (**Lui et al., 2001**). En effet, les isolats A1, A3, Y2 et Y1 ont montré une zone transparente relativement peu importante, indiquant une dégradation efficace des graisses par rapport aux autres souches, en fonction du diamètre de la zone transparente qui les entoure. Étant donné que les échantillons A1, A3, appartiennent à l'espèce *Lactococcus*, cela signifie que la bactérie lactique *Lactococcus* a une activité lipolytique dans la dégradation des graisses comparée aux bactéries lactobacille et *Streptococcus*. Ces résultats sont en accord avec ceux de (**Béal et al. 2008**).

## Chapitre V : Résultats et discussion

Cette faible activité lipolytique présente un avantage quant à leur utilisation en tant que cultures starter, provoquant ainsi une dégradation limitée des composés gras du lait, juste suffisante pour produire les produits aromatiques sans provoquer la rancidité du produit fini (Mc sweeney et Sousa, 2000).

D'après Deeth et Touch, (2000); les enzymes lipolytiques coupent les liaisons esters des triacylglycérols, produisant des mono- et des diacylglycérols et des acides gras libres, qui jouent un rôle de précurseur important dans les réactions cataboliques, qui produisent des composés volatils et contribuent à la flaveur des fromages (MC Sweeney *et al.*, 2000).



**Figure 29** : Activité lipolytique des isolats sur gélose MRS additionné d'huile d'olive

## Chapitre V : Résultats et discussion

**Tableau 15** : Pouvoir protéolytique et lipolytique des isolats :

Code de souche	Diamètre de la zone pour le pouvoir protéolytique	Diamètre de la zone pour le pouvoir lipolytique
<b>S1</b>	18 mm	3 mm
<b>S2</b>	16 mm	6 mm
<b>S4</b>	15 mm	3 mm
<b>CH5</b>	12mm	-
<b>F1</b>	12mm	4 mm
<b>F2</b>	13 mm	5 mm
<b>F3</b>	11 mm	3 mm
<b>A1</b>	10 mm	9 mm
<b>A2</b>	12 mm	-
<b>A3</b>	12 mm	8 mm
<b>Y1</b>	11 mm	7 mm
<b>Y2</b>	10 mm	6 mm
<b>Y3</b>	11 mm	4 mm
<b>S5</b>	17mm	2mm

### 7.3 Etude de la capacité d'acidification des souches isolées :

Les bactéries lactiques produisent de l'acide comme rôle principal. L'acidité des bactéries présentes dans le lait de chèvre et de chamelle a été mesurée dans cette étude. Les valeurs du tableau 15 montrent comment le pH et l'acidité ont changé au fil du temps. Le pH et l'acidité de la solution changent avec le temps pendant l'incubation. Le pH varie de 7,01 à 6,71 et l'acidité varie de 11°D à 14°D. Après 24 heures d'incubation, les valeurs de pH diminuent et varient de pH 5,42 à pH 3,98, ainsi que des niveaux d'acidité élevés et des températures comprises entre 20 D° et 45°.

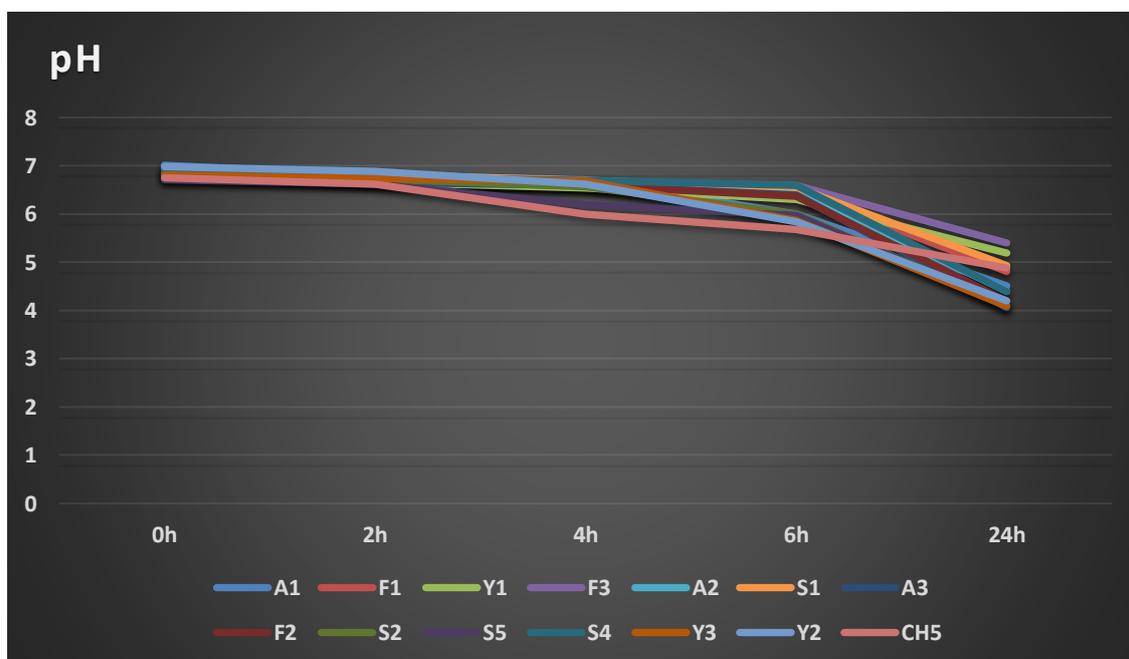
D'après ces résultats, nous remarquons que la totalité des bactéries lactiques identifiées présentent une production progressive en acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études et rejoignent ceux des auteurs (Zergoug , 2017) (Sancher et al., 2006; Cheriguene et al., 2006).

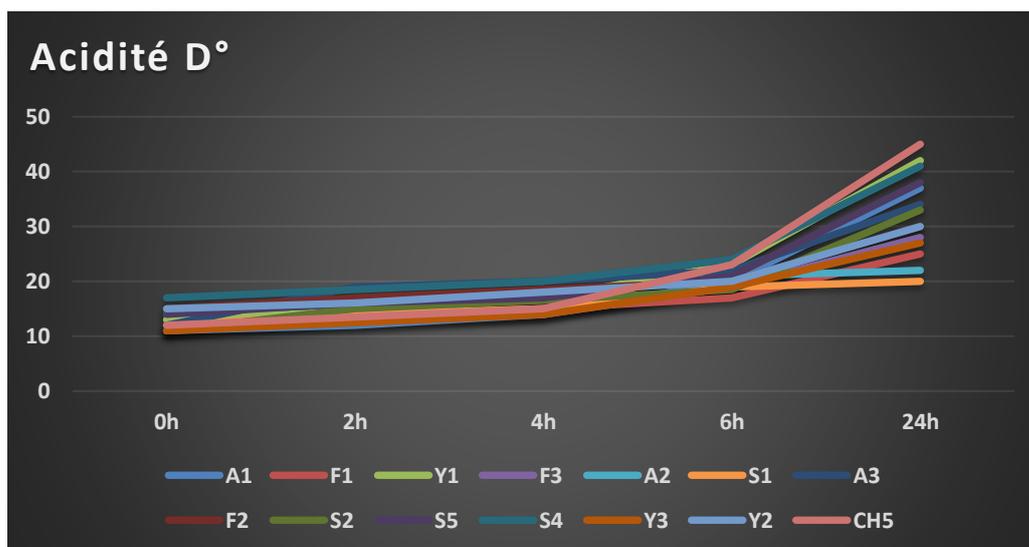
## Chapitre V : Résultats et discussion

**Tableau 16** : Les variations de l'acidité (°D) et pH des souches isolées, durant 24h d'incubation (0h, 2h, 4h, 6h et 24h) :

Souche	T0		T1		T2		T3		T4	
	PH	AC	PH	AC	PH	AC	PH	AC	PH	AC
<b>A1</b>	7 :01	11	6.80	12	6.71	14	5.99	20	4.51	37
<b>F1</b>	6.81	12	6.70	14	6.59	15	6.47	17	4.81	25
<b>Y1</b>	6.93	13	6.66	14.5	6.54	17	6.30	23	5.19	42
<b>F3</b>	6.80	11	6.70	13	6.68	14	6.61	19	5.42	25
<b>A2</b>	6.85	14	6.72	16	6.63	17.5	6.49	21	4.40	22
<b>S1</b>	6.95	12	6.82	14	6.70	15	6.55	19	4.93	20
<b>A3</b>	6.94	12	6.65	19	6.60	20	6.40	22	4.06	34
<b>F2</b>	6.83	15	6.73	17	6.59	18.5	6.36	20	4.19	30
<b>S2</b>	6.82	11	6.73	15	6.57	16.5	5.99	18.5	4.10	33
<b>S5</b>	6.71	14	6.62	16	6.20	17	5.96	21	4.21	38
<b>S4</b>	6.88	17	6.76	18.5	6.70	20	6.59	24	4.34	41
<b>Y3</b>	6.81	11	6.74	12.5	6.68	14	5.87	19	4.03	27
<b>Y2</b>	6.98	15	6.88	16	6.62	18	5.84	20	4.10	30
<b>CH5</b>	6.75	12	6.67	13.5	5.99	15	5.68	23	3.98	45



**Figure 30** : Evolution de pH des souches isolées à différents intervalles de temps.



**Figure 31 :** Evolution de l'acidité des souches isolées à différents intervalles de temps.

### 8. Résultats des interactions bactériennes :

L'activité antibactérienne des souches lactiques contre trois souches pathogènes a été évaluée afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir antagoniste. Les résultats de ce test sont illustrés dans le (Tableau. 17).

**Tableau 17 :** Spectre d'action les BAL entre les germes pathogènes

Souche	<i>Klebsiella.p</i>	<i>Pseudomonas.a</i>	<i>Proteus.m</i>
S1	17mm	13mm	20mm
S2	14mm	14mm	17mm
S4	18mm	15mm	20mm
S5	13mm	-	17mm
A1	16mm	12mm	18mm
A2	19mm	10mm	15mm
A3	17mm	14mm	20mm
Y1	15mm	12mm	17mm
Y2	05mm	08mm	10mm
Y3	10mm	10mm	12mm
F1	14mm	-	15mm
F2	16mm	16mm	20mm
F3	17mm	17mm	18mm
CH5	16mm	14 mm	18mm

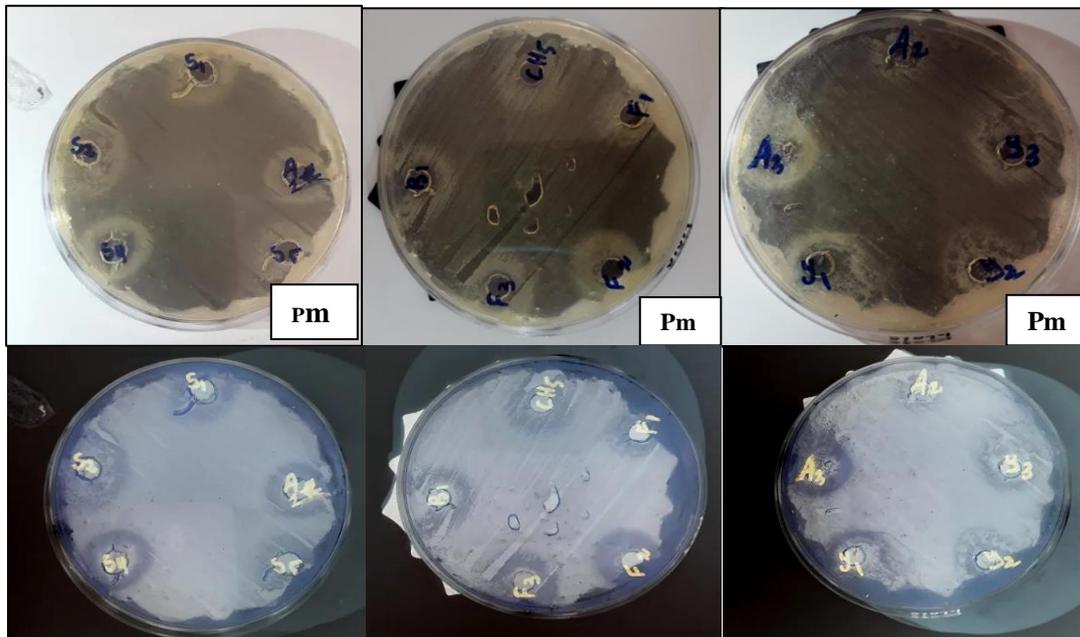


Figure 32 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'encontre de *Proteus mirabilis* ATCC35659

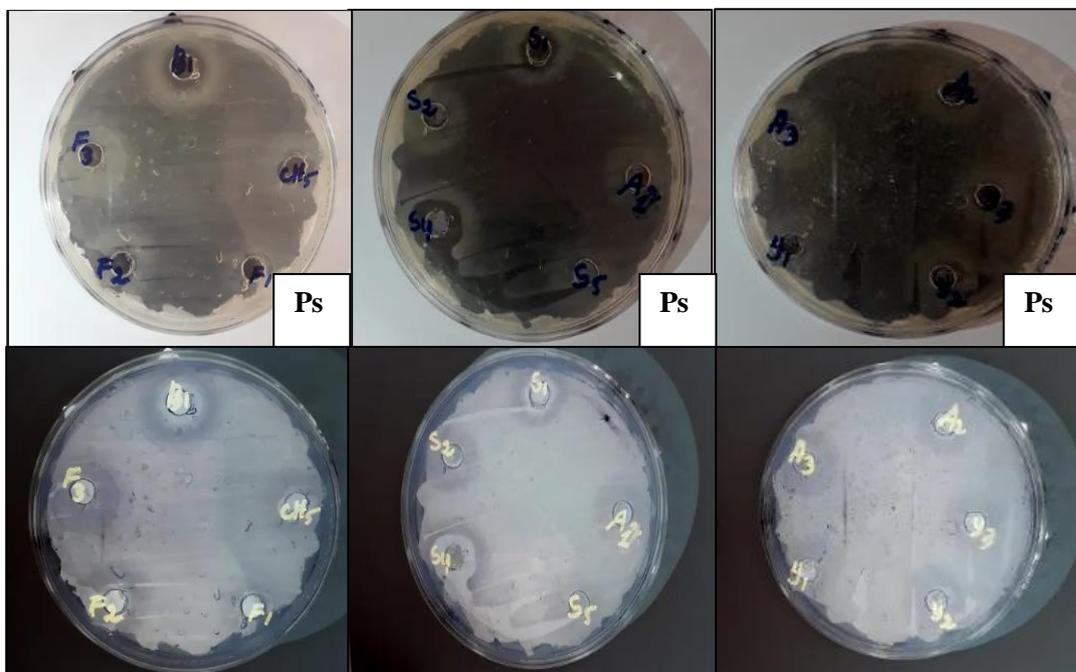
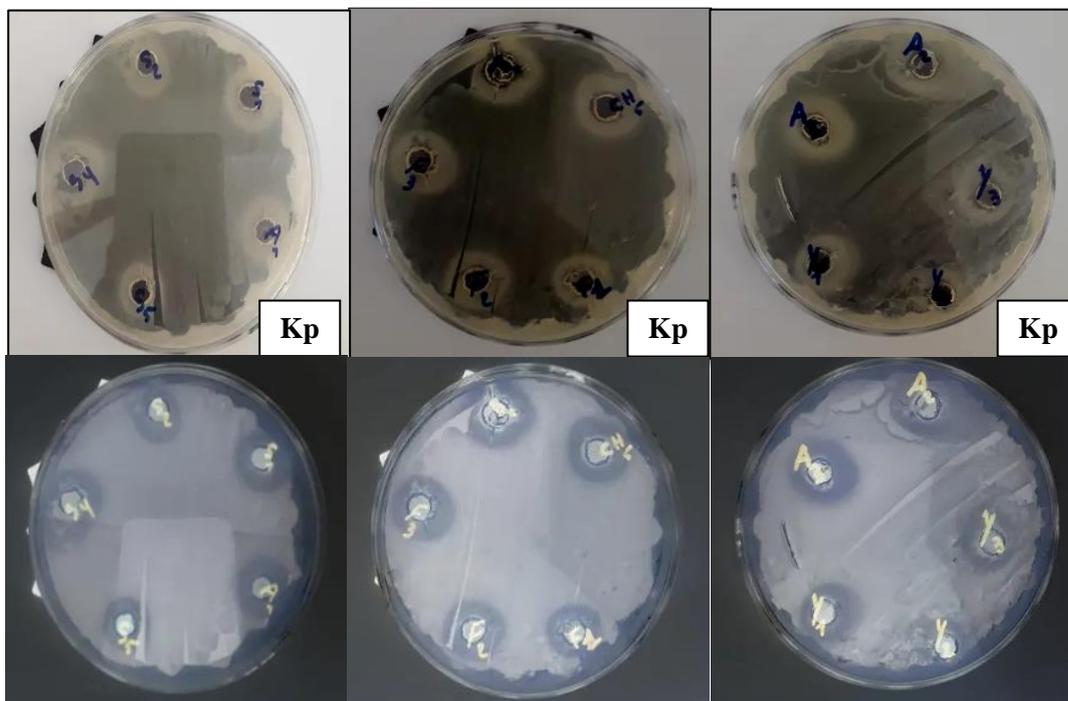


Figure 33 : Activité antibactérienne des souches lactiques vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853



**Figure 34 : Activité antibactérienne des souches lactiques vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603**

L'action inhibitrice des bactéries lactique se fait par la sécrétion des métabolites primaires (acide lactique et acétique ...) ainsi que à la production d'autres composés antimicrobiens, tels que l'acide formique, hydrogène peroxyde et bactériocines (Titieket al., 1996 ; Aslam et Qazi, 2010).

Les souches présentant une zone claire d'extension latérale supérieure à 5 mm sont considérées comme productrices de substances antibactériennes (Fleming et al., 1975).

Nous avons remarqué que nos 14 souches ont données un effets inhibiteur vis-à-vis les 03 souches pathogènes de G-, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu solide par la méthode de diffusion à partir des puits.

## Chapitre V : Résultats et discussion

---

Nous avons remarqué que les longueurs des zones d'inhibition variant de 0 à 20 mm, et cette variation due selon le type de bactérie lactique.

On constate que les bactéries lactique *Lactococcus lactis* ( A1 , A2, A3) et les *Streptococcus thermophilus* ( CH5, F2, F3, Y1, Y2, Y3 ) montre une activité antimicrobienne supérieur par un moyenne de 16.4 mm.

Les *Lactobacillus delbrueckii* par un moyenne de 14.1 mm a l'exception de la souche *Lactobacillus fermentum* ( S5) qui montre une activité antimicrobienne négative contre la souche pathogène *Pseudomonas aeruginosa*.

Et pour les *Enterococcus faecium* ( F1) montre une faible activité antimicrobienne par l'apparition des zones claire d'inhibition avec un moyenne de 9mm.

La capacité inhibitrice in vitro des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires (**Ammor et al., 2006**).

## Conclusion

Le lait cru de chameau et de chèvre algérien est largement consommé dans les régions arides et semi-arides en raison de ses hautes valeurs nutritionnelles et médicinales ainsi que de ses propriétés protectrices. Dans cette étude, 14 isolats de bactéries lactiques ont été prélevés à partir du lait de chamelle et de chèvre des régions de Laghouat et de Mostaganem. Cette recherche s'inscrit dans le cadre de la sélection de bactéries lactiques productrices de bactériocines isolées à partir de sources laitières naturelles.

L'objectif principal était d'effectuer une analyse physicochimique et microbiologique des deux échantillons de lait. Les résultats de l'analyse physicochimique ont révélé que le pH des échantillons se situe entre 6,67 et 6,9 et l'acidité Dornic varie entre 11,60°D et 17,15°D.

Après isolement, purification et caractérisation morphologique, physiologique et biochimique des isolats, nous avons identifié six espèces différentes dans des proportions variées : *Lactobacillus delbrueckii* (3), *Lactobacillus fermentum* (1), *Streptococcus thermophilus* (6), et *Lactococcus lactis subsp. lactis* (1) *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (2), *Enterococcus faecium* (1) sur un total de quatorze isolats étudiés.

D'une part, les résultats des études sur les aptitudes technologiques indiquent que l'activité protéolytique et lipolytique des ferments étudiés est d'une importance capitale pour l'industrie fromagère. Par conséquent, une étude détaillée des enzymes protéolytiques impliquées a été réalisée. Ces isolats peuvent être utilisés pour la production de ferments de culture destinés à la fabrication d'aliments tels que le fromage et le yaourt.

D'autre part, il a été démontré que nos isolats possèdent un pouvoir inhibiteur contre les agents pathogènes *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 et *Proteus mirabilis* ATCC35659.

Les résultats globaux de cette étude révèlent que les isolats de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus* présents dans le lait de chèvre et de chamelle possèdent un potentiel technologique et probiotique significatif.

- En Perspectives, il serait intéressant de :
- - Approfondir les études sur des souches isolées à travers le génie génétique.
- La détermination des bactériocine produite.
- Caractérisation physicochimique de la bactériocine.

## A

- **Ait-Belgnaoui A., Lamine F., Han W., Eutamene H., Fioramonti J., Bueno L. Et Theodorou V., 2005.** A Probiotic Strain (*Lactobacillus Farciminis*) Prevents Stress-Induced Increase Of Colonic Permeability And Visceral Sensitivity To Distension In Rats. *Nutr. Ali. Fonct.* **3** : 59-63.
- **Ammor S., Tauveron G., Dufour E. And Chevallier I. (2006).** Antibacterial Activity Of Lactic Acid Bacteria Against Spoilage And Pathogenic Bacteria Isolated From The Same Meat Small-Scale Facility, 1-Screening And Characterization Of The Antibacterial Compounds. *Food Control.* Vol. 17(06): 454-461. And Milk Products. *Australian Journal Of Dairy Technology*, 55: 153–168. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity In Fermented Milk. L'institut National
- **Axelsson, L. (2004)** Lactic Acid Bacteria: Classification And Physiology. In *Biology Of Microorganisms On Grapes, In Must And In Wine.* König H. ET Frohlich J. (2009) Springer Ed, Allemagne, P: 3-29.

## B

- **Badis A., Guetarni D., Moussa B. B., Henni D. E., Kihal M. 2004.** Identification And Technological Properties Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Raw Goat Milk Of Four Algerian Races. *Food Microbiol*, Vol. 21, P: 579–588.
- **Barka I Et Khakha H S ,2021-** Etude Et Caractérisation Des Bactéries lactiques De S'men Elaboré A Partir Du Lait Dechamelle, Mémoire De Master, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA ,89p
- **Béal C, Marin M, Fontaine E, Fonseca F Et Obert JP. (2008).** Production Et Conservation Des Ferments Lactiques Et Probiotiques. In : *Bactéries Lactiques De La Génétique Aux Ferments* (Carrieu G Et Luquet FM). Technique Et Documentation. Lavoisier, Paris :P 1-144.

- **Bekhouché Farida. (2006).** Bactéries Lactiques Du Lait Cru De Vache Et Microorganismes Pectinolytiques Des Olives Noires Et Vertes : 1. Isolement Et Identification Biochimique. 2. Evaluation Et Optimisation De La Production D'enzyme Polygalacturonase. Thèse De Doctorat D'état En Microbiologie Et Enzymologie Option : Génie Alimentaire. Université De Mentouri Constantine Institut De La Nutrition De L'alimentation Et Des Technologies.
- **Bellale I., 2018.** L'Activité Antimicrobienne Des Bactéries Lactiques Isolées A Partir Du Lait De Chamelle Vis-A-Vis Les Souches Pathogènes. Mémoire De Master 2 : Microbiologie Appliquée. Université De Mostaganem, 58p.
- **Benech R.O., Kheard E.E., Lacroix C. Etliss I. (2002).** Antibacterial Activities Of Nisin Z Encapsulated In Liposomes Or Produced In Situ By Mixed Culture During Cheddar Cheese Ripening, Appl. Environ. Microbio, 68, P 5607-5619.
- **Benkrizi N, 2019-** Caractérisation Biochimique Et Microbiologique Des Laites De Chèvre : Variabilité Saisonnière Et Aptitude Technologique, Thèse De Doctorat, Université De A. Benbadis De Mostaganem, 173p
- **Bergy's manual. (2009).** Systematic Of Bacteriology. Second Edition. Volume Three The Firmicutes. Edition Springer
- **Boudinar F Z Et Belallai,** - L'antagonisme Des Bactéries Lactiques Isolées A Partir De Lait De Chamelle Vis-A-Vis Des Bactéries Pathogènes, Mémoire De Master, Université De A. Benbadis De Mostaganem , 92p
- **Boudjemaa Khaled. (2008).** Essai D'optimisation De La Production D'acide Lactique Sur Lactisérum Par Streptococcus Thermophilus. Mémoire De Magister. Option Biochimie Et Microbiologie Appliquées. Université M'Hmed Bougara –Boumerdés
- **Brahmia R ; Douaouria S Et Souadikia M , 2022-** Lait De Chèvre : Production, Intérêt Nutritionnel, Diététique Et Contraintes, Mémoire De Master, Université 8 Mai 1945 Guelma, 50p.

## C

- **Calvez. S ; Belguesmia. Y ; Kergourley. G. (2009).** In Bactériocines : De La Synthèse Aux Applications In Bacteries Lactiques : Physiologique , Metabolisme, Genomique Et Applications Industrielles Edition : Economica .2009. P 100-122.

- **Caridi A., Micari P., Caparra P., Cufari A. And Sarullo V. (2003).** Ripening And Seasonal Changes In Microbial Groups And In Physico-Chemical Properties Of The Ewes' Cheese Pecorino Del Poro. *International Dairy Journal* 13, 191-200.
- **Cholet O., (2006).** Etude De L'écosystème Fromager Par Une Approche Biochimique Et  
**Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D. (1996)** Physiology Of Pyruvate Metabolism In *Lactococcus Lactis*. *Antonie Van Leeuw*. 70: 253-267.
- **Cheriguene A., Chougrani F. et Bensoltane A., 2006.** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from goat's Algerian milk. *Pakistan J. Biol. Sci.* 9(7): 1242-1249.
- **Cheriguene, A., Chougrani, F., Bekada, A.M.A., El Soda, M. and Bensoltane, A. (2007).** Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goat's milk. *African J. of Biotechnology*, 6 (15) : 1854-1861.
- **Corrieu G., Luquet F.M., 2008.** BACTÉRIES LACTIQUES DE LA GÉNÉTIQUE AUX FERMENTS. LAVOISIER ED., ED. VOL.: LAVOISIER. 872. De Recherche Pour Agriculture, Equation Aux Dérivéespartielles Sciences.86: 21-38.

## D

- **De Roissart H.B. (1986).** Les Bactéries Lactiques. Dans : Le Lait Et Les Produits Laitiers. Luquet F. M., 3, Ed. Techniques Et Documentations Lavoisier. Paris, Pp: 343-407
- **Deeth H.C. And Touch V., (2000).** Methods For Detecting Lipase Activity In Milk Production Of Flavor Compounds In Cheese During Ripening: A Review. *Lait* 80: 293-324.
- **Dellaglio, F., De Roissard, H., Torriani, S., Curk, M.C. Et Janssens, D.(1994).** Caractéristiques Générales Des Bactéries Lactiques. In : Bactéries Lactiques (De Rossard H. Et Loquet F.M.). Lorica, Uriage. 1 : 25-116. ·
- **Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C. Et Janssens, D. (1994)** Caractéristiques Générales De Bactéries Lactiques. In Bactéries Lactiques, 25-116. Uriage Lorica.
- **Delves-Broughton J., Blackburn R. J., Evans P. Ethughenholtz J. (1996).** Applications Of The Bacteriocin, Nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69, P193-202. In ( Galves A . 2007).

- **Deroissart, H., Luquet, F.M., 1994.** Les Bactéries Lactiques. Uriage, Lorica, France, 1 :1- 286 Pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier P 476. Deux Lactobacilles Isolés De Lait Camelin Du Sud Ouest Algérien. European. J. Sci. Res. 34 (2):
- **Djamal R ,2021-** Comparaison Entre Potentiel Probiotique Des Bactéries Lactiques Isolées A Partir De Lait Chèvre Et Lait De Chamelle., Mémoire De Master, Université Mohamed Khider De Biskra, 59p
- **Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. Andshaha N.P. (2007).** Proteolytic
- **Dortu C., Et Thonart P. (2009).** Les Bactériocines Des Bactéries Lactiques : Caractéristiques Et Intérêts Pour La Bioconservation Des Produits Alimentaires. Biotechnol Agron Soc Environ 13.143-154.
- **Dou M Et Zerig H ,2020-** Etude Comparative Entre Les Différents Lait Cru « Lait De Vache Et Lait De Chèvre » Dans La Région d’El Oued. Mémoire De Master, Université Echahidhamma Lakhdar -El OUED , 93p
- **Dridier .D ; Prévost. H. (2009).** Bactéries Lactiques : Physiologique, Métabolisme, Génomique Et Applications Industrielles Edition : Economica
- **Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tinail, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2007).**

## G

- **Garvie, E.I. (1986).** Genus *Pediococcus*. *In-Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Vol.2.* (P. H .A. Sneath., N. S. Mair., M. E. Share& K. G. Holt, Éd.s.), *Williams & Wilkins, Baltimore*, Pp. 1075-1079.
- **Gonzalez, B., P. Arca, B. Mayo Et J. E. Suarez. (1994).** Détection, Purification And Partial Characterization Of Plantaricin C, A Bacteriocinproduced By A *Lactobacillus Plantarum*strain Of Dairyorigin. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2158-2163
- **GUIRAUD J.P., 2003.** MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE. 2 ED., ED. VOL. PARIS DUNOD. 651.
- **Guiraud, J. P. (1998)** Microbiologie Alimentaire. Ed. DUNOD, Paris

## H

- **Hamami A Et Chala K, 2020-**L’allergie Aux Protéines Du Lait De Vache (APLV) : La Place Du Lait De Chamelle Comme Une Nouvelle Alternative A La Nutrition Des

Personnes Allergiques, Mémoire De Master, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou, 56p

- **Hamel K Et Raouaner , 2021-** Etude De Caractéristique Physico-Chimique Et Sensorielles De Smen Elaboré A Partir De Lait De Chamelle , Mémoire De Master, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA , 66p
- **Hamlaoui N, 2020-** Contribution A L'étude De Qualité Des Trois Laits : Lait De Vache, Lait De Chèvre Et Lait De Chamelle, Mémoire De Master, Université 8 Mai 1945 Guelma 75p
- **Hammi, I. (2016).** Isolement Et Caractérisation De Bactériocines Produites Par Des Souches De Bactéries Lactiques Isolées A Partir De Produits Fermentés Marocains Et De Différentes Variétés De Fromages Français, Thèse De Doctorat. Industriel. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.Internationales Polytechnique, Québec ; 608p.

## J

- **Jenness R. (1980).** Composition And Characteristics Of Goat Milk: Review 1968-1979. Journal Of Dairy Science, 63, 1605-1630.
- **Joubert D., 2016.** Les Ferments Lactiques. Revue Des ENIL. N°345 : 2-19

## K

- **Karthikeyan, V. Et Santhosh, S. W. (2009).** Study Of Bacteriocin As A Foodpreservative And The L. Acidophilusstrain As Probiotic. Pak. J. Nutr., 8: 335-340.
- **-Klaenhammer T.R. 1993.** Genetics Of Bacteriocinsproduced By Lacticacidbacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12(1-3): 39-85.

## L

- **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M., Ouhssine M., (2005).** Selection De Souches De Bactéries Lactiques Antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 144 : 237-250.
- **Labioui H., Laaroussi E., E L Yachioui M., Mohammed. O., 2005.** Sélection De Souches De Bactéries Lactiques Antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. , 144(1): P. 237-250.

- **Larpent J.P., 1997.** Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 10-72.  
Larpent, J. P. (1990). Les Fermentations Alimentaires. *In-Microbiologie Alimentaire, Technique & Documentation, Lavoisier, Apria, 02:3-17.*
- **Larpent J.P., 1997.** Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 10-72.  
Larpent, J. P. (1990). Les Fermentations Alimentaires. *In-Microbiologie Alimentaire, Technique & Documentation, Lavoisier, Apria, 02:3-17.*
- **Larpent-Gourgaud, M., Michaux, O, Larpent, J.P., Desmases, N., Desmazeaud, M., Leveau J.Y. Et Bouix M., (1993).** Microbiologie Industrielle : Les Microorganismes D'intérêt
- **Leveau J.Y., Boiux M. Et De Roissart H.B., 1991.** La Flore Lactique : Technique D'analyse Et De Contrôle Dans Les Industries Agro Alimentaires. *2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. **3:** 2-40.
- **Liu W. Et Hansen J.N. (2001).** The Antimicrobial Effect Of A Structural Variant Of Subtilin Against Outgrowing Bacillus Cereus T Spores And Vegetative Cells Occurs By Different Mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 648-651.
- **Ludwing W., Schleifer K-H Et Whitman X B., 2009.** Order: Lactobacillales. In: De Vosp, Garrity G M , Jones D, Krieg N R , Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K-H Et Whitmanw B.(2009). *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Second Edition Volume Three: The Firmicutes.* Springer Dordrecht Heidelberg London New York. P464.

## M

- **Mahamedi, A.E. (2015).** Etude Des Qualités Hygiéniques, Physico-Chimique Et Microbiologiques Des Ferments Et Des Beurres Traditionnels Destinés A La Consommation Dans Différentes Régions d'Algérie. Thèse De Magister. Université d'Oran, 137p.
- **Mahaut M., Jeantet R. Et Brule G., (2000).** Initiation A La Technologie Fromagère. *Tec & Doc Lavoisier.* 194p.
- **Makhloufi .K. M. (2012)** Caractérisation D'une Bactériocine Produite Par Une Bactérie Lactique *Leuconostoc Pseudomesenteroides* Isolée Du Boza. Thèse De Doctorat De L'université Pierre Et Marie Curie. Spécialité : Microbiologie, Biochimie (Ecole Doctorale Iviv)

- **Mami A., 2013.** Recherches Des Bactéries Lactiques Productrices De Bactériocines A Large Spectre D'action Vis-A-Vis Des Germes Appliqués Dans Les Toxi-Infections Alimentaires En Algérie. Thèse De Doctorat, Microbiologie Appliqué, 203p.
- **Marth E.H. Et Steele J.L 2e Ed., Marcel Dekker, Inc.** New York. 243-300.
- **Marshall K. (2004).** Therapeutic Applications Of Whey Protein. *Alternative. Medicine Review*, 2, Pp.136-156.
- **Mathieu J. (1998).** Initiation A La Physicochimie Du Lait. Guides Technologiques Des IAA. Edition Lavoisier Tec Et Doc, Paris.
- **Mayeux. J. V. Sandine. W. W. F. Et Elliker. P. R (1962).**A Selective Medium For Detecting Leuconostoc Organisms In Mixed Isolate Starter Cultures. *J. Dairy Sci.*45:655-656.
- **Mayo, B., Aleksandrak -Piekarczyk T., Fernández M., Kowalczyk M., Alvarez-Martín, P. Et Bardowski, J. (2010).** Updates In The Metabolism Of Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology Of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications Blackwell Publishing* (3-34). Moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIÉS.
- **Martinez- Muracia., A.J Et Collins M.D., 1990.** Phylogenetic Analysis Of The Genus Leuconostoc Based Reverse Transcriptase Sequencing Of 16S Rrna. *FEMS. Microbiol. Lett.* 70:73:84.
- **Mangin Irène Masson Florence, Montel, M.C., Et Taillier, P.(1997).** Les Ferments Lactique Et Bactéries Apparentée In *Microbiologie Alimentaire Techniques De Laboratoire Larpent J-P .Tec & Doc, Lavoisier, PP : 199-255.*
- **Mc Sweeney P.L.H. And Sousa M.J., (2000).** Biochemical Pathways For The Activity Of Dairy Lactic Acid Bacteria And Probiotics As Determinant Of Growth And In Vitro.
- **Megdoul Z ,2019-**Caractérisation De La Consommation De Lait De Chèvre : Cas Des Willayas De Tizi Ouzou, Bouira Et Bejaia, Mémoire De Master, UNIVERSITE DE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU, 55p
- **Moll. G. N; Konings. W. N; Driessen. J. M. (1999)** .Bacteriocins: Mechanism Of Membrane Insertion And Pore Formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* 76: P 182
- **Moussaoui, H. (2013).** Protéolyse Et Autolyse De Souches De Lactobacilles D'origine Laitier, L'étude De Leur Aptitude A Hydrolyser Les Caséines Et Les Protéines De Poisson. Thèse De Magister. Université d'Oran, 118p.

## N

- **Nguyet.R. (2008).** Genetics Of Lactic Acid Bacteria. In: Applied Dairy Microbiology

## P

- **Prescott Et Al (2003).** Microbiologie.2ème Edition Française. Traduction De La 5ème Edition Américaine Par Claire-Michelle-Bacq-Calberg Et Jean Dussart. Edition De Boeck.

## R

- **Robinson R.K. 3rd Ed., John Wiley And Sons, Inc., New York.**261-366. 218-227.
- **Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. Et Karam N.E., 2009.** Protéolyse Et Autolyse Chez je veut le full refrence de ce article: • Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. Et Karam N.E., 2009. Protéolyse Et Autolyse Chez
- **Ruas-Madiedo P., Alting A.C. And Zoon P., (2005).** Effect Of Exopolysaccharides Andproteolytic Activity Of Lactococcus Lactis Subsp. Cremoris Strains On The Viscosity And Structure Of Fermented Milks. International Dairy Journal. Vol. 15, 155-164.

## S

- **Saidi, N., Guessas, B., Bensalah F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D. E., Prevost, H. Et Kihal, M. (2002).** Caractérisation Des Bactéries Lactiques Isolées Du Lait De Chèvre Des Régions Arides. J. Aleg. Reg. Arides. 1: 1-11.
- **Sahel N., Cheriguene A, Zineb H.( 2023).** Microbiological and Physico-Chemical Characteristics of Camel Milk from Southwestern Algeria. journal.pjar 36.4.377.388
- **Schillingeret, F.K. Luke., (1989).** Antibacterial Activity Of Lactobacillus Sake Isolated From Meat. Appl. Environ. Microbiol, V55, P1901–1906.
- **Siegumfeldt H., Rechinger K.B. And Jakobsen M., (2000).** Dynamic Changes Of Intracellular Ph In Individual Lactic Acid Bacterium Cells In Response To A Rapid Drop In Extracellular Ph. Appl Environ Microbiol, 66: 2330-2335.
- **Stiles, M. Et Holzapfel W.H., (1997).** Review Article Lactic Acid Bacteria Of Foods And Their Current Taxonomy. International Journal Of Food Microbiology. 36:1-29

## T

- **Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. (1976).** Bacteriocins Of Gram Positive Bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- **Tamime A.Y., (2002).** Microbiology Of Starter Cultures. In: *Dairy Microbiology Handbook Technologically Important Properties Of Lactic Acid Bacteria From Beyaz Cheese Made From Raw Ewe's Milk.* *Journal Applied Microbiology*, 91, 861-870.
- **-Thakur, R.L. Et Roy, U. (2009).** Antibacterialactivity Of *Leuconostoc Lactis* Isolated From Raw Cattle Milk And It Spreliminary Optimization For The Bacteriocin Production. *Res. J. Microbiol.*, 4: 122-131.
- **Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994)** Métabolisme Des Sucres Par Les Bactéries Lactiques. Dans : *Bactéries Lactiques*, Vol. I, P 239-290 (Editeurs : De Roissart H., Luquet
- **Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. Et Slamet S., (1996).** Antimicrobial Substance Produced By *Lactobacillus* Sp. TGR-2 Isoletedfromgrowol. *Indonesian. Food Nutr. Prog.* 3(2) : 29-34.
- **Towmey D Et AL., (2002)** . .In *Bacteries Lactiques :Physiologie , Metabolisme,Genomique Et Applications Industrielles* Edition : Economica .2009. P 100

## V

- **Vingola C.L., (2002).** *Science Et Technologie Du Lait, Transformation Du Lait.* Presses
- **Vuillemard J.C., 1986.** *Microbiologie Des Aliments. Evolution De L'activité Protéolytique Des Bactéries Lactiques.* *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. **3** : 1-65.

## W

- **Wernry U., 2006.** Camel Milk, The White Gold Of The Desert. *Journal Of Camel Practice And Research* 13:15-26.
- **Welman A.D. And Maddox I.S., (2003).** Exopolysaccharides From Lactic Acid Bacteria, Perspectives And Challenges. *Trends In Biotechnology.* Vol. 21, 269-274.

### Z

- **Zadi H., 1998.** Bactéries Lactiques Isolées De Lait De *Camelus Dromedarius*: Etude Microbiologique Et Biochimique, Caractéristiques Technologiques, Elaboration De Ferments Lactiques Mésophiles Et Fabrication De Fromages. Thèse De Doctorat d'Etat. Université De Constantine, Algérie. 205.
- **Zergoug ,A . (2017)** , Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires . Université Abdel Hamid Ibn Badis , Mostaganem

## Annexe :

### Composition des milieux de culture :

#### Milieu d'isolement :

##### Milieu M17

Utilise pour la culture des lactocoques :

Extrait de viande.....	5g
Extrait de levure.....	2,5 g
Acide ascorbique.....	0,5g
Peptone de soja.....	5g
B-glycérophosphate.....	19g
Peptone papistique de viande.....	2,5g
Sulfate de magnésium.....	0,25g
Lactose.....	5g
Peptone triasique de caséine.....	2,5g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 7,2

Autoclave 20 min à 120°C.

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

Utilise pour la culture des lactobacilles.

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	8g
Extrait de levure.....	4g
Glucose.....	20g
Phosphate di potassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
Sulfate de manganèse, 4H <sub>2</sub> O.....	0,05g
Tween 80.....	1ml
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 6,5

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### **Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	8g
Extrait de levure.....	4g
Glucose.....	20g
Phosphate di potassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
Sulfate de manganèse, 4H <sub>2</sub> O.....	0,05g
Tween 80.....	1ml
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 4/ 6,5/9

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

### **Bouillon M17**

Extrait de viande.....	5g
Extrait de levure.....	2,5 g
Acide ascorbique.....	0,5g
Peptone de soja.....	5g
B-glycérophosphate.....	19g
Peptone papistique de viande.....	2,5g
Sulfate de magnésium.....	0,25g
Lactose.....	5g
Peptone triasique de caséine.....	2,5g
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 7,2

Autoclave 20 min à 120°C.

## II- Milieu d'identification :

### **Bouillon hypersalée:** (2 concentration 4% et 6,5%)

Employée pour différencier les lactocoques et streptocoques thermophiles.

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

On ajuste le pH à 6,5

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20min

### **Milieu de Clark et Lubs**

Utilise pour mettre en évidence l'acétyle

Peptone.....	5g
Phosphate di potassique.....	5g
Glucose.....	5g
Eau distillée.....	1000ml

On dissout toutes les ingrédients dans l'eau distillée on ajuste le pH à 7,0

Réparation en tubes à raison de 7ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20min

### **Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)**

Tryptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Saccharose.....	100g
Glucose.....	5g
Citrate de sodium.....	1g
Gélatine.....	2,5g
Azohydrate de sodium.....	0,075g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1000ml

On ajuste le pH à 7

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20min

### **Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)**

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre.....1000ml

Bromocrésol pourpre.....0.025ml

pH 7

Autoclavage 120°C/20minutes

### **Milieu YMA (Yeast-Milk-Agar)**

Peptone.....5g

Extrait de viande.....3g

Lait écrémé.....10g

Agar.....15g

Eau distillée.....1000ml

On ajusté le pH = 7.2

Le milieu stérilisé à autoclave à 120°C pendant 20 mm

### **Lait écrémé**

Lait écrémé.....10g

Extrait de levure.....0, 5g

Eau distillée.....100ml

Stérilisation à 120° C pendant 10min

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

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

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

### **Préparation des sucres :**

On utilise 7 sucres dans cette étude : (Glucose, saccharose, Lactose, Fructose, glycérol, sucrose et maltose) : 02g de chaque sucre dans 100ml de l'eau distillée.

Stérilisation par autoclavage à 20°C pendant 20 min.

### **Lait de sherman :**

Lait écrémé.....25g

Eau distillé .....1000ml

Bleu de méthylène .....0,1/0,3g

### **Milieu triglycéride :**

MRS additionné matières lipidiques 10% de (L'huile d'olive )

### **III- Les diluants :**

#### **Eau physiologique :**

Utilise pour la réalisation des dilutions.

Chlorure de sodium .....9g

Eau distillée.....1000 ml

Stérilisation à 120°C pendant 20 min.

#### **Annexe 02 : Coloration de Gram :**

##### **1. Matériels :**

- Les lames
- Les colorants

##### **2. Mode opératoire :**

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.
- Immerger la lame dans la solution de Cristal violet pendant 1 mn.
- Immerger la lame dans Lugol 30 seconde.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée.
- Rincer à l'eau.
- Colorer avec la solution de Fuchsine pendant 1mn.
- Laver à l'eau.
- Observer à l'objectif X 100, en immersion avec l'huile.

##### **3. Résultat :**

Les bactéries Gram+ sont colorées en violet, les bactéries Gram- sont colorées en rose.