



République Algérienne Démocratique Et Populaire
Université Abed El Hamid Ibn Badais

Faculté Des Science de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Microbiologie Appliqué

Par

Zafranekhalida

&

Chergui sihem

Thème :

Isolement et identification biotechnologique des souches de *Leuconostoc*

Soutenu le 11/06/2024

Président	BAHLOUL H	MCB	Université de Mostaganem
Encadreur	LABTAR A	MCB	Université de Mostaganem
Examineur	SIDHOUM W	MCA	Université de Mostaganem
Co-encadreur	DJIBAOUI R	PR	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciements

Au début et avant tout, le remerciement et louange à Allah tout puissant qui nous a guidés sur le chemin droit tout au long de notre travail et nous a inspiré aux justes réflexes car sans lui rien n'est possible et ce travail n'aurait pas abouti.

Nous tenons à exprimer nos profondes gratitudee et toutes nos reconnaissances à notre encadrant **LABTARASMAA**, pour son aide précieuse à notre égard, et nous la remercions chaleureusement pour ses conseils, sa présence, sa contribution efficace , ses encouragement et surtout , sa générosité , sa patience et son soutien continu qui ont grandement contribué à la réalisation de ce mémoire .

Nous remercions également **BAHLOUL HALIMA** d'avoir acceptée La présidence du jury de notre travail, C'est également un grand honneur pour nous d'être jugé par vous.

Nous tenons à remercier **SIDHOUM WARDA** d'avoir acceptée d'examiner notre mémoire.

Nous remercions aussi l'ensemble du personnel travaillant au laboratoire du département de biologie. J'adresse mes remerciements particuliers au technicien du laboratoire, Djilali ben Bouziane, et à vous tous qui avez contribué, de près ou de loin, à la réussite de nos travaux appliqués.

Dédicace

C'est avec l'aide et la grâce du DIEU que j'ai achevé cet humble travail que je dédie

A mon père Zain : 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 nuits pour mon éducation et mon bien être.

A ma mère kheira : Tu représentes le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et prier pour moi ; ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études Ce travail est le fruit de vos sacrifices cher parents vous avez Consentis pour mon éducation et ma formation.

A Mes très chers frères : Nadia, Nour Elhoda, Mariam, Ahmed, Rachida, Karima.

Je remercie également mon mari et sa famille.

Je leur souhaite tout le bonheur du monde, et qu'ils soient heureux dans leur vie

Dédicace

Je dédicace ce modeste travail :

A mes chers parents qui ont fait preuve de beaucoup de patience et de

Sacrifice qu'ils trouvent ici un modeste témoignage de mon indéfinie

Tendresse . . . il ya tant d'amour et de générosité dans vos âmes.

Chère mère Saada j'avoue vraiment que tu été pour mois la lumière qui me guide mes

Routes et qui m'emmène aux chemins de la réussite

Cher père ALaarbi je me rappel toujours de tous les moments ou tu m'poussé à

Travailler et à réussir, merci pour tous les fois ou tu as été

A mes côtés et ou tu t'es soutenu financièrement et moralement, que Dieu

Fasse toujours de toi une couronne .au-dessus de nos têtes

Puisses –tu toujours être un soutien pour toujours

A mes frère et sœurs tout en son nom, tout cela grâce à toi, ô plus grand partisan

A mon encadreur Asmaa LABTAR pour son soutien, sa patience et ses conseils

Depuis le début jusqu'à ce que nous ayans obtenus notre diplôme

Ames amis, et mes proches

Khalida

Résumé

Les bactéries lactique sont connues par leur capacité de produire des composés actifs lors de leur croissance à savoir les acides organiques qui acidifient le milieu .Leur utilisation pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques.

Les *Leuconostoc* sont des bactéries lactiques Gram positives, catalase négatif, non pathogène, tolérant les milieux acides et en classée le troisième genre des bactéries lactique.

Dans cette étude, 8 souches de *Leuconostoc* ont été isolées à partir de quatre origines du lait (vache, brebis, chèvre et chamelle) Après l'isolement les souches ont été caractérisées et identifiés par des tests classiques tests que les morphologiques, physiologiques et biochimiques pour identifier le genre puis testés leur potentiel technologique : activité protéolytique, la production des exopolysaccharides (dextrane), pouvoir antibactérien contre des bactéries pathogènes : *E. coli* ATCC 2592, *S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 et la dégradation des sucres, hydrolyse de l'arginine

Les résultats obtenus indiquent que toutes les souches présentent des caractéristiques technologiques intéressantes: la production des exopolysaccharides (EPS), pouvoir protéolytique important, hydrolyse de l'arginine dégradation de sucres, résistance aux antibiotiques ainsi qu'un pouvoir inhibiteur contre les germes pathogènes utilisées.

Mots clés : *Leuconostoc*, EPS, activité protéolytique, activité antibactérienne, hydrolyse de l'arginine.

ملخص

تُعرف بكتيريا حمض اللبنيك بقدرتها على إنتاج مر كبات نشطة أثناء النمو، وهيا لأحماض العضوية التي تحمض البيئة، ويتحدد استخدامها في تطبيقات تصنيعها بمعين من خلال خصائصها الوظيفية والتكنولوجية.

بكتيريا الليوكونوستوك هي بكتيريا حمض اللبنيك موجبة الجرام، سالبة الكاتلاز وغير ممرضة وتتحمل البيئات الحمضية، مما يجعلها الجنس الثالث من بكتيريا حمض اللبنيك.

في هذا الدراسة، تم عزل 8 سلالات من *Leuconostoc* من أربعة أجناس من الحليب

(البقر والنعاجو الماعز والإبل)، وبعد عزلها، تمتوصيف السلالات لتحديد هاعن طريق الاختبار الكلاسيكية مثلًا لاختبار التمرور فولوجية والفسيد

ولوجية والكيميائية الحيوية لتحديد الجنس، ثم اختبار قدراتها التكنولوجية: النشاط المحلل للبروتين، وإنتاج السكريات الخارجية

(الديكستران)، والقدرة المضادة للبكتيريا المسببة للأمراض E. كولايا ATCC 2592 ، *S. aureus* ATCC

، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027، 25923، وتحلل السكريات، والتحلل المائي للبروتين، إلخ .

أظهرت النتائج التيمما الحصول عليها أن جميع السلالات لها خصائص تكنولوجية مثيرة للاهتمام: إنتاج جزيئات السكر يد الخارجية

(EPS)، وقوة عالية في تحلل البروتين، والتحلل المائي للبروتين، وتحلل السكريات، ومقاومة المضادات الحيوية، والقدرة المثبطة ضد مسببات الأ

مرضا المستخدمة.

الكلمات المفتاحية :

ليوكونوستوك، EPS، النشاط المحلل للبروتين، النشاط المضاد للبكتيريا، التحلل المائي للبروتين.

Summary

Lactic acid bacteria are known for their ability to produce active compounds during growth, i.e. organic acids that acidify the environment, and their use for a given industrial application is determined by their functional and technological properties.

Leuconostocs are Gram-positive, catalase-negative, non-pathogenic, acid-tolerant lactic acid bacteria, making them the third genus of lactic acid bacteria.

In this study, 8 strains of *Leuconostoc* were isolated from four Milk origins (cow, ewe, goat and Camel). After isolation, the strains were characterized and identified by classical morphological, physiological and biochemical tests to identify the genus, then tested for their technological potential: proteolytic activity, production of exopolysaccharides (dextran), antibacterial power against pathogenic bacteria: *E. coli* ATCC 2592, *S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 and sugar degradation, arginine hydrolysis, etc.

The results show that all strains have interesting technological characteristics: production of exopolysaccharides (EPS), high proteolytic power, arginine hydrolysis, sugar degradation, antibiotic resistance and inhibitory power against the pathogens used.

Key words:

Leuconostoc, EPS, proteolytic activity, antibacterial activity, arginine hydrolysis.

Liste des abréviations

ADH : Arginine di hydrolase

ARG: Arginine

MRS: Man Rogosa et Sharpe

MRS BCP : Man Rogosa Sharp additionné de pourpre de bromocrésol

MRS – M:ManRogosa Sharp additionné saccharose.

Ln : *Leuconostoc*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

Na cl : Chlorure de sodium

PH : potentiel d'hydrogène

T° : Température

%: pourcentage

EPS : exo polysaccharide

ML : millilitre.

µL : microlitre

Liste de tableaux

N°	Titre	Page
1	La composition de lait de chèvre (Thibaut, 2004)	6
2	Comparaison entre le lait de chèvre et de vache (Zeller, 2005)	6
3	Provenance et l'origine des échantillons	18
4	Souches utilisées dans le test antimicrobien	25
5	Flore lactique présente dans les différents échantillons du lait	29
6	Tableau représentant les résultats des tests physiologique	33
7	Résultats de culture sur lait de Sherman	34
8	Le profil de dégradation des sucres par les souches de <i>Leuconostoc</i>	36
9	Les caractères biochimiques et morphologiques des isolats	38
10	: Résultats de l'activité protéolytique des isolats	40
11	Résultats de l'activités antibactériennes	42
12	: résultats de test sensibilité des antibiotiques	43

Listes des figures

N°	Titre	Page
1	Image de <i>Leuconostoc</i> : (A) observation de <i>Leuconostoc</i> par microscope Optique (B) Observation de <i>Leuconostoc</i> par microscope électronique	7
2	Arbre montrant les relations phylogénétique entre les espèces de <i>Leuconostoc</i> selon leur séquence de l'ARN 16s (Hansal .2015)	8
3	Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . 1 citrate perméase, 2 citrate lyase, 3 oxaloacétate décarboxylase, 4 lactate déshydrogénase, 5 acétolactate synthèse, 6 a-acétolactate décarboxylase, 7 décarboxylation non enzymatique, 8 2,3-butanediol déshydrogénase, 9 acétate kinase 10phospho transacétylase, 11 alcool déshydrogénase (GERALD <i>et al</i> , 2001)	12
4	Représentation schématique de la structure générale du dextrane (Covis, 2011, Harutashi 2013, Mensink <i>et al</i> , 2015)	16
5	Les échantillons collectés pour isolement des souches <i>Leuconostoc</i>	19
6	Dilutions décimales	20
7	Test de catalase (catalase +, catalase -)	22
8	Aspect macroscopique des cultures bactériennes des souches de <i>Leuconostoc</i> sur MRS Gélosé (E04, E03C2)	30
9	Aspect des souches de <i>Leuconostoc</i> sur bouillon MRS (chamelle, chèvre, E4, E4(C1), E4(1), E3(C2), VSL, VSL (C1)	31
10	Aspect macroscopique des souches pures des <i>Leuconostoc</i> sur gélose MRS (VSL(C1), Chamelle, VSL)	31
11	Observations microscopiques des souches isolées après une coloration de Gram à grossement ×100(Chamelle, VSL)	32
12	Résultats du test de catalase (test négatif)	32

13	Résultats du test de bleu de méthylène ((A) 0.3% et (B) 0.1%)	34
14	Type fermentaire des souches isolats (<i>Leuconostoc</i>) sur bouillon MRS	35
15	Résultats de dégradation des sucres	37
16	Résultats de l'hydrolyse de l'arginine ADH par les souches de <i>Leuconostoc</i> (chamelle E03C(2), chèvre, VSL, VSLC(1), E03C(2), E04, E04(1), E04C(1))	38
17	L'aspect des colonies des souches <i>Leuconostoc</i> productrice des d'exopolysaccharides sur milieu hyper saccharose (chamelle, E03C(2))	39
18	L'aspect des colonies des souches <i>Leuconostoc</i> productrices des d'exopolysaccharides sur Gélose MRS –M (additionnée 10% Saccharose)(chamelle).	39
19	L'activité protéolytique des résultants positive des souches <i>Leuconostoc</i> sur gélose MRS additionné du lait (chamelle, chèvre, VSL, VSL C(1), E (3) C(2), E04, E04(1), E04 C(1))	41
20	Croissance des souches indicatrices sur gélose nutritive	41
21	activité antibactérienne par des souches (VSL, chèvre, E04, E04 (C1) vis –à vis <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	42
22	Test de sensibilité des souches (E04, chamelle, E04) aux antibiotiques	44

Table de matières

Résumé

Liste d'abréviation

Liste des tableaux

Liste des figures

Table de matières

Introduction

CHAPITRE 1 :

Synthèse bibliographique

1- Définition de <i>Leuconostoc</i>	5
2- Composition générale de lait	5
3- Genre <i>Leuconostoc</i>	7
3- 1- Historique sur les <i>Leuconostoc</i>	7
4- Ecologie des <i>Leuconostoc</i>	8
5- Classification de <i>Leuconostoc</i>	8
6- Caractères généraux	10
6-1- Caractères morphologiques et cultureux	10
6-2- Caractéristiques physiologiques et biochimiques	10
6-2-1-Fermentation des sucres	10
6-2-2- Fermentation de citrate.....	11
6-3- Caractères biotechnologiques	13
6-3-1- L'activité protéolytique.....	14
6-3-2- L'activité lipolytique.....	14
6-3-3- L'activité antibactérienne.....	14
6-3-4- Activité aromatisant	15
7- Utilisations desgenre.....	15

CHAPITRE 2 :

MATRIEL ET METHODES

1- Objectifs.....	18
2- Lieu de travail	18
3- Provenance des échantillons	18
4- Milieux de culture des souches	19
4-1- Isolement des souches	19
4-2-Purification des souches	20
4-3- Conservation des souches.....	21
4-3-1- Conservation des souches a longue durée	21
5- Caractéristiques phénotypiques des souches	21
5-1- L'aspect macroscopique	21
5-2- L'aspect microscopique.....	21
6- Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches	21
6-1- Test de catalase	21
6-2- Test physiologiques.....	22
6-2-1- Croissance à différentes températures	22
6-2-2- Croissance à différents PH	23
6-2-3- Croissance à différentes concentrations de Na Cl	23
6-2-4- Croissance sur le lait de Sherman (lait au bleu de méthylène à 0.1% et0.3%)	23
6-3- Tests biochimiques.....	23
6-3-1 -Recherche de type fermentaire	23
6-3-2- Utilisation des sucres	24
6-3-3- Hydrolyse de l'arginine.....	24
7- Caractérisation technologique des souches	25
7-1- Activité protéolytique.....	25
7-2- Production des Exo polysaccharides EPS	25
7-3- Activité antimicrobienne	25

7-3-1- Méthode direct (spot agar test).....	26
7-4- La résistance aux antibiotiques.....	26

Chapitre 3:Résultats et Discussion

1-Résultats et discussions	29
1-1- Isolement et purification.....	29
2- Pré-identification des souches	30
2-1- Aspect macroscopique	30
2-1-1- Sur milieu liquide	30
2-2- Aspect microscopique	31
2-3-Test de recherche de catalase.....	32
3-Test physiologiques.....	32
3-1- Croissances à différents températures.....	33
3-2- Résistance à la salinité	33
3-3- Croissance à différents PH	33
3-4- Culture sur lait de Sherman	35
4- Tests biochimiques.....	35
4 -1- Recherche de type fermentaire	35
4 -2- Test de dégradation des sucres	36
4 -3- Hydrolyse de l'arginine	37
5-Test technologiques.....	39
5 -1- Production des exopolysaccharides (dextrane).....	39
5 – 2- L'activité protéolytique	40
5 – 3- L'activité antimicrobienne	41
Conclusion.....	44
Références bibliographiques.....	47
Annexe.....	56

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène situé dans des habitats riches en nutriments, elle peuvent coloniser de nombreux produits alimentaires tels que les produits laitiers y compris le lait maternel(Martin et al., 2003) la viande, les poissons, les végétaux, les légumes, les céréales, les boissons, les eaux et le miel,(Lasztity.,2009 ;Rokopal.,2015 ;zarour et al., 2017 ;zhengetal.,2020 ;lavermicoccaet al.,2021).

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps de façon conscient ou non pour leur activité antimicrobienne.(Luquent et Corrieu,2005). Les *Leuconostoc* sont utilisées en industrie laitière pour leur capacité à produire du CO₂ et des composés d'arôme (di acétyle et acétoiné)(*Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris*) grâce au Co- métabolisme du citrate et du lactose .Les produits de protéolyse contribuent aussi à la saveur des fromages.(Zadi-Karam et al, 2011).

Les *Leuconostoc* sont loin de faire l'unanimité dans le monde la technologie laitière ; si certains utilisateurs les emploient comme levain pour améliorer la qualité de leurs produits (beurre, pâtes fraîches, fromage à pâte persillée), d'autre les redoutent pour les accidents de fabrication dont on les rend, à tort à raison, responsables.

Le genre *Leuconostoc* fait partie des bactéries lactiques acidifiantes chimio hétérotrophes qui jouent un rôle important dans l'industrie agroalimentaire,

Les espèces du genre *Leuconostoc* ont été utilisées comme ferment pour les produits alimentaires commerciaux afin de maintenir la qualité des légumes fermentés, des produits laitiers, des viandes, et boissons alcoolisées pendant des périodes prolongées(budde et al.,2003 ;Eom et al.,2007)

Dans de nombreux produits laitiers, elles font partie naturelle des bactéries lactiques non starter expliquant les développements de la saveur (cogan et al. 1994; Makarova et al. 2006)

En raison de ces caractéristiques de production d'aromes, *Ln mesenteroides* est connue sous le nom de « bactérie de l'arome » *Leuconostoc SP* se caractérisent par une fermentation hétéro lactique par la voie de la phosphocétolase (PKP) (ôzcan et al, 2019).

Le dextrane est un homopolysaccharide avec une chaîne linéaire contenant au moins 50% de résidus D-glucopyranosyle et de multiples applications dans les produits alimentaires y compris la boulangerie, les sucreries et les boissons (**Kothari et al, 2014 ; Koirala et al., 2021**).

Toutes les espèces de *Leuconostoc* sont hétéro fermentaire et sont capables de produire du dextrane à partir de saccharose et ils sont intrinsèquement résistants à la vancomycine. La plage de température de croissance est comprise entre 1°C et 37°C ; mais l'optimum se situe entre 20°C et 30°C (**Yang et al, 2015 ; Cholakov et al., 2021**).

La Leucocine a été le premier type de bactériocine ; isolée de *Leuconostoc gelidium* (UAL) 187 (**Hastings et al, 1991**) qui a été suivie par la découverte et l'identification de divers autres types de bactériocines de *Leuconostoc mesenteroides subsp* (**Mat- aragas et al, 2004 ; Todorov et Dicks ; 2005**).

Les objectifs de cette étude se résument dans l'isolement des souches de *Leuconostoc* à intérêt technologique. Les isollements sont réalisés à partir de lait cru de différentes régions d'Algérie et leur caractérisation par la recherche des aptitudes technologiques.

Ce travail est constitué de 3 parties :

La première partie consiste en

L'étude bibliographique qui porte sur les connaissances des *Leuconostoc*.

La deuxième partie est composée

D'une méthodologie de travail qui rassemble tous les matériels et méthodes utilisés pour exécuter les travaux de cette étude, elle est divisée en 2 étapes.

La première étape s'intéresse à l'isolement à partir de différents échantillons, la sélection de souches à Gram positif et catalase négatif, et la recherche des critères phénotypiques et physicochimiques.

La deuxième étape est basée sur la recherche des aptitudes technologiques et probiotiques des souches identifiées telles que :

- L'activité protéolytique.

-
- Test de sucres.
 - Production des EPS.
 - L'activité antibactérienne vis à vis de pathogènes
 - Le di acétyle. Tu ajoutes tt les autres tests en ordre
 - Résistances antibiotiques

La troisième partie englobe:

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail.

Une discussion des résultats.

Une conclusion générale.

CHAPITRE 1 :

Synthèse bibliographique

1- Définition de *Leuconostoc*

L'origine du terme scientifique *Leuconostoc* est tirée du mot grec " Leuco "qui signifie" blanc" et" nostoc" veut dire" algue" (**Brahimi, 2015**). Le genre de *Leuconostoc* a été défini par van thieghem en 1878. le terme *Leuconostoc* vient du mot Nostoc qui est une algue bleue mucilagineuse et de leuco qui veut dire blanc. Les *Leuconostocs* sont apparus à l'origine sous forme de chaîne, d'aspect mucilagineux, non pigmentés. Les premières souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans des sucreries. Or les *Leuconostocs* responsables des ces accidents produisent des dextrans et en milieu saccharoses, les chaînes de cocci sont entourées d'une gaine bien distincte à l'examen microscopique : gaine qui appelle celle des Nostocs (**Devoyod et Poullain, 1988**). Ce n'est qu'en 1912 que **BEIJERINCK** isola du beurre et d'autres produits laitiers.

Le lait est le produit sécrétions mammaires de mammifères .La composition de lait varie selon les espèces animales, mais aussi selon différents facteurs tels l'individualité, la race, la période de lactation, l'alimentation, la raison, l'âge (**CIRIHA ,2022**)

2- Composition générale de lait

Le lait de vache est constitué de nombreux composé dont le plus abondant est l'eau (78%), dans laquelle sont dispersés tous les autres éléments (**Mathieu, 1998**).

Le lait de chèvre set un aliment de grande importance à l'échelle mondiale (**Wehrmüller et Ryffel,2007**) c'est un liquide blanc composé de lipides en émulsion sous forme de globule , de caséine en suspension colloïdale ,de lactose et de minéraux en solution .comparé é au lait de vache, il est légèrement plus blanc(**Avalos De la Cruz, 2007**).

Tableau 1 : La composition de lait de chèvre (Thibaut, 2004).

Eau	Matières grasses	Glucides	Protéines	Vitamines	Cendres
88%	Phospholipides	Lactose	Lactoglobuline	A	Cl
	Triglycérides		Protéose	B	Ca
	Monoglycérides		Peptone	C	Ph
	AG libres		Lactoglobuline	B1	Mg
	Cérébrosides		Albumine	B2	Na
	Stérols		Immunoglobuline	B6	K
			Caséine	B12	

Le lait de chèvre et les produits qu'il permet de posséder de nombreuses propriétés intéressantes (Barth *et al.* 2010). Le tableau montre la différence entre le lait de chèvre et celui de vache

Tableau 2 : Comparaison entre le lait de chèvre et de vache (Zeller, 2005).

Composants chimiques	Lait de vache (g/l)	Lait de chèvre (g/l)
Eau	900	900
Matière protéique	32	30.8
Lactose	48	48
Calcium	1.25	1.25
Phosphore	0.95	0.95
Matière grasse	40.4	34.4

3- Genre *Leuconostoc*

3- 1- Historique sur les *Leuconostoc*

Leuconostoc est un genre de bactéries lactiques. Leur première description a été proposée en 1878, par Van Tieghem (**Garvie, 1986**), l'isolement des premières souches produisant du dextrane à partir de saccharose présenté dans le milieu provient des accidents apparus dans les sucreries.

En 1918, EVAN trouva que les espèces du genre *Leuconostoc* ont le caractère hétéro fermentaire, donc ils sont capables de produire de CO₂ à partir du glucose, et celui-ci a été confirmé par HUCKER en 1928 (**Devoyod et Poullain, 1988**).

Ce genre comprend 12 espèces microbiennes dont : (*L.citreum*, *L.carnosum*, *L.fallax*) .(**Tormo.,2010**).

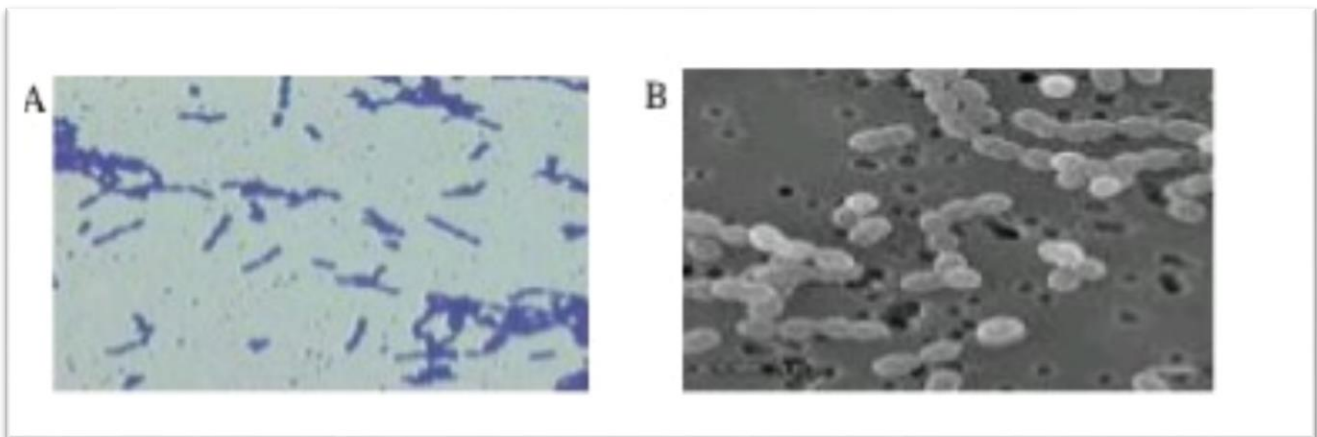


Figure 01 : image de *Leuconostoc* : (A) observation de *Leuconostoc* par microscope Optique (B) Observation de *Leuconostoc* par microscope électronique

Les *Leuconostoc* producteurs de dextrane (Betacoccus)(**Devoyod et Poullain, 1988**). Sont hétéro fermentaire, leur forme est lenticulaire, ils sont soit en paires ou en chaînes, mésophile (**Mouchet, 1962**). Et se caractérise avec la production d'acide lactique (isomère D), de CO₂, d'éthanol, hydrolyse, de l'esculine et la formation de dextrane pour certaine espèces, la

température de croissance de cette bactérie est 30 C°, et elle a une capacité accroitre à différents PH (Pilet *et al*, 1998 ; Ho *et al*, 2007).

4- Ecologie des *Leuconostoc*

Les *Leuconostoc* sont des bactéries épiphytes largement retrouvée dans la nature et sont associés aux plantes ,ils ont été isolés à partir des végétaux (Hemme et Foucaud-Scheunemann .,2004) et dans divers produits végétaux fermentés , tels que concombre, kimchi ,chou et olives(Kim et chun,2005 ;Mäki .,2004).En plus du matériel d'origine végétale, ils sont fréquents dans les aliments d'origine animale (lait cru et produits laitiers, viande, volaille et poissons) (Björkroth et Holzapfel,2006) . Ainsi le lait de chamelle cru ou fermenté qui est considéré comme un biotope favorable pour les *Leuconostoc*(Bellil, 2019).

5- Classification de *Leuconostoc*

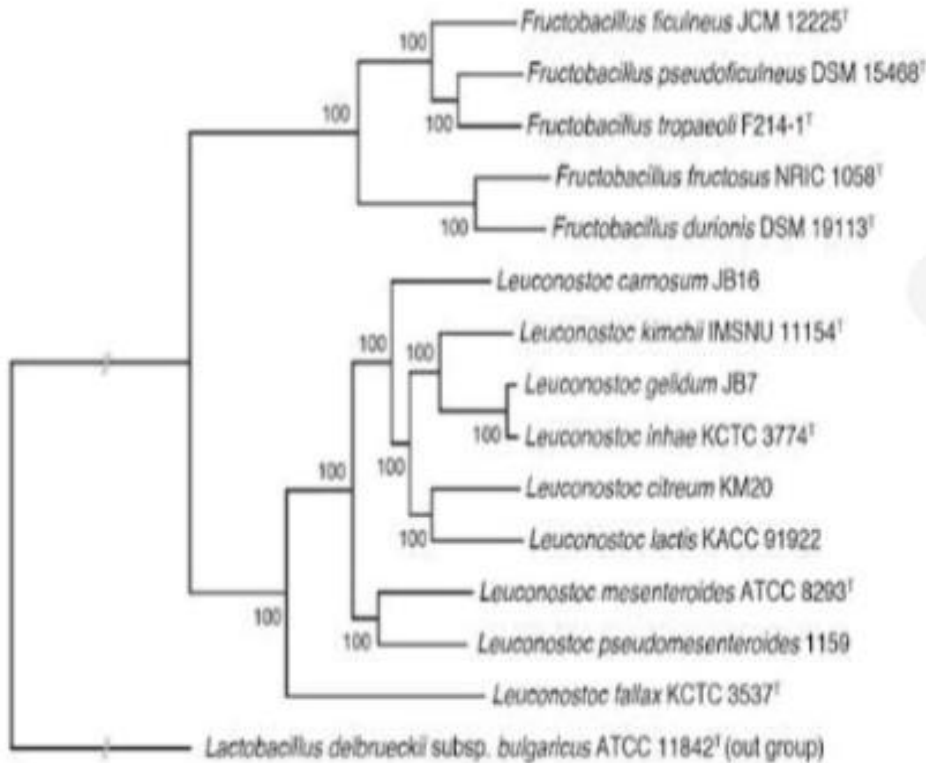


Figure 02 : Arbre montrant les relations phylogénétique entre les espèces de *Leuconostoc* selon leur séquence de l'ARN 16s (Hansal .2015).

La première classification exhaustive du genre *Leuconostoc* est celle de HUCKER et PEDERSON de 1931 qui ont étudié 80 souches d'origines très diverses (sirop de sucre, légumes en fermentation, y compris de choucroute, fenouils marinés, haricots verts, betteraves, blettes, produits fermentés à base de tomates ainsi que de lait et de produits laitiers). Ils ont classé le genre *Leuconostoc* en trois groupes :

- Le groupe I ne fermentant pas le saccharose : *Leuconostoc citrovorus*.
- Le groupe II fermentant le saccharose et les pentoses : *Leuconostoc mesenteroides*.
- Le groupe III fermentant le saccharose mais non les pentoses : *Leuconostoc dextranicus*.

Les groupes II et III sont des producteurs de dextrane, or bien que *Leuconostoc citrovorus* ne produise pas de dextrans, les propriétés de production de gomme par des organismes faibles producteurs d'acide isolés de levains montrent, d'après HUCKER et PEDERSON, qu'ils sont identiques aux organismes dextrane – positifs isolés des végétaux et des sirops de sucre. (Hucker et Pederson., 1931).

Depuis la première classification du genre la taxonomie n'a pas cessé d'évoluer. Leur classification change au fur et à mesure avec la progression des connaissances, pour s'adapter aux nouvelles connaissances scientifiques. Selon (Hui et Evranuz, 2016), ce genre renferme 14 espèces (*mesenteroides*, *lactis*, *seudomeseneroides*, *carosum*, *gelidum*, *fallax*, *citreum*, *gasicomitatum*, *kimchi*, *garlicum*, *inhae*, *holzapfelii*, *palmaetmiyukkimchii*). L'espèce *Ln : mesenteroides*, *subsp. dextranicum*, *subsp. cermoris*) et *subsp. suionicum* qui a été ajoutée par (Gu et al., 2012) (Ruppitsch et al., 2021).

Parmi la famille des *Leuconostocaceae*, sept génomes de *Leuconostoc*, ont été complètement séquencés. Outre onze, génomes sont disponibles mais avec des séquences brutes. La taille du génome des *Leuconostocaceae* varie de 1.4 à 2.2 Mb (Chelo et al, 2019). Ils présentent de 1 à 6 plasmides (masses moléculaires allant de 1 à 76 MDa), dont la plupart sont cryptiques. Cependant, les gènes impliqués dans le transport et l'hydrolyse du lactose, ainsi que dans la production et la résistance à la bactériocine, sont portés par un plasmide. Chez certaines espèces, la bactériocine (*mésentéricine* Y105) est codée sur un plasmide dans *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* Y105.

6- Caractères généraux

L'identification des caractéristiques spécifiques aux *Leuconostoc* est basée sur des caractères phénotypiques et ceci est pour isoler ces bactéries, ainsi pour établir une distinction entre quelques espèces (HANNACHI, 2008). Parmi ces caractères il existe: la tolérance à l'oxygène, la résistance à la salinité dans des différentes concentrations, la capacité de produire du CO₂ et des substances aromatiques, le pouvoir fermentatif et la production des exo polysaccharides (GURTLER et MAYALL, 2001).

6-1- Caractères morphologiques et cultureux

Les *Leuconostokes* sont exigeantes sur le plan nutritionnel et nécessitent une source d'acides aminées et de vitamines ainsi qu'un glucide fermentable pour leur donner de l'énergie. Habituellement, elles poussent bien dans les bouillons de Man, Rogosa et Sharpe, mais mal dans le lait, nécessitant souvent des suppléments de vitamines B, de minéraux et d'acides aminés pour la croissance. Les acides aminés spécifiques dont ils ont besoins à l'aspartate, le glutamate, la valine, la leucine, l'isoleucine et en fonction de la souche, l'histidine, la méthionine, tryptophane, arginine et cystéine. Mg²⁺ et Mn²⁺ stimulent leur croissance. Les *Leuconostokes* sont incapables de métaboliser l'arginine (LIU, 2016). Certaines espèces telles que *Leuconostoc mesenteroides* ne peuvent pas croître en absence d'ions minéraux, ce qui indique l'exigence absolue pour ces éléments (FOUCAUD et al., 1997).

6-2- Caractéristiques physiologiques et biochimiques

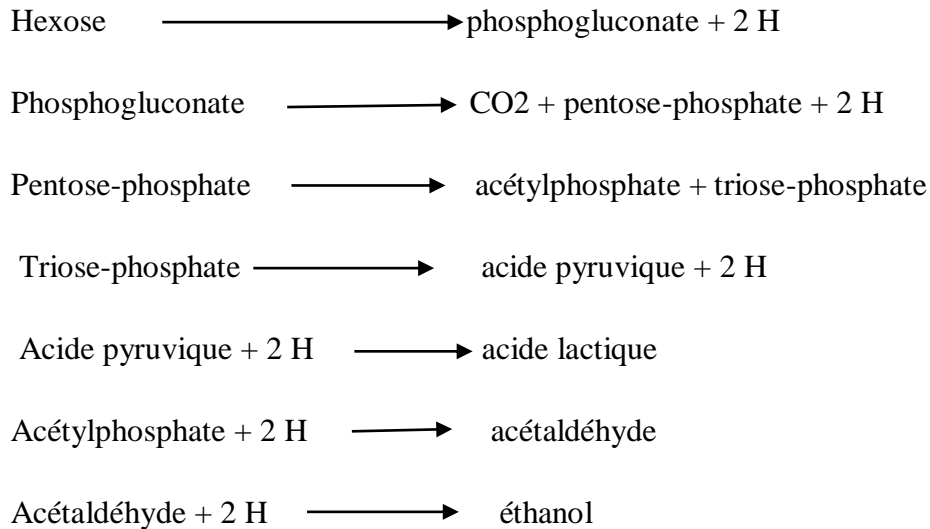
Les espèces de *Leuconostoc* sont des bactéries mésophile, leurs température optimum de croissance est de 18- 30°C, leur température minimale est de 5°C et la maximale est de 40°C (RAHMANI, 2014). Et leur pH optimale de croissance ne se fait que à un pH voisin au celui du lait et ne se développent plus à un pH acide (CHAKOU et BESSADIK, 2018). Parmi les caractères biochimiques les plus importants, nous pouvant citer: la fermentation des sucres, la fermentation de citrate, la production de dextrane (RAHMANI, 2014).

6-2-1-Fermentation des sucres

Les bactéries lactiques ont la capacité de produire de l'acétaldéhyde et de l'éthanol à partir du glucose (LEES et JAGO, 1976; in BEN GUEHZA et MOUKNINE, 2019). Trois Chapitre I Généralités sur les *Leuconostoc* 9 voies principales existent pour la synthèse de l'acétaldéhyde à

partir du glucose: la voie d'Embden-Meyerhof, celle d'EtnerDoudoroff et la voie des hexoses mono phosphates (DEVOYOD et FRANCOISE, 1988).

Compte tenu des études effectuées sur *Ln. mesenteroides* ou *Ln. dextranicum*, il est possible de donner le schéma simplifié suivant de la fermentation des hexoses par les *Leuconostoc*:



Soit : hexose CO_2 + éthanol + acide lactique (DEVOYOD et FRANCOISE, 1988). L'acétate est le principal produit terminal du métabolisme des hexoses des souches de *Leuconostoc* par voie oxydative (ITO et *al.*, 1983).

6-2-2- Fermentation de citrate

L'acide lactique est utilisé par nombreuse espèces de genre *Leuconostoc*, cependant il ne peut être dégradé qu'en présence d'un substrat fermentescible et une source d'azote. (LEUVEAU et BOIUX, 1993). Le transport du citrate à travers la membrane cellulaire est assuré par un citrate perméase. Une fois dans la cellule, le citrate est clivé en acétate et oxaloacétate par un citrate lyase (Figure 03) (GERALD et *al.*, 2001). L'oxaloacétate est ensuite converti en pyruvate et en CO_2 par une oxaloacétate décarboxilase (GERALD et *al.*, 2001).

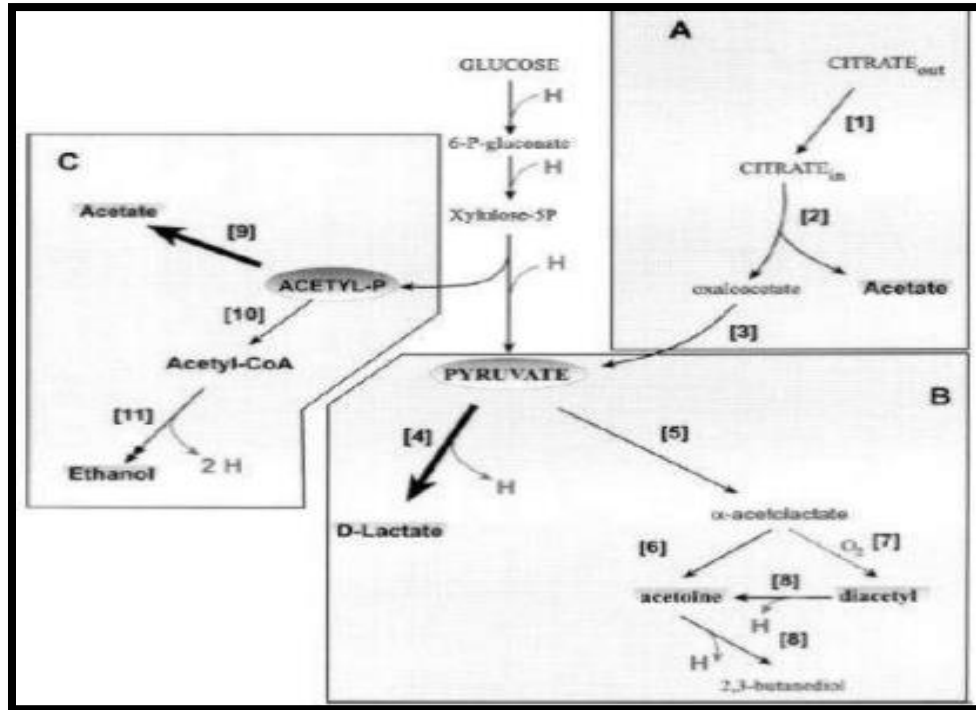


Figure03: Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides*. 1 citrate perméase, 2 citrate lyase, 3 oxaloacétate décarboxylase, 4 lactate déshydrogénase, 5 a acétolactate synthèse, 6 a-acétolactate décarboxylase, 7 décarboxylation non enzymatique, 8 2,3-butanediol déshydrogénase, 9 acétate kinase 10phospho transacétylase, 11 alcool déshydrogénase (GERALD et al, 2001).

1. Les principales fonctions sont : la production d'acide l'acide acétique J .J .DEVOYOD, Françoise POULLAINE), la protéolyse, la lipolyse, la production de gaz et d'arôme et l'inhibition des bactéries indésirable (pathogène entre autres) d'après **Stadhouders(1974)**.

2-Utilisation de *Leuconostoc* pour améliorer la structure des fromages :Ils sont utilisés pour améliorer l'ouverture, des fromages. Pour**STADHOUDERS(1980) UMBERT et al. (1957)**

3-Utilisation des *Leuconostocs* pour éliminer certains défauts de goût : L'acétaldéhyde est un produit du métabolisme des *Ln* : Une petite quantité d'acétaldéhyde est reconnue comme participant à l'obtention d'un bon arôme selon (**LINDSAY et al. 1965**) et **KEENAN et al. (1966)**.

4. Production de dextrans :

Les dextrans produits par *Ln. mesenteroides* associées à l'épichlorhydrine ont été utilisés dans les procédés de filtration sur gel de concentration ou de récupération de protéines à partir de lactosérum de fromagerie (**LAWFORD et al., 1979**).

Ln. mesenteroides a été associé à *Xanthomonascampes* tris pour produire des bouillons visqueux à partir de lactosérum supplémenté en saccharose (**SCHWARTZ et BODIE, 1984**).

5. Ils jouent un rôle essentiel dans plusieurs fermentations industrielles (**Ogier et al, 2008**) comme celui des saucisses fermentées, des légumes et des produits fermentés à base de céréales et des produits laitiers (tels que le beurre, crème, lait frais et crus, fromage)(**Guiraud,2003**).

6-3- Caractères biotechnologiques

Les *Leuconostokes* représentent le troisième groupe important de bactéries lactiques puisqu'ils ont une grande importance et jouent un rôle essentiel dans plusieurs fermentations industrielles **OGIER et al., (2008)** comme celui des saucisses fermentées, des légumes et des produits fermentés à base de céréales et des produits laitiers (tels que le beurre, crème, lait frais et crus, fromages) (**GUIRAUD, 2003; OGIER et al., 2008**).

Ces bactéries sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort par la production de CO₂. Ces ouvertures facilitent le développement, la croissance et l'installation correcte de *penicillium roquefort* (**Devoyod et al, 1988**).

L'obtention de saveur caractéristique aussi la texture et la saveur d'une grande variété des produits fermentés sont améliorés (**Hannachi, 2008**) en particulier par l'intervention de *Ln : mesenteroides* et *Ln : lactis* qui métabolisent le citrate et produisent des composés aromatiques qui contribuent à la texture de fromage tel que di acétyl et acétone (**Vedamuthu, 1994**).

Leur métabolisme du citrate et des oses participent à l'aromatisation des produits laitiers fermentés. Leur production d'acide acétique, de di acétyl et de CO₂, en inhibant les bactéries psychotropes, permettrait d'augmenter la durée de vie de fromages (**Idder, 2014**).

Peuvent induire une altération par production de composé indésirable (amine biogènes) dans les aliments, ou dextrane dans les processus de fermentation du sucre (**Hemme et al, 2004**).

L'utilisation des LAB pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques.

6-3-1- L'activité protéolytique

Les *Leuconostoc* peuvent acquérir tous les besoins en acides aminés par l'hydrolyse des protéines présentant dans le lait et ceci grâce à une fermentation reposant sur un système protéolytique. Le métabolisme d'hydrolyse des protéines (**Zergoune, 2015**).

6-3-2- L'activité lipolytique

Les bactéries lactiques notamment les *Leuconostoc* possèdent une variété d'enzymes lipolytiques capables d'hydrolyser divers esters d'acide gras, des substrats de tri-, di- et mono-acylglycerol (**Holzappel et Wood., 2014**).

Les propriétés lipolytiques peuvent présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**Corrieu et Luquet, 2008**). Les enzymes lipolytiques sont produites au cours de la phase exponentielle de croissance, la production est fortement influencée par les conditions de croissance (**Kenneally et al, 1998**).

6-3-3- L'activité antibactérienne

Les BL y compris Les *Leuconostoc* sont très connus par la production d'une variété de composés antimicrobiens tel que: l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide propénoïque, les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène, le di acétyl, la ré utérine et dioxyde de carbone et diverses substances inhibitrices. Cette propriété est utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour la bio conservation, en utilisant une microflore naturelle contrôlée et/ou leurs produits antimicrobiens. (**Labioui et al., 2005**), 2009 ; PAPAGIANNI, 2012; BEN ATTALLAH et al, 2017).

Production d'exo polysaccharides (EPS) :

D'après **Garvie (1984)** .*Ln. mesentroides* se développe bien sur milieu contenant du saccharose et forme de grandes quantités de dextrane, tandis que *Ln. dextranicum* est moins actif et forme seulement de petites quantités de dextrane. Selon **Devoyod et Poullain (1988)** deux types de colonies été observées sur le milieu au saccharose de **Mayeux, Sandine et Elliker(1962)** ;

- a)- de grosses colonies gluantes, devenant rapidement confluentes au fur et à mesure que l'incubation se prolonge ;
- b) De petites colonies (2 mm environ de diamètre) bombées et adhérant fortement à la surface de la gélose.

6-3-4- Activité aromatisant

- ✓ Production de substance aromatique 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 di acétyle sont les plus importants (TAMIME, 1990). Certaines espèces de *Leuconostoc* utilisées dans l'industrie laitière sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers : di acétyle, acétoïne, 2,3- butane diol (RAYNAUD et al, 2003 ; LEROY et DEVUYST, 2004).

7- Utilisations du genre

Les *Leuconostoques* jouent un rôle central en plusieurs secteurs tel que l'industrie alimentaire, pharmaceutiques, l'agriculture, et la biotechnologie. Tandis que leur utilisation en industrie alimentaire constitue l'application majeure de ces bactéries (KASSAS, 2017). Les exopolysaccharides produit par *Leuconostoc* ont un rôle d'agents épaississants, des stabilisants, des émulsifiants, des agents gélifiants et/ou viscosifiant dans L'industrie médicale, pharmaceutiques et même dans la fabrication des cosmétiques (SANLIBABA et ÇAKMAK, 2016). Sa présence dans les aliments améliore les propriétés rhéologiques et organoleptiques des produits fermentés (tels que les produits laitiers) dont ils ont plusieurs usages : contrôlent la viscosité et modifient le flux, améliorent la texture, sensation de bouche et la stabilité de congélation-décongélation, épaississants, agents de suspension, produits alimentaires de faibles calories, fibres alimentaires, films et agents de revêtement, glaçage des aliments congelés, et agents hydratants (BAJPAI et al., 2015). Les EPS peuvent également être utilisées comme source d'oligosaccharides et de monomères de sucre. (PATEL et al ., 2012). Les *Leuconostoques* sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort par la production de CO₂. Ces ouvertures facilitent le

développement, la croissance et l'installation correcte de *Penicillium roqueforti* (DEVOYOD et *al.*, 1988).

I. Le dextrane

Caractérisation de dextrane

Le mot dextrane a été utilisé pour la première fois en 1874 par Scheibler et cela pour étudier la nature du composé responsable de l'apparition d'une certaine viscosité dans les jus de betterave sucrés, le comportement que Pasteur en 1861 (Pasteur, 1861)

Ce produit est utilisé pour des applications cliniques présente au minimum 50% des liaison α -(1,6) dans sa chaîne principale et différents types de ramifications, principalement α -(1,3), mais aussi α -(1,2) ou α -(1,4) en fonction de la souche productrice (MONSAN *et al.* , 2001).

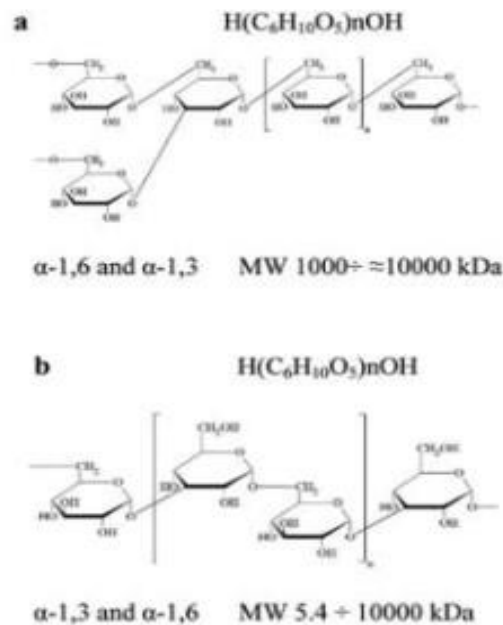


Figure 04 : Représentation schématique de la structure générale du dextrane (Covis, 2011, Harutashi 2013, Mensink et *al.*, 2015)

CHAPITRE 2 :
MATRIEL ET METHODES

1- Objectifs

L'objectif principal de cette étude consiste principalement sur l'isolement, identification phénotypique et la recherche des caractères technologiques des souches de *Leuconostoc* isolées à partir de différents lait cru (vache, chèvre, brebis et chamelle) de race locale de différentes régions d'Algérie et à rechercher d'éventuelles souches d'intérêt par les étapes suivantes :

- ✓ Isolement et purification des bactéries du *Leuconostoc*.
- ✓ Identification phénotypique des isolats lactiques et la recherche de quelques caractéristiques biochimiques et physiologiques.
- ✓ Recherche des aptitudes technologiques des isolats lactiques.

2- Lieu de travail

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie appliqué 3 de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Abed Alhamid Ibn Badais Mostaganem).

3- Provenance des échantillons

Les différents échantillons de lait collectés dans les régions de Laghouat et Mostaganem sont consignés dans le **tableau3**.

Tableau3 : provenance et l'origine des échantillons

Echantillon	Date de collection	Provenances
Lait de chamelle	1 /03/2024	Laghouat
Lait de chèvre(1)	24/ 03/2024	Bouguirat Mostaganem
Lait de brebis	24/03/2024	Bougierait Mostaganem
Lait de vache(1)	25/03/2024	Sidi lak der Mostaganem
Lait de chamelle	18/03/2024	Laghouat
Lait de vache	18/03/2024	Moucheté Mostaganem
Lait de chèvre	15/04/2024	Sidi Ali Mostaganem
Lait de vache	18/04/2024	Achaacha Mostaganem
Lait de chèvre(2)	20/04/2024	Bougierait Mostaganem
Lait de vache (2)	21/04/2024	Sidi lak der Mostaganem

Le lait cru doit être traité avec un grand soin afin d'éviter tout risque de contamination qui peut influencer sur la flore lactique. En effet, la réalisation du prélèvement nécessite le port de gants et laver les trayons avec une serviette propre, tirer quelques jets de lait pour réduire le nombre de bactéries dans le canal du trayon (Lévesque, 2004, Benazzouz, 2012).

Douze échantillons ont été prélevés à l'aide de traite manuelle de manière aseptique dans des flacons de verre stériles de 200 ml, transportés dans des boîtes isothermes de 4°C acheminés au laboratoire et conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation.

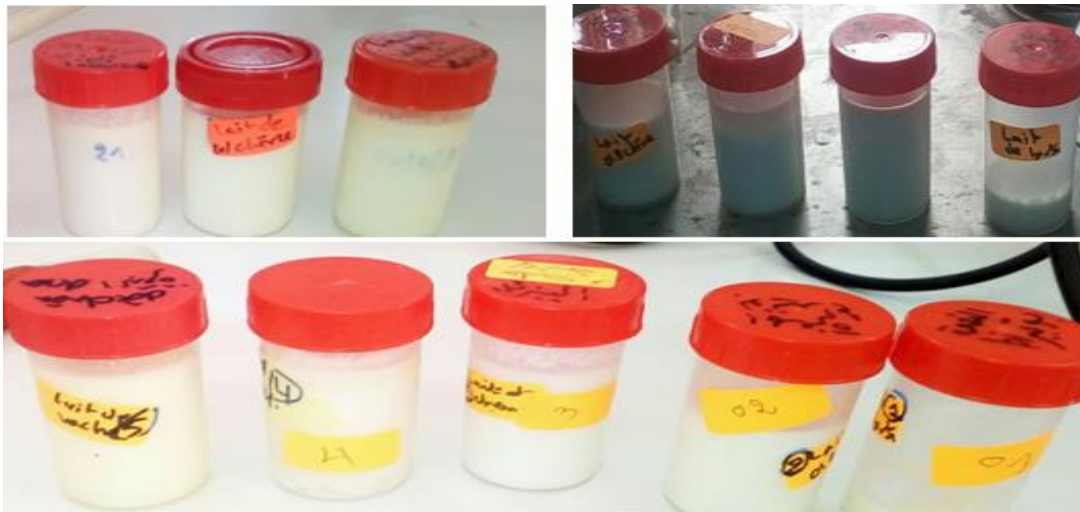


Figure05:Les échantillons collectés pour isolement des souches *Leuconostoc*

4- Milieux de culture des souches

L'isolement s'est fait sur deux milieux.

- MRS (DE Man Rogosa *et al*, 1960), pour la culture des *Leuconostoc* (voir annexes).
- Gélose nutritive (GN) pour la culture des souches pathogènes (voir annexes).

4-1- Isolement des souches

Après la fermentation du lait, une série de dilutions de 1 ml de lait fermenté ont été homogénéisés dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique 0.85% (Ashraf et shah, 2011) (voir annexe). Chaque suspension a été homogénéisée pendant 2 minutes puis des dilutions décimales sont réalisées de l'ordre de 10^{-1} , 10^{-5} .

Les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} ont été étalées sur des boîtes de pétri contenant de la gélose MRS (De Man *et al.*, 1960) ajusté à pH 6.5. Les boîtes ont été incubées en anaérobiose pendant 48 h à 30 °C (Figure 07). Les techniques d'isolement sont basées sur l'obtention d'un clone (Mathot *et al.* 1994 ; Khedid *et al.*, 2006 ; Benazzouz, 2012).

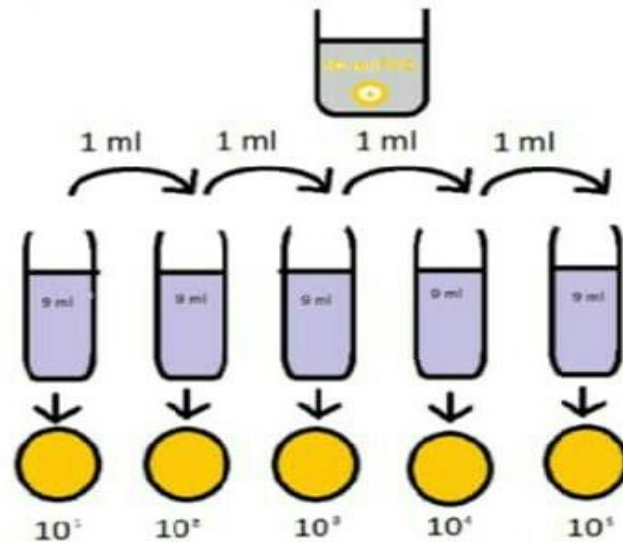


Figure 06 : Dilutions décimales

4-2-Purification des souches

A partir des colonies obtenues, des purifications sont effectuées sur milieu MRS solide/solide ; solide/liquide par repiquage successif. L'opération est renouvelée en prenant chaque fois des colonies identiques bien distinctes dans un milieu sélectif cité ci-dessus. Ceci conduit à obtenir une culture dont la pureté est estimée par l'observation macroscopique (l'aspect des colonies) et microscopique des cellules après coloration de Gram (forme).

4-3- Conservation des souches

La conservation d'une souche pure a comme but de maintenir ces souches pures à conservé viable, dans cette étude, deux types de conservation en été réalisé.

4-3-1- Conservation des souches a longue durée

A partir de jeunes cultures (24h-48h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 12000 trs/min pendant 20 min à 4°C. Les surnagent sont jetés puis les culots récupérés et lavés avec de l'eau physiologique ensuite additionnés avec le milieu de conservation. Le milieu de conservation contient un bouillon MRS additionné à 20 % (v / v) de glycérol.

Les cultures des souches ont été conservées en tubes eppendorfs à -20 °C (Accolas *et al.*, 1980).

5- Caractéristiques phénotypiques des souches

5-1- L'aspect macroscopique

Cette étude basé sur l'observation visuelle des colonies obtenues sur les boites pétri contenant milieu MRS solide pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies (**Badis et al**, 2005).

5-2- L'aspect microscopique

Sur des cultures jeunes et sur des frottis fixés des colorations de Gram ont été réalisées. L'observation microscopique au grossissement (Gx1000) permettra d'observer la morphologie des cellules bactériennes et leur mode d'association ainsi que le type de Gram(**Badis et al**, 2004).

6- Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches

6-1- Test de catalase

L'activité catalytique se traduit par l'intervention d'une enzyme respiratoire appelé catalase qui permet de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau(H₂O)et oxygène (O₂).

La recherche de la catalase se fait par contact d'une colonie bien isolée avec une goutte d'eau oxygéné : un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la

décomposition de l'eau oxygéné sous l'action de la catalase (**Guiraud, 1998**).seules les bactéries à catalase négatif sont retenues.

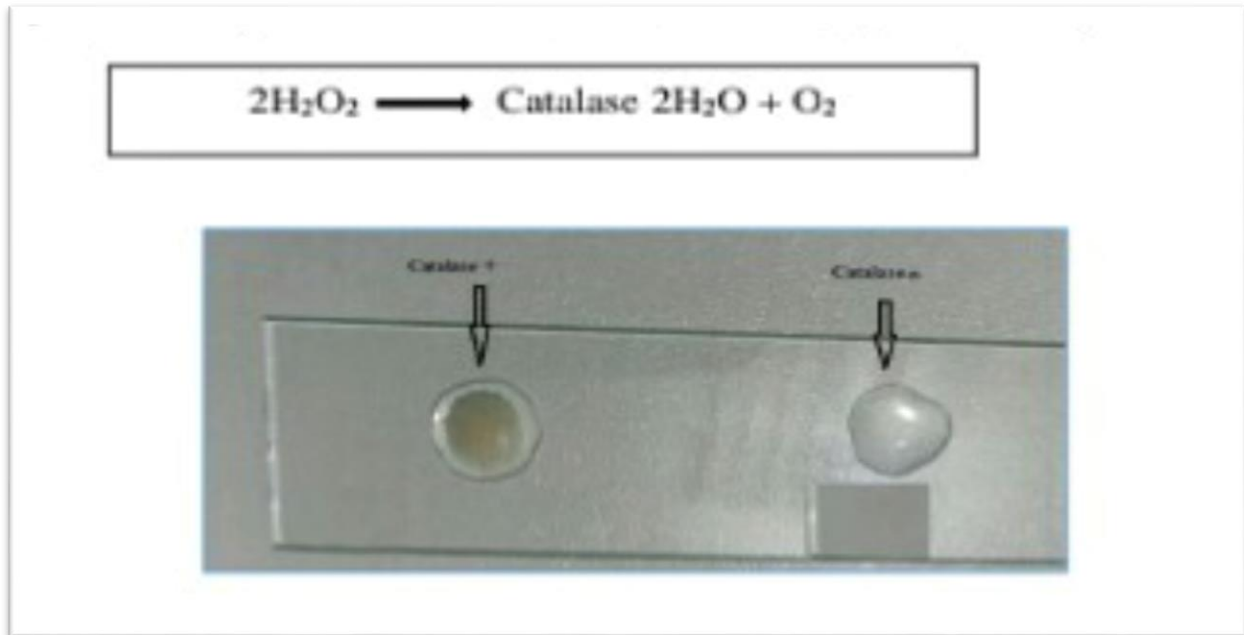


Figure07 : Test de catalase (catalase +, catalase -)

6-2- Test physiologiques

6-2-1- Croissance à différentes températures

La croissance bactérienne est évalué par l'appariation d'un trouble d'un trouble dans le milieu MRS liquide après 5jours d'incubation à 4C°,10C°,30C°,et 45C°(**Guessas et Kihal, 2004**).La thermorésistante des bactéries est testée au bain marie à 63C°Pendant 30minutes , suivie d'une incubation à30 C° /24h à48h (**Guiraud,1998**).

Ce test a pour but de distingue les souches mésophiles des thermophiles ainsi que les thermorésistantes.

6-2-2- Croissance à différents PH

A partir d'une culture jeune des isolats (culture de 18h à 30°C), nous avons réalisé un ensemencement dans le milieu MRS liquide à différents PH : 4 ; 6.5 puis incubé à 30°C pendant 48h à 72h (Guessas et Kihal, 2004).

Ces tests ont pour but de déterminer les microorganismes acidophiles, basiphiles et neutrophiles.

6-2-3- Croissance à différentes concentrations de Na Cl

L'intérêt de ce test de rechercher les souches tolérantes à la salinité (halophiles) .un ensemencement des isolats est effectué dans un milieu MRS liquide content 4% et 6.5% de chlorure de sodium .Il est ensuite incubé à 30°C avec un témoin MRS liquide sans sel, pendant 2 à 3 jours. (Gueusas et Kihal, 2004; Badis *etal*, 2004).

La croissance des bactéries est évaluée par l'apparition de turbidité dans le tube (Leveau et bouix, 1980).

6-2-4- Croissance sur le lait de Sherman (lait au bleu de méthylène à 0.1% et 0.3%)

Ce test montre l'aptitude des souches à pousser en présence de bleu de méthylène qui en bleu en milieu très oxydant, blanc en milieu réduit.

Chaque culture lactique à tester est ensemencé dans le lait au bleu méthylène à 0.1% et 0.3% ;et après on incubé à 30°C pendant 24 heures à 48 heures.

Les *Leuconostoc* réduisent le bleu de méthylène avec coagulation.

6-3- Tests biochimiques

6-3-1 -Recherche de type fermentaire

Ce test permet de déterminer le type de métabolisme (homofermentaire ou hétéro fermentaire) par lequel le substrat carboné est transformé, et la production de gaz à partir de la dégradation du glucose (Hansal, 2015).

Les souches isolées ont été inoculées dans du bouillon MRS contenant les cloches des Durhams, puis incubées à 30°C pendant 48h .L'absence de gaz dans les cloches indique le

métabolisme homofermentaire ; tandis que la présence de gaz montre qu'il s'agit d'un métabolisme hétéro fermentaire (**Boumediene, 2013**). Le type fermentaire de *Leuconostoc* est hétéro fermentaire (le métabolisme de glucose produit de quantités équimolaire d'acide lactique , d'éthanol et de CO₂(**Hansal .,2015**).

6-3-2- Utilisation des sucres

La vérification de la capacité de dégradation des sucres de ses souches isolées à été effectué sur bouillons MRS .BCP dépourvu extrait de viande et sans sucre (**Badis et al ., 2005**)

Les sucres utilisés dans ce test sont les suivant : Raffinose, Xylose, Sorbitol, Mannitol, Lactose, Maltose, Fructose, Saccharose, Cellulose, Glucose. Des solution sucré ont été préparer de 1g de chaque sucre avec 10ml de l'eau distillé stérile ,le tout a été homogénéisé puis stérilisé à 100C° pendant 20 min au bain marie .

L'ensemencement a été réalisé dans des microplaquettes contenant des puits, chaque ligne verticale comporte un sucre qui sera utilisé par différents souches, chaque puits contient 200 µl de MRS. BCP avec 100µl de solution sucré et 100µl de suspension bactérienne, le tout a été recouvrir par une couche de huile de paraffine.

Les microplaquettes ont été incubées a 30C° pendant 72h et verifir chaque 24h (**Guessas, 2006**)

6-3-3- Hydrolyse de l'arginine

La dégradation d'arginine en ammoniac se fait par l'intervention d'un enzyme appelé Arginine dihydrolase (ADH), et des acides amines (composés basiques) (**Hansal, 2015**). mise en evidence par l'ensemencement des souches sur milieu M16 .BCP après incubation à 30C° pendant 24h à 48h en anaérobiose. Le virage de milieu de vert au jaune (car on a utilisé l'indicateur coloré le bleu de bromothymol) indique qu'il n'ya pas d'hydrolyse de l'arginine . par contre les colonies de couleur blanches hydrolysent l'arginine (**Boumediene, 2013**).

7- Caractérisation technologique des souches

7-1- Activité protéolytique

Sur les boîte de pétri content du MRS modifier avec 10% de lait et faire un ensemencement les souches à surface et incubé à 30C° pendant 48h.

7-2- Production des Exo polysaccharides EPS

Les exopolysaccharides produit par les souches de *Leuconostoc* est réalisé par des ensemencement sur milieu MRS saccharose (additionné a 5% du saccharose) (Mayeux et al, 1962) et sur milieu hyper saccharose (voir annexe) les cultures ont été ensuite incubés a 30C° pendant 24h à 48h Les souches productrices sont caractérisée par la formation de colonies larges, gluantes et très visqueuses. (Sanchez et al., 2006, Leveau et al .1991).

7-3- Activité antimicrobienne

Nous avons utilisé trois souches de références dans cette étude sont mentionnés dans le tableau 04 suivant :

Tableau 04 : Souches utilisées dans le test antimicrobien

Bactéries	Gram	Référence
<i>Staphylocoques aureus</i>	Positif	ATCC25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC9027
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC25992

Dans un premier temps ces bactérie sont cultivée à 37°C sur 10 ml de bouillon nutritif pendant 24h. La culture d'une nuit obtenue servirait d'inoculum.

7-3-1- Méthode direct (spot agar test)

L'activité antimicrobienne de nos souche à été évaluée sur milieu solide selon la méthode (Fleming et al., 1975).

Les différentes souches isolées ont été testées pour la production d'un composé antimicrobien contre des bactéries pathogènes.

Les souches indicatrices, *E. coli* ATCC 2592, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25992 ont été cultivé dans des bouillons nutritifs à 37 °C pendant 24h.

Les cultures ont été ensemencés sur les boites de pétri contenant MRS a l'aide d'un écouvillon stérile. Ensuite les boites ont été séchées pendant 15 minutes, puis utilisées pour le test de sensibilité.

30 µl de cultures de culture jeune de 24h-72 h est ajouté à des disques stériles en papier (diamètre 6mm) et placés a sur la surface de l'agar MRS.

Ensuite les boites ont été incubées à 30°C pendant 24-48 heures. Après l'incubation, les boites ont été examinées pour vérifier la formation de zones d'inhibition autour des disques. Après l'incubation les boites ont été vérifiées pour les diamètres des zones d'inhibition. Une zone claire de plus de 1 mm autour d'un disc est considérée comme résultat positive (Rubio et al, 2014).

7-4- La résistance aux antibiotiques

Les souches ont été cultivées dans bouillon MRS et incubées à 30°C pendant 18h puis étalées sur la gélose MRS. Des disques d'antibiotiques ont été placés sur gélose et incubés pendant 24heures à 30°C. Les antibiotiques incluent sont Streptomycine (S), Gentamicine (CN), Oxacilline (OX).

Les zones inhibitrices émergeant après 24h d'incubation ont été mesurées. L'activité a été évaluée comme étant sensible, S ($\geq 21\text{mm}$) ; I (16-20mm) et R ($\leq 15\text{mm}$) comme décrit précédemment par (*Liasi et al ; 2009*).

Chapitre 3: Résultats et Discussion

1-Résultats et discussions

1-1- Isolement et purification

Dans notre étude les isolats ont été obtenus à partir des douze échantillons collectés de lait cru de vache brebis, chèvre et chamelle. Les bactéries à Gram positif et catalase négatif sont sélectionnées pour l'étude. Huit isolats ont été sélectionnés comme *Leuconostoc* de forme sphérique sont utilisés pour la caractérisation biochimique, physiologique comme le montre le **tableau 5**.

Tableau 5 : Flore lactique présente dans les différents échantillons du lait

SOURCES	nombre de souches
Lait de chèvre	1
Lait de chamelle	2
Lait de vache	5
Lait de brebis	0
Nombre total	8

Les résultats du tableau montrent l'absence totale des *Leuconostoc* dans le lait de brebis. Ils sont compatible avec ceux décrits par (Zadi-Karam et Karam., 2006 ;Hansal .,2015 ;Zarour.,2018).

Qui ont isolées les souches de *Leuconostoc* à partir du lait de chamelle et du lait de chèvre et de lait de vache selon le résultat de (Meghoufel., 2019). Par contre, nos résultats relatifs au lait de brebis sont différents de ce obtenus par (Mahi., 2010) ;(Boumediane., 2013) et (Zarour., 2018).Qui ont pu isoler des *Leuconostoc* à partir de ce lait.

2- Pré-identification des souches

2-1- Aspect macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique des souches de *Leuconostoc* sur milieu MRS solide après 48h d'incubation nous a permis de distinguer des colonies gluantes, visqueuses blanchâtres (Fig08).

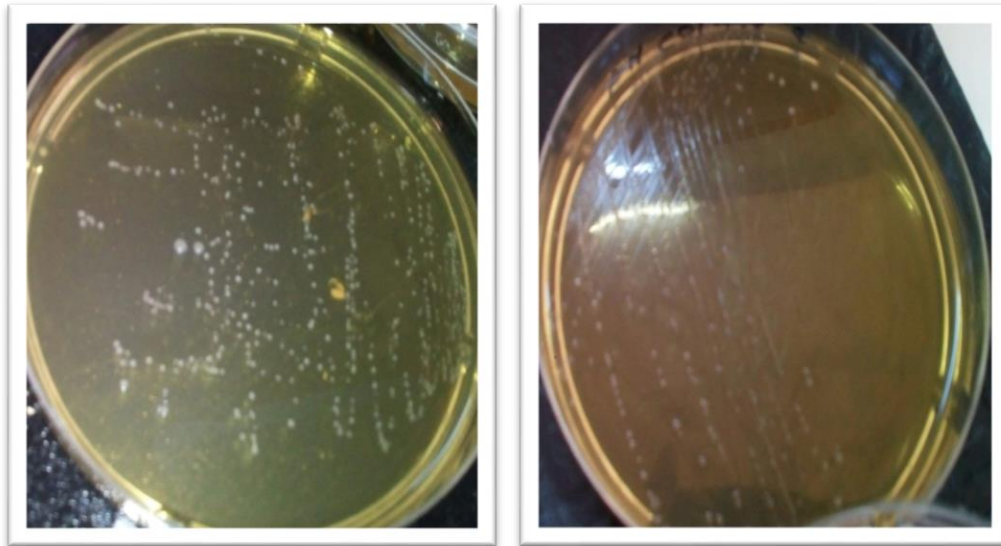


Figure8 : Aspect macroscopique des cultures bactériennes des souches de *Leuconostoc* sur MRS Gélisé (E04, E03C2).

2-1-1- Sur milieu liquide

Après 48h d'incubation, la croissance en milieu MRS liquide se traduit par l'apparition du trouble au fond du tube avec une zone transparente.

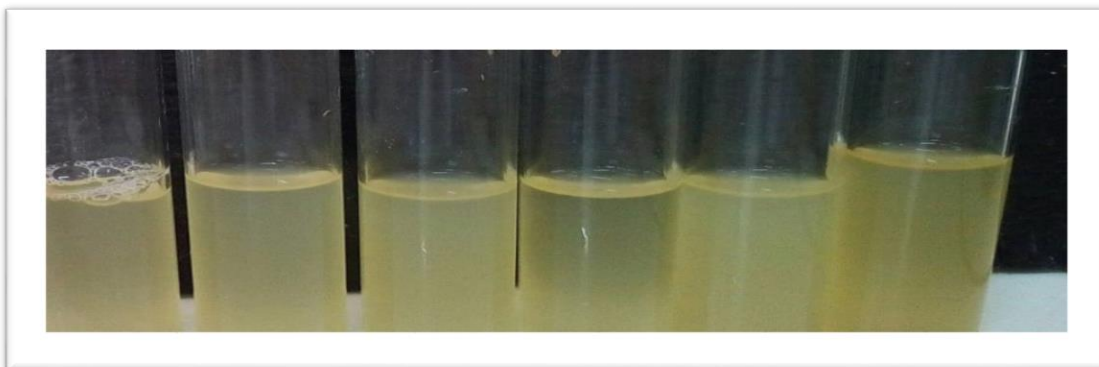


Figure 9 : Aspect des souches de *Leuconostoc* sur bouillon MRS (chamelle, chèvre, E4, E4(C1), E4(1), E3(C2), VSL, VSL (C1))

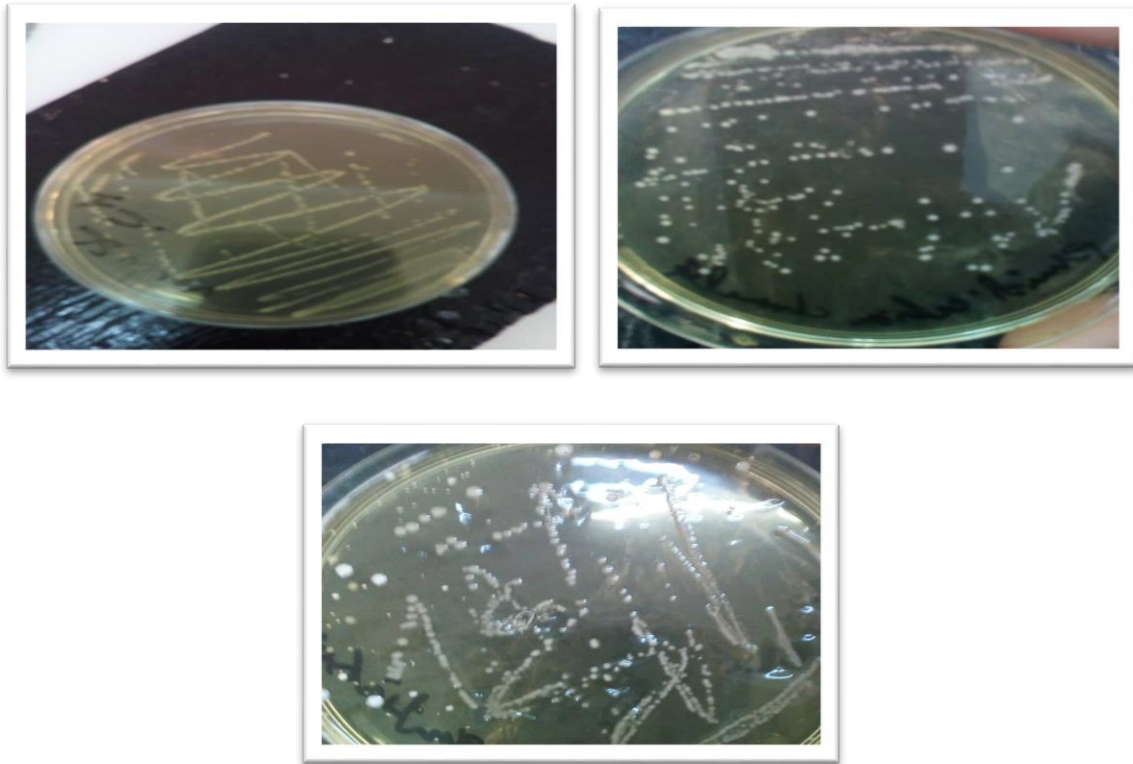


Figure 10: Aspect macroscopique des souches pures des *Leuconostoc* sur gélose MRS (VSL(C1), Chamelle, VSL).

2-2- Aspect microscopique

L'observation microscopique des bactéries isolées, pures après coloration de Gram a révélé que ces souches sont Gram positive, catalase négatives, cellules en forme coques de coques ou ovoïdes associés en paires ou en chaînes courtes ou moyennes (Hansal, 2015) (figure11).

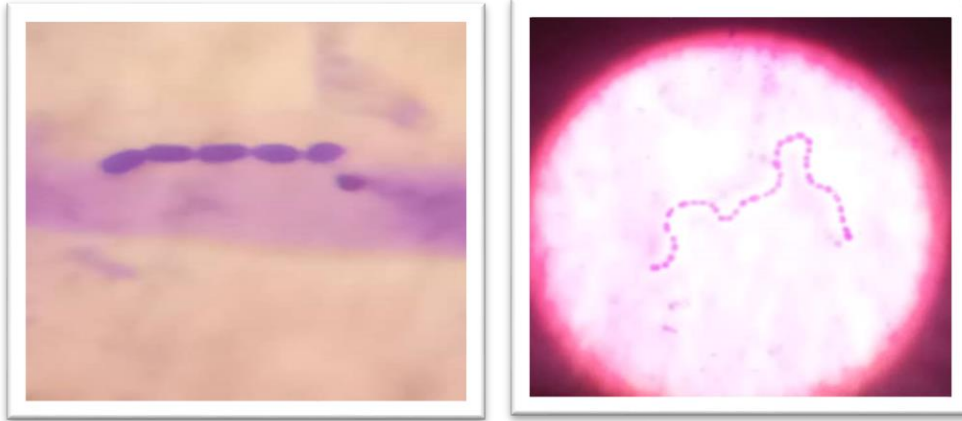


Figure 11 : Observations microscopiques des souches isolées après une coloration de Gram à grossissement $\times 100$ (Chamelle, VSL).

2-3-Test de recherche de catalase

Les souches isolées ne possèdent pas l'enzyme de catalase donc le test est négatif, l'absence de cette enzyme est un caractère spécifique aux bactéries lactiques (*Leuconostoc*).



Figure 12 : Résultats du test de catalase (test négatif).

3-Test physiologiques

Les résultats des tests physiologiques qui ont été réalisés sur les isolats sont représentés dans le tableau suivant : tableau 06

3-1- Croissances à différents températures

Toutes les souches testées n'ont pas poussés à 04C° et a 45C°, par contre il existe une croissance sous une température de 15C° et de 30 C° ceci montre que ces bactéries sont mésophiles (tableau06).

3-2- Résistance à la salinité

Toutes les souches qui ont été testées pour savoir leur résistance aux différentes concentrations de sel et n'ont pas poussées à 6,5% de Na Cl mais été poussées à 4 %.

3-3- Croissance à différents PH

Après une incubation à 30C°, les résultats qui ont été obtenus montrent qu'il n'ya pas de croissance à pH 04 mais les souches se développent bien a pH 6.5 (tableau 06).

Tableau 06 : tableau représentant les résultats des testes physiologique

Souche	Croissance à différents T°				Croissance différents (Na Cl) %		Croissance à différents PH	
	4C°	15C°	30C°	45C°	4%	6.5%	4	6.5
Chamelle	-	+	+	-	+	-	-	+
Chèvre	-	+	+	-	+	-	-	+
SL C(1)	-	+	+	-	+	-	-	+
E 4	-	+	+	-	+	-	-	+
E 4(1)	-	+	+	-	+	-	-	+
E 4 C(1)	-	+	+	-	+	-	-	+
Vache SL	-	+	+	-	+	-	-	+
E 3 C(2)	-	+	+	-	+	-	-	+

+ : croissance

- : pas de croissance

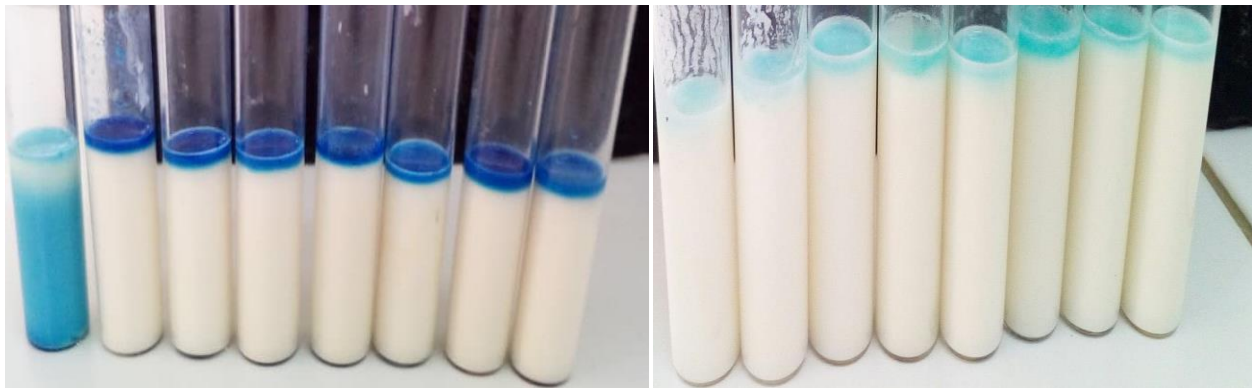
Tableau 07 : résultats de culture sur lait de Sherman

Souche	Chamelle	Chèvre	VSL	VSL C (1)	E 04	E 04 C(1)	E 04 (1)	E 03 C(2)
Culture sur bleu de méthylène 0.1%	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC
Culture sur bleu de méthylène 0.3%	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FAC

FC : fort coagulation

FAC : faible coagulation

Le test de lait de Sherman à 0.1% et 0.3% de bleu de méthylène est réalisé pour étudier la sensibilité aux colorants et le pouvoir coagulant des bactéries lactiques. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures suivantes :



A

B

Figure13 : Résultats du test de bleu de méthylène ((A) 0.3% et (B) 0.1%).

3-4- Culture sur lait de Sherman

Après l'incubation à 30 C° pendant 48h, les souches qui ont été testés par le bleu de méthylène donne une fort coagulation à 0.1% et 0.3% soft un seule échantillon (Chamelle, chèvre, VSL, VSL(C1), E04, E04(C1), E04(1), E03(C2)) qui donne faible coagulation.

Alors nous avons constaté que les souches de *Leuconostokes* ont la capacité de réduire le bleu de méthylène avec coagulation.

4- Tests biochimiques

4 -1- Recherche de type fermentaire

Ce test constitue la première clé d'identification phénotypique des bactéries lactique leur objectif est de faire différencier entre les souches hétéro fermentaires et les souches homo fermentaires (Hansal, 2015).

Après une incubation à 30C°, les résultats montre qu'il ya l'apparition d'un trouble au fond des tubes ensemencés avec un dégagement de gaz de CO₂ au niveau des cloches (flottement), donc les souches étudiées sont des hétéro fermentaire.

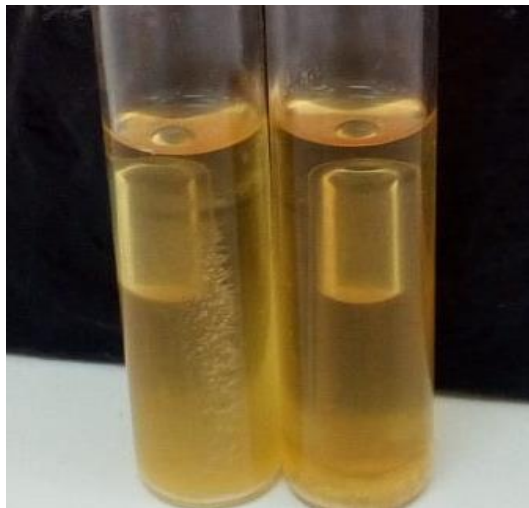


Figure14 : Type fermentaire des souches isolats (*Leuconostoc*) sur bouillon MRS

4 -2- Test de dégradation des sucres

Pour une identification des isolats nous avons établi un profil de fermentation de dix sucres (Raffinose ,Xylose, Sorbitol, Mannitol ,Lactose, Maltose, Fructose ,Saccharose ,Cellulose, glucose) en utilisent le bouillon MRS .BCP sans extrait de viande et dépourvu du sucre, l'indicateur de pH dans ce milieu a été le pourpre de bromocrésol , leur couleur va tourner par la suite vers le jaune avec une acidification de milieu cela indique la dégradation des sucres par les bactéries (Hansal,2015).

Nos résultats montrent la présence de virage de couleur de milieu vers le jaune sauf quelques exception donc les souches qui ont été isolées ont la capacité de se développer à partir différents source de carbone.

Tableau 08 : Le profil de dégradation des sucres par les souches de *Leuconostoc*

Souche	R	MA	SO	MA	XY	LA	FR	CE	SH	GLU
Chamelle	-	+	-	-	+	+	+	+/-	+	+
Chèvre	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
VS	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
VS C(1)	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
E04	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
E04 C(1)	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
E 04 (1)	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
E 03 C(2)	-	+	-	+	+	+	+	+/-	+	+

(+) : Dégradation du sucre

(-) : pas de dégradation du sucre

S1 :Raffinose, S2 :Maltose, S3 :Sorbitol, S4 :Mannitol , S5 :Xylose , S6 :Lactose , S7 :Fructose, S8 :Cellulose ,S9 :Saccharose ,S10 :Glucose.

D'après les critères phénotypiques apportées par différents auteurs (Carr et al,2002 ; Badis et al.,2005 ;Hammes et Hartal, 2006 ;Khadid et al.,2006) nous avons pu conclure que les Leuconostokes sont capable d'utilisés plusieurs sucres. Le virage de couleur Pourpre de bromocrésol contenant dans le milieu MRS BCP confirme que les souchechamelle

,chèvre,VSL,VSL C(1),E (3)C(2),E04,E04(1),E04 C(1) ont dégradés la plupart des sucres additionnés dans le milieu ce qui laisse ce dernier (acide).

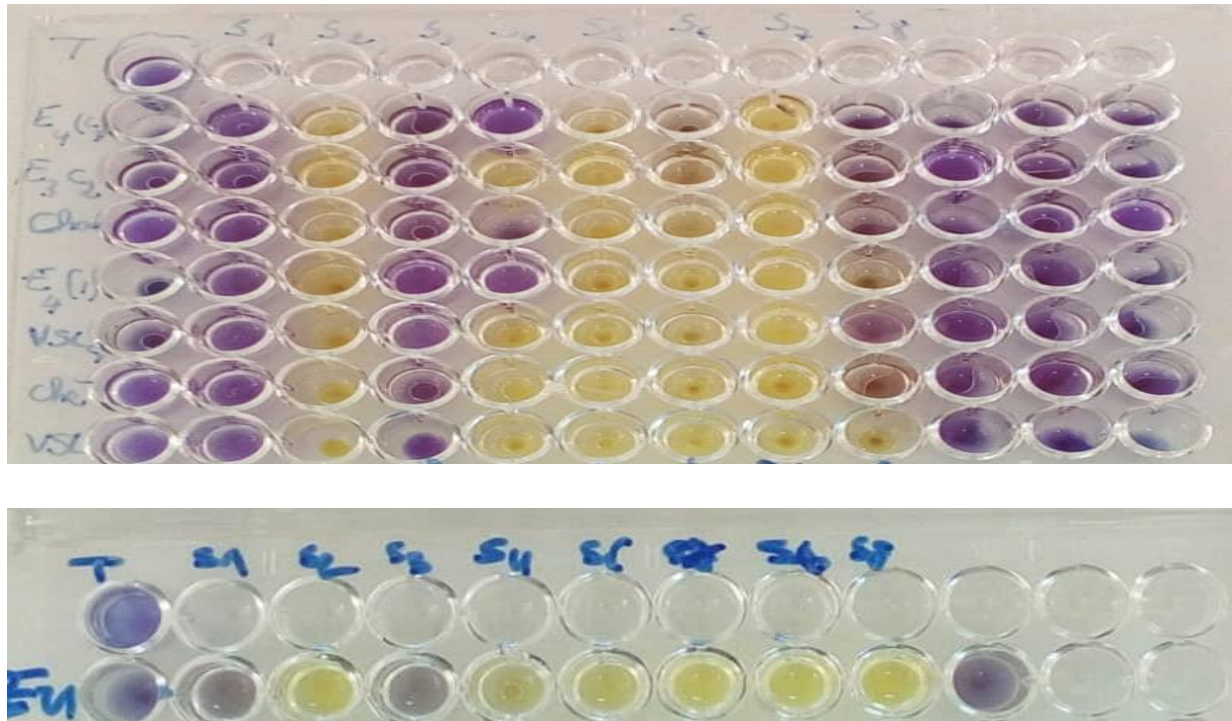


Figure15: Résultats de dégradation des sucres

4 -3- Hydrolyse de l'arginine

D'après Khaddid, la production de l'acide lactique acidifie le milieu de culture (M16 BCP), qui contient un indicateur de pH, et la couleur de ce dernier va virer vers le jaune. Les bactéries possédant.

L'ADH vont ré-alcalinisés le milieu et sa couleur reviendra bleu, les souches qui ne possèdent pas cette enzyme leur milieu va rester jaune (**Hansal, 2015**).

Après 48h d'incubation sur gélose M16. BCP à 30C°, nous avons observé l'apparition d'une coloration jaune à cause de l'acidification du milieu donc ADH – à l'exception de quelques souches. Les résultats montrent que toutes les souches isolées sont ADH- (les souches de *Leuconostoc* sont ADH-).

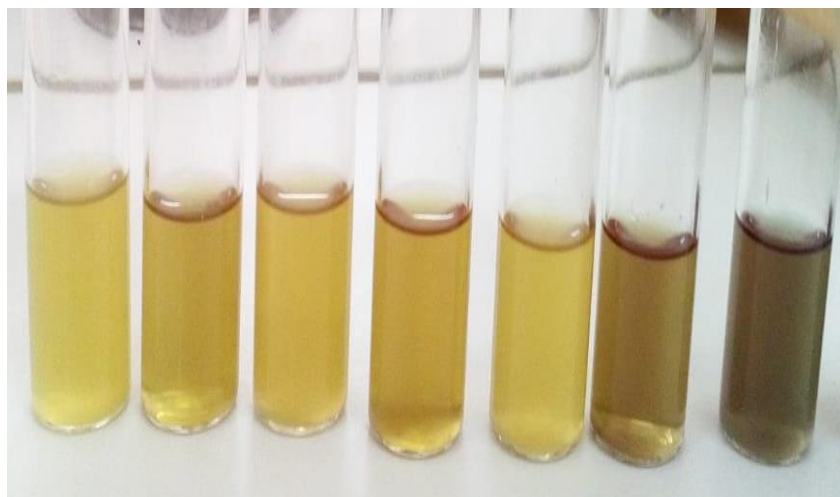


Figure16 : Résultats de l’hydrolyse de l’arginine ADH par les souches de *Leuconostoc* (chamelle, chèvre,VSL, VSLC(1), E (3) C(2), E04, E04(1), E04 C(1)).

Tableau 09 : les caractères biochimiques et morphologiques des isolats.

Souche	Chamelle	Chèvre	VS	VS C(1)	E04	E 04(1)	E 04 C(1)	E 03 C(2)
Production de CO2	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	+/-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-

5-Test technologiques

5 -1- Production des exopolysaccharides (dextrane)

La production des exopolysaccharides à été détecté sur milieux : MRS-M, milieu hyper saccharose. Toutes les souches de *Leuconostokes* isolés sont productrices des EPS (Figure18,19)

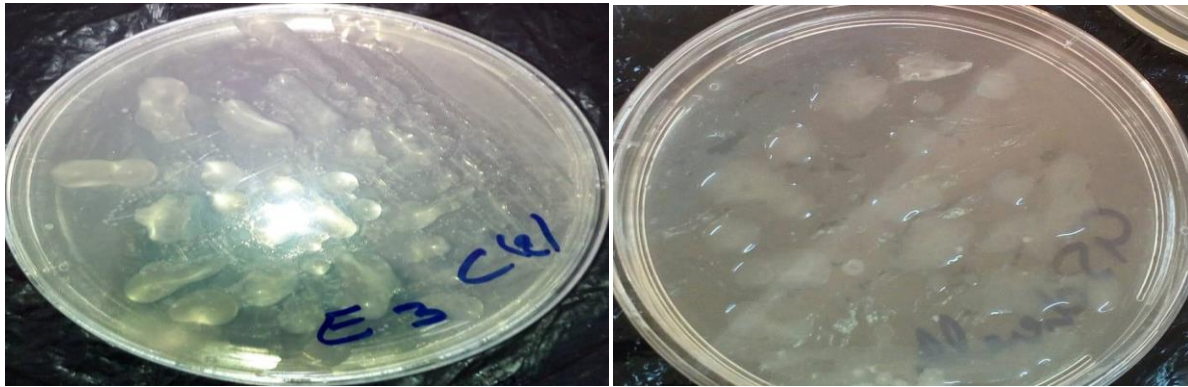


Figure 17:L'aspect des colonies des souches *Leuconostoc* productrice des d'exopolysaccharides sur milieu hyper saccharosé (chamelle, E03C(2)).

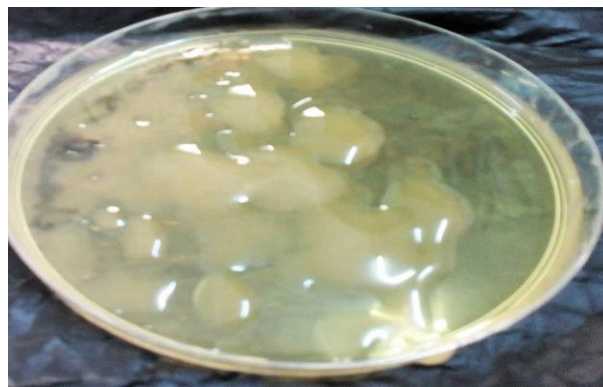


Figure18:L'aspect des colonies des souches *Leuconostoc* productrices des d'exopolysaccharides sur Gélose MRS –M (additionnée 10% Saccharose)(chamelle).

5 – 2- L'activité protéolytique

L'activité protéolytique est importante pour la caractérisation technologique des bactéries lactiques car elle leur donne la capacité de croître efficacement dans le lait et également pour l'amélioration de la qualité organoleptique du produit final. L'activité protéolytique de nos souches a été traduite par la présence d'un halo clair entourant la tache sur la gélose MRS additionnée de 10% de lait écrémé ce qui indique l'hydrolyse de la caséine. Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches isolées ont présenté une activité protéolytique. Les diamètres des halos clairs des souches ont été compris entre 33mm et 13 mm, La souche chamelle a montré un halo d'hydrolyse de diamètre le plus large (33mm) tandis que les souche chèvre, VSLC (1), E3C (2) ont montré le même diamètre des halos (18mm), les souches VSL, E04, E04C(1), E04(1) ont montré presque le même diamètre des halos clairs respectivement (15 mm 16 mm 15 mm 13 mm) .Les résultats obtenus lors de la réalisation de ce test sont illustrés dans (**Tableau 10 et Figure20**).

Tableau10 : résultat de l'activité protéolytique des isolats

Souches	L'activité protéolytique (mm)
Chamelle	33
Chèvre	18
VS	15
VS C(1)	18
E04	16
E 04 C(1)	15
E 04(1)	13
E 03 C(2)	18



Figure19 :L'activité protéolytique des résultants positive des souches *Leuconostoc* sur gélose MRS additionné du lait (chamelle,chèvre,VSL, VSLC(1), E (3)C(2) ,E04,E04(1),E04 C(1) .

5 – 3- L'activité antimicrobienne

Les indicatrices ont été cultivées sur deux milieux gélose nutritive (figure21) et bouillon nutritif



Figure20 : Croissance des souches indicatrices sur gélose nutritive.

L'objectif de cette activité est de chercher l'effet inhibiteur de souches isolées. Toutes les souches testées ont montré une activité inhibitrice contre les bactéries indicatrices (**Savado et al.,2004,Harnadez 2005 et Mami 2013**). Les résultats sont exprimés en mesurant le diamètre de la zone claire autour des disques (mm). Les résultats sont présentés dans le tableau N. Toutes les souches de *Leuconostoc* ont été capables d'inhiber la croissance des trois agents pathogènes (*Pseudomonasaeruginosa* ATCC9027, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli*25992 ATCC25992) avec des diamètres d'inhibition compris entre (8 mm et 12mm).

Tableau11 : résultat de l'activité antibactérienne

Souches	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC25992
Chamelle	12mm	11mm	11mm
Chèvre	09mm	02mm	08mm
VSL C(1)	07mm	05 mm	07mm
E 04 (1)	10mm	06mm	10mm
E 04 C (1)	11mm	06 mm	08mm
E 3 C (2)	08mm	07mm	08mm

Nous avons constaté que la souche chamelle a montré les diamètres d'inhibition les plus larges pour les trois souches indicatrices respectivement (12mm, 11mm, 11mm). .



Figure 21 : activité antibactérienne par des souches (VSL, chèvre, E04, E04 (C1))

vis –à vis *Staphylococcus aureus* ATCC25923

5 – 4- Resistance des antibiotiques

La résistance aux antibiotique est considérée comme une condition préalable à la sélection à la sélection d'une souche pro biotique (FAO /OMS ,2002).Le profil de résistance ou la sensibilité des souches pour 03 type d'antibiotiques est démontré dans (Figure et Tableau). Les échantillon(Chamelle, chèvre, E 04 , E 03 C (2), E 04 C (1) résistent a l'effet des antibiotiques Streptomycine (S) ,Gentamicine (CN),Oxacilline (OX) ,E04 (1) sensible aux 3 antibiotiques ,VSL sensible Gentamicine (CN) et résistance aux antibiotiques (OX) et S ,VSL C(1) sensible à la gentamicine (CN) et l'oxacilline (OX)et résistance de antibiotique(S) .

Tableau 12 : résultats de test de sensibilité aux antibiotiques

Antibiotique	Symbole	Chamelle	chèvre	VSL	VSL C(1)	E 04	E04 (1)	E04C(1)	E (3) C(2)
Streptomycine	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicine	CN	R	R	S	S	R	R	R	R
Oxacilline	OX	R	R	R	S	R	R	R	R

R : résistance

S : sensible

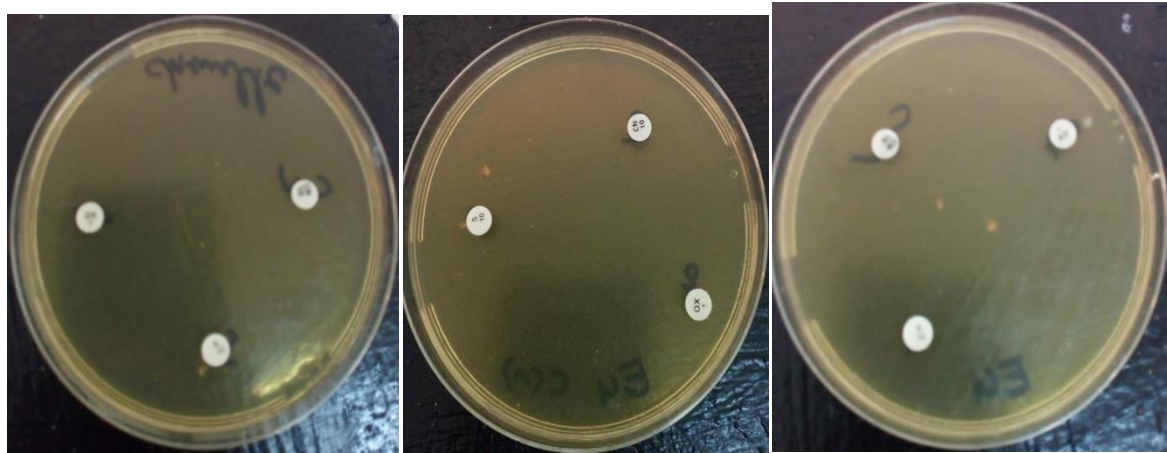


Figure 22:Test de sensibilité des souches (Chamelle, E04 C(1), E04) aux antibiotiques

Conclusion :

Conclusion :

Conclusion :

Ce travail a visé l'étude du potentiel technologique des souches *Leuconostoc* (Ln) isolées à partir des différents laits crus dans la région de Mostaganem, et Laghouat.

Un isolement de 8 souches a été réalisé à partir de 12 échantillons de lait cru de chèvre, de chamelle, de vache, et de brebis. Notre travail a débuté par l'isolement et la purification des souches appartenant au genre *Leuconostoc*.

L'identification phénotypique des isolats a été assurée en utilisant des méthodes classiques de la microbiologie.

Après l'isolement, les souches de *Leuconostoc* retenues ont été identifiées par des tests physico-chimiques et microbiologiques qui conduisent à définir le genre.

Nous avons choisi d'étudier des propriétés biochimiques, physiologiques et microbiologiques qui sont en priorité lors de la sélection des souches d'intérêt comme fermentation des sucres, hydrolyse de l'arginine..et technologique tels que, l'activité protéolytique, l'activité antibactérienne, production des exopolysaccharides (EPS), la résistance aux antibiotiques.

D'une part les résultats suggèrent que toutes les souches de *Leuconostoc* isolés possèdent une activité protéolytique, et ont un pouvoir inhibiteur contre les agents pathogènes *E.coli* ATCC2592, *S. aureus* ATCC2592, *pseudomonas aerogienosa*.

D'autre part les résultats montrent que toutes les souches isolés ont la capacité de produire des EPS (dextrane), et d'hydrolyser l'arginine et réduction de bleu de méthylène.

Les résultats totaux obtenus dans cette étude révèlent que les isolats de *Leuconostoc* dans le lait de chèvre, vache et chamelle ont un potentiel technologique important.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ABDEL-RAHMAN E.-S., SCHICK R., KURZ T., 2007.** Influence of dextran on sucrose crystallization. *Zucker industrie* 132,453–460.
2. **ADDER Z. (2014)** Etude du pouvoir acidifiant des bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc*, Microbiologie.
3. **ADIMPONG, DAVIDB, DENNIS S, NIELSEN, KIM.ISORENSEN, PATRIK FK DEREK ET LENE JESPERSEN (2012).**”Genotypiccaractérisation and safety assessment. Of lactic acid bacteria from indigenous. African fermented food products, In:p. 10-12.
4. **AVALOS. D-A. (2007).** Faisabilité de la production en Mexique de fromage de chèvre additionnés de piment : aspect technologiques, sensoriels, sanitaire et économique. Thèse de doctorat, Nancy-université INPL, Lorraine, Laboratoire de Science et Génie Alimentaire.241p.
5. **B ADIS, A., GUETARNI, D., KIHAL, M. ET OUZROUT, R.(2005).**Caractérisationphénotypiquedes Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien&Tech*, 23: p 30-37.
6. **BADIS, A., GUETARNIB, D., MOUSSA BOUDJEMAA, B., HENNIC, D.E., KIHALC, M. (2004).**Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiologies*, 21:p 579–588.
7. **BAJPAI. V, RATHER. I, MAJUMDER. R, SHUKLA. S, AERON. A, KIM. K, KANG. S, DUBEY. R, MAHESHWARI. D, LIM. J, PARK. Y., 2015.** Exo polysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects.*Bangladesh Journal of Pharmacology*. 11p, 1-23.
8. **BAREFOOT S.F., KLAENHAMMER T.R.,1983.** Detection and activity of lacticin B bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbial.* 45 :1808-1815.
9. **BARTH K, HORVAT E, KERN. A, MAURER V, MUNTWYLER J, SIMANTKE C, STÖGER E ET REINMUTH B. (2010).** Chèvres laitières bio. p2 -**Zeller. R. (2005).** Le fromage de chèvre : spécificités technologiques et économiques. P9. Thèse de doctorat, école nationale vétérinaire TOULOUSE, 78p.
10. **BEN GUEHZA. A, MOUKNINE. H., 2019.** Intérêt technologique des souches de *Leuconostoc* isolées à partir de différents produits laitiers. Mémoire de master en Microbiologie Appliqué, Université KasdiMerbah Ouargla.74p.
11. **BENAZZOUC D., 2012.** Isolement et caractérisation des bactéries lactiques productrices d'arômes (diacétyle. Ecole nationale supérieure d'Agronomie El-Harrach Alger P13.
12. **BENMECHERNENE Z., CHENTOUF H. F., YAHIA B., FATIMA G., QUINTELABALUJA M., CALO-MATA P., BARROS-VELAZQUEZ J., 2013.** Technological aptitude and

- applications of *Leuconostocmesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. Bio Med research international 2013.
13. **BOUMEDIENE K., 2013.** Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie. Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen PP 30-38.
 14. **BRAHIMI S. (2015)** Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolées à partir des margines d'olives "AMOREDJ" fermentés, Biodiversité des micro-organismes, 203p.
 15. **BROOKER B. E., 1977.** Ultrastructural surface changes associated with dextran synthesis by *Leuconostocmesenteroides*. Journal of bacteriology 131(1) 288-292.
 16. **BUDDE B.B. HORNBAEK T., JACOBSEN T., BARKHOLT V., KOCH A.G., 2003.** *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed Meats: culture isolation bacteriocin identification and meat application experiments. Int. J. Food Microbial. 83 171–184.
 17. **CARR FJ, CHILL D, MAIDA N(2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey. Crit.Rev.Microbiol., p124-131.
 18. **CHAKOU. R et BESSEDIK. K., 2018.** Etude de quelques caractères technologiques des souches de *Leuconostoc* isolées à partir du lait de chèvre et de chamelle. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master académique en microbiologie appliquée. Uni KasdiMerbah- Ouargla P16.
 19. **CHELO I.M., ZE-ZE L., TENREIRO R., 2010.** Genome diversity in the genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* determined by physical and genetic mapping. Microbiology 156: 420
 20. **CHOLAKOV, R., TUMBARSKI, Y., YANAKIEVA, V., DOBREV, I., SALIM, Y., & DENKOVA, Z. (2021).** Antimicrobial activity of *Leuconostoc lactis* strain BT17, isolated from a spontaneously fermented cereal beverage (Boza). Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2021, 47-49.
 21. **CHWARTZ R.D., BODIE E.A., 1984.** Production of viscous dextran-containing whey-sucrose broths by *Leuconostocmesenteroides* ATCC 14935. Appl. Environ. Microbiol., 48, 678-679.
 22. **CIRIHA :** centre d'information et de recherche sur les intolérances et l'hygiène Alimentaire, composition du lait. Consulté le 22 mai 2022. Accessible sur la page : web : <http://ciriha.org/index.PHP/allergies-et-intolerances-2/Le-lait/composition-et-proprietés-du-lait-de-vache>.
 23. **COGAN T. M., JORDAN K. N., 1994.** Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. Journal of Dairy Science 77(9) 2704-2717.
 24. **COGAN T.M., 1980.** Les levains lactiques mésophiles. Une revue. Lait, 60, 397-425.- **STADHOUDERSJ., 1974.** Dairy starter cultures. Milchwissenschaft, 29, 329-337.

25. **COVIS. R., 2011.** *Synthèse de polysaccharides amphiphiles à partir de dextrane et Application à la stabilisation d'émulsions directes et inverses.* Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine Spécialité : Génie des procédés et des produits P36.
26. **DE VUYST L., AVONTS L., MAKRAS E, (2004).** Probiotics, prebiotics and guthealth. In : Remacle C. (Ed.), *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease.* Taylor & Francis: London, p416- 482.
27. **DEVOYOD J.J., DESMAZEAUD M., 1970.** Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. 1. Action des entérocoques vis-à-vis des *streptocoques* lactiques et des *Leuconostocs*. *Lait*,50374-350.
28. **DEVOYOD J.J., DESMAZEAUD M., ASSEMAT L., AUCLAIR J., 1972.** Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. IV. Action inhibitrice des microcoques caséolytiques sur l'ouverture du caillé. *Lait*, 52, 297-310.
29. **DEVOYOD J.J., MULLER M., 1969.** La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. et les streptocoques lactiques et les *Leuconostoc*. Influence de différents microorganismes de contamination. *Lait*, 49, 369-399.
30. **DEVOYOD J-J, POUILLAIN F. (1988)** Les *Leuconostoc*. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Le Lait*, Laboratoire de Microbiologie laitière. INRA Editions. Jouy-en-Josas, France.
31. **DEVOYOD J-J, POUILLAIN F. (1988)** Les *Leuconostoc*. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Le Lait*, Laboratoire de Microbiologie laitière. INRA Editions. Jouy-en-Josas, France.
32. **DEVOYOD, J.J., POUILLAIN, F., (1988).** Les *Leuconostocs*: propriétés, leur rôle en technologie laitière. *Lait*, p249–280.
33. **DIAZ-MONTES E., YAÑEZ-FERNANDEZ J., CASTRO-MUÑOZ R., 2020.** Microfiltration-mediated extraction of dextran produced by *Leuconostocmesenteroides* SF3. *Food and Bioprocess Technology* 119 317-328.
34. **DOLS M., 1996.** Etude de la dextrane-saccharase de *Leuconostocmesenteroides* NRRL B- 1299 production et application à la synthèse d'oligosides. Thèse de doctorat en Biologie et génétique moléculaires et cellulaires. Biotechnologie Toulouse INSA P1.
35. **EOM H.J., SEO D.M., HAN N.S., 2007.** Selection of psychrotrophic *Leuconostoc spp.* Producing highly active dextranase from lactate fermented vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 117 61–67. Ethanol from glucose by lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.*
36. **FAO/WHO. (2002)** joint FAO/Who Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Canada.
37. **FLEMING, H.R., ETCHELL, G.L., COSTILOW, R.N. (1975).** Microbial inhibition by isolate of *pediococcus* from cucumber brine. *Appl and Microbiology*, 30:104-1042.

38. **FOUCAUD. C., FRANCOIS. A et RICHARD. J., 1997.** Development of achemically defined medium for the growth of *Leuconostocmesenteroides*. *AppliedandEnvironmentalMicrobiology*, 63(1), PP 301-304.
39. **GALESLOOTTE., HASSING F., 1961.**Enkeleverschillen in gedragtussenzuursels met aisaromabacterie*Streptococcusdiacetilactis* of *Betacoccuscremoris*. *Neth. Milk Dairy J.*, 15, 225-247.
40. **GARVIE E.I., 1984.** Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differenciation of the *Leuconostocs* from other lactic acid bacteria. *Methods Microbial.* 16, 147-178.
41. **GARVIE E.I., 1986.**Gram positive cocci- *GenusLeuconostoc*. In: *Bergeys'Manual*, 9th edit., theWilliams and Wilkins Co., Baltimore, 1071-1075.
42. **GU R.X., YANG Z.Q., LI Z.H., CHEN S.L., LUO Z.L., 2012.** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan Xinjiang and Bama Guangxi China. *Anaerobe* 14: 313-317.
43. **GUESSAS B., 2006.** Potentialité métabolique des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio control des *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat d'Etat Université d'Oran Algeria.
44. **GUESSAS B., ET KIHAL M., 2004.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone: raw goats 'milk. *African Journal of biotechnology.* 3(6) PP 339-342.
45. **GUIRAUD J-P. (2003)** Microbiologie alimentaire, RIA, Dunod, Paris, 650p.
46. **GUIRAUD. J, P., 2003.** Microbiologie alimentaire. *Dunod-RIA.* P 696.
47. **GURTLER Y,Mayall B-C. (2001)** Genomic approaches to typing taxonomy and evolution of bacterial isolates, *Int. J. System. Evol, Microbial.*
48. **GURTLER. V, et MAYALL. B.C., 2001.** Genomic approaches to typing taxonomyand evolution of bacterial isolates. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51, PP 316.
49. **HANNACH. S-S., 2008.** *Inhibition des bacteries indésirables par l'activitéantimicrobienne des espèces de Leuconostoc isolées du lait cru de chèvre.* Mémoire de magister en microbiologie fondamentale et appliquée. Uni. Oran-Es-Sénia. P 7.
50. **HANSAL N. (2015).** Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de *leuconostocmesenteroides* isolé à parti redu lait cru de chèvre et de chamelle. Mémoire de magister en Microbiologie Fondamentale et Appliqué, Université d'Oran 1, 154p.
51. **HEMME D, FOUCAUD SCHEUNEMANN C. (2004)***Leuconostoc*, characteristics, useindairytechnology and prospects in functionalfoods. *International Dairy Journal* 14. INSBANA. France
52. **HOLZAPFEL. W H, et WOOD B J B., 2014.** Lactic acid bacteria biodiversity and Taxonomy. *John Wiley & Sons, Ltd*, PP 395-400.

53. HUCKER G.J., PEDERSON C.S., 1931. A study of the physiology and classification of the *genus Leuconostoc*. Zentralbl. Bakteriologie, II Abt. 85, 65-114.
54. HUI Y. H., EVRANUZ E. Ö., 2016. Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology 2^{ème} Edition: CRC Press.
55. IBARBURU I., PUERTAS A. I., BERREGI I., RODRÍGUEZCARVAJAL M. A., PRIETO A., DUEÑAS M. T., 2015. Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. International Journal of Biological Macromolecules 214 54–62.
56. ITO S., KOBAYASHIE. T, OHTA. Y, AKIYAMA. Y., 1983. Inhibition of glucose catabolism by aeration in *Leuconostoc mesenteroides*. J. Ferment. Technology. 6p, 353-358.
57. KASSAS. Z., 2017. Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts
58. KEENAN T.W., LINDSAY R.C., 1966. Removal of green flavor from ripened butter cultures. Microbiol., 14, 802-806.
59. KHEDID K., FAID M., MOKHTARI A., SOULAYMANI A., ZINEDINE A., 2006. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. Microbial.Res.10 PP 10-16.
60. BAREFOOT S.F., KLAENHAMMER T.R., 1983. Detection and activity of lacticin B bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45 :1808- 1815.
61. KIM M., CHUN J., 2005. Bacterial community structure in Kimchi a Korean fermented vegetable food as revealed by 16S rRNA gene analysis. Int J Food Microbiol 103 :91-96.
62. KLAEHAMMERT.R .1998. Bactériocine. Biochimie. 70:337 -349.
63. KOIRALA, P., MAINA, N. H., Nihtilä, H., Katina, K., Coda, R. (2021) .Brewers spent Grain as substrate for dextran biosynthesis by *Leuconostoc pseudomesenteroides* DSM20193 and *Weissella confusa* A16. Microbial Cell Factories, 20(1), 1-13
64. KOTHARI, D., Das, D., Patel, S., Goyal, A. (2014). Dextran and food application. Polysaccharides, 1-16.
65. LABIOUI H, ELMOUALDI L, El yachioui M et Ouhssine M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 238, 237-250.
66. LACRAMPE J.L., WEBER F., 1973. Teneur en di acétyle de levains et caillés maigres fabriqués à partir de bactéries lactiques concentrées, congelées, conservées sous azote liquide. Lait, 53,491-519.
67. LASZTITY R., 2009. Food quality and standards - Volume III: EOLSS Publishers Company Limited .

68. **LAWFORD G.R., KUGERMAN A., WILLIAMS T, 1979.** Dextran biosynthesis and dextran sucrose production by continuous culture of *Leuconostoc mesenteroides*. Biotechnology. Bioeng., 21, 1121-1131.
69. **LAWFORD G.R., KUGERMAN A., WILLIAMS T, 1979.** Dextran biosynthesis and dextran sucrose production by continuous culture of *Leuconostoc mesenteroides*. Biotechnol. Bioeng., 21, 1121-1131.
70. **LEEMHUIS H., PIJNING T., DOBRUCHOWSKA J.M., VAN LEEUWEN S.S., KRALJ S., DIJKSTRA B.W., DIJKHUIZEN L., 2013.** Glucanases: three-dimensional structures reactions mechanism α -glucanase and their implications in biotechnology and food applications. J Biotechnology 163:250–272.
71. **LEES .G.J, JAGO G.R., 1976.** Acetaldehyde: an intermediate in the formation of
72. **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.
73. **LEVEAU J.Y., BOUIX M., 1980.** "LA FLORE LACTIQUE" dans "technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro- alimentaire". Bourgeois C M Leveau JY. A.p r i a. Paris. PP 3-106.
74. **LIASI SA, AZMI TI, HASSAN MD, SHUHAIMI M, ROSFARIZAN M, ARIFF AB.** Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. Malays J Microbiol. 2009;5(1):33–37
75. **LINDSAY R.C., DAY E.A., SANDINE W.E., 1965.** Green flavor defect in lactic starter cultures. J.DairySci., 48, 863-869.
76. **LIU. S-Q., 2016.** Lactic Acid Bacteria: *Leuconostoc spp.* Reference Module in Food Sciences. National University of Singapore, Singapore. Elsevier Inc. PP 1-6
77. **MAGHNIA DJ. (2011)** Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels Algériens. Mémoire de Magister, Microbiologie alimentaire.
78. **MAKAROVA K., SLESAREV A., WOLF Y., SOROKIN A., MIRKIN B., KOONIN E., MILLS D., 2006.** Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(42) 15611-15616.
79. **MAN J.c., GALESLOOTTE., 1962.** De invloed van aentoevoeging van mangaanaan de melk op de groei van zuurselbacteriën. Neth. Milk Dairy J., 16, 1-23.
80. **MARTIN R., LANGA S., REVIRIEGO C., JIMINEZ E., MARIN M. L., XAUS J.FERNANDEZ L., RODRIGUEZ J. M., 2003.** Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. The Journal of Pediatrics 143(6) 754-758.
81. **MATHIEU J. (1998).** Ecole nationale des industries du lait et des viandes de la RocheSurforon. Initiation à la physico-chimie du lait. Ed. Tec & Doc : Lavoisier, Paris. p : 12-210. ISBN : 2-7430-0233-6.

82. **MATHOT A.G., KIHAL M., PREVOST H., DIVIES C., 1994.** Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar medium. *Int. J. Dairy* 4 PP 459-469.
83. **MAYEUX J., SANDINE W., ELLIKER P., 1962.** A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 45. 655.
84. **MEGHOUFEL N. L., 2019.** Etude de la diversité taxinomique et technologique des bactéries lactiques isolées au cours de la production de Jben et approche moléculaire de leurs interactions au microcosme fromager (Doctoral dissertation Université de Mostaganem Abdelhamid Ibn Badis.
85. **MÜNKEL F., BECHTNER J., ECKEL V., FISCHER A., HERBI F. JAKOB F., WEFERS D., 2019.** Detailed structural characterization of glucans produced by glucansucrases 114 from *Leuconostoc citreum* TMW 2.1194. *Journal of agricultural and food chemistry* 67(24) 6856-6866.
86. **OGIER J-C, CASALTA E, FARROKH C, SAÏHI A. (2008)** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*.
87. **OGIER. J, SERROR. P., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 126p, 291-301.
88. **ÖZCAN E. SELVI S. S., NIKEREL E., TEUSINK B., ÖNER E. T., ÇAKIR T., 2019.** A genome-scale metabolic network of the aroma bacterium *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*. *Applied microbiology and biotechnology* 103(7) 3153-3165.
89. **PATEL. S, MAJUMDER. A, GOYAL. A., 2012.** Potentials of exo polysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*. 52p, 3-12.
90. **PILET M-F., BRILLET A., DRIDER D., ET PREVOST H. (2005)** La biopréservation : une technologie innovante de conservation des aliments. *Revue Générale du Froid*, mai 2005, 1053 : 32-35.
91. **RAHMANI. KH., 2014.** Etude de cinétique d'acidification en Ph et en acide des bactéries lactique du genre *leuconostoc*. Mémoire de master, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.
92. **ROKOP Z. P., HORTON M. A., NEWTON I. L. G., 2015.** Interactions between cooccurring lactic acid bacteria in honey bee hives. *Applied and Environmental Microbiology* 81(20) 7261-7270.
93. **SANCHEZ J.I., MARTINEZ B., GUILLEN R., JIMENEZ D.R., RODRIGUEZ A., 2006.** Culture Conditions Determine the Balance between Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *App. Environm. Micro.* Vol. 72 N° 12. P 7495–7502.
94. **SANLIBAB. P, ÇAKMAK. A., 2016.** Exo polysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology Open Access*. 2p. 10115.
95. **SAVADOGO A., 2004.** Caractérisation biochimique et : Moléculaire des bactéries Lactiques productrices d'exo polysaccharides isolées à partir d'échantillons de lait

- fermenté du Burkina Faso. Doctorat en sciences biologique appliquée spécialité biochimie et biotechnologie P 26.
96. **SCHMID J., 2018.** Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 53 130–136.
97. **TAMIME. A., 1990.** Microbiology of starter cultures. In: Robinson, R. K. Ed, Dairy Microbiology, Elsevier, and London. Vol (2), 131- 201p. Technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée, Université Badji Mokhtar Annaba. 59p.
98. **THIEBAULT C. (2004).** Le régime crétois. Thèse de doctorat en Pharmacie, Université HENRI POINCARÉ - NANCY 1, Faculté de pharmacie. P122.
99. **TORMO H., (2010).** Diversité des flores microbiennes des laits crus de chèvre et facteurs de variabilité. Thèse de doctorat. Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Toulouse : Université de Toulouse, P258.
100. **UMBREIT W.W., BURRIS R.H., STAUFFER J.F., 1957.** Manometric techniques. 3rd ed., Minneapolis, Burgess publishing co.
101. **WEHRMULLER K ET RYFFELS. (2007)** .Produits au lait de lait de chèvre et alimentation .ALP actuel 2007, no28. Fiche technique destinée à la pratique. P 04.
102. **YANG C., WANG D., ZHOU Q. AND XU J. (2015).** Bacteraemia Due to Vancomycin-Resistant *Leuconostoc lactis* in a Patient with Pneumonia and Abdominal Infection. *The American Journal of the Medical Sciences*, 349(3): 282 – 283.
103. **ZADI-KARAM H., KARAM N-E., 2006.** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie : mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie Uni. D'Oran-Sénia 31000 Oran Algérie. PP 153-156.
104. **ZAROOUR K., LLAMAS M. G., PRIETO A., RUAS-MADIEDO P., DUEÑAS M. T., De PALENCIA P. F., AZNAR R., KIHAL M., LOPEZ P., 2017.** Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers* 174 646-657.
105. **ZAROOUR K., PRIETO A., PÉREZ-RAMOS A., KIHAL M., LÓPEZ P., 2018.** Analysis of technological and probiotic properties of Algerian *L. mesenteroides* strains isolated from dairy and non-dairy products. *Journal of functional foods* 49 351-361.
106. **ZHENG J., WITTOUCK S., SALVETTI E., FRANZ C. M., HARRIS H. M., MATTARELLI P., 2020.** A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901 and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70 2782–2858.

Annexe

Annexe

Annexe 01 : Les milieux de culture utilisés.

01. Milieu MRS (Man Rog osa et Sharpe ,1960)

Extrait de levure	5g
Extrait de viande.....	10g
Poly peptone.....	10g
Citrate de sodium.....	2g
Acétate de sodium.....	2g
Glucose.....	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.25g
MnSO ₄	0.05g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

Ph 6.5

Autoclavage 120°C/20minutes

02 : Bouillon et gélose saccharose

Saccharose.....	100ml
Extrait de levure.....	2.5g
K ₂ HPO ₄	5g
MgSO ₄	0.2g
NH ₄ SO ₄	0.2g
Na Cl.....	0.6g
Eau distillée.....	1000ml

PH ajuste à 7

03 : MRS –M (5% Saccharose)

MRS additionnée par saccharose 5g →100ml.

04 : Milieu M 16BCP (Thomas ,1973)

Extrait de levure.....2.5g
Extrait de viande.....5g
Peptone.....10g
Acide ascorbique.....0.5g
Lactose.....2g
L'arginine.....4g
Pourpre de bromocrésol.....0.05g
Agar-agar.....15
Eau distillée.....1000ml

PH 6.5 /Autoclavage 120°C/20minutes

05 : Milieu MRS BCP

MRS (milieu liquide) moins l'extrait de viande et sans sucre1000ml
Bromocrésol pourpre0.025ml

PH 6.5

Autoclavage 120°C/20minutes

06 : MRS additionnée à10% lait écrème

100ml MRS avec 10ml lait écrème

07 : Milieu sel biliaire

Milieu MRS modifie a 0.5% sel biliaire

08 : Eau physiologique

Chlorure de sodium.....8.5g

Peptone.....0.5g

Eau distillée.....1000ml

Annexe 02 : Technique de coloration de Gram

La première étape de la coloration consiste à réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune (sur milieu solide) et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine(ou à la pipette pasteur stérile) puis on étale sur 1à2 cm par mouvement circulaire en partant du centre de la lame.

La deuxième étape nécessite le séchage et la fixation par la chaleur (pour tuer les bactéries, fixer leur structure cytotologique, et les faire adhérer à la lame.

La troisième étape nécessite quelques gouttes de violet de gentiane sur frotti fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute de Lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 secondes.

La quatrième étape, à savoir le bain d'alcool 90° (ne va traverser que la paroi de certains bactéries (Gram-),et décoloré leur cytoplasme). Puis on rince avec de l'eau distillée.

Enfin, quelques gouttes de fuchsine sont versées sur la lame qu'on laisse agir une minute .La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique.

